

微流控技术在脓毒症诊治中的应用进展

杨润 王洁敏 皋源

上海交通大学医学院附属仁济医院重症医学科 200127

通信作者: 皋源, Email: rj_gaoyuan@163.com

【摘要】 脓毒症是机体对感染的反应失调而导致危及生命的器官功能障碍,其病程进展快、病死率高、后遗症多发,早期诊断并及时治疗可提高患者生存率以及改善预后。降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)等生物标志物在脓毒症早期诊断中的应用研究较为广泛,但其特异性和敏感性都有局限性。微流控技术对一些生物标志物及病原微生物的检测不仅对脓毒症的早期诊断有较高的特异性和敏感性,对脓毒症患者病情严重程度及预后也有一定的评估价值,且检测方法快捷、准确,具有临床应用的可行性。本文通过对微流控技术在脓毒症诊治中的应用进展进行综述,以期论证微流控技术对早期诊断脓毒症的价值,并指导未来研究的改进方向。

【关键词】 脓毒症; 微流控技术; 中性粒细胞; 血液流变学; 病原微生物

基金项目: 上海市科技计划项目(18411951100)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.026

Advances of microfluidic technologies applied in diagnosis and treatment of sepsis

Yang Run, Wang Jiemin, Gao Yuan

Department of Critical Care Medicine, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Corresponding author: Gao Yuan, Email: rj_gaoyuan@163.com

【Abstract】 Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. It is characterized by rapid progression, high mortality, and frequent sequelae. Early diagnosis and timely treatment can improve patient survival and long-term prognosis. Biomarkers such as procalcitonin (PCT), C-reactive protein (CRP), and interleukin-6 (IL-6) have been widely used in the early diagnosis of sepsis, but there still exist limitations on their specificity and sensitivity. Microfluidic technology was applied for the detection of some biomarkers and pathogenic microorganisms, not only because it has a higher specificity and sensitivity for the early diagnosis of sepsis, but also has a certain evaluation value for the severity of sepsis and the prognosis of patients. These quick and accurate methods have the feasibility of clinical application. To demonstrate the value of microfluidic technology for early diagnosis of sepsis and to guide the improvement of future research, the application of microfluidic technology in the diagnosis and treatment of sepsis was reviewed in this article.

【Key words】 Sepsis; Microfluidic; Neutrophils; Hemorheology; Pathogenic microorganism

Fund program: Shanghai Municipal Science and Technology Commission Project (18411951100)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.026

脓毒症是目前全球范围内急危重症医学面临的重要临床问题,每年诊断为脓毒症的患者超过1900万,其中约有600万患者死亡,病死率超过25%,而存活患者中仍有约300万人存在认知功能障碍^[1]。早期准确识别与及时恰当处理可改善脓毒症患者的预后。近年来,对于脓毒症早期诊断方法的研究越来越受到重视,快捷、准确、临床可行性强是研究人员普遍追求的方向。微流控技术开始应用于脓毒症患者体液细胞、血液流变学特性改变、病原微生物等特异性检测,现就相关研究内容进展进行综述。

1 脓毒症诊断背景

脓毒症被定义为由宿主对感染的反应失调引起的危及生命的器官功能障碍^[2],是收入重症加强治疗病房(ICU)的常见原因,并且可导致多器官功能障碍综合征(MODS)甚至死亡^[3]。器官功能障碍可以通过如序贯器官衰竭评分(SOFA)或快速SOFA(qSOFA)来定义^[2]。然而,在现行诊

断标准下仍有约30%的患者被误诊、漏诊。目前诊断的低敏感性会延误脓毒症的早期诊断及治疗,降低有效进行早期干预的可能性,从而导致更差的预后;而低特异性的诊断能力导致很多不必要的抗菌药物使用,在给医院和患者带来相当大的经济负担的同时,也会促进对抗菌药物耐药的菌株繁殖,直接影响患者的预后^[4]。

脓毒症与非感染性疾病引起炎症反应的鉴别比较困难,生物标志物对脓毒症的诊断有着重要意义,可以用于评估是否存在脓毒症以及脓毒症的严重程度。宿主对感染的免疫反应涉及数百种介质和单分子,其中有许多已被试验证实可作为生物标志物^[5-6]。理想的脓毒症诊断生物标志物应当具有高敏感性、高特异性以及高度准确性;同时,对生物样本的采集、检验以及储存也应当简便快捷,还应兼具价格低廉的特点^[7]。

