

• 临床检验研究 •

急性呼吸系统感染性疾病流式淋巴细胞亚群检测诊断效率的回顾性调查

胡莉娜, 吴丽娟, 古 宇, 刘毓刚, 但 刚
(成都军区总医院检验科, 成都 610083)

摘要:目的 调查淋巴细胞亚群对急性呼吸系统感染性疾病的诊断价值, 为规范流式淋巴细胞亚群检验报告提供科学依据。方法 回顾性分析 71 例急性呼吸系统感染性疾病的流式淋巴细胞亚群检测结果和血常规淋巴细胞测定结果, 比较各项指标在辅助临床诊断中的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、误诊率、漏诊率及诊断符合率的差异性。结果 在急性呼吸系统感染性疾病的诊断中完整的淋巴细胞亚群检测的诊断效率比完整的 T 淋巴细胞亚群检测高 ($\chi^2=20.83, P<0.01$); 完整的 T 淋巴细胞亚群检测比传统的 T 淋巴细胞亚群百分含量加绝对计数联合检测的诊断效率高 ($\chi^2=11.5, P<0.01$); 传统的 T 淋巴细胞亚群百分含量加绝对计数联合检测比单一的 T 淋巴细胞亚群百分含量检测的诊断效率高 ($\chi^2=4.0, P<0.05$)。结论 流式细胞术外周血淋巴细胞亚群检测比血常规更能及时有效地提示急性呼吸系统感染性疾病的临床诊断, 并对疾病的治疗疗效和预后有着重要的临床意义。

关键词: 呼吸系统; 传染病; 淋巴细胞亚群; 双阴性 T 细胞; 双阳性 T 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)20-2308-02

Retrospective study on lymphocyte subgroups by flow cytometry in patients with infectious diseases in respiratory apparatus

Hu Lina, Wu Lijuan, Gu Yu, Liu Yugang, Dan Gang

(Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China)

Abstract: **Objective** To survey lymphocyte subsets of acute respiratory system of infectious diseases diagnosis value, in order to regulate the streaming lymphocyte subsets inspection reports provide the scientific basis. **Methods** Retrospective analysis of 113 cases of acute respiratory system of infectious diseases streaming lymphocyte subsets detection results and routine blood lymphocyte determination result, comparison of various indexes in clinical diagnosis of auxiliary sensibility specificity, positive, negative predictive prediction, the misdiagnosis rate, and the differences of the missed diagnosis was. **Results** Complete lymphocyte subsets detection acute respiratory system of infectious diseases diagnosis efficiency than complete T lymphocytes and group of detection high ($\chi^2=20.83, P<0.01$); Complete T lymphocyte subsets detection than traditional T lymphocyte subsets percentage content and absolute count joint test to diagnose efficiency high ($\chi^2=11.5, P<0.01$); The traditional T lymphocyte subsets percentage content and absolute count than single joint test T lymphocyte subsets percentage content detection diagnosis high efficiency ($\chi^2=4.0, P<0.05$). **Conclusion** Streaming cells during the peripheral blood lymphocyte subsets than routine blood test can more effectively and timely tips acute respiratory system of clinical diagnosis of infectious diseases, and the treatment of diseases effect and prognosis has important clinical significance.

Key words: respiratory system; communicable diseases; lymphocyte subsets; double negative T-cell; double positive T-cell

