

· 论 著 ·

腹水 CD64 指数对失代偿期肝硬化并发自发性细菌性腹膜炎的诊断价值

刘光亮¹, 王娜^{1,2}, 陈春波², 陶鹏¹, 张大志¹, 周智¹, 胡鹏¹, 孙航², 刘杞^{2△}

(1. 重庆医科大学附属第二医院感染科 400010; 2. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 400042)

摘要:目的 检测失代偿期肝硬化患者腹水 CD64 指数,探讨其在自发性细菌性腹膜炎(SBP)中的诊断价值。方法 将失代偿期肝硬化伴腹水患者分为非 SBP 组、SBP 疑诊组和 SBP 确诊组,并设阴性和阳性对照组(非 SBP 组、腹水细菌培养阳性组);依据腹痛及外周血中性粒细胞百分比,将 SBP 疑诊组进一步分组,流式细胞术检测各组的腹水 CD64 指数;并比较抗菌药物治疗后腹水 CD64 指数的差异。分析腹水 CD64 指数、腹水 WBC 计数及降钙素原诊断 SBP 的效能。结果 腹水 CD64 指数在 SBP 确诊组(179.39±65.56)及 SBP 疑诊组(115.49±58.42)高于非 SBP 组(26.88±26.05),差异有统计学意义($P<0.01$)。SBP 疑诊伴腹痛组与无痛组腹水 CD64 指数差异无统计学意义($P>0.05$)。SBP 疑诊伴外周血中性粒细胞百分比升高组较无外周血中性粒细胞百分比升高组腹水 CD64 指数水平明显升高($P<0.05$)。治疗无效组的 CD64 指数水平明显高于治疗有效组($P<0.01$)。腹水 CD64 指数曲线下面积大于降钙素原及腹水 WBC 计数,并具有较高的灵敏度及特异度。结论 腹水 CD64 指数检测快捷,影响因素少,可为临床上诊断 SBP 提供一种新选择。

关键词:肝硬化;腹水;流式细胞术;自发性细菌性腹膜炎;CD64 指数

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)32-3863-04

Significance of the ascites CD64 index in patients with decompensated cirrhosis complicated with spontaneous bacterial peritonitis

Liu Guangliang¹, Wang Na^{1,2}, Chen Chunbo², Tao Peng¹,
Zhang Dazhi¹, Zhou Zhi¹, Hu Peng¹, Sun Hang², Liu Qi^{2△}

(1. Department of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To detect the ascites CD64 index of patients with decompensated cirrhosis, and explore the value in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis(SBP). Methods Decompensated cirrhosis with ascites patients were divided into non-SBP group, SBP suspected group and SBP diagnosed group. Two control groups were composed of patients with ascites culture positive and non-SBP group. SBP suspected group were further grouped according to abdominal pain and the percentage of peripheral blood neutrophils. The CD64 index was detected by flow cytometry. Compared the difference of ascites CD64 index after treatment, and analyzed diagnosis performance of procalcitonin in human peripheral blood and ascites white blood cell count of SBP. Results The level of the ascites CD64 index was significantly higher in SBP diagnosed group(179.39±65.56) and SBP suspected group(115.49±58.42) than that of non-SBP group(26.88±26.05) ($P<0.01$). The differences of the ascites CD64 index between SBP suspected associated with abdominal pain group and SBP suspected associated with painless group was not statistically significant ($P>0.05$). The level of the ascites CD64 index in SBP suspected with percentage of peripheral blood neutrophils elevated group was increased significantly than non-elevated group ($P<0.05$). CD64 index level in effective treatment group was significantly lower than the ineffective treatment group ($P<0.01$). The area of the ascites CD64 index under the curve was greater than procalcitonin in human peripheral blood and ascites WBC count, and had a higher sensitivity and specificity. Conclusion The detection process of the ascites CD64 index is fast and with less influential factors, which provides a new choice for the clinical diagnosis of SBP.