在过去的20多年里报道了许多与脓毒症预后相关的

标志物,然而,因为缺乏相同的评估基线,这些标志物的诊断准确性仍不清楚,没有能够在临床上作为诊断标准推广使用^[8]。白细胞计数(WBC)、C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)和白细胞介素-6(IL-6)作为诊断生物标志物已经通过广泛的试验和临床应用,但是在自身免疫性疾病、癌症、缺血性心脏病发作后的组织坏死和严重的病毒感染情况下,这些生物标志物都可能升高^[9-10];同样,许多其他标志物也无法区分脓毒症与全身炎症反应综合征(SIRS)^[7],因此,到目前为止其实际应用价值有限。利用血液等体液进行病原微生物培养有助于诊断脓毒症,但需要较长时间(通常为数天)才能使细菌生长,所以不适用于早期诊断脓毒症的需要。

有研究表明,应用聚合酶链反应(PCR)技术可以在较短时间内对病原体DNA进行扩增和分离,并且不易受到广谱抗菌药物应用的干扰,从而达到早期诊断的目的。但进行PCR检测需要相对苛刻的条件和实验室环境,并且会受到患者样本条件的影响,比如在样本WBC超过 $30 \times 10^9/L$ 的情况下,PCR扩增受到明显抑制^[11]。这在临床应用中仍是需要突破的“瓶颈”。

2 微流控技术的原理

微流控技术是一种精确控制和操控微尺度流体的技术,尤其特指亚微米结构的技术。其中,“微”意味着微小的容量、微小的体积以及低能量消耗。

流体在微观上行为与宏观上行为的主要区别在于:微观尺度下,重力和惯性不再对流体起主导作用,而表面张力、能量耗散及流体阻力开始主导着流体行为^[12]。在微流体通道内,由于通道尺寸微小,雷诺数(比较惯性和黏性力的常数)变得很小,黏滞力对流场的影响大于惯性,流场中流速的扰动会因黏滞力而衰减,流体流动稳定,形成层流而非湍流。所以当几束流体并行时,相互之间不会发生混合,而流体之间的物质交换则依赖于相对而言更加缓慢而无效率的扩散^[13]。所以微流体仪器可以获得比传统实验条件更精细、更稳定的化学梯度,也可以确保流体化学和物理性质(浓度、pH值、温度、剪切力等)的高特异性^[14]。

微流控芯片技术已被证实医疗应用中的功效,目前正在逐步应用于基础医学研究干细胞生长及其功能、细胞衰老过程、细胞微环境及其相关递质等诸多方面;临床医学研究中,微流控技术也在例如脓毒症等疾病的早期诊断、抗菌药物耐药细菌感染的筛查、辅助生殖技术以及肿瘤临床分型等领域有所发展^[15-17]。例如在鉴定肿瘤细胞异质性与侵袭性表型的应用中,Liu等^[16]利用肿瘤细胞硬度及表面摩擦力较正常体细胞降低的特性,进一步推导出细胞新的物理参数——“可运输性”,通过设计特殊的微流控芯片装置,可对具有较高“可运输性”的肿瘤细胞进行筛选。

与PCR技术不同的是,微流控技术并不对DNA或是细胞因子等物质进行倍增从而产生放大效应,更多的是通过例如尺寸、形状、密度、可变形性、电/磁敏感性和流体动力学特性等细胞特性之间的差异,对具有特殊理化性质的细胞或病原体进行筛选分离和富集,从而达到明确诊断或是辅助诊

断的目的^[18]。

3 微流控技术在脓毒症诊治中的应用

3.1 微流控技术与中性粒细胞:中性粒细胞对多种循环因子敏感,并整合这些信号相应地调节它们的活化状态和行为^[19]。中性粒细胞迁移功能障碍是脓毒症的典型标志,其能够导致患者对致病性感染的免疫反应减弱,以及其他靶器官损伤。脓毒症患者的中性粒细胞丧失了对趋化信号作出适当反应的能力,并失去了原有的抗菌活性。因此,它们在脓毒症期间的功能异常可能是由循环中存在的炎症和感染相关因子的累积效应导致,包括之前讨论的许多理论上的脓毒症生物标志物。已在脓毒症动物模型上证实,使用药物调节中性粒细胞可以改善预后^[20],间接提示中性粒细胞功能失调在促进细胞因子功能紊乱和随后的器官功能衰竭方面具有直接作用,有助于判断脓毒症的严重程度。

