

• 论 著 •

CD64 指数在手足口病并发病毒性脑炎和化脓性脑膜炎中鉴别诊断的价值*

方代华, 邓罗华[△], 刘 洋, 孙浩森, 邓星强
(江苏省徐州市儿童医院 221006)

摘 要:目的 探讨中性粒细胞 CD64 指数在儿童手足口病并发病毒性脑炎与化脓性脑膜炎鉴别中的应用价值。方法 采用流式细胞术测定中性粒细胞膜上 CD64 表达程度,并计算 CD64 指数。采用方差分析比较手足口病并发病毒性脑炎、化脓性脑膜炎患儿和对照样本中性粒细胞 CD64 表达指数差异。绘制 ROC 曲线比较 CD64 指数和 CRP 辅助诊断化脓性脑膜炎的效果。结果 儿童手足口病并发病毒性脑炎、化脓性脑膜炎患儿和对照样本中性粒细胞 CD64 表达指数间比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。ROC 曲线分析显示 CD64 指数在阈值为 0.17 时较 C 反应蛋白(CRP)具有更好的灵敏度和特异性。结论 中性粒细胞 CD64 指数在儿童手足口病并发病毒性脑炎和化脓性脑膜炎的诊断中,具有重要的参考价值。

关键词:CD64 指数; 手足口病; 病毒性脑炎; 化脓性脑膜炎

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.18.007 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)18-2673-03

The value of CD64 index in hand foot mouth disease complicated with viral encephalitis and purulent meningitis*

FANG Daihua, DENG Luohua[△], LIU Yang, SUN Haomiao, Deng Xingqiang
(Xuzhou Children's Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

Abstract:Objective To explore the application value of CD64 expression on the neutrophils in the identification of children with hand, foot and mouth disease complicated by viral encephalitis (HFMD-encephalitis) and purulent meningitis. **Methods** The expression of CD64 on the membrane of neutrophils was measured by flow cytometry, and the CD64 index was calculated. AVOVA was used to compare the expression of CD64 in the neutrophils of children with HFMD-encephalitis, purulent meningitis and controls. The diagnostic efficacies of CD64 index and CRP in diagnosis of purulent meningitis were compared by ROC curve. **Results** The expression of CD64 on the neutrophils had significant difference in children with HFMD-encephalitis, purulent meningitis and controls ($P < 0.01$). ROC curve analysis showed that the CD64 index with cut-off 0.17 has higher sensitivity and specificity than CRP. **Conclusion** The CD64 index has important value in the diagnosis of HFMD-encephalitis and purulent meningitis.

Key words:CD64 index; hand, foot and mouth disease; viral encephalitis; purulent meningitis

化脓性脑膜炎和病毒性脑炎具有相似的临床表现,尤其对于不典型化脓性脑膜炎和早期患者常常被误诊为病毒性脑炎,快速确诊对于这两种疾病的治疗具有重要意义^[1-3]。手足口病合并病毒性脑炎是儿童中常见的一种病毒性脑炎,与化脓性脑膜炎都是比较严重的疾病,这两种疾病具有一些相似的症状,本研究尝试寻找一种可以帮助辨别这两种疾病的方法。

CD64 作为免疫应答过程中的重要蛋白,在机体受到病毒或细菌感染时会在中性粒细胞上表达增加^[4-5]。并且有文献报道病毒和细菌感染时中性粒细胞 CD64 的表达具有差异^[6]。然而,中性粒细胞 CD64 在这 2 种疾病中的表达情况鲜有研究。笔者对 2 种疾病的中性粒细胞 CD64 表达情况进行了检测分析,研究 CD64 在这 2 种疾病诊断中的应用价值。同时,将 CD64 与常用的细菌感染指标 C 反应蛋白(CRP)进行比较,以进一步评价中性粒细胞 CD64 对化脓性脑膜炎诊断的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 1—10 月在本院住院的化脓性脑膜炎患儿 130 例,手足口病合并病毒性脑炎患儿 554 例,患儿总计 684 例,其中男 410 例,女 274 例;健康对照儿童 70 例,其中男 37 例,女 33 例;年龄 15 d 至 11 岁,为入院治疗的非感染患者(疝气、胯关节脱位)。本研究方案已通过徐州市儿童医

院伦理委员会批准(批准号:2013 伦审第 1-6 号)。所有受试患儿家长均签署了知情同意书,基线资料见表 1。

1.2 诊断标准 诊断依据《实用儿科学(第 7 版)》的诊断标准^[7]。

1.2.1 手足口病并发病毒性脑炎组纳入标准 (1)症状:确诊手足口病,有发热和神经系统症状;(2)体征:临床体征支持脑实质受损改变;(3)脑脊液:脑脊液常规和生化呈非化脓性改变,细胞数、蛋白正常或轻度增高,糖和氯化物正常;(4)脑电图:脑电图背景活动异常;有不同程度的节律减慢。对临床诊断符合而脑脊液细胞数正常者、接受外院病原学治疗者不纳入研究对象。