Key words: liver cirrhosis; ascites; flow cytometry; spontaneous bacterial peritonitis; CD64 index

失代偿期肝硬化患者机体免疫功能低下,门静脉高压,肠道充血、水肿,细菌容易通过受损的肠道黏膜屏障进入循环系统,导致自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP),但 SBP 的症状、体征往往不够典型,难以早期诊断及治疗,成为肝硬化患者最重要的死因之一^[1-2]。中性粒细胞 CD64 分子在细菌感染时明显升高,在病毒感染以及类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等非细菌性炎症时不会增加^[3]。流式细胞术检测 WBC 的 CD64 分子表达操作简单、快捷,影响因素少。CD64 指数是对 CD64 分子表达进行量化,在细菌感染诊断中的灵敏度及特异度均较高^[4-6]。SBP 的早期是一种局部

感染,目前鲜见对其直接感染部位标本——腹水的 CD64 指数的报道。本研究通过检测失代偿期肝硬化患者腹水 CD64 指数,探讨其在 SBP 诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2012 年 8 月至 2012 年 10 月失代偿期肝硬化伴腹水的患者,诊断符合《病毒性肝炎防治指南》^[7] 的 56 例血清腹水清蛋白梯度(serum ascites albumin gradient, SSAG)≥11 g/L 的患者纳入研究。根据症状、体征、血培养、胸片或胸部 CT 等检查排除腹腔外其他系统感染。根据临床表现、实验室检查结果,分为非 SBP 组、SBP 疑诊组、SBP 确诊

组,并对肝脏储备功能进行 Child-Pugh 评分,见表 1。以非 SBP 组为阴性对照组,腹水细菌培养阳性为阳性对照组。腹水细菌培养结果为大肠埃希菌 3 例,肺炎克雷伯杆菌 1 例,金黄色葡萄球菌 1 例,均来自 SBP 确诊组。并依据腹痛及外周血中性粒细胞百分比情况将 SBP 疑似组进一步分组分析。

表 1 患者一般资料

项目	非 SBP 组 (n=12)	SBP 疑似组 (n=35)	SBP 确诊组 (n=9)
性别(男/女)	9/3	27/8	7/2
年龄(岁)	50.25±17.76	56.62±11.51	55.75±11.78
乙型肝炎肝硬化(n)	5	18	3
丙型肝炎肝硬化(n)	1	5	1
酒精性肝硬化(n)	2	1	1
乙型肝炎合并酒精性肝硬化(n)	1	2	0
丙型肝炎合并酒精性肝硬化(n)	0	3	1
肝硬化合并原发性肝癌(n)	1	1	2
原发性胆汁性肝硬化(n)	1	2	1
隐源性肝硬化(n)	1	3	0
Child-Pugh 评分($\bar{x}\pm s$)	10.63±1.59	10.52±2.25	9.25±2.22

1.2 诊断标准及排除标准 SBP 诊断标准^[1,8]:(1)局部症状和(或)腹膜炎表现为腹痛、腹部压痛、呕吐、腹泻、肠梗阻;(2)全身炎症表现为低热或高热、寒战、外周血 WBC 计数异常,呼吸急促和(或)心动过速;(3)肝功能恶化;(4)未予抗菌药物预防用药的胃肠道出血;(5)无明显原因的急性肾功能损伤;(6)休克;(7)肝性脑病;(8)腹水中性粒细胞计数大于或等于 $250\times 10^6/L$;(9)腹水细菌培养阳性;(10) SAAG ≥ 11 g/L。符合(10)及(8)~(9)中至少 1 项即可确诊,符合(10)及(1)~(7)中至少 1 项为临床疑似。排除标准:近 1 个月有继发性腹腔感染、其他系统感染及使用抗菌药物。SBP 疑似组和 SBP 确诊组使用抗菌药物 7 d 后判断治疗效果,疗效判定标准(1)治疗有效组:局部症状、腹膜炎、全身炎症表现逐渐缓解,复查腹水中性粒细胞计数小于 $250\times 10^6/L$,腹水细菌培养阴性;(2)治疗无效组:局部症状、腹膜炎、全身炎症表现不缓解或持续加重,复查腹水中性粒细胞计数大于或等于 $250\times 10^6/L$ 或腹水细菌培养阳性。

1.3 实验仪器及试剂 Eppendorf 5810R 高速冷冻离心机、美国 BD 公司 CANTO-II 流式细胞仪由重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供,人 CD64 检测试剂盒(含 CD45-PERCP 及 CD64-PE)、红细胞裂解液购自美国 BD 公司。血常规、肝肾功能及腹水白蛋白、降钙素原、凝血功能,由本院检验科分别采用 SYSMEX XT-2000i 血常规仪、HITACHI7600 型全自动生化分析仪、COBASE411 电化学发光仪、STAGO-COMPACT 血凝分析仪及其配套试剂检测。

