

• 临床检验研究 •

流式细胞术检测淋巴细胞亚群对发热患儿病原体判断的价值

赵文利¹, 吴柏杨², 吴丽娟³, 汤雪芹¹, 邓琼仙¹, 孙仙琳¹, 吕洁¹

(中国人民解放军成都军区总医院: 1. 儿科, 3. 检验科, 成都 610083; 2. 成都医学院 610083)

摘要:目的 评估流式细胞术(FCM)检测淋巴细胞亚群对发热患儿病原体判断的价值。方法 应用 FCM 检测 62 例发热患儿外周血淋巴细胞免疫表型(CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁻CD19⁺、CD3⁻CD16/56⁺), 同时进行外周血常规检查, 独立和联合判断患儿可能感染的病原体, 并进行比较。结果 FCM 检测发热患儿淋巴细胞亚群的异常率为 89%, 显著高于血常规法的 66%, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 两种方法联合判断时为 95%; FCM、血常规法和两种方法联合判断发热患儿的病原体感染情况时, FCM 能较多地发现病毒或胞内菌感染, 但病原体倾向不明显, 血常规法可能更容易提示为细菌感染, 而联合判断能提高病原体的诊断率。单独采用 FCM 和血常规法判断病原体的正确率分别为 82% 和 73%, 两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。单独采用 FCM 和血常规法对 62 例发热患儿感染病原体的正确判断率分别为 74% 和 66%, 联合判断时升至 90%。结论 FCM 淋巴细胞亚群检测联合血常规可提高对发热患儿病原体判断的准确率, 有利于指导临床合理用药。

关键词:流式细胞术; 淋巴细胞亚群; 发热; 病原体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)15-1692-02

Value of lymphocyte subgroup by flow cytometry for the judgment of pathogens in children with fever

Zhao Wenli¹, Wu Boyang², Wu Lijuan³, Tang Xueqin¹, Deng Qiongxi¹, Sun Xianlin¹, Lv Jie¹

(1. Department of Paediatrics; 3. Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China; 2. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

Abstract: **Objective** To assess the value of lymphocyte subgroup detected by flow cytometry(FCM) for the judgment of pathogens in children with fever. **Methods** The potential pathogens in 62 children with fever were independently and jointly judged by the detected results of the expression of lymphocyte subsets (including the percentage and level of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁻CD19⁺, CD3⁻CD16/56⁺) and blood routine test. **Results** The percentage of abnormal change in lymphocyte subset was 89% by FCM, significantly higher than 66% by blood routine test ($\chi^2 = 9.042, P < 0.01$), and increased to 95% by combined detection of the two methods. Among FCM, blood routine test and combined detection, for the judgment of pathogens, FCM could easily discover viral or intracellular bacterial infection, blood routine test could easily discover bacterial infection, and combined detection could improve the diagnostic rates of pathogens. The correct diagnostic rates of FCM and blood routine test for the judgment of pathogens were 83% and 73%, and there was no statistical difference between them ($P > 0.05$). The correct diagnostic rates of FCM and blood routine test for pathogens in 62 cases of children with fever were 74% and 66%, and rose to 90% of combined judgment. **Conclusion** Detection of lymphocyte subsets by FCM, combined with blood routine test, could increase the accurate rate for the judgment of pathogens in children with fever, and provide guidance for rational administration.

Key words: flow cytometry; lymphocyte subsets; fever; pathogen

超级细菌的出现引起临床对合理用药的极大关注^[1-3]。如何在现有检验检测条件下, 尽快判断可能的感染病原体以指导合理用药, 是摆在临床医师和检验工作者面前的重大命题。本研究旨在立足于本院新近建立起的流式细胞术(FCM)淋巴细胞亚群检测法和原有血常规法的检测条件下, 评价新的 FCM 对感染病原体的诊断价值, 以指导临床在常见发热患儿抗感染治疗时合理选择药物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集发热患儿 62 例, 为本院儿科和内科 2009 年 9 月至 2011 年 5 月住院患儿, 其中男 49 例, 女 13 例, 年龄 1~18 岁, 平均 12.8 岁; 全部患儿均有反复发热, 体温 37.9℃ 以上, 病程 0.5~390 d 不等。所有患儿均进行 FCM 和血常规测定, 将测定结果分为 FCM 组、血常规组、联合检测组进行分析。

1.2 方法 全部受检者用抗凝真空采血管采外周静脉血 2 mL 送检, 用三色免疫荧光多参数流式细胞仪(美国 FAC Sca libur BD 公司)检测外周血 T 淋巴细胞免疫表型(CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺)和 B 淋巴细胞(CD3⁻CD19⁺)、自然杀伤

(NK)细胞(CD3⁻CD16/56⁺)的数量, 并计算阳性百分率, 同时采用五分类法检测外周血常规。

1.3 感染病原体判断 淋巴细胞亚群检测结果判断标准: 分别按 CD4⁺/CD8⁺ 比值(CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺)、CD3⁺CD4⁺(T4 细胞)、CD3⁺CD8⁺(T8 细胞)、CD3⁺CD4⁻CD8⁻(双阴性 T 细胞)、CD3⁺CD4⁺CD8⁺(双阳性 T 细胞)、CD3⁻CD16/56⁺(NK 细胞)、CD3⁻CD19⁺(B 淋巴细胞)的顺序进行判断。本实验室 1~18 岁正常人群外周血 T 淋巴细胞亚群参考范围百分率($\bar{x} \pm 2s$)和绝对计数($\bar{x} \pm 2s$)分别为: CD3⁺为 58.4%~81.5% 和 $0.47 \sim 3.26 \times 10^9/L$; CD3⁺CD4⁺为 24.93%~45.57% 和 $(0.20 \sim 1.82) \times 10^9/L$; CD3⁺CD8⁺为 16.4%~33.7% 和 $(0.13 \sim 1.35) \times 10^9/L$; CD4⁺/CD8⁺ 比值为 0.89~2.01; CD3⁺CD4⁻CD8⁻ 为 0.00%~12.33% 和 $(0.00 \sim 0.29) \times 10^9/L$; CD3⁺CD4⁺CD8⁺ 为 0.00%~1.42% 和 $(0 \sim 0.03) \times 10^9/L$ 。B 细胞参考范围为 6.48%~16.6%, 绝对计数参考范围为 $(0.05 \sim 0.67) \times 10^9/L$ 。NK 细胞参考范围为 5.17%~24.65%, 绝对计数参考范围为 $(0.04 \sim 1.00) \times 10^9/L$ 。血常规考察白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞的绝对值和百

分比,以相应年龄段儿童正常参考值为标准进行判断。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行处理,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 发热患儿淋巴细胞亚群和血常规异常改变情况比较 FCM 组与血常规组比较,有统计学意义差异 ($\chi^2 = 9.042, P = 0.003$);FCM 组与联合检测组比较,差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.740, P = 0.187$);血常规组与联合检测组比较,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 16.74, P = 0.000$)。见表 1。

2.2 FCM 与血常规法对病原体的判断情况 各组间无显著

性差异,但 FCM 能较多地发现病毒或胞内菌感染,并反映出变态反应改变,也能提示存在感染,但病原体倾向不明显。而血常规可能更容易提示为细菌感染。两者联合可提高病原体的诊断率。见表 2。

表 1 发热患儿淋巴细胞亚群和血常规异常改变情况比较[n(%), n=62]

组别	异常率	正常率
FCM 组	55(89)	7(11)
血常规组	41(66)	21(34)
联合检测组	59(95)	3(5)

表 2 FCM、血常规法及两者联合对病原体的判断情况比较[n(%), n=62]

组别	病毒或胞内菌感染率	细菌感染率	混合感染率*	变态反应感染率	不确定感染率	无改变感染率
FCM 组	27(44)	19(31)	0(0)	1(2)	8(13)	7(11)
血常规组	17(27)	24(39)	0(0)	0(0)	0(0)	21(34)
联合检测组	26(42)	25(40)	4(6)	1(2)	3(5)	3(5)