1.2.2 化脓性脑膜炎患儿组纳入标准 患儿有发热、呕吐、头痛、精神改变、脑膜刺激征等临床表现,脑脊液常规生化结果符合化脓性改变或脑脊液涂片、培养找到细菌。患儿排除其他颅内感染等疾病;接受外院治疗者不纳入研究对象。

1.3 仪器与试剂 流式细胞仪型号为 BD FACSCanto II,单克隆抗体 CD64-PE 和红细胞裂解液(FACSLysin)均购自美国 BD 公司。CRP 采用免疫比浊法检测,使用日立 7600 生化分析仪。

1.4 方法

* 基金项目:江苏省徐州市科技局资助项目(XZZD1368)。

作者简介:方代华,男,主任技师,主要从事细胞免疫方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:251963221@qq.com。

1.4.1 样本收集 各组均在入院 12 h 内(急性期)采集空腹静脉血 1~2 mL,采用 EDTA 抗凝。

表 1 研究对象的一般资料

组别	<i>n</i>	男/女(<i>n</i> / <i>n</i>)	年龄(年)	发热[<i>n</i> (%)]
健康对照组	70	1.12/1.00	3.5±0.9	0
手足口病合并				
病毒性脑炎组	554	1.38/1.00	3.4±0.6	523(94.4)
化脓性脑膜炎组	130	2.17/1.00	3.1±0.5	128(98.5)

1.4.2 样本处理 分别向已编好号的试管中加入 20 μL CD64-PE 单克隆荧光抗体和 50 μL 抗凝全血混匀,室温避光孵育 15 min。然后向试管中加入 1×FACSLysin 1 mL,混匀,室温避光孵育 10 min。接着用 2 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,最后用 450 μL PBS 缓冲液悬浮细胞,然后进行流式细胞仪检测。

1.4.3 上机检测 使用首先在 FSC/SSC 散点图分别中圈出淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞。分别建立直方图,显示三群细胞的平均荧光强度(MFI)。每个样本获取 10 000 个细胞,获得每种细胞的 CD64 平均荧光强度数据。

1.4.4 CD64 指数计算 计算公式:CD64 指数=(中性粒细胞-淋巴细胞)/(单核细胞-中性粒细胞)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析。对数据进行对数转换,使其符合正态分布,转换公式为: $Y = \ln(X) + 4$,其中 X 为 CD64 指数, Y 为转换后的结果。对转换后的数据进行正态分布检验(Shapiro-wilk 检验)、均值分析和两因素方差分析(Two-way ANOVA),之后采用 Tukey HSD 法进行多重比较。将 CD64 指数和 CRP 两种方法的检测数据绘制受试者工作特征曲线(ROC),分析其工作效率。使用约登指数(Youden index)计算 CD64 指数和 CRP 区分化脓性脑膜炎和正常对照的最佳阈值。分别计算出最佳阈值时 3 种检测方法的特异性、灵敏度、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)、阳性似然值(PLR)和阴性似然值(NLR)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 数据分组 将数据分成 3 组:手足口病合并病毒性脑炎(G1 组);化脓性脑膜炎(G2 组);非感染对照(G3 组)。

2.2 样本的差异性分析 CD64 指数经检验不符合正态分布,

在对数转换后均符合正态分布($P > 0.05$),见表 2。对正态转换后的数据进行了方差分析,3 组数据差异有统计学意义($P < 0.05$)。3 组间性别比例差异有统计学意义($P < 0.05$)。但是两因素交互作用分析结果显示,性别的差异对分组效应的影响不显著($P > 0.05$)。多重比较结果显示,两组患儿与健康对照组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。化脓性脑膜炎患儿与手足口病合并病毒性脑炎患儿间差异有统计学意义($P < 0.05$)。**2.3 CD64 和 CRP 的 ROC 分析** 为化脓性脑膜炎 3 种感染指标绘制的 ROC 曲线显示,CD64 指数比 CRP 具有更大的线下面积(AUC),见图 1。

约登指数显示 CD64 指数的最佳阈值是 0.17。在此阈值时 CD64 指数的特异性和灵敏度分为 92.42%和 63.85%。CRP 的最佳阈值是 2.95。在此阈值时其的特异性和灵敏度分为 81.82%和 43.08%。CD64 指数比 CRP 具有更高的灵敏度和特异性。并且 CD64 指数具有更高的阳性预测值、阴性预测值和阳性似然值,较低的阴性似然值。见表 3。

表 2 各组数据的正态分布检测和均值分析

组别	<i>n</i>	正态性检验(<i>P</i>) ^a	CD64($\bar{x} \pm s$)	CRP($\bar{x} \pm s$)
G1 组	554	0.560	0.16±0.09	— ^b
G2 组	130	0.689	0.26±0.21	21.47±51.93
G3 组	70	0.838	0.11±0.04	2.48±3.96

注:^aShapiro-wilk 检验, $P > 0.05$ 表示符合正态分布。^b病毒感染患者的该项检测数据不全

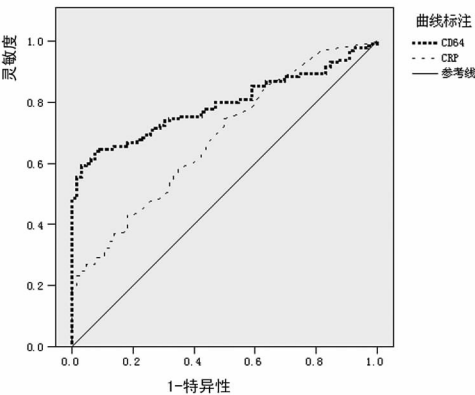


图 1 CD64 和 CRP 的 ROC 曲线

表 3 CD64 和 CRP 两种方法辨别化脓性脑膜炎的能力比较

方法	阈值	灵敏度(%)	特异性(%)	线下面积	PPV(%)	NPV(%)	PLR	NLR
CD64	0.17	63.85	92.42	0.792	94.32	56.48	8.43	0.39
CRP	2.95	43.08	81.82	0.682	82.35	42.19	2.37	0.7

3 讨 论

化脓性脑膜炎和病毒性脑炎具有相似的临床表现。鉴别化脓性脑膜炎和病毒性脑炎的金标准是脑脊液培养、涂片和 PCR。脑脊液培养耗时较长,脑脊液涂片和 PCR 的假阴性较高。目前临床中多采用细菌感染的指标来辅助鉴别这两种疾病,如降钙素原(PCT)、CRP 等^[8-12]。CD64 作为一种感染指标,对细菌和病毒感染有一定的鉴别能力^[6]。有研究对中性粒细胞上的 CD64 进行绝对定量来探讨其在这两种疾病鉴别中的价值,其结果显示 CD64 具有很高的灵敏度和特异性,但是

CD64 的绝对定量是一种成本较高且操作较复杂的方法。近几年,国外有研究人员提出了 CD64 相对定量的方法,并且在感染性疾病的辅助诊断中具有很高的应用价值^[13]。笔者选择的 CD64 指数据计算公式考虑到了淋巴细胞上 CD64 的阴性表达和单核细胞上的阳性表达,并以二者作为内部参照来显示样本中性粒细胞的 CD64 表达情况^[13-14]。Karlis 等^[15]发现,流感病毒感染患者外周血中性粒细胞上 CD64 的表达显著低于细菌感染患者。本研究结果也与之相似,本结果显示手足口病毒感染患者与细菌性感染患者中性粒细胞上

CD64 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),并且均值分析表明手足口病毒感染患者中性粒 CD64 的表达低于细菌感染患者。

化脓性脑膜炎是细菌感染性疾病,包含了多种细菌的感染情况。CRP 是常用的细菌感染判断传统指标。为了进一步探讨 CD64 指数区分化脓性脑膜炎与非感染对照的能力,笔者将它与 CRP 进行了比较。本研究显示 CD64 指数比 CRP 具有更高的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和阳性似然值,较低的阴性似然值。这说明 CD64 是一种更为有效的细菌感染指标,本研究结果与新生儿败血症中的研究结果相似^[16-17]。

本研究结果显示,CRP 具有很高的特异性(81.82%和 83.33%),但是灵敏度不够理想(43.08%和 33.85%)。这一结果与其他感染疾病研究获得的结果一致^[10,16-20]。这可能跟 CRP 的产生机制有关。CRP 通常感染后 48 h 才能达到峰值,并且有研究表明病毒性脑炎患者的 CRP 也会升高^[8-9,21]。

由于本研究只考虑了手足口病合并病毒性脑炎一种病毒性疾病,这种疾病是由微小核糖核酸类病毒引起的疾病,因此对于化脓性脑膜炎与其他病毒感染所致病毒性脑炎的鉴别诊断,CD64 是否同样较高的价值,仍需进一步证实。同样地,虽然本研究结果表明 CD64 指数在化脓性脑膜炎患者诊断中具有很高的参考价值,与在其他种类细菌感染性疾病研究结果一致,但是仍需要更多的细菌感染疾病研究来丰富 CD64 指数在诊断中的意义。

