

- [16] Zare RN, Kim S. Microfluidic Platforms for Single-Cell Analysis[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2010, 12(2):187-201.
- [17] Wolfe KA, Breadmore MC, Ferrance JP, et al. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids[J]. Electrophoresis, 2002, 23(6):727-733.
- [18] Gijs M. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications[J]. Microfluid Nanofluid, 2004, 1(1):22-40.
- [19] Duarte GR, Price CW, Littlewood JJ, et al. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads[J]. Analyst, 2010, 135(3):531-537.
- [20] Reedy CR, Price CW, Sniegowski J, et al. Solid phase extraction of DNA from biological samples in a post-based, high surface area poly(methyl methacrylate) (PMMA) microdevice[J]. Lab Chip, 2011, 11(9):1603-1611.
- [21] Kim J, Johnson M, Hill P, et al. Microfluidic sample preparation:

- cell lysis and nucleic acid purification[J]. Integr Biol, 2009, 1(10):575-586.
- [22] Bentiez JJ, Topolancik J, Tian HC, et al. Microfluidic extraction, stretching and analysis of human chromosomal DNA from single cells[J]. Lab Chip, 2012, 12(22):4848-4854.
- [23] Cao Q, Mahalanabis M, Chang J, et al. Microfluidic Chip for Molecular Amplification of Influenza A RNA in Human Respiratory Specimens[J]. PLOS One, 2012, 7(3):e33176.
- [24] Gervais L, Rooij N, Delamarche E. Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics[J]. Adv Mater, 2011, 23(24):H151-H176.
- [25] Breussin F, Roussel B. Point of Care Testing Applications of Microfluidics Technologies[S]. Yole Développement, June 2012.

(收稿日期:2012-11-08)

• 综 述 •

诊断类风湿性关节炎伴感染的新指标:中性粒细胞 CD64

魏忠华,何思春,王利君,焦 鑫,周 红 综述,黄君富 审核
(四川省达州市中心医院检验科 635000)

关键词:中性白细胞; 关节炎,类风湿; 细菌感染; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)13-1711-03

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以对称性多关节炎为主要临床表现的异质性、系统性、自身免疫性疾病。我国 RA 的患病率略低于 0.5%~1%的世界平均水平,为 0.32%~0.36%左右^[1]。感染是类风湿性关节炎(RA)患者一个主要的并发症,还常引起死亡,生物试剂如 TNF- α 受体阻滞剂增加肺结核发病率或机会感染^[2],RA 活动期患者有发热、关节痛、炎性标志物(如 CRP、ESR)增高,感染也有发热、炎性标志物增高,用临床症状和血液中炎性标志物升高来区分 RA 患者是活动期或感染非常困难,医生常用经验判断是否使用抗菌素,可能引起非感染患者使用抗菌素,会增大细菌的耐药性、病人不良事件的风险。因此,对类风湿性关节炎是否伴感染的鉴别诊断就显得十分重要和必要。近年来,国内外大量研究证明,中性粒细胞表面 CD64 的表达对诊断细菌性感染具有较高的特异性及敏感性,而对 RA 伴感染的研究较少。本文就中性粒细胞 CD64 对早期诊断 RA 伴感染早期的诊断价值及应用前景进行综述。

1 感染的检测指标

感染是一种临床常见的病理生理过程,其测定指标较多,常用的指标有:白细胞计数、中性粒细胞百分比、C-反应蛋白、血沉、体温等。当发生感染时,这些指标通常都会升高,而非感染性炎症反应也会引起这些指标升高。因此,这些指标在诊断细菌性感染时特异性不高^[3-4],必须结合临床表现,作为感染诊断的参考指标。细菌培养或 PCR 方法能检测出明确的病原微生物,但培养时间较长,阳性率偏低,PCR 方法灵敏度高,不过也存在一定的假阳性或假阴性问题,并且无法做药敏实验。近年来,PCT 作为诊断感染和败血症的指标准确性好于 CRP,而且感染时比 CRP 升高更迅速^[5],但也有研究表明 PCT 在诊断细菌性感染时敏感性仅为 76%,特异性仅为 70%,只有中等诊