呼吸系统感染性疾病在临床十分常见, 医师通常通过血常规检查, 根据外周血白细胞总数及分类结果粗略判断感染的大致类型, 如是细菌性感染、病毒性感染、细菌与病毒的混合性感染及寄生虫感染等, 在细菌学培养鉴定和病毒、寄生虫免疫血清学诊断尚未完成前, 结合胸部放射性检查结果即经验性给予患者以初步治疗, 待 3~4 d 后全部检验报告出来后, 再进一步诊断和判断是否需要调整治疗用药物等。因此, 在呼吸系统感染性疾病的快速诊断方面, 临床急需新型、更加准确地检验指标予以支持。淋巴细胞是机体最主要的免疫细胞群, 外周血淋巴细胞亚群测定是反映机体免疫功能状态的重要指标, 对于感染类型的判断及体内免疫功能状态的适时了解均有裨益^[1]。本研究回顾调查流式细胞术外周血淋巴细胞亚群检测对呼吸系统感染性疾病的临床诊断价值, 并探讨了双阴性 T 细胞、双阳性 T 细胞在呼吸系统感染性疾病诊断中的应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 为本院 2010~2011 年门诊收治的发热待查患者 113 例, 男 83 例, 女 30 例; 年龄 2~84 岁, 平均 39 岁。最终明确诊断为急性呼吸系统感染 71 例, 男 50 例, 女 21 例; 年龄 2~84 岁, 平均 35 岁。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞亚群测定 采用三色流式细胞术、SSC/FSC 设门淋巴细胞分析总 T 细胞 (CD3⁺)、T₄ 细胞 (CD3⁺ CD4⁺)、T₈ 细胞 (CD3⁺ CD8⁺)、DN-T 细胞 (双阴性细胞, CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻)、DP-T 细胞 (双阳性细胞, CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺) 和 T₄/T₈ 比值、B 细胞 (CD3⁻ CD19⁺) 和 NK 细胞 (CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺) 亚群的含量, 具体方法参见参考文献 [2] 执行。全部试剂为美国 Beckman-Coulter 公司产品, 仪器采用 Beckman-Coulter XL4-MCL 型流式细胞仪。

1.2.2 血常规分析 采用深圳迈瑞 BC-5500 全自动五分类血细胞分析仪检测淋巴细胞百分含量及其绝对计数。试剂为原装配套试剂 (溶血素、稀释液、清洗液、校准品、质控品)。

1.2.3 实验诊断的判断标准 以健康人群血常规和流式淋巴细胞亚群参考范围的 98% 区间为判断依据, 将检测结果落于参考范围之外者记录为诊断阳性。

1.3 统计学处理 各组合之间比较用 χ^2 检验。采用四表格计算各项指标的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、误诊率、漏诊率及诊断符合率。计算公式: 灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) × 100%; 特异性 = 真阴性 / (假阳性 + 真阴性)

$\times 100\%$; 阳性预测值 = 真阳性 / (真阳性 + 假阳性) $\times 100\%$; 阴性预测值 = 真阴性 / (假阴性 + 真阴性) $\times 100\%$; 误诊率 = 假阳性 / (假阳性 + 真阴性) $\times 100\%$; 漏诊率 = 假阴性 / (真阳性 + 假阴性) $\times 100\%$; 诊断符合率 = (真阳性 + 真阴性) / (真阳性 + 假阴性 + 假阳性 + 真阴性) $\times 100\%$ 。

2 结 果

在 71 例急性呼吸系统感染患者中, 流式淋巴细胞亚群结果百分比异常的是总 T 细胞有 31 例, T₄ 细胞有 33 例, T₈ 细

胞有 33 例, DN-T 细胞有 7 例, DP-T 细胞有 10 例, B 细胞有 28 例, NK 细胞有 16 例。流式细胞细胞亚群结果绝对计数异常的是总 T 细胞有 19 例, T₄ 细胞有 21 例, T₈ 细胞有 13 例, DN-T 细胞有 4 例, DP-T 细胞有 8 例, B 细胞有 10 例, NK 细胞有 7 例。T₄/T₈ 比值异常的有 38 例。白细胞异常的有 38 例, 淋巴细胞百分比异常的有 49 例, 绝对计数异常的有 15 例。上述结果经过处理后得到的流式淋巴细胞亚群和血常规淋巴细胞各项指标的诊断价值评价指标见表 1。

表 1 流式淋巴细胞亚群和血常规白细胞各项指标的临床诊断价值(%)