1.4 外周血及腹水标本采集 入院后 24 h 内,抗菌药物使用前,采集外周血送本院检验科行血常规、肝肾功能、凝血功能、降钙素原等检查。腹腔穿刺术无菌抽取 10~15 mL 腹水行细菌培养,5 mL 腹水行腹水清蛋白定量,100 mL 腹水行人工腹水细胞计数,若腹水 WBC $>300\times 10^6/L$ 则进行细胞分类;送 100 mL 腹水至流式细胞室,在 5 h 内完成 CD64 指数检测。肝

硬化疑似组和确诊组患者在使用抗菌药物治疗 7 d 后采集腹水和外周血行上述检测。

1.5 腹水 WBC 的 CD64 分子检测 100 mL 腹水 250 g 离心 8 min,去上清,调整细胞数至 $(1\sim 2)\times 10^6/mL$,取 1 mL 细胞悬液用 $50\ \mu m$ 的尼龙筛网过滤至流式细胞专用管,250 g 离心 8 min 后去上清液,残留 100 μL 细胞悬液,每管加入人 CD64 检测试剂盒抗体 20 μL ,混匀后室温避光染色 60 min,红细胞裂解液溶血洗涤后上机检测,侧向角散射光信号(side scatter, SSC)和 CD45 设门确定单核细胞群、淋巴细胞群、中性粒细胞群,门内的细胞数在 10 000 个以上,测定 CD64 的平均荧光强度(mean fluorescent intensity, MFI),并计算 CD64 指数(待测中性粒细胞 CD64 MFI 与淋巴细胞 CD64 MFI 比值)^[9]。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行分析,所有计量数据进行正态性检验,正态分布数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,若同时满足方差齐性,组间比较采用 *t* 检验,否则采取非参数检验。用受试者工作特征曲线(ROC)分析腹水 CD64 指数、腹水 WBC 计数及降钙素原诊断 SBP 的效能,曲线下面积比较采用 *Z* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术检测 流式细胞术检测的散点图中淋巴细胞是 CD64 分子表达的内部阴性对照,单核细胞是 CD64 分子表达的内部阳性对照。中性粒细胞 CD64 分子表达在 SBP 确诊组高于 SBP 疑似组,阳性对照组高于阴性对照组,见图 1。

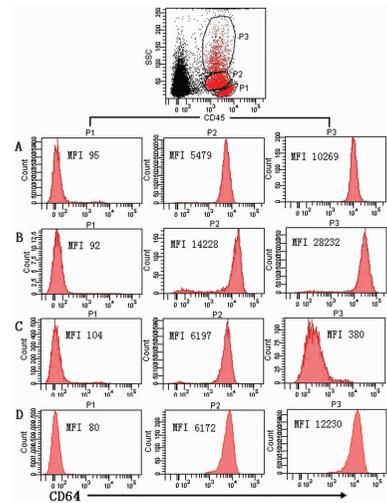


图 1 流式细胞术检测腹水 WBC 的 CD64 分子表达图
A: SBP 疑似组; B: SBP 确诊组; C: 阴性对照组; D: 阳性对照组;
P1: 淋巴细胞群; P2: 单核细胞群; P3: 中性粒细胞群。

图 1 流式细胞术检测腹水 WBC 的 CD64 分子表达图

2.2 各组腹水 CD64 指数比较 SBP 确诊组、SBP 疑似组、阳性对照组腹水 CD64 指数较阴性对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$); SBP 确诊组腹水 CD64 指数较 SBP 疑似组升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 SBP 疑似各组指标比较 SBP 疑似伴腹痛组降钙素原、腹水 WBC 计数、腹水 CD64 指数高于无腹痛组,但差异无统计学差异($P>0.05$),见表 3。SBP 疑似伴外周血中性粒细胞百分比升高组降钙素原、腹水 WBC 计数、腹水 CD64 指数都高于无外周血中性粒细胞百分比升高组,但只有腹水 CD64 指数在两组间的差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

2.4 治疗有效组与无效组各指标比较 治疗无效组的腹水 CD64 指数高于治疗有效组,差异有统计学意义($P<0.01$),治疗无效组的腹水 WBC 计数、外周血 WBC、外周血中性粒细胞

百分比、降钙素原高于治疗有效组,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 5。

2.5 诊断指标的 ROC 分析 按照腹痛、外周血中性粒细胞百分比升高分组,腹水 CD64 指数曲线下面积与 0.5 相比较,差异具有统计学意义($P<0.01$),降钙素原曲线下面积与 0.5 相