有研究表明,从脓症患者血液中分离出的中性粒细胞在直接微流体通道中显示出特异性自发运动特征,这可以早期诊断大部分因烧伤引起的脓毒症,敏感性为80%,特异性为77%^[19]。Ellett等^[21]对上述情形进行了进一步研究,他们使用全血样本测量中性粒细胞运动,选取了准确性高、不易受其他因素影响的5个参数进行观测,包括中性粒细胞计数(N)、迁移通道内中性粒细胞显示的振荡数(O)、自发运动期间暂停的细胞数(P)、细胞向外迁移(R)、以及细胞迁移的平均距离(D)等,并使用公式计算脓毒症评分[脓毒症评分= $N(O+P+R+D)/103$],通过受试者工作特征曲线(ROC)下面积(AUC)评估脓毒症评分的价值。通过该方法判定脓毒症评分阈值为30分时,对于鉴别样本来源患者是否患有脓毒症是最佳的。总体而言,脓毒症评分的AUC为0.98,敏感性为96.8%、特异性为97.6%。自发性中性粒细胞运动模式特点的观测显示出脓症患者与非脓症患者之间的显著差异,验证了之前在分离的中性粒细胞中观察到的自发性运动变化的结论,并且全血细胞分析中的中性粒细胞运动模式对其运动行为差异进行了放大,能够更准确地鉴别是否患有脓毒症。同时他们发现,在中性粒细胞分离期间去除血浆的同时也清除了血浆因子,导致中性粒细胞表型发生一定的变化,从而使脓毒症与非脓症患者之间的鉴别难度增加。所以在血标本测定中保留血浆对于区分有无脓毒症患者的中性粒细胞运动模式是至关重要的。

Hassan等^[22]认为,WBC和中性粒细胞上的CD64表达(nCD64)与脓毒症早期诊断的敏感性及特异性密切相关。CD64通常在单核细胞表面表达,但在炎症情况下,它在中性粒细胞表面表达会迅速上调。因为在感染或炎症反应期间,炎性细胞因子刺激nCD64表达增加,并且细胞因子刺激的强度与nCD64表达的增加程度直接相关。荟萃分析表明,当SIRS诊断标准与nCD64⁺细胞结合在一起时,脓毒症早期诊断的准确性、敏感性和特异性可以得到显著提高^[7]。Hassan等^[22]使用一种即时检测(PoC)微流体生物芯片,对白细胞进行计数,并从无需任何人工处理的10 mL全血样本中量化nCD64水平。ROC曲线分析显示出qSOFA评分对脓毒

症诊断的可预测性(AUC=0.70),并且qSOFA联合nCD64的AUC增加到0.77。通过建立包括测定目标患者群体的关键参数(WBC、中性粒细胞、单核细胞计数)的动态范围、平均值和标准差的模型,临床医生能够快捷且更加准确地预测脓毒症。并且通过对照,生物芯片测量结果与流式细胞仪检测结果显示出极好的相关性,但前者更加简单便捷,可供ICU全天候使用,同时由于其不需要对样本进行人为处理,所以更容易使测量样本的可重复性标准得到统一。

3.2 微流控技术与血液流变学特性:脓毒症会引起血液成分的变化,从而导致血液流变学特性和包括红细胞、白细胞在内的细胞黏附性改变,会降低红细胞变形性,增加白细胞、血小板和内皮细胞之间的聚集与黏附^[23],这种血液流变学特性可能会进一步加剧微循环功能障碍。因此,对血液流变学特性改变的监测可能为脓毒症的诊断提供新的视角。另外,脓毒症过程中活化的血小板会释放或产生许多小分子,以调节炎症和组织修复过程。这些分子可能促进血小板免疫细胞黏附。鉴于在严重脓毒症中普遍观察到严重的小血小板减少症,说明血小板功能可能在某种程度上与脓毒症的严重程度相关^[24]。Yeom等^[25]设计了一种微流体系统,用于在离体条件下对脂多糖(LPS)诱导脓毒症大鼠模型进行测量,以了解血液的生物、物理特性随时间发生的变化。通过设计特殊通道、应用定量标记等方法,他们观测到血液黏度、红细胞聚集、血小板黏附和脓毒性生物标志物有增加趋势。同时,一些促炎细胞因子[包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-6和IL-8]的改变在脓毒性休克或多器官功能衰竭过程中发挥着重要作用;PCT也被建议作为预测脓毒症的可靠生物标志物。因此,为了评估大鼠体外模型中的脓毒症程度,该实验还对血浆中PCT和IL-8的水平进行了检测。结果显示,随着LPS注射后时间的延长,PCT和IL-8水平显著上升。先前研究报道,高水平的PCT和IL-8可以反映脓毒症的严重程度^[26-27]。据此推断出血液流变学特性和血小板黏附的变化主要是由于脓毒症病情程度变化引起的。该微流体系统将有益于监测由脓毒症引起的血液流变学特性和血小板活化的变化,并据此动态监测判断疾病进展的严重程度。

