

• 临床检验研究论著 •

流式细胞仪分析指标与传统感染指标在 早产儿感染早期诊断中的比较^{*}

陈 睿, 马丽亚, 钟文明, 陈 幽, 陈丽芝, 卢光进[△]

(宝安区妇幼保健院新生儿科, 广东深圳 518133)

摘 要:目的 比较流式细胞仪分析指标与传统感染指标在早产儿感染早期诊断中的临床应用。方法 将 60 例早产儿根据其临床症状和实验室结果分为感染组($n=29$)与及非感染组($n=31$)。采用 BD FACSCanto II 流式细胞仪检测 CD11b、CD64、CD45RO, 体液及分泌物的培养采用 BACTEC 9120 全自动血液培养系统, 血常规及超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)检测分别采用 Sysmex XE-5000 全自动血细胞分析仪及 i-CHROMA Reader 免疫荧光分析仪。用受试者工作特征(ROC)曲线分析各指标在早产儿感染中的诊断价值, 计算其在早产儿早期感染诊断中的敏感性、特异性、阳性预测值及阴性预测值。结果 出生后第 1 天, 感染组早产儿中性粒细胞 CD11b、CD64, 单核细胞 CD64 及 hs-CRP 水平显著高于非感染组($P<0.05$)。两组早产儿 CD45RO、WBC、中性粒细胞绝对数及百分比的差异无统计学意义($P>0.05$)。中性粒细胞 CD64、单核细胞 CD64、hs-CRP 的 ROC 曲线下面积(AUC) >0.7 , 它们在早产儿感染的早期诊断中有较高价值, 三者联合检测的最高敏感性、特异性、阳性预测值及阴性预测值分别为 79.31%、96.78%、83.34% 及 75.00%。结论 流式细胞仪分析指标在早产儿感染的早期诊断中具有较好的临床应用价值。

关键词:早期诊断; 早产儿; 感染; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1248-03

Comparison of FACS analysis indicators and traditional infection indicators in early diagnosis of infection in premature infants^{*}

Chen Rui, Ma Liya, Zhong Wenming, Chen You, Chen Lizhi, Lu Guangjin[△]

(Department of Neonatology, Baoan Maternal & Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China)

Abstract: Objective To compare the clinical application of FACS analysis indicators and traditional infection indicators in early diagnosis of infection in premature infants. **Methods** 60 premature infants were divided into the infected group ($n=29$) and non-infected group ($n=31$) according to their clinical symptoms and laboratory results. BD FACSCanto Flow Cytometry was employed to detect CD11b, CD64 and CD45RO, BACTEC 9120 Automated Blood Culture System was used to conduct body fluids and secretions culture. Sysmex XE-5000 Automated Hematology Analyzers and i-CHROMA Reader Immunofluorescence Analyzer were adopted to conduct the complete blood count test and hypersensitive C-reactive protein(hs-CRP) detection, respectively. Receiver operator characteristic(ROC) curve was used to analyze the diagnostic value of indexes above in preterm infants with infection, and their sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were calculated. **Results** On the first day after birth, neutrophil CD11b, CD64, monocyte CD64 and hs-CRP levels of preterm infants in infection group were obviously higher than those in non-infection group($P<0.05$). Differences of CD45RO, WBC, neutrophil absolute and percentage between the two groups showed no statistical significance($P>0.05$). ROC area under the curve(AUC) >0.7 was found in Neutrophil CD64, monocyte CD64 and hs-CRP, which had higher value in early diagnosis of infection in premature infants. The highest sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were 79.31%, 96.78%, 83.34% and 75.00%, respectively. **Conclusion** FACS analysis indicators has better clinical value in the early diagnosis of infection in premature infants.

Key words: early diagnosis; premature infants; infection; flow cytometry

新生儿,特别是早产儿,感染的发病率高,是导致新生儿死亡的重要原因之一。而发生感染性疾病时,新生儿临床表现常不明显、非特异性,易被忽视。早期诊断早产儿感染是进行治疗的基础,及时给予有效抗菌药是提高早产儿存活率,减少并发症的关键。微生物培养是诊断细菌感染的金标准,但耗时长、阳性率低。超敏 C 反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)和血细胞分析的敏感性和特异性较低。本实验室对临床早产儿用流式细胞仪进行外周血中性粒细胞细胞 CD11b、CD64 和单核细胞 CD64 的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)检测以及淋巴细胞 CD45RO 检测,在