比较, P 分别为: $P>0.05$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 。按照 2010 年欧洲肝病学会指南进行分组,腹水 CD64 指数曲线下面积与 0.5 相比较,差异有统计学意义($P<0.05$),降钙素原曲线下面积与 0.5 相比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 6。

表 2 各组指标比较($\bar{x}\pm s$)

指标	SBP 确诊组($n=9$)	SBP 疑诊组($n=35$)	阴性对照组($n=12$)	阳性对照组($n=5$)
腹水淋巴细胞 CD64 MFI	89.75±17.12	91.00±42.31	131.25±66.81	82.20±22.47
腹水单核细胞 CD64 MFI	6 905.25±5 176.97	5 204.67±2 696.32	5 490.38±4 539.08	6 854.60±4 484.82
腹水中性粒细胞 CD64 MFI	16 466.50±7 676.85	10 318.90±4 998.01	4 857.13±6 683.71	16 273.60±6 662.32
腹水 CD64 指数	179.39±65.56 ^{ab}	115.49±58.42 ^a	26.88±26.05	203.14±77.73 ^a
腹水 WBC 计数($\times 10^9/L$)	1 364.25±1 299.78	145.33±116.77	78.75±37.58	1 656.00±1 194.57
外周血 WBC($\times 10^9/L$)	4.35±1.19	4.83±3.03	3.73±1.79	4.55±1.12
外周血中性粒细胞百分比(%)	69.10±8.91	70.40±9.71	64.68±5.10	70.62±8.43
外周血降钙素原(ng/mL)	0.54±0.23	0.45±0.31	0.24±0.17	0.57±0.21

^a: $P<0.01$,与阴性对照组比较;^b: $P<0.05$,与 SBP 疑诊组比较。

表 3 SBP 疑诊伴腹痛组与无腹痛组各指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	腹水 CD64 指数	腹水 WBC 计数($\times 10^6/L$)	外周血 WBC($\times 10^9/L$)	外周血中性粒细胞百分比(%)	外周血降钙素原(ng/mL)
伴腹痛组	15	120.16±61.29	157.89±121.61	4.92±3.20	69.43±5.62	0.46±0.28
无腹痛组	20	100.53±27.47	70.00±26.46	4.30±2.09	76.17±4.67	0.33±0.29
P		0.598	0.237	0.687	0.278	0.698

表 4 SBP 疑诊伴外周血中性粒细胞百分比升高组与无外周血中性粒细胞百分比升高组各指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	腹水 CD64 指数	腹水 WBC 计数($\times 10^6/L$)	外周血 WBC($\times 10^9/L$)	外周血中性粒细胞百分比(%)	外周血 PCT(ng/mL)
伴外周血中性粒细胞百分比升高组	18	144.23±62.76	148.91±122.46	5.82±3.80	77.90±4.70	0.56±0.34
无外周血中性粒细胞百分比升高组	17	87.79±33.82	141.40±116.63	3.73±1.34	62.14±6.38	0.31±0.21
P		0.021	0.887	0.116	—	0.064

—:此项无数据。

表 5 治疗有效组与无效组的各指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	腹水 CD64 指数	腹水 WBC 计数($\times 10^6/L$)	外周血 WBC($\times 10^9/L$)	外周血中性粒细胞百分比(%)	外周血降钙素原(ng/mL)
治疗有效组	29	70.83±37.81	137.50±104.81	3.90±1.47	65.44±7.98	0.27±0.21
治疗无效组	15	147.84±69.30	177.00±153.33	5.70±3.63	72.48±10.18	0.48±0.32
P		0.003	0.469	0.126	0.075	0.073

表 6 各组腹水 CD64 指数、腹水 WBC 计数、外周血中性粒细胞百分比 ROC 比较

项目	腹水 CD64 指数				腹水 WBC 计数				外周血降钙素原			
	AUC	临界值	灵敏度(%)	特异度(%)	AUC	临界值($\times 10^6/L$)	灵敏度(%)	特异度(%)	AUC	临界值(ng/mL)	灵敏度(%)	特异度(%)
腹痛	0.825	78.07	85.7	75.0	0.720	105	61.9	83.3	0.692	0.38	61.9	66.7
外周血中性粒细胞百分比	0.867	96.94	85.7	78.9	0.645	145	57.1	78.9	0.720	0.42	71.4	73.6
外周血中性粒细胞百分比和腹痛	0.905	110.80	90.9	81.8	0.754	115	81.8	77.2	0.800	0.44	81.8	77.2
2010 欧洲肝病学会指南	0.862	128.60	75.0	82.7	—	—	—	—	0.655	0.48	75.0	69.0