断能力^[6]。随着流式细胞分析技术日渐成熟,郑林华等^[7]研究淋巴细胞亚群与慢性乙型肝炎的关系,发现外周血及肝组织内 T 淋巴细胞亚群的数量与乙肝病毒感染相关;Ng 等^[8]对多种白细胞表面标记物,即细胞表面受体进行研究,结果发现 CD64 对严重感染有较高的敏感性和特异性。

2 CD64 的生物学特性

CD64 是相对分子质量为 72 000 的跨膜糖蛋白,它的基本结构分为胞外部分、跨膜片段及胞浆尾,由位于 1 号染色体长臂上的 A、B、C 3 个基因编码,它分布于白细胞的表面,是 Fc 受体之一,即(Fc γ RI),属于免疫球蛋白超家族的成员。IgG 的 Fc γ R 分 3 型:Fc γ I(CD64)、Fc γ R II(CD32)、Fc γ R III(CD16),CD64 是其中亲和力最高的受体。CD64 具有信号传导作用、介导吞噬作用、介导细胞毒作用,这些功能参与先天或后天免疫应答,在吞噬细菌与免疫复合物的过程起着非常重要的作用。CD64 在通常情况下(非细菌感染)在中性粒细胞表面低水平表达,而在外周血中,主要分布在单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞表面。一般情况下,机体感染或内毒素入侵时 CD64 在刺激后 4~6 h 即可升高^[5],可作为感染的早期诊断标志物之一,在诊断感染性疾病时敏感性和特异性都比较高(90%~100%),显示了很好的诊断优势。目前,由美国 BD 诊断试剂公司生产的 CD64 检测试剂盒和 FACSCalibur 流式分析仪分析软件使得 CD64 的检测更标准化^[9],数据分析自动化,结果更准确,CD64 检测结果常用阳性细胞百分率、CD64 平均密度和 CD64 指数 3 种方法表示,国内外学者^[10-12]认为 CD64 指数对细菌性感染有很好敏感性和特异性,还可判断感染的严重程度。

3 中性粒细胞 CD64 在 RA 并发感染的价值

自身免疫性疾病患者受到损害,常发机会感染,诊断其感

染类型常常困难,因为症状不典型,甚至无临床症状,炎症标志白细胞计数、CRP 升高,不能用于区分自身免疫性疾病患者活动期与感染,但它们治疗基本原则不同,因此将活动期自身免疫性疾病和并发感染性疾病区分具有重要意义,风湿科医师迫切需要区分感染的新标志物。

3.1 中性粒细胞 CD64 在诊断 RA 并发感染的诊断价值。感染患者、活动期自身免疫病患者中性粒细胞 CD64 表达强度明显高于健康对照或 RA 不活动期患者,RA 并发感染患者组明显高于 RA 活动期疾病组,RA 活动期患者组高于 RA 非活动期疾病组与健康对照组,RA 非活动期疾病组与健康对照组比较无差别($P > 0.05$),以中性粒细胞 CD64 强度大于或等于 43.5 为截断值,诊断感染的敏感度为 94.4%,特异度为 88.9%,中性粒细胞 CD64 的表达,诊断 RA 伴感染具有良好的敏感性和特异性^[13];CD64 表达 ROC 曲线下的面积大于 CRP、ESR、WBC,表明 CD64 在区别感染方面比其他指标更有优势,CD64 诊断 RA 局部感染的敏感性和特异性分别为 76%、94.4%^[14];Matsui T 等^[2]以中性粒细胞 CD64 平均密度 Cut-off 2000 为截断值,诊断感染敏感度为 92.7%,特异度为 96.5%,CD64 的表达不受 RA 活动期或使用糖皮质激素、抗风湿药物、生物制剂的影响,CD64 表达由细菌、病毒、真菌、结核分枝杆菌等感染引起升高;有研究表明 CD64 联合 CD35 还可鉴别细菌感染性疾病和病毒感染性疾病,以减少抗菌素不必要的使用^[15-16],利用 DNAVS 评分区分 DNA 和 RNA 病毒感染^[17],利用 CRP/CD11b 的比值可判断革兰阳性细菌引起的败血症^[18]。因此,CD64 是一项高敏感、高特异的诊断 RA 并发感染的早期标志物,联合其他指标,更有利于临床医生找出 RA 并发感染的病因和指导临床合理用药。

3.2 中性粒细胞 CD64 在诊断 RA 与其他疾病鉴别诊断中的应用。中性粒细胞 CD64 水平也可作为局部骨骼肌感染和晶体性关节炎诊断的有用指标^[19];自身免疫病炎症活动患者 CD64 低于全身感染患者,诊断全身感染的敏感度为 85%,特异度为 91%^[20];斯蒂尔疾病(AOSD)活动期成人患者无论感染与否,中性粒细胞 CD64 表达增高,在治疗后,随临床症状、其它实验室数据改善下降,中性粒细胞 CD64 可作为一个 AOSD 诊断和监测疾病活动的有用标志^[21];家族性地中海热 FMF 患者 CD64 的表达($2\ 439.6 \pm 2\ 215.8$)显著高于健康受试者(547.8 ± 229.5 , $P = 0.003$)、RA 患者(606.5 ± 228.2 , $P < 0.000\ 1$)和 SLE(681.3 ± 281.1 , $P = 0.004$),定量测定中性粒细胞 CD64 表达是区别 FMF 和自身免疫性疾病的有用工具^[22],中性粒细胞 CD64 表达能区分 RA 与 AOSD、FMF、局部骨骼肌感染、全身感染性疾病等,它的敏感性和特异性都高于 CRP 和红细胞沉降率等传统指标。因此,CD64 也是一项 RA 与其它疾病鉴别诊断的较好指标之一。

4 CD64 在监测 RA 并发感染患者的疗效观察

Matsui 等^[23]用 tocilizumab 药物治疗 RA 并发感染患者,有效时中性粒细胞 CD64 表达下降至正常水平($400 \sim 1\ 000$),无效时中性粒细胞 CD64 没有明显变化;Weinmann 等^[24]用甲氨蝶呤、低剂量强的松治疗早期类风湿性关节炎患者,测定活化标志 CD11b、CD64、CD86、CD69,这些活化标志治疗前后没有明显变化;Bunescu 等^[25]用甲氨蝶呤或抗 TNF- α 治疗 RA 患者,治疗前后 RA 患者中性粒细胞 CD64 比对照组高,治疗前后中性粒细胞 CD64 的没有显著性变化;但有学者认为 CD64 可用为一个敏感的生物标志物,可预测局部炎症和抗风湿药治疗的疗效^[26]。因此,CD64 有望作为 RA 并发感染患者

抗菌药物停药的有效指标。

5 展 望

CD64 是一项高敏感、高特异的诊断 RA 并发感染的早期标志物,并且有望作为 RA 并发感染患者抗菌药物停药的有效指标。随着流式分析技术在临床广泛应用,CD64 检测标准化,能 2h 内检出结果,能帮助临床医生对患者快速作出诊断,CD64 也可以作为动态观察感染指标之一,CD64 联合 CD35 还可鉴别细菌感染性疾病和病毒感染性疾病,联合淋巴细胞还可区分 DNA 病毒感染和 RNA 病毒感染,联合 CRP/CD11b 的比值可判断革兰阳性细菌引起的败血症,对于诊断和治疗临床疾病具有更重要的应用价值。CD64 有望成为诊断类风湿性关节炎伴感染的新指标。