早期诊断早产儿感染及疗效观察方面取得了较好的效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 11 月至 2012 年 6 月本院新生儿科收治的胎龄不超过 36 周的早产儿 74 例,排除 10 例临床症状与实验室结果不相符的可疑病例及中途出院或死亡共 4 例,纳入余下的 60 例早产儿,其中,男 38 例,女 22 例;顺产 36 例,剖宫产 23 例,臀助产 1 例;胎龄 $25^{+6} \sim 36$ 周,平均 32^{+5} 周;出生体质量 $900 \sim 2\,750$ g,平均 1 889 g。采用 Apgar 评分, 1 min: 6~10 分,平均 9.3 分; 5 min: 6~10 分,平均 9.8 分;

^{*} 基金项目:深圳市科技计划项目(201003335)。 作者简介:陈睿,女,副主任技师,主要从事新生儿实验室检验工作。 [△] 通讯作者, E-mail: lugj1111@yahoo.com.cn。

10 min;9~10 分,平均 10 分。在患儿出院时根据其是否感染分为感染组($n=29$)与及非感染组($n=31$)。

1.2 标本采集 所有患儿均于出生 0~12 h 内及用药前采血,(1)取 0.5~1.0 mL 全血以无菌技术床边接种,进行血培养检测;(2)取 1.0 mL 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,EDTA)-K₂ 抗凝血,依次进行 CD11b、CD64、CD45RO、血常规、hs-CRP 检测;(3)视需要取相应体液与分泌物送检验科进行病原微生物培养。

1.3 主要仪器与试剂 BD FACSCanto II 流式细胞仪、BD FACS™ Lyse Wash Assistant、BD FACS Diva 软件、BACTEC 9120 全自动血液培养系统及 BD PHOENIX™ System 全自动细菌鉴定药敏仪均为美国 BD 公司产品,Sysmex XE-5000 全自动血细胞分析仪为日本 Sysmex 公司产品,i-CHROMA Reader 免疫荧光分析仪为韩国 Boditech MED Inc 公司产品;主要试剂:CD11b[藻红蛋白(phycoerythrin,PE)]、CD14[异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)]/CD64(PE)、CD45RA(FITC)/CD45RO(PE)/CD3[多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物(peridinin-chlorophyll-protein complex,PerCP)]/CD4[别藻蓝蛋白(allophycocyanin,APC)]等均购自美国 BD 公司。

1.4 检测方法 采用 BD FACSCanto II 流式细胞仪检测 CD11b、CD64、CD45RO,体液及分泌物的培养采用 BACTEC 9120 全自动血液培养系统,血常规检测采用 Sysmex XE-5000 全自动血细胞分析仪。采用 i-CHROMA Reader 免疫荧光分析仪及配套试剂测定 hs-CRP。

1.5 阳性判断标准^[1-3] 流式细胞仪检测,新生儿出生后第 1 天,中性粒细胞 CD11b、CD64 的 MFI 分别为:≥1 151、≥1 013,单核细胞 CD64 的 MFI:≥4 340,CD45RO:≥19%。血常规检测,新生儿出生后第 1 天,WBC:10×10⁹/L~31×10⁹/L;中性粒细胞绝对数:≥5×10⁹/L~18×10⁹/L;血小板

计数(platelet count,PLT):80×10⁹/L~356×10⁹/L。出生后第 3 天,WBC:≥5.0×10⁹/L~14.5×10⁹/L;中性粒细胞绝对数:≥2×10⁹/L~7×10⁹/L;PLT:61×10⁹/L~335×10⁹/L。出生后第 7 天,WBC:≥6×10⁹/L~14.5×10⁹/L;中性粒细胞绝对数:≥2×10⁹/L~6×10⁹/L;PLT:124×10⁹/L~678×10⁹/L;hs-CRP:≥3.0 mg/L。

1.6 受试者工作特征(receiver operator characteristic,ROC)曲线分析 用 ROC 曲线评估各指标在早产儿感染中的诊断价值;用四格表计算 ROC 曲线下面积(area under the curve,AUC)>0.7 的指标在诊断早产儿早期感染中的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,数据用中位数与四分位数间距[M($P_{25} \sim P_{75}$)]表示,组间比较采用非参数 Mann-Whitney 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

出生后第 1 天,感染组早产儿中性粒细胞 CD11b、CD64,单核细胞 CD64 及 hs-CRP 水平显著高于非感染组($P<0.05$)。两组早产儿 CD45RO、WBC、中性粒细胞绝对数及百分比的差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