3.3 微流控技术与病原微生物:脓毒症是由感染引起的,所以鉴别脓毒症与非感染性炎症反应最直观的方法就是找到感染的病原微生物,目前的检验方法主要是血培养,其被推荐为诊断的“金标准”^[28],然而这种方法耗时(通常>24 h),且假阴性率很高。因此,根据血培养分析作出早期临床决策并非总是可行的。

大肠埃希菌(*E.coli*)感染是新生儿早发性脓毒症的最常见原因。近年来,研究人员提出了检测大肠杆菌的不同方法,诸如磁分离、荧光染色、电检测和微流体免疫测定等方法用于从血液中分离、捕获和鉴定大肠杆菌。Bisceglia等^[29]应用介电泳(DEP)微流体装置成功分离出全血样本的大肠杆菌。这些微流控技术可以通过跳过细菌培养时间来减少诊断脓毒症的时间。未来需要进一步减少对于检验样本的

处理时间(从目前的几小时到将来的几分钟)。Kang等^[30]整合了基于液滴封装和粒子计数系统的专业知识,创建了一个全面的液滴数字检测(IC 3D)系统。该系统可以在不进行血培养及扩增的前提下,检测出稀释的血液样品中数量低至1个的大肠杆菌细菌。Schwartz和Bercovici^[31]利用等速电泳及荧光标记的抗菌肽完成了连续去除悬浮在水中的大肠杆菌的试验。该技术将可能应用于检测早期脓毒症或疑似脓症患者体液中的细菌。

辨别引起脓毒症的细菌菌株可以对治疗干预进行更为精确的指导。Patterson等^[32]报道了一种新的基于微流控芯片的微生物病原体检测和菌株鉴别技术,通过特定的DNA探针,可以有效鉴别鼠伤寒沙门菌和猪霍乱沙门菌血清型。肺炎链球菌是发达国家和发展中国家肺炎、脓毒症及脑膜炎发生的主要致病菌,并且其拥有超过90种荚膜的血清型,每种血清型引起肺炎、脓毒症、脑膜炎、慢性阻塞性肺疾病及其他感染性并发症的发病率各不相同^[33]。基于相关菌株之间的核酸序列差异的微流控装置,有可能实现早期检测和区分肺炎链球菌荚膜血清型并对临床治疗方案的制定给予指导。

Zelenin等^[34]基于对细菌具有刚性细胞壁,并且能够承受比人血细胞更严苛的化学处理的理论,应用选择性血细胞裂解技术,能够从全血中分离出病原微生物。但微流控技术在筛选病原微生物的应用中仍存在一些不足,例如IC 3D系统在单次样品检测中可以检测到的靶标数量有限,每次探测仅能分析1种细菌^[35],并且缺乏与细菌学检测进行对比的大样本临床试验,尚不足以替代细菌学检测成为临床应用的“金标准”。

3.4 微流控技术与其他衍生物:脓症患者体内生化成分的改变也是一种研究方向。有证据表明,过量生成的一氧化氮(NO)在严重脓毒症和脓毒性休克患者的心血管事件转归中起着关键作用^[36]。Hunter等^[37]制造了一种具有低噪声型NO微流体传感器,用于快速监测和分析脓症患者血液中NO水平的变化。

Herrmann等^[38]应用即时兼容的微流控芯片,在细菌感染的特异性条件下,测量细胞衍生出的纳米级别的微泡活动。发现当多核细胞暴露于革兰阴性和革兰阳性细菌环境时,会诱导发生明显的微泡群体脱落,并且可以观测到它们的促凝血、聚集活动显著增加,促炎活性也具有一定的可比性。通过双盲试验证明了该项技术可以快速(≤ 1.5 h)且可靠地鉴别诊断细菌性感染与非感染性炎症。

4 总结与展望

脓毒症早期诊断对于尽早进行临床干预,改善患者预后具有重要意义。与传统的测量方法及工具相比,微流控装置具有其独特的优势,例如所需样品体积小、敏感性高、观测更加直观等。但是到目前为止,由于很多细胞及生物标志物在脓毒症期间活化并发生改变的生物学原理仍不甚清楚,脓症患者血浆中存在影响这些细胞及生物标志物发生理化性质改变的细胞因子,所以并没有能够准确地对脓毒症与非脓

毒症患者进行鉴别的单一指标。并且对于不同靶标的检测,需要设计不同的微流控芯片装置,所以大规模推广临床应用仍存在“瓶颈”。未来进行更多更大样本量的病例研究以及对微流控装置进行系统化之后,利用微流控技术能够帮助人们更好地了解脓毒症的病理学特征,也很有可能成为脓毒症诊断和监测的重要工具。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, et al. Recognizing sepsis as a global health priority: a WHO resolution [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377 (5): 414–417. DOI: 10.1056/NEJMp1707170.
- [2] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [3] Liu V, Escobar GJ, Greene JD, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts [J]. *JAMA*, 2014, 312 (1): 90–92. DOI: 10.1001/jama.2014.5804.
- [4] Sharma S, Kumar A. Antimicrobial management of sepsis and septic shock [J]. *Clin Chest Med*, 2008, 29 (4): 677–687, ix. DOI: 10.1016/j.ccm.2008.06.004.
- [5] Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, et al. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2012, 25 (4): 609–634. DOI: 10.1128/CMR.00016–12.
- [6] Gibot S, Béné MC, Noel R, et al. Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186 (1): 65–71. DOI: 10.1164/rccm.201201–0037OC.
- [7] Stubljär D, Skvarc M. Effective strategies for diagnosis of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) due to bacterial infection in surgical patients [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2015, 15 (1): 53–56. DOI: 10.2174/187152651566615032016.
- [8] Liu Y, Hou JH, Li Q, et al. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Springerplus*, 2016, 5 (1): 2091. DOI: 10.1186/s40064–016–3591–5.
- [9] Koeze J, Hendrix MG, van den Bergh FA, et al. In critically ill patients the procalcitonin level can be misleading [J]. *Crit Care*, 2011, 15 (2): 422. DOI: 10.1186/cc10132.
- [10] Jereb M, Lunaček NK, Kotar T, et al. Procalcitonin in hantavirus infections [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011, 71 (4): 287–291. DOI: 10.3109/00365513.2011.560675.
- [11] Suberviola B, Márquez-López A, Castellanos-Ortega A, et al. Microbiological diagnosis of sepsis: polymerase chain reaction system versus blood cultures [J]. *Am J Crit Care*, 2016, 25 (1): 68–75. DOI: 10.4037/ajcc2016728.
- [12] Kirby BJ. *Micro- and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- [13] Tabeling P, Chen S. *Introduction to microfluidics* [M]. Oxford: Oxford University Press, 2005.
- [14] Chokkalingam V, Weidenhof B, Krämer M, et al. Optimized droplet-based microfluidics scheme for sol-gel reactions [J]. *Lab Chip*, 2010, 10 (13): 1700–1705. DOI: 10.1039/b926976b.
- [15] Smith GD, Takayama S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction [J]. *Mol Hum Reprod*, 2017, 23 (4): 257–268. DOI: 10.1093/molehr/gaw076.
- [16] Liu Z, Lee Y, Jang Jh, et al. Microfluidic cytometric analysis of cancer cell transportability and invasiveness [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14272. DOI: 10.1038/srep14272.
- [17] Aroonnu A, Janvilisri T, Ounjai P, et al. Microfluidics: innovative approaches for rapid diagnosis of antibiotic-resistant bacteria [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61 (1): 91–101. DOI: 10.1042/EBC20160059.
- [18] Faridi MA, Ramachandraiah H, Banerjee I, et al. Elasto-inertial microfluidics for bacteria separation from whole blood for sepsis diagnostics [J]. *J Nanobiotechnology*, 2017, 15 (1): 3. DOI: 10.1186/s12951–016–0235–4.
- [19] Jones CN, Moore M, Dimisko L, et al. Spontaneous neutrophil migration patterns during sepsis after major burns [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e114509. DOI: 10.1371/journal.pone.0114509.
- [20] Kurihara T, Jones CN, Yu YM, et al. Resolvin D2 restores neutrophil directionality and improves survival after burns [J]. *FASEB J*, 2013, 27 (6): 2270–2281. DOI: 10.1096/fj.12–219519.
- [21] Ellett F, Jorgensen J, Marand AL, et al. Diagnosis of sepsis from a drop of blood by measurement of spontaneous neutrophil motility in a microfluidic assay [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2 (4): 207–214. DOI: 10.1038/s41551–018–0208–z.
- [22] Hassan U, Ghonge T, Reddy B Jr, et al. A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15949. DOI: 10.1038/ncomms15949.
- [23] Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4 [J]. *Blood*, 2005, 106 (7): 2417–2423. DOI: 10.1182/blood–2005–03–0916.
- [24] Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood [J]. *Nat Med*, 2007, 13 (4): 463–469. DOI: 10.1038/nm1565.
- [25] Yeom E, Kim HM, Park JH, et al. Microfluidic system for monitoring temporal variations of hemorheological properties and platelet adhesion in LPS-injected rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 1801. DOI: 10.1038/s41598–017–01985–w.
- [26] Morgenthaler NG, Struck J, Chancerelle Y, et al. Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection [J]. *Horm Metab Res*, 2003, 35 (5): 290–295. DOI: 10.1055/s–2003–41304.
- [27] Van Zee KJ, Fischer E, Hawes AS, et al. Effects of intravenous IL-8 administration in nonhuman primates [J]. *J Immunol*, 1992, 148 (6): 1746–1752.
- [28] Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, et al. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23 (1): 235–251. DOI: 10.1128/CMR.00043–09.
- [29] Bisceglia E, Cubizolles M, Trainito CI, et al. A generic and label free method based on dielectrophoresis for the continuous separation of microorganism from whole blood samples [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 212: 335–343. DOI: 10.1016/j.snb.2015.02.024.
- [30] Kang JH, Super M, Yung CW, et al. An extracorporeal blood-cleansing device for sepsis therapy [J]. *Nat Med*, 2014, 20 (10): 1211–1216. DOI: 10.1038/nm.3640.
- [31] Schwartz O, Bercovici M. Microfluidic assay for continuous bacteria detection using antimicrobial peptides and isotachopheresis [J]. *Anal Chem*, 2014, 86 (20): 10106–10113. DOI: 10.1021/ac5017776.
- [32] Patterson AS, Heithoff DM, Ferguson BS, et al. Microfluidic chip-based detection and intraspecies strain discrimination of *Salmonella* serovars derived from whole blood of septic mice [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79 (7): 2302–2311. DOI: 10.1128/AEM.03882–12.
- [33] Bewick T, Sheppard C, Greenwood S, et al. Serotype prevalence in adults hospitalised with pneumococcal non-invasive community-acquired pneumonia [J]. *Thorax*, 2012, 67 (6): 540–545. DOI: 10.1136/thoraxjnl–2011–201092.
- [34] Zelenin S, Ramachandraiah H, Faridi A, et al. Microfluidic-based bacteria isolation from whole blood for diagnostics of blood stream infection [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1547: 175–186. DOI: 10.1007/978–1–4939–6734–6_14.
- [35] Sinha M, Jupe J, Mack H, et al. Emerging technologies for molecular diagnosis of sepsis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31 (2): pii: e00089–17. DOI: 10.1128/CMR.00089–17.
- [36] Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33 (9): 1186–1193. DOI: 10.1016/S0891–5849(02)01009–2.
- [37] Hunter RA, Privett BJ, Henley WH, et al. Microfluidic amperometric sensor for analysis of nitric oxide in whole blood [J]. *Anal Chem*, 2013, 85 (12): 6066–6072. DOI: 10.1021/ac400932s.
- [38] Herrmann IK, Bertazzo S, O'Callaghan DJ, et al. Differentiating sepsis from non-infectious systemic inflammation based on microvesicle-bacteria aggregation [J]. *Nanoscale*, 2015, 7 (32): 13511–13520. DOI: 10.1039/c5nr01851j.

(收稿日期: 2019–04–30)