综上所述,本研究把 CD64 相对定量的方法用于化脓性脑膜炎和病毒性脑炎的辅助诊断中,取得了很好的效果。因此,笔者认为 CD64 可以和 CRP 一样成为鉴别脓性脑膜炎和病毒性脑炎的参考指标,帮助临床减少这两种疾病的误诊。

参考文献

- [1] 唐丽洁,黄莹.新生儿化脓性脑膜炎 18 例回顾性分析[J].中国中西医结合儿科学,2011,3(2):172-173.
- [2] 周晓蓉.小儿化脓性脑膜炎误诊为病毒性脑炎原因分析[J].临床误诊误治,2001,14(2):94-95.
- [3] 张志华.小儿化脓性脑膜炎 69 例误诊探析[J].临床误诊误治,2006,19(7):64-65.
- [4] Leino L, Sorvajrvi K, Katajisto J, et al. Febrile infection changes the expression of IgG Fc receptors and complement receptors in human neutrophils in vivo[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107(1): 37-43.
- [5] Pivi JK, Ulla H, Lina L, et al. Simultaneous quantitative analysis of Fc gamma RI(CD64) and CR1(CD35) on neutrophils in distinguishing between bacterial infections, viral infections, and inflammatory diseases[J]. Clin Immunol, 2009, 133(3): 314-323.
- [6] Van Der Wim M, Peter P, Scott S, et al. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression: comparative trends during experimental human endotoxemia[J]. J Endotoxin Res, 2007, 13(2): 94-100.
- [7] 胡亚美,江载芳,诸福棠.实用儿科学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2002:759-766.
- [8] Gray M, Simmons R, Mason H, et al. Quantitative levels of C-reactive protein in cerebrospinal fluid in patients with bacterial meningitis and other conditions[J]. J Pediatr,

- 1986, 108(5 Pt 1): 665-670.
- [9] Donald R, Strachan F, Schoeman F, et al. Cerebrospinal fluid C-reactive protein in infective meningitis in childhood[J]. J Lab Clin Med, 1985, 106(4): 424-427.
- [10] Kenichiro T, Yoshinori K, Daisuke S, et al. Diagnostic accuracy of serum procalcitonin concentrations for detecting systemic bacterial infection in patients with systemic autoimmune diseases[J]. J Rheumatol, 2008, 35(1): 114-119.
- [11] Nylen S, Whang T, Snider H, et al. Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis[J]. Crit Care Med, 1998, 26(6): 1001-1006.
- [12] Monneret G, Labaune M, Isaac C, et al. Procalcitonin and C-reactive protein levels in neonatal infections[J]. Acta Paediatr, 1997, 86(2): 209-212.
- [13] Sushant S, Neelam W, Rajive K, et al. Evaluation of CD64 expression on neutrophils as an early indicator of neonatal sepsis[J]. Pediatr Infect Dis J, 2013, 32(1): e33-e37.
- [14] Fang H, Fan H, Li J, et al. Ratios of CD64 expressed on neutrophils, monocytes, and lymphocytes May be a novel method for diagnosis of neonatal sepsis[J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9(2): 175-181.
- [15] Karlis P, Gustav F, Lena DH, et al. Neutrophil and monocyte receptor expression in uncomplicated and complicated influenza A infection with pneumonia[J]. Scand J Infect Dis, 2008, 40(4): 326-337.
- [16] Choo YK, Cho HS, Seo IB, et al. Comparison of the accuracy of neutrophil CD64 and C-reactive protein as a single test for the early detection of neonatal sepsis[J]. Korean J Pediatr, 2012, 55(1): 11-17.
- [17] Groselj-Grenc M, Ihan A, Pavcnik-Arnol M, et al. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children[J]. Intensive Care Med, 2009, 35(11): 1950-1958.
- [18] Xiong SD, Pu LF, Wang HP, et al. Neutrophil CD64 Index as a superior biomarker for early diagnosis of infection in febrile patients in the hematology department[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 55(1): 82.
- [19] Yang AP, Liu J, Yue LH, et al. Neutrophil CD64 combined with PCT, CRP and WBC improves the sensitivity for the early diagnosis of neonatal sepsis[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(2): 345-351.
- [20] Antoine G, Mikael R, Elise S, et al. The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients[J]. Intensive Care Med, 2012, 38(3): 445-452.
- [21] Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein[J]. J Emerg Med, 1999, 17(6): 1019-1025.