以检测指标为自变量,临床分组为因变量作 ROC AUC,中性粒细胞 CD64、单核细胞 CD64、hs-CRP 的 ROC AUC>0.7,它们在早产儿感染的早期诊断中有较高价值。CD45RO、WBC、中性粒细胞绝对数及百分比的 ROC AUC<0.5,在早期早产儿感染的诊断中无价值,见表 2。

ROC AUC>0.7 的中性粒细胞 CD64、单核细胞 CD64 及 hs-CRP 联合检测,其最高敏感性可达 79.31%,最高特异性达 96.78%,阳性预测值可达 83.34%,阴性预测值达 75.00%,见表 3。

表 1 感染组与非感染组早产儿出生后第 1 天各检验指标的比较[M($P_{25} \sim P_{75}$)]								
组别	中性粒细胞				CD64	CD45RO	WBC	hs-CRP(mg/L)
	CD11b(MFI)	CD64(MFI)	绝对数(×10 ⁹ /L)	百分比(%)	(单核细胞,MFI)	(%)	(×10 ⁹ /L)	
感染组	1 473(831~4 294)	1 468(886~2 796)	5.42(2.38~8.88)	50.60(34.00~66.02)	6 339(4 318~8 117)	5.65(3.23~7.45)	10.68(5.51~12.76)	1.20(0.50~2.60)
非感染组	996(581~2 262)	797(610~1 071)	6.15(4.09~8.30)	55.80(46.00~63.20)	4 010(3 438~5 032)	5.10(4.10~7.30)	11.11(9.10~13.09)	0.50(0.50~0.90)
Z	-2.249	-3.610	-0.052	-0.555	-3.927	-0.840	-0.170	-2.913
P	0.025	0.000	0.959	0.579	0.000	0.401	0.865	0.004

表 2 出生后第 1 天各指标在早产儿感染中的诊断价值				
检验结果变量	AUC(%)	标准误	渐进 Sig. b	渐近 95%可信区间
CD11b(中性粒细胞)	66.9	0.070	0.025	0.532~0.806
CD64(中性粒细胞)	77.1	0.063	0.000	0.648~0.895
CD64(单核细胞)	79.5	0.060	0.000	0.678~0.912
CD45RO(淋巴细胞)	49.1	0.076	0.906	0.342~0.640
血培养	50.1	0.075	0.988	0.354~0.649
中性粒细胞绝对数	45.8	0.082	0.579	0.298~0.618
中性粒细胞百分比	49.6	0.790	0.959	0.342~0.650
hs-CRP	71.2	0.067	0.050	0.581~0.842

表 3 中性粒细胞及单核细胞 CD64、hs-CRP 在早产儿早期感染诊断中的敏感性和特异性(%)

检验结果变量	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值
CD64(中性粒细胞)	72.42	74.20	72.42	74.20
CD64(单核细胞)	75.87	70.97	70.97	75.87
hs-CRP	17.25	96.78	83.34	55.56
CD64(中性粒细胞)+CD64(单核细胞)+hs-CRP(并联)	79.31	58.07	63.89	75.00
CD64(中性粒细胞)+CD64(单核细胞)+hs-CRP(串联)	17.25	96.78	83.34	55.56
CD64(中性粒细胞)+CD64(单核细胞)(并联)	79.31	58.07	63.89	75.00
CD64(中性粒细胞)+CD64(单核细胞)(串联)	68.97	87.10	83.34	75.00

3 讨 论

感染是导致早产儿死亡的重要原因之一。微生物培养是临床医师确定感染的金指标。由于病原菌的分离、培养时间长,且易受各种外界因素影响,培养的阳性率较低,从而使早期诊断受到限制,难以将其作为抗菌药使用的早期指标。目前临床常用的感染指标(如外周血 WBC 及其分类计数),由于早产儿出生后 WBC 生理水平波动较大,影响早产儿 WBC 水平的因素也较多,其对早产儿感染诊断的敏感性和特异性均较低。早产儿的感染易感性以及早产儿感染初期临床症状的不典型性和多样性,使早期诊治成为改善患儿预后的关键,因此,寻找一个有效的早期诊断早产儿感染的指标尤为重要。

正常人体内血 CRP 浓度极低,但在组织损伤或感染引起的炎症反应时,其升高较为显著。hs-CRP 是使用高敏感的检测手段,具有检测血 CRP 浓度不超过 0.3 mg/L 的能力。CD64 是 IgG 的 Fc 段受体,其表达受细胞因子的调节,发挥连接体液免疫和细胞免疫的桥梁作用^[4]。有报道显示,新生儿感染时,中性粒细胞 CD64 可明显增加,且在非感染状态下,早产儿和足月儿中性粒细胞 CD64 的表达水平无差异^[5-6],提示中性粒细胞 CD64 的表达是新生儿,尤其是早产儿细菌感染的一个标志。近年来,国外学者开始研究单核细胞 CD64 在新生儿感染性疾病中的变化^[7-8],他们指出,虽然中性粒细胞 CD64 在炎症反应中增高的倍数高于单核细胞 CD64,但两者在新生儿感染性疾病的早期诊断方面具有相似的敏感性和特异性。本研究表明,在早产儿感染的早期诊断中,hs-CRP、中性粒细胞 CD64、单核细胞 CD64 具有较大的临床意义。

早产儿早期感染多见于宫内感染和分娩过程感染,感染本身也是早产原因之一,因此,早产儿感染的早期诊断尤为重要。本研究显示,出生后第 1 天,感染组患儿中性粒细胞 CD64、单核细胞 CD64 较非感染组有较大改变,而传统指标中较为敏感的 hs-CRP 在感染时的改变不如前者,感染组与非感染组患儿 WBC、中性粒细胞绝对数与百分比的差异无统计学意义。本研究表明流式细胞仪检测在早产儿感染中的诊断价值优于传统检验指标。hs-CRP 的 ROC AUC 为 71.2%,预测早产儿感染的敏感性和特异性与李绍锦等^[9]、麦海珊等^[10]的研究结果相符,可能跟早产儿的免疫系统、肝脏发育不完善,产生的 CRP 量极微小有关。单核细胞 CD64 的 ROC AUC 大于中性粒细胞 CD64,中性粒细胞 CD64 与单核细胞 CD64 在最佳临床诊断阈值时,在早产儿感染的早期诊断方面有较高的敏感性和特异性,可作为早期诊断早产儿感染的实验室依据。

本研究还显示 ROC AUC>0.7 的中性粒细胞及单核细胞 CD64、hs-CRP 联合检测时,其敏感性、特异性、阳性预测值及阴性预测值均高于单独检验。联合检测可提高早产儿感染的早期诊断率,对早产儿感染的早期诊断和治疗具有重要的临床指导意义。

采用流式细胞仪检测 CD64 的用血量极少,只需 100 μ L 抗凝全血,用 CD14/64 双色荧光抗体,通过设门,一次性可获得中性粒细胞和单核细胞 CD64 两个结果,且检测时间短,从抽血到获得检测结果只需 40 min,非常适合临床对早产儿检测项目的要求。

参考文献

[1] 陈睿,陈幽,马丽亚,等. CD11b 及 CD64 在早产儿感染早期诊断中意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2013, 27(6): 548-550.

[2] Hodge S, Hodge G, Flower R, et al. Surface activation markers of T lymphocytes: role in the detection of infection in neonates[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 113(1): 33-38.

[3] 金汉珍等. 实用新生儿学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.

[4] Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. Fc gamma receptors in autoimmune diseases[J]. Eur J Clin Invest, 2001, 31(9): 821-831.

[5] Ng PC, Li K, Wong RP, et al. Neutrophil CD64 expression: a sensitive diagnostic marker for late-onset nosocomial infection in very low birthweight infants[J]. Pediatr Res, 2002, 51(3): 296-303.

[6] 张金萍, 陈超, 杨毅. CD64 在新生儿感染诊断中的临床意义[J]. 中华围产医学杂志, 2006, 9(5): 320-324.

[7] Nuutila J, Hohenthal U, Laitinen I, et al. Simultaneous quantitative analysis of Fc gamma RI (CD64) expression on neutrophils and monocytes: a new, improved way to detect infections[J]. J Immunol Methods, 2007, 328(1/2): 189-200.

[8] Genel F, Atlıhan F, Gulez N, et al. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection[J]. World J Pediatr, 2012, 8(1): 72-75.

[9] 李绍锦, 李上森, 杨娇娇, 等. 检测降钙素原及超敏 C-反应蛋白在新生儿感染的临床意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(10): 2104-2105.

[10] 麦海珊, 郭少萍. 超敏 C 反应蛋白与新生儿感染的关系研究[J]. 海南医学, 2007, 18(4): 57-58.