组合项目		检测内容	灵敏度	特异性	阳性 预测值	阴性 预测值	误检率	漏检率	诊断 符合率
代号	项目								
A	传统 T 淋巴细胞亚群百分比构成	总 T 细胞百分数, T ₄ 细胞百分数, T ₈ 细胞百分数, T ₄ /T ₈ 比值	76.06	45.24	70.13	52.77	54.76	23.94	64.60
B	传统 T 淋巴细胞亚群百分含量和绝对计数	总 T 细胞百分数, T ₄ 细胞百分数, T ₈ 细胞百分数, 总 T 细胞数, T ₄ 细胞数, T ₈ 细胞数, T ₄ /T ₈ 比值	78.87	42.86	70.00	54.55	57.14	21.13	65.49
C	完整 T 淋巴细胞亚群	总 T 细胞百分数, T ₄ 细胞百分数, T ₈ 细胞百分数, DN-T 细胞百分数, DP-T 细胞百分数, 总 T 细胞数, T ₄ 细胞数, T ₈ 细胞数, DN-T 细胞数, DP-T 细胞数, T ₄ /T ₈ 比值	85.92	38.33	68.54	58.33	66.67	14.08	66.37
D	完整淋巴细胞亚群	总 T 细胞百分数, T ₄ 细胞百分数, T ₈ 细胞百分数, DN-T 细胞百分数, DP-T 细胞百分数, B 细胞百分数, NK 细胞百分数, 总 T 细胞数, T ₄ 细胞数, T ₈ 细胞数, DN-T 细胞数, DP-T 细胞数, B 细胞数, NK 细胞数, T ₄ /T ₈ 比值	91.55	32.57	68.42	66.67	71.43	8.45	68.15
E	血常规白细胞检查	白细胞总数, 淋巴细胞分类数	73.32	21.16	61.46	32.53	79.11	27.35	54.42

3 讨 论

人体的免疫系统, 主要肩负着免疫防护、免疫稳定以及免疫监视的作用, 对入侵的外源性抗原物质如细菌、病毒和体内出现的异常细胞如肿瘤细胞、胞内微生物感染细胞等, 能及时产生免疫应答予以杀灭, 不至于造成机体的损伤。但当其结构或功能有缺陷或失调时, 就会引起严重的危害人体的传染病、肿瘤以及自身免疫病等疾患。CD3⁺CD4⁺ 细胞和 CD3⁺CD8⁺ 细胞是 T 淋巴细胞中功能相异的两个亚群, 在机体免疫应答中分别起辅助、诱导和抑制、细胞毒作用, 发挥正、负调节作用, 形成 T 细胞网络。他们通过细胞间的直接接触或通过释放细胞因子, 导致或抑制效应, 使免疫应答在双向调控下表现出适当的强度。一般的病原微生物感染不同程度上将引起 Th 淋巴细胞数量上的降低, 导致 Th/Ts 比值倒置, 且以全身性感染时 Th 亚群的这种变化幅度最为明显, 另外以侵袭和破坏机体免疫系统的感染引起的变化幅度最大。临床抗感染治疗有效时, 可以观察到 Th 细胞数量上的增加以及 Th/Ts 的比值逐渐恢复^[3-4]。NK 细胞(CD16⁺56⁺): NK 细胞在免疫系统中起着举足轻重的作用。它不依赖抗体、补体及预先致敏即可快速杀死肿瘤细胞, 并与单核细胞, 粒细胞等协同作用, 而起到抗肿瘤抗感染的免疫调节作用, 通常在感染的极早期或早期升高, 在感染的中后期下降。B 细胞升高通常提示细菌性感染。

本实验主要讨论在发热患者中, 淋巴细胞亚群检测对急性呼吸系统感染性疾病的诊断效率。在以往, 发热患者检查都是通过查外周血象的白细胞及分类来判断有无感染, 由于项目单一, 不能全面的反应患者机体整个免疫功能的改变。通过本实

验数据分析, 传统 T 淋巴细胞亚群百分比诊断急性呼吸系统感染性疾病的灵敏度为 76.06%, 特异性为 45.24%, 诊断符合率为 64.60%; 传统 T 淋巴细胞亚群百分比和绝对计数联合诊断的灵敏度比 A 提高了 2.81%, 诊断符合率提高了 0.89%; 当 T 淋巴细胞亚群中含有 DP-T 细胞和 DN-T 细胞百分比和绝对计数联合检测后其诊断的敏感性比 B 提高了 7.05%, 诊断符合率提高了 0.90%; 完整的 T 细胞亚群和 B 细胞、NK 细胞联合检测其诊断的敏感性比 C 提高了 5.63%, 诊断符合率提高了 1.78%; 血常规的白细胞和淋巴细胞百分比加绝对计数检测的灵敏度为 73.32%, 特异性为 21.16%, 诊断符合率为 54.42%, 均低于淋巴细胞亚群各组合。通过这些数据比较可以看出淋巴细胞亚群全面检测对于急性呼吸系统感染性疾病的诊断大大提高。另外我们还发现在这 71 例患者中有 3 例肺部感染患者只有双阳性 T 细胞绝对含量发生了改变其余检测指标均无变化, 这可以有效的提示临床医生患者出现了免疫系统的改变, 有感染发生^[5], 因此在流式细胞的检测中应该包含有双阴性和双阳性 T 细胞百分含量和绝对值计数的指标。所以对于刚入院检查的发热患者, 需要做流式淋巴细胞亚群的检测(总 T 细胞、T₄ 细胞、T₈ 细胞、B 细胞、NK 细胞、双阴性 T 细胞、双阳性 T 细胞的百分含量和绝对计数以及 T₄/T₈ 的比值), 这样大大地提高了临床上对急性呼吸系统感染性疾病的诊断。近年来, 多项研究发现, 恶性肿瘤、结核、慢性阻塞性肺病急性发作以及慢性支气管炎急性发作等患者较健康人群免疫力低下^[6-8], 通过给予免疫调节剂来纠正机体的免疫失衡状态在很大程度上可以缓解病情, 缩短疗程, 改(下转第 2312 页)

2.3 动员后单采样品质量鉴定结果 本组 8 例患者采用化疗联合粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)动员造血干细胞。外周血干细胞采集从开始动员后每天复查血常规至 WBC 最低点后,此时做外周血单个核细胞计数及外周血 CD34⁺ 阳性细胞计数,结果 87.5% 的患者动员效果较好,其单个核细胞含量均在 70.0% 以上,只有 1 例患者单个核细胞含量不足 70.0%。CD34⁺ 细胞总数大于 4×10^6 /kg 体质量者占 90.0%,总体看经动员后干细胞释放效果达到要求,见表 1。

2.4 回输前复苏冻存单采样品的质量鉴定结果 比较冻存前后单个核细胞含量,细胞数量在冻存后存在一定衰减,但衰减量小于 10.0%,经 *t* 检验证实冻存前后差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

3 讨 论

AHSCT 作为目前治疗恶性血液系统疾病的重要方法之一与其他移植相比,其具有干细胞来源不受供者的限制、预处理强度低、移植相关并发症少、安全性高、受年龄限制小、适用人群广及花费相对较少等优点,具有显著临床优势^[5]。经研究表明,目前应用流式细胞术能更加准确获得干/祖细胞含量,对移植单采样品质量进行分析,有效提高干细胞移植治疗效果。移植治疗过程中由于正常外周血中造血干细胞浓度很低^[2],患者采用化疗联合粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)动员后,造血干细胞显著增加,但这种情况维持时间较短暂^[3],因此,选择恰当的指标和合适的时间来确定采集时机对提高采集效果很重要。分析结果其中有几点需要特别注意,由于干细胞计数对于 AHSCT 十分重要,即使是动员后的单采标本,CD34⁺ 细胞含量仍然较少,因此送检一定要及时,标本采集后应按急诊样品 30 min 内进行检测,否则容易造成阳性细胞丢失。另外,检测中同型对照管十分重要,每份标本检测时必须设置同型对照管进行平行测定,用于对仪器各荧光通道电压是否合适的审核与调节,同时有助于发现个别存在污染荧光物质的情况。

本组研究通过建立三色流式细胞术造血干/祖细胞分类计数方法对临床实施 AHSCT 提供了有效指导,主要用于临床进行干细胞采集前,对于细胞捐献者动员后外周血 CD34 干细胞的动员效果进行监测和实施单采的时机判断,辅助临床制定单采计划。另外,用于单采物质质量的鉴别,造血干细胞表达 CD34 不表达 CD38,造血祖细胞既表达 CD34 也表达 CD38,以 CD45 作为外周血有核细胞的标志^[6-7],结合 CD34 和 CD38 单抗,通过流式细胞术可对传统意义上的干细胞总数(CD34⁺ 细胞总

数)进行测定,并同步分别测定造血干细胞和造血祖细胞数量,一般来说,单采物单个核细胞含量可以反映单采效果,质量较好的单采物其单个核细胞含量应大于总细胞数量的 70% 以上。还可用于 CD34 细胞总数的测定,辅助临床做出是否继续或停止单采的判断。为了确保干细胞移植成功,采集的 CD34⁺ 细胞总数应大于 4×10^6 /kg 体质量。另外,单采物中造血干细胞和造血祖细胞数量的测定,可用于单采量的精确计算和预后判断。干细胞移植希望移植的是真正的造血干细胞而不是造血祖细胞,质量满意的单采物应该含有高浓度的造血干细胞。通过分类计数可准确获得干/祖细胞数。

参考文献

- [1] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:60-71.
- [2] Gratama JW, Orfao A, Barnett D, et al. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Cytometry, 1998, 34(2): 128-142.
- [3] Siena S, Bregni M, Brando B, et al. Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor[J]. Blood, 1989, 74(1): 1905-1914.
- [4] Mougi H, Shinmyozu K, Osame M, et al. Determining the optimal time for peripheral blood stem cell harvest by detecting immature cells (immature leukocytes and immature reticulocytes) using two newly developed automatic cell analyzers[J]. Int J Hematol, 1997, 66(3): 303-313.
- [5] Barnett D, Janossy G, Lukenko A, et al. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34⁺ haematopoietic stem cell. Prepared by the CD34⁺ haematopoietic stem cell working party. General haematology task force of the british committee for standards in haematology[J]. Clin Lab Haematol, 1999, 21(5): 301-308.
- [6] Pollard Y, Watts MJ, Grant D, et al. Use of the hemopoietec progenitor cell count of the Sysmex SE29500 to refine apheresis timing of peripheral blood stem cells[J]. Br J Haematol, 1999, 106(2): 538-544.
- [7] 江雁, 穆红, 唐志琴, 等. 急性白血病系列特异性抗原表达分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 338-339.

(收稿日期: 2011-08-08)

(上接第 2309 页)

善预后。所以,对于急性呼吸系统感染性疾病的诊断,流式淋巴细胞亚群检测优于血常规,这些指标对临床的治疗疗效和预后有着重要的临床意义。

参考文献

- [1] Tanaka S, Isoda F, Ishihara Y, et al. T Lymphopenia in relation to body mass index and TNF2- γ in human obesity: adequate weight reduction can be corrective[J]. Clinical Endocrinology, 2001, 54(4): 347-354.
- [2] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:1, 78-88, 119-122, 124-127.
- [3] 吴丽娟, 刘丁, 陈伟, 等. 外周血 T 淋巴细胞免疫功能与医院感染的关系[J]. 重庆医学, 2006, 35(23): 2124-2125.

- [4] 刘建强, 李秀武, 杨志英, 等. 肺结核并呼吸衰竭患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 河北医药, 2010, 32(15): 2075-2077.
- [5] 裴宇容, 何宗忠, 孙德华, 等. 手足口病患儿 T 淋巴细胞亚群与双阴性调节性 T 细胞的检测及其临床意义[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(1): 49-51.
- [6] 金从国, 王熙才, 伍治平, 等. 癌症患者外周血 T 细胞亚群水平及临床意义[J]. 肿瘤研究与临床, 2003, 15(1): 33-34.
- [7] 于春宝, 左云, 王俊玲, 等. 肺结核患者细胞免疫功能的研究[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(2): 138-140.
- [8] 高越, 何建如, 陈小青, 等. 慢性支气管炎急性发作期患者 T 淋巴细胞亚群的研究[J]. 科技通报, 2001, 17(2): 67-69.

(收稿日期: 2011-08-08)