*:指存在病毒或胞内菌和细菌联合感染后的改变特点。

2.3 FCM 与血常规法的判断正误率比较 对已明确所感染病原体的 56 例患儿,分别采用 FCM 与血常规法结果进行独立判断,与确诊结果一致则正确,不一致则错误,由此比较两种方法的判断正误率。FCM 组和血常规组判断病原体的正误率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.287, P = 0.257$),见表 3。

表 3 FCM 与血常规法的判断正误率比较[n(%), n=56]

组别	正确率	错误率
FCM 组	46(82)	10(18)
血常规组	41(73)	15(27)

2.4 FCM 与血常规法独立和联合判断对发热患儿感染病原体的正确判断率 FCM 组与血常规组比较,差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.963, P = 0.326$);FCM 组与联合检测组比较,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.526, P = 0.019$);血常规组与联合检测组比较,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.653, P = 0.001$),见表 4。

表 4 FCM 与血常规法对发热患儿感染病原体的判断正确率比较[n(%), n=62]

组别	判断正确率	其他*
FCM 组	46(74)	16(26)
血常规组	41(66)	21(34)
联合检测组	56(90)	6(10)

*:包括有改变但不明确、误判或没变化的病例。

3 讨论

当病原体突破黏膜和皮肤屏障进入机体引起感染并导致发热时,一般机体的非特异性和特异性免疫已相继启动^[4-5],出现免疫细胞、细胞因子的连锁反应。为了实现合理用药,就必须进行靶向抗感染,因此临床上需要尽快明确所感染的病原体。可以采用培养法、ELISA 法寻找病原体感染的直接或间接依据,但这些方法均不能快捷、简便得到结果;采用 PCR 法直接检测常见病原体是未来方向之一^[6],但也存在取样难、检测准确性较差等问题;也可采用 C 反应蛋白(CRP)或降钙素原检测^[7],但这 2 个指标倾向于对细菌感染的判断;白细胞介素(IL)-2 是急性反应蛋白,IL-6 是已知最早出现的感染指标,干扰素(IFN)- γ 具有抗肿瘤和免疫调节作用,同时检测感染相关

细胞因子群的变化^[8],判断感染病原体,目前在国内不少大型医院已开展;传统的血常规检测在感染病原体的判断上是有一定价值的,但显然远不能满足准确、快速的临床需求;而 FCM 淋巴细胞亚群检测可快速、简便、直接评估感染时全程参与的 T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞亚群、NK 细胞的比例和绝对计数^[9],对感染病原体的判断价值值得关注。不同的病原体引起机体免疫细胞的动态变化是有规律可循的。

本研究采用 FCM 联合血常规检测淋巴细胞亚群的变化情况,以期早期判断发热患儿可能感染的病原体。结果发现对发热患儿感染后机体免疫细胞异常改变的检测率 FCM 和血常规法分别为 89% 和 66%,差异显著,尤其是早期免疫应答的改变。FCM 能较多地发现病毒或胞内菌感染,但病原体倾向不明显,而血常规可能更容易提示为细菌感染,两者联合可提高病原体的诊断率。对已明确感染病原体的 56 例发热患儿,单独采用 FCM 和血常规判断的正确率分别为 82% 和 73%,但两种方法的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。单独采用 FCM 和血常规法对发热患儿感染病原体的正确判断率分别为 74% 和 66%,两种方法联合判断时正确判断率显著升高至 90%。

综上所述,在临床工作中,面对发热患儿时应高度重视淋巴细胞亚群的检测,通过联合血常规结果,实现快速、简便的病原体判断,指导临床合理用药。本研究结果还提示,现有方法仍不完善,根据病情进展适时动态检测并与其他检测方法联合,有利于提高感染病原体的正确判断率。

参考文献

- [1] Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, et al. Balkan NDM-1: escape or transplant? [J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(3): 164.
- [2] Helali A. Rational use of medicines[J]. Med Trop (Mars), 2006, 66(6): 619-622.
- [3] Guo Y, Wang J, Niu G, et al. A structural view of the antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug[J]. Protein Cell, 2011, 2(5): 384-394.
- [4] 杨锡强. T 细胞亚群的临床意义[J]. 中国实用儿科杂志, 2000, 4(15): 250-251.
- [5] 庄然. 人类 NK 细胞的亚群及其特征[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 645-648.
- [6] 黄烈, 曾凡胜, 王琼, 等. 多重 PCR 检测儿童呼(下转第 1695 页)

0.05), 而采用 CD45/SSC 设门法测得的 CD8 细胞绝对值高于 CD3/SSC 设门法, 差异有统计学意义 ($P=0.011$), 见表 1。

表 1 CD45/SSC 与 CD3/SSC 设门法检测淋巴细胞亚群结果比较

指标	CD45/SSC	CD3/SSC	P
CD3 ⁺ 细胞(%)	64.4±8.75	—	—
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞(%)	34.2±8.65	—	—
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞(%)	25.4±7.29	—	—
CD3 ⁺ 细胞绝对值(/mL)	907.6±593.9	926.5±589.1	0.650
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞绝对值(/mL)	475.5±277.7	501.4±285.7	0.078
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞绝对值(/mL)	388.0±293.3	364.7±284.4	0.011

—: 无数据。

2.2 两种设门方法测定结果的线性方程及相关系数 对相关系数(r)进行相关性分析, 结果 P 均小于 0.05, 表明采用两种设门方法所测得的绝对值结果性关系良好。见表 2。

表 2 CD45/SSC 与 CD3/SSC 设门检测淋巴细胞亚群绝对值的相关性分析

指标	线性方程	相关系数(r)
CD3 ⁺ 细胞绝对值	$Y=0.944\ 5X+69.241$	0.962
CD3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞绝对值	$Y=1.003\ 9X+23.973$	0.999
CD3 ⁺ CD8 ⁺ 细胞绝对值	$Y=0.964\ 9X-9.698$	0.995

3 讨论

利用 FCM 分析血液标本中 T 淋巴细胞亚群的方法很多, 常用的有 FSC/SSC、CD45/SSC 和 CD3/SSC 设门法等。FSC/SSC 设门法是利用细胞的前向散射角和侧向散射角即光散射物理特性来设门识别淋巴细胞。这种设门方法由于没有考虑细胞的生物学特性, 容易受到多种因素如有核红细胞、单核细胞、小的粒细胞、嗜碱性粒细胞等的干扰, 无法将具有相同光散射特性的淋巴细胞和干扰杂质准确区别开来, 使淋巴细胞百分率计算不准确而常导致分析结果产生误差。

引入 CD45、CD3 单克隆抗体测定 T 淋巴细胞亚群绝对值是基于细胞的生物学特性, 使用多参数 FCM 分析。许多学者证实, CD45 是一种表达于白细胞的分化抗原, 造血系统细胞 CD45 的荧光强度(FI)与细胞分化程度有关, 即分化程度高的成熟白细胞, 其 CD45 的 FI 也高, 分化程度低的细胞其 FI 也低, 而红系细胞的 FI 最低。在成熟白细胞中, 各类细胞 CD45 的 FI 亦不相同, 其中淋巴细胞和单核细胞的 FI 高于中性粒细胞。因此, 根据各类细胞 CD45 的 FI 和颗粒密度不同, 采用 CD45/SSC 设门法可以将原始细胞(低 FI、低或高 SSC)、淋巴细胞(高 FI、低 SSC)、单核细胞(高 FI、中等 SSC)、中性粒细胞(低 FI、高 SSC)、红系细胞(最低 FI、低或高 SSC)和细胞碎片(最低 FI、最低 SSC)清楚地区分开。CD45/SSC 设门法是以 CD45 在细胞膜表达强度及颗粒的多少来区分细胞群, 设定的细胞群为 CD45 高表达、低 SSC 的淋巴细胞, 排除了非淋巴细胞的影响, 从而保证了所分析的全是淋巴细胞。CD3 是一种表达于 T 淋巴细胞的分化抗原, 具有更高的特异性, 采用

CD3/SSC 设门法可以将 CD3⁺ 细胞和 CD3⁻ 细胞清楚地区分开, 因此该设门法具有更高的准确性。目前大多实验室都采用 CD45/SSC 和 CD3/SSC 设门法对淋巴细胞亚群绝对值进行分析, 但对两种方法的结果比较尚未见报道。本实验结果显示, CD45/SSC 和 CD3/SSC 设门法测定 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺ 细胞绝对值差异无统计学意义 ($P>0.05$), 其结果相关性良好^[7]。

笔者发现, CD3/SSC 设门法得到的数据比较有限, 较 CD45/SSC 设门法可提供的信息少。比如 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞占淋巴细胞的比例在 CD3/SSC 设门中无法得知(见表 1), 因此, 笔者建议在一般情况下采用 CD45/SSC 设门法。但 CD45/SSC 设门法也有缺陷性^[8-10]; 当淋巴细胞群与其他细胞群分离不佳时, 很难将所有淋巴细胞都区分出来, 这时只有采用 CD3/SSC 设门法才能将 CD3⁺ 细胞和 CD3⁻ 细胞分离开来。目前, 实验室常常结合使用 CD45/SSC 和 CD3/SSC 两种设门方法进行分析。在本实验中也发现, 用 CD3/SSC 设门法时, 有些细胞会出现 CD3 弱表达, 在散点图中 CD3⁺、CD3⁻ 细胞群会连在一起, 很难将 CD3⁺ 细胞准确地区分出来, 但这种情况出现的概率远低于 CD45/SSC 设门法。可见, CD45/SSC、CD3/SSC 设门方法各有优缺点, 在实际工作中可相互结合、互为补充。

参考文献

- [1] Maino VC, Picker LJ. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression[J]. Cytometry, 1998, 34(5): 207-215.
- [2] 王建中. 流式细胞分析在严重急性呼吸综合征临床研究中的应用[J]. 中国医疗器械杂志, 2003, 9(3): 19-21.
- [3] 李太生, 邱志峰, 韩杨, 等. 严重急性呼吸综合征急性期 T 淋巴细胞亚群异常改变[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(5): 297-299.
- [4] 王建中, 王淑娟. 当前临床式细胞分析的发展趋势[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(1): 5-7.
- [5] NCCLS. H42-T Clinical applications of flow cytometry: quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes [S]. Wayne PA: NCCLS, 1992.
- [6] Béné MC, Kolopp Sarda MN, El Kaissouni J, et al. Automated cell count in flow cytometry: a valuable tool to assess CD4 absolute levels in peripheral blood[J]. Am J Clin Pathol, 1998, 110(3): 321-326.
- [7] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 23-25.
- [8] 赵广玲, 许洪志, 黄敏, 等. 骨髓增生异常综合征和再生障碍性贫血患者骨髓原始细胞免疫表型分析[J]. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47(2): 53-57.
- [9] 姚志娟, 廖丽, 党永辉, 等. 180 例急性白血病流式细胞术免疫分型的特点分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2004, 12(1): 83-85.
- [10] 陈珊珊. 流式细胞术用于临床检验中得一些问题[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(4): 197-198.

(收稿日期: 2011-06-10)

(上接第 1693 页)

吸道感染常见病毒[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(7): 665-667.

[7] 黄彩芝, 莫丽亚, 李先斌, 等. 不同细菌感染所致脓毒症患儿血清降钙素原水平的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1110-1111.

[8] 黄忠强, 吴华伟, 王伟利. T 细胞、细胞因子在抗病毒免疫中的作用机制[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2006(4): 2-4.

[9] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010.

(收稿日期: 2011-06-10)