参考文献

- [1] 陆再英,钟南山,谢毅,等.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2010:848-855.
- [2] Matsui T, Ohsumi K, Ozawa N, et al. CD64 on neutrophils is a sensitive and specific marker for detection of infection in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2006, 33(12):2416-2424.
- [3] Davis BH. Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(2):193-207.
- [4] Ng PC, Lain HS. Diagnostic markers for neonatal sepsis[J]. Curr Opin Pediatr, 2006, 18(2):125-131.
- [5] Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(8):903-916.
- [6] Jones AE, Fiechtel JF, Brown MD, et al. Procalcitonin test in the diagnosis of bacteremia: a meta analysis[J]. Ann Emerg Med, 2007, 50(1):34-41.
- [7] 郑林华,时永全,韩英. T 淋巴细胞亚群与慢性乙型肝炎的关系[J]. 中华肝病杂志, 2012, 20(1):75-77.
- [8] Ng PC, Li K, Wong RP, et al. Neutrophil CD64 expression: a sensitive diagnostic marker for late-onset nosocomial infection in very low birth weight infants[J]. Pediatr Res, 2002, 51(3):296-303.
- [9] Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes[J]. Mediators Inflamm, 2008;202646.
- [10] 冯萍,虞培娟,朱雪明. 细菌感染患者外周血中性粒细胞表面 CD64 指数的变化[J]. 检验医学, 2010, 25(2):96-99.
- [11] 孙丽,楼燕茹,牧启田. 中性粒细胞 CD64 指数测定在肺部感染性疾病诊断中的价值[J]. 检验医学, 2010, 25(2):100-102.
- [12] Icardi M, Erickson Y, Kilborn S, et al. CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12):3914-3919.
- [13] Hussein OA, El-Toukhy MA, El-Rahman HS. Neutrophil. CD64 Expression in Inflammatory Autoimmune Diseases: Its Value in Distinguishing Infection from Disease Flare[J]. Immunological Investigations, 2010, 39(7):699-712.
- [14] Nishino J, Tanaka S, Kadono Y, et al. The usefulness of neutrophil CD64 expression in the diagnosis of local infection in patients with rheumatoid arthritis in daily practice[J]. J Orthop Sci, 2010, 15(4):547-552.
- [15] Jalava-Karvinen P, Hohenthal U, Laitinen I, et al. Simultaneous quantitative analysis of Fc gamma RI(CD64) and CR1(CD35) on neutrophils in distinguishing between bacterial infections, viral in-

- fections, and inflammatory diseases[J]. Clin Immunol, 2009, 133(3):314-323.
- [16] Mokuda S, Doi O, Takasugi K. Simultaneous quantitative analysis of the expression of CD64 and CD35 on neutrophils as markers to differentiate between bacterial and viral infections in patients with rheumatoid arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2012, 22(5):750-757.
- [17] Nuutila J. The novel applications of the quantitative analysis of neutrophil cell surface FcγRIIb(CD64) to the diagnosis of infectious and inflammatory diseases[J]. Curr Opin Infect Dis, 2010, 23(3):268-274.
- [18] Lilius EM, Nuutila J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression[J]. Scientific World Journal, 2012, 2012:527347.
- [19] Doi T, Miyazaki T, Nishino J, et al. Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for local infection and crystal-induced arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2010, 20(6):573-579.
- [20] Allen E, Bakke AC, Purtzer MZ, et al. Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections[J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(6):522-525.
- [21] Komiya A, Matsui T, Nogi S, et al. Neutrophil CD64 is upregulated in patients with active adult-onset Still's disease[J]. Scand J Rheumatol, 2012, 41(2):156-164.
- [22] Migita K, Agematsu K, Yamazaki K, et al. Expression of CD64 on polymorphonuclear neutrophils in patients with familial Mediterranean fever[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 164(3):365-372.
- [23] Matsui T, Komiya A, Shimada K, et al. Neutrophil CD64 as a marker of infection in patients treated with tocilizumab[J]. Mod Rheumatol, 2009, 19(6):696-697.
- [24] Weinmann P, Moura RA, Caetano-Lopes JR, et al. Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy[J]. Clin Exp Rheumatol, 2007, 25(6):885-887.
- [25] Bunesco A, Seidman P, Lenkei R, et al. Enhanced FcγRIIb receptor I, αMβ2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets[J]. J Rheumatology, 2004, 31(12):2347-2355.
- [26] Fueeldner C, Mittag A, Knauer J, et al. Identification and evaluation of novel synovial tissue biomarkers in rheumatoid arthritis by laser scanning cytometry[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(1):R8.

(收稿日期:2013-01-08)

• 综 述 •

多药耐药铜绿假单胞菌研究进展

王丽娟¹, 徐修礼², 史皆然¹, 刘冰¹, 孙慧英¹, 白艳玲¹, 马春丽¹ 综述, 李武平¹ 审校
(第四军医大学西京医院:1. 感染管理科;2. 检验科, 陕西西安 710032)

关键词: 假单胞菌, 铜绿; 生物学特性; 危险因素; 抗药性, 微生物; 防治

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)13-1713-03

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属革兰阴性杆菌, 为一种能引起人和动物感染的条件致病菌, 是导致医院感染的重要菌属。美国疾病控制中心(CDC)的院内感染监测(NNIS)报告指出: 从1990年1月到1996年3月, 铜绿假单胞菌在所有院内感染致病菌中排第5位, 在革兰阴性菌中排第2位^[1]。我国全国性革兰阴性菌耐药监测(NPRS)数据显示: 从1994年到2001年, 铜绿假单胞菌在所有院内感染革兰阴性菌中排第1位^[2-3]。随着抗菌素的广泛使用, 铜绿假单胞菌的多重耐药现象越来越严重, 给临床抗感染治疗带来了难题。对3种或3种以上的抗菌素耐药的铜绿假单胞菌被称为多药耐药铜绿假单胞菌(MDRPA), 1996年台北大学附属医院 Hsueh等^[4]从1例烧伤患者伤口处分离到我国台湾地区第1株泛耐药菌株。2004年北京协和医院报道有44例MDRPA院内感染, 病死率为55%^[5]。近年MDRPA的检出率逐年上升, 其高耐药性引起了国内外同行的重视。作为超级细菌, 对其进行生物学特性、感染危险因素、耐药机制及防治等研究具有重要的意义。

1 生物学特性

铜绿假单胞菌俗称绿脓杆菌, 为革兰阴性杆菌, 是人体内的正常菌群, 为专性需氧菌, 最适生长温度为25~30℃, 广泛分布于医院环境, 是临床上常见的院内感染致病菌。近年来, PA对人体的致病作用明显增加, 成为一系列严重的化脓性感染的重要致病菌, 烧伤创面渗液、潮湿的特性更有利于铜绿假

单胞菌的定植。PA的致病机制复杂, 主要由于: (1)黏附素, 包括胞外荚膜、IV型菌毛、LPS等。(2)分泌能够破坏细胞、组织的胞外产物, 如荧光色素、蛋白酶、磷脂酶、ADP-糖基转移酶等。(3)外膜、胞浆及内膜所携带的致病因子, 如β-内酰胺酶、外膜蛋白及青毒素结合蛋白(PBPs)。(4)生物膜障碍与主动转运系统及耐药质粒的存在阻止药物到达其靶位。这些因素共同构成了多药耐药铜绿假单胞菌的致病机制。

2 感染危险因素

2.1 年龄 老年患者多脏器功能衰退, 表现为T淋巴细胞减少, 机体免疫力下降, 易引起病原菌感染及定植。国内文献报道的老年科患者常见病原菌分布情况显示, 铜绿假单胞菌目前已成为老年患者医院感染的主要致病菌, 检出率为28.2%, 占致病菌之首^[6]。

2.2 基础疾病 烧伤患者创面潮湿为细菌定植创造有利条件, 宋启发等^[7]研究结果显示烧伤病房的多药耐药铜绿假单胞菌的分离率高达75%。PA也是重要的呼吸道感染致病菌之一, 且耐亚胺培南铜绿假单胞菌(imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, IRPA)分离率可高达35%^[8], 与呼吸系统疾病病程长, 使用抗菌素过久有关。

2.3 接受侵入性操作 侵入性操作不同程度引起机械性损伤, 破坏人体正常屏障, 降低防御保护功能, 增加感染机会。感染严重的机械通气患者, 在气管插管的内壁上易形成细菌生物膜, 从而促进了细菌耐药性的发展^[9-10]。Kischke等^[11]报道,