—:此项无数据。

3 讨 论

失代偿期肝硬化患者免疫功能低下,容易导致 SBP。肝硬化常合并脾功能亢进,导致 WBC 水平下降,并发细菌感染时,外周血 WBC 难以上升到临床上的常规诊断标准,灵敏度较低。临床判断细菌感染的常用指标,如外周血 WBC、外周血中性粒细胞百分比、红细胞沉降率、血清 C 反应蛋白、降钙素原,均属于细菌感染的非特异度指标,在心肌梗死、急性创伤、外科手术、肿瘤浸润等情况也会增加。腹水细菌培养是判断感染细菌的金标准,但所需时间长,灵敏度也较低。

CD64 是免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段受体,属免疫球蛋白超家族成员,主要分布于单核细胞、巨噬细胞表面,中性粒细胞表面一般为低水平表达,在细菌细胞壁的脂多糖、 γ 干扰素、白细胞介素-12 等因子刺激下,可使 CD64 分子在中性粒细胞表面大量表达^[10-11]。机体受到细菌感染时,中性粒细胞 CD64 分子表达在 4 h 内明显增高^[12],因此可以作为早期诊断的依据。

早期的 SBP 是一种局部感染,根据 2010 年欧洲肝病学会指南^[8],腹水中性粒细胞计数是诊断 SBP 灵敏度较好的指标。但受到腹水红细胞、利尿、大量腹水等因素影响,导致其灵敏度降低。本实验通过对腹水中性粒细胞 CD64 分子表达的研究,从而避开了这些因素的影响。研究结果显示,SBP 疑似组及 SBP 确诊组的腹水 CD64 指数明显高于非 SBP 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明腹水 CD64 指数对能够有效地诊断 SBP。结合临床资料对 SBP 疑似组进一步分析,腹痛分组标准下,两组间腹水 CD64 指数的差异无统计学意义($P > 0.05$);按外周血中性粒细胞百分比是否升高分组,两组间腹水 CD64 指数的差异有统计学意义($P < 0.05$);提示外周血中性粒细胞百分比可能对 SBP 的诊断有一定帮助,但失代偿期肝硬化患者常伴有脾功能亢进,且免疫功能低下,发生感染后,外周血中性粒细胞百分比不一定会升高,故价值有限。治疗无效组的腹水 CD64 指数明显高于治疗有效组($P < 0.01$)。考虑治疗无效组持续存在细菌感染,通过细菌细胞壁的脂多糖、 γ 干扰素、白细胞介素-12 等因子刺激,导致 SBP 患者腹水中性粒细胞 CD64 分子持续高表达。因此,腹水 CD64 指数能够有效地反映 SBP 抗感染的治疗效果,有望成为临床评估 SBP 抗菌药物使用疗效的新指标。

同时,对腹水 CD64 指数、降钙素原、腹水 WBC 计数 3 种指标的 SBP 诊断效能行 ROC 分析,结果显示,腹水 CD64 指数 ROC 下面积均较大于降钙素原和腹水 WBC 计数,跟 0.5 比较,差异更显著。有研究指出^[13-15],降钙素原在诊断肺炎、败血症等细菌感染时有较好的灵敏度及特异度,但在腹部感染的诊断中无明显有益的证据。本研究显示,在 SBP 的诊断中,腹水 CD64 指数较降钙素原、腹水 WBC 计数具有更高的灵敏度及特异度。

综上所述,腹水 CD64 指数在 SBP 的诊断中具有较高灵敏度和特异度,可作为指导临床合理使用抗菌药物的一种新的参考指标,以减少细菌耐药及二重感染的产生。

参考文献:

[1] Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis:an update[J]. *Hepatology*,2010,49(6):

2087-2107.

- [2] Wiest R,Garcia-Tsao G. Bacterial Translocation(BT) in Cirrhosis[J]. *Hepatology*,2005,41(3):422-433.
- [3] Allen E,Bakke AC,Purtzer MZ, et al. Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections[J]. *Ann Rheum Dis*,2002,61(5):522-525.
- [4] Migita K,Agematsu K,Yamazaki K, et al. Expression of CD64 on polymorphonuclear neