

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.19.009

流式细胞 CD64 检测在鉴别类风湿关节炎合并感染中的意义

刘 洋,曹 玲,张朝霞[△]

(新疆医科大学第一附属医院检验科,乌鲁木齐 830054)

摘 要:**目的** 探讨 CD64 检测在类风湿关节炎(RA)合并感染中的临床意义。**方法** 根据 2010 年美国风湿病学会和欧洲抗风湿病联盟修订的 RA 分类标准和评分体系,选取 2016 年 9 月至 2017 年 6 月来该院就诊的 RA 患者 64 例,根据病原学结果分为 RA 合并感染组 29 例,RA 活动期组 35 例。纳入同期健康体检者 30 例为对照组。测定各组中性粒细胞 CD64 与 C 反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)、降钙素原(PCT)水平,分析其相关性,绘制受试者工作曲线(ROC 曲线)。**结果** RA 合并感染组 CD64 为 4.08(3.24~6.29),明显高于 RA 活动期组及对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。RA 合并感染组 CD64 水平与 PCT 呈正相关($r=0.409$, $P<0.05$),RA 活动期组 CD64 水平与 CRP、ESR、PCT 无相关性($P>0.05$)。ROC 曲线分析显示,CD64 诊断 RA 合并感染的灵敏度为 82.8%,特异度为 97.1%。**结论** 中性粒细胞 CD64 在区分 RA 合并感染及 RA 病情活动中具有较高的灵敏度及特异度,可为早期诊断及治疗提供帮助。

关键词:类风湿关节炎; CD64; 流式细胞; 感染

中图法分类号:R593.22

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)19-2872-04

Significance of flow cytometry CD64 detection in identifying rheumatoid arthritis complicating infection

LIU Yang, CAO Ling, ZHANG Zhaoxia[△]

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract:**Objective** To investigate the clinical significance of CD64 detection in rheumatoid arthritis (RA) complicating infection. **Methods** According to the RA classification criteria and scoring system revised by the American Rheumatism Association and European League against Rheumatism, 64 patients with RA in this hospital from September 2016 to June 2017 were selected and divided into the RA complicating infection group (29 cases) and active stage group (35 cases). Contemporaneous 30 persons undergoing healthy physical examination were included as the control group. The levels of neutrophil CD64, CRP, ESR and PCT were detected and their correlation was analyzed. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn. **Results** The CD64 level in the RA complicating infection group was 4.08(3.24—6.29), which was significantly higher than that in the RA active stage group and control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The CD64 level in the RA complicating infection group was positively correlated with PCT ($r=0.409$, $P<0.05$); while the CD64 level in the RA active stage group had no correlation with CRP, ESR and PCT ($P>0.05$). The ROC curve analysis showed that the sensitivity of CD64 for diagnosing RA complicating infection was 82.8% and the specificity was 97.1%. **Conclusion** Neutrophil CD64 level has higher sensitivity and specificity in discrimination between RA complicating infection and active RA, and provides help for early diagnosis and treatment.

Key words: rheumatoid arthritis; infection; CD64; flow cytometry

类风湿关节炎(RA)是一种病因未明的、常见的,以侵蚀性、慢性、进行性多关节炎为主要临床表现的自身免疫性疾病。主要累及外周关节,以对称性、多关节滑膜炎为主,好发于手、腕、足等小关节,常反复发作。病理变化主要表现为滑膜炎、血管翳形成,侵蚀软骨及骨组织,最终可能导致关节结构破坏、畸形、功能丧失等。我国的患病率为 0.32%~0.36%,是造成我国人群丧失劳动力和致残的主要病因之一^[1]。

激素、免疫抑制剂被广泛应用于 RA 患者,当 RA 患者合并感染时,临床症状可表现为发热、关节痛、C 反应蛋白(CRP)升高、红细胞沉降率(ESR)增快等,与 RA 病情活动很难区别,但两种情况的治疗方法完全不同。误诊会使患者使用过多的抗菌药物,造成不必要的经济损失;还会使患者使用免疫抑制剂如肿瘤坏死因子(TNF)- α 等,造成感染加重。目前,感染已成为 RA 患者的主要并发症和死亡原因之一^[2]。因此,

寻找一种简便、可靠的指标来区别合并感染还是 RA 活动成为临床迫切需要解决的问题。

目前,常用的感染指标有白细胞、ESR、CRP 等,在 RA 活动期上述感染指标水平也增高,但缺乏特异性;细菌培养耗时过久且阳性率低,给临床的及时治疗造成困扰。CD64 近年来作为一种感染的新指标越来越受到关注^[3-4]。研究发现中性粒细胞 CD64 的表达在 RA 疾病活动时不上调^[5],激素、免疫抑制剂和生物制剂等并不影响 CD64 的表达。这使得 CD64 有望成为鉴别 RA 病情活动与继发细菌感染的检测指标。本文探讨 CD64、CRP、ESR 及降钙素原(PCT)在 RA 合并感染中的意义与临床应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 9 月至 2017 年 6 月来本院就诊的 64 例 RA 患者。诊断标准参照 2010 年美国风湿病学会(ACR)和欧洲抗风湿病联盟(EULAR)修订的 RA 分类标准和评分体系:DAS28 以压痛关节数及肿胀关节数评分,以 28 个关节计分,包括双手指关节(10 个)、双手近端指间关节(10 个)、双腕关节(2 个)、双肘关节(2 个)、双肩关节(2 个)、双膝关节(2 个),DAS28 评分大于 2.6 分为 RA 活动期^[6]。根据临床诊断及病原学结果分为 RA 合并感染组和 RA 活动期组。RA 合并感染组 29 例,其中男 11 例、女 18 例,平均年龄(54.76 ± 14.48)岁;肺部感染 18 例,泌尿系统感染 7 例,皮肤感染 4 例。RA 活动期组 35 例,其中男 7 例、女 28 例,平均年龄(53.57 ± 11.95)岁。对照组为同期本院健康体检者 30 例,其中男 9 例、女 21 例,平均年龄(53.00 ± 11.04)岁,无严重心脑血管疾病及肝、肾功能异常,无其他器质性疾病。以上 3 组的性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪(贝克曼库尔特 FC500MCL)、TQ-PREP 前处理仪、贝克曼库尔特 AU5800 全自动生化分析仪、罗氏 e411 电化学发光分析仪。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD64(IgG1, κ , 克隆号 10.1)、多甲藻叶绿素蛋白(PerCP)标记的小鼠抗人 CD45(IgG1, κ , 克隆号 2D1)、藻红蛋白(PE)标记的 CD13、藻红蛋白花青素(PE-CY5 即 PC5)标记的 CD33、别藻蓝蛋白(APC)藻红蛋白-得克萨斯红(ECD)标记的 CD14。溶血剂和缓冲液均由 Becton Dickinson 公司(美国)生产。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 抽取患者入院 24 h 内静脉血进行检测,于入院次日早晨空腹抽取 3 mL 乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)抗凝静脉血,2 h 内送检。同时抽取肝素抗凝静脉血进行 CRP 及 PCT 检测,抽取外周静脉血经枸橼酸钠抗凝后于 ESR 检测管中,在室温下测定 1 h ESR。

1.3.2 流式细胞术(FCM)检测 CD64 取流式专用

管,各管依次加入 CD64-FITC 5 μ L、CD45-PerCP 5 μ L、CD13-PE 5 μ L、CD14-ECD 5 μ L、CD33-PC5 5 μ L、EDTA 全血 70 μ L。混匀试剂和抗凝血,在室温避光孵育 15 min 后,使用 TQ-PREP 前处理仪每管加入溶血剂(甲酸水溶液)1 mL,混匀后加入稳定剂(碳酸钠-氯化钠水溶液)500 μ L,混匀后再加入固定剂(多聚甲醛-磷酸盐缓冲液)500 μ L,前处理完毕后上流式细胞仪检测。利用前向散射光(FSC)、侧向散射光(SSC)和 CD45-PerCP 选取中性粒细胞群,调节荧光补偿后,检测中性粒细胞群细胞表面 CD64 表达的平均荧光强度(MFI)。每份标本检测 8 000 个细胞,数据由 CXP Software 获取和分析,所有操作均由专业人员完成,确保结果的准确性。

1.3.3 CRP、PCT 及 ESR 的检测 采用贝克曼库尔特 AU5800 全自动生化分析仪测定 CPR,采用罗氏 e411 电化学发光分析仪测定 PCT;采用魏氏法检测 ESR。仪器设备均通过质控,所有标本均在 2 h 内检测完成。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。正态性检验采用 K-S 检验,符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;非正态分布的计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间的比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。相关性分析采用 Pearson 相关;绘制受试者工作特征(ROC)曲线,根据最佳临界值(cut off 值)计算灵敏度、特异度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 CD64、CRP、ESR、PCT 结果比较 RA 合并感染组 CD64 明显高于 RA 活动期组与对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),RA 活动期组 CD64 水平与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。RA 合并感染组 CRP、ESR、PCT 水平明显高于 RA 活动期组与对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),RA 活动期组 CRP、ESR 与对照组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),其余指标各组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 RA 合并感染组、RA 活动期组 CD64 与 CRP、ESR、PCT 的相关性 经线性相关分析,RA 合并感染组 CD64 水平与 CRP、ESR 无相关性($r = 0.072, 0.388, P > 0.05$);CD64 水平与 PCT 呈正相关($r = 0.409, P < 0.05$)。RA 活动期组 CD64 水平与 CRP、ESR、PCT 也无相关性($r = -0.310, -0.167, 0.544, P > 0.05$)。提示 CD64 的表达水平与 RA 病情活动无关。

2.3 CD64、PCT 的 ROC 曲线分析 将 RA 合并感染组与 RA 活动期组的 CD64、PCT,绘制 ROC 曲线,比较曲线下面积(AUC),计算灵敏度、特异度及 cut

off 值。CD64、PCT 的 AUC 分别为 0.953、0.922, 差异有统计学意义($P<0.05$)。当 cut off 值为 3.780 时, CD64 的灵敏度为 82.8%, 特异度为 97.1%, 其 AUC 最大(0.953), 与 PCT 的 AUC(0.922) 比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。行串联试验, 计算 CD64

联合 PCT 的诊断效能, 得出 AUC 为 0.987, 当二者同时阳性时, 灵敏度为 96.6%; 当二者同时阴性时, 特异度为 97.1%, 较单独诊断试验灵敏度和特异度提升。见图 1。

表 1 3 组 CD64、CRP、ESR、PCT 结果比较

组别	n	CD64	CRP	ESR	PCT
		[$M(P_{25}, P_{75}), MFI$]	[$M(P_{25}, P_{75}), \text{mg/L}$]	($\bar{x} \pm s, \text{mm/h}$)	[$M(P_{25}, P_{75}), \mu\text{g/L}$]
RA 合并感染组	29	4.08(3.24, 6.29)	32.70(25.20, 52.39)	57.62 $\pm$ 12.81	1.20(0.83, 2.95)
RA 活动期组	35	2.60(2.09, 3.08) ^a	12.33(5.76, 20.10) ^a	36.51 $\pm$ 16.56 ^a	0.05(0.03, 0.11) ^a
对照组	30	2.73(2.49, 3.04) ^a	4.67(2.74, 8.01) ^{ab}	10.27 $\pm$ 6.30 ^{ab}	0.04(0.02, 0.09) ^a
H/F		29.937	45.39	89.81	45.239
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: 与 RA 合并感染组比较, ^a $P<0.05$; 与 RA 活动期组比较, ^b $P<0.05$

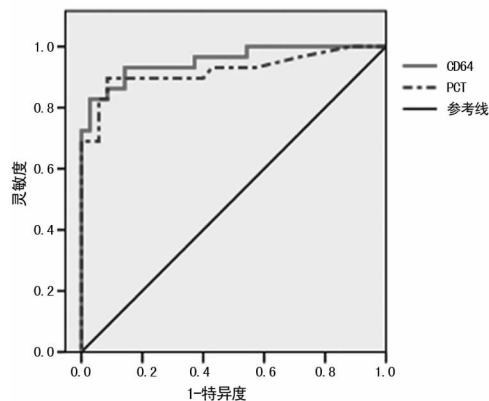


图 1 CD64、PCT 的 ROC 曲线分析

3 讨 论

CD64 是免疫球蛋白超家族的成员, 相对分子质量为 72×10^3 的跨膜糖蛋白, 主要分布在外周血的单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞表面。非细菌感染时在中性粒细胞表面 CD64 呈低水平表达^[7-9]; 细菌感染或内毒素入侵时, CD64 在受到刺激后 4~6 h 即可启动免疫应答, 在诊断感染性疾病时灵敏度和特异度较高, 可作为感染的早期诊断标志物之一, 具有诊断优势。国内外有报道使用中性粒细胞 CD64 阳性率、中性粒细胞 CD64/CD35 比例等对 RA 合并感染进行鉴别诊断, 均获得了满意结果^[2-3]。本文研究了 CD64、CRP、PCT 及 ESR 在 RA 合并感染中的意义, 结果显示 RA 合并感染组中性粒细胞 CD64 表达显著高于 RA 活动期组及对照组($P<0.05$), 且 RA 活动期组与对照组 CD64 水平差异无统计学意义($P>0.05$), 说明 CD64 的表达与 RA 的病情活动无关, 这与 KOMIYA 等^[4]、李德红等^[5]的报道一致。

CRP 是由白细胞介素(IL)-6 驱动, 在机体受到感染、炎症或组织损伤时血浆水平升高的一类急性时相反应蛋白。CRP 在许多原核生物中存在, 但也存在于坏死和凋亡的真核细胞中。RA 病情缓解后

CRP 下降, 是反映病情活动和治疗效果的较好指标。ESR 具有操作简便、重复性好的特点, 其在 80% 的 RA 患者病情活动期增快, 但由于影响因素很多, 不能仅仅依据 ESR 的升高与否来判断 RA 患者病情的活动情况。对于 RA 合并感染的情况, 上述指标不能较好地判断。

PCT 是由甲状腺的 C 细胞产生的早期激素, 是无活性的降钙素前体, 对感染尤其是细菌感染较为敏感, 在全身性细菌感染、严重的组织创伤、严重休克、全身炎症反应综合征及多器官功能障碍综合征时明显增高^[10-13], 真菌、病毒局部感染、肿瘤等疾病时仅表现为轻度升高或者不升高。在相关性分析中, RA 合并感染组 CD64 水平仅与 PCT 呈正相关, 表明 CD64 对细菌感染较为敏感。ROC 曲线中当 CD64 cut off 值为 3.780 时, 灵敏度为 82.8%, 特异度为 97.1%, 其 AUC 优于 PCT($P<0.05$), 表明 CD64 可作为诊断 RA 合并感染的指标, 与张晶等^[6]的研究一致。CD64 与 PCT 二者联合诊断可提升诊断效能。

MAGNUSSON 等^[7]研究了 CD64 在 RA 患者单核细胞与免疫球蛋白中的水平和其在疾病活动中的作用。研究发现, 在 RA 患者滑膜组织中, 巨噬细胞 FcγR II B 及活化性 Fcγ I、Fcγ II、Fcγ III 受体的表达均增加, 关节腔注射抗炎药物后, 滑膜中 FcγR I 的表达较之前降低, 提示 FcγR 在 RA 滑膜炎发挥中心作用。活化性 Fcγ 受体参与吞噬、免疫复合物诱导的炎症和相关细胞炎症因子的释放。本研究中 RA 活动期组 CD64 水平与对照组差异无统计学意义($P>0.05$), 可能与样本量较少有关。

HUSSEIN 等^[8]的研究表明, 活动期的 RA 患者滑液中 CD64 的表达升高较外周血中性粒细胞 CD64 升高明显。可能是由于关节内的细胞因子或其他因素, 如免疫复合物的沉积导致。对重症监护病房(ICU)患者诊断脓毒症时, 中性粒细胞 CD64 表现优

于 PCT 和 CRP^[9]。CD64 和 CRP 或 PCT 联合检测可提高脓毒症的诊断准确性。在 ICU 指导抗菌药物治疗时,这种方法可能是有用的。中性粒细胞 CD64 是目前诊断感染的著名标志物,有研究报道流式细胞定量测定中性粒细胞 CD64 还可能是淋巴瘤的诊断标志物^[14-15]。

本文的不足之处:CD64 对于 RA 合并感染的判断,其灵敏度为 82.8%,但徐勤燕等^[16]的相关报道中灵敏度可高达 94.4%。原因可能为本研究入组的患者例数相对较少,并且存在地域、民族的差异性,患者来源群体的不同都可能导致灵敏度的不同。希望在以后的研究中纳入更多数量的患者及进行多中心的试验。通过这种方式,将有可能获得更加准确的数据,帮助临床的诊断及治疗,监测疾病,评估预后等。在今后的研究中,将继续研究自身免疫性疾病与 CD64 表达的关系,希望从中能发现有关疾病发生、发展的机制与原理,为临床更好地诊疗提供帮助与支持。

综上所述,中性粒细胞 CD64 在区分 RA 合并感染及 RA 病情活动中具有很好的灵敏度及特异度,可为早期诊断及治疗提供帮助。

参考文献

- [1] 葛均波,徐永健.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:808.
- [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] 王宾,王红. C 反应蛋白、降钙素原、中性粒细胞表面 CD35 和 CD64 诊断脓毒症的临床价值[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(8): 752-755.
- [4] KOMIYA A, MATSUI T, HORIE K, et al. Neutrophil CD64 for monitoring the activity of nontuberculous mycobacteria infection in patients with rheumatoid arthritis[J]. Modern Rheumatol, 2014, 24(5): 770-774.
- [5] 李德红,李勇,居军,等. 中性粒细胞 CD64 在类风湿关节炎合并感染者中的表达及意义[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(1): 77-79.

- [6] 张晶,张露,刘园园,等. 中性粒细胞 CD64 指数在血流和局部细菌感染中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(19): 1673-4130.
- [7] MAGNUSSON S E, WENNERBERG E, MATT P, et al. Dysregulated Fc receptor function in active rheumatoid arthritis[J]. Immunol Lett, 2014, 162(1 Pt A): 200-206.
- [8] HUSSEIN O A, EL-TOUKHY M A, EL-RAHMAN H S. Neutrophil CD64 expression in inflammatory autoimmune diseases: its value in distinguishing infection from disease flare[J]. Immunol Invest, 2010, 39(7): 699-712.
- [9] JÄMSÄ J, ALA-KOKKO T, HUOTARI V, et al. Neutrophil CD64, C-reactive protein, and procalcitonin in the identification of sepsis in the ICU-post-test probabilities[J]. J Crit Care, 2017, 43(1): 139-142.
- [10] KOMIYA A, MATSUI T, HORIE K, et al. Neutrophil CD64 is upregulated in RA patients with lymphoma but not in other solid cancers[J]. Mod Rheumatol, 2016, 26(2): 216-223.
- [11] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN A J, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(9): 1580-1588.
- [12] 张可珊,陈鸣. 中性粒细胞 CD64 在感染性疾病诊治中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(5): 340-343.
- [13] 王丽娟,托娅. 外周血中性粒细胞 CD64 在细菌感染性疾病中的临床研究新进展[J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8(1): 1674-7151.
- [14] 王继辉,王昕,张庆. 降钙素原在辨别感染及指导抗生素使用的新进展[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(1): 119-120.
- [15] TEN O J, NETEA M G, KULLBERG B J. Utility of immune response-derived biomarkers in the differential diagnosis of inflammatory disorders[J]. J Infect, 2016, 72(1): 1-18.
- [16] 徐勤燕,丁志祥,周伊兰,等. 中性粒细胞 CD64 指数在鉴别类风湿关节炎合并感染中的应用评价[J]. 江苏大学学报(医学版), 2016, 26(5): 444-448.

(收稿日期:2018-01-18 修回日期:2018-05-02)

(上接第 2871 页)

- [10] ZAIMOKU Y, TAKAMI A, SATO H, et al. IgM anti-recipient ABO antibodies predict acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Int J Hematol, 2013, 98(1): 96-101.
- [11] KIM J G, SOHN S K, KIM D H, et al. Impact of ABO incompatibility on outcome after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2005, 35(5): 489-495.

- [12] GUTIÉRREZ-AGUIRRE C H, GÓMEZ-DE-LEÓN A, ALATORRE-RICARDO J, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning in an outpatient setting in ABO-incompatible patients: are survival and graft-versus-host disease different[J]. Transfusion, 2014, 54(5): 1269-1277.

(收稿日期:2018-01-30 修回日期:2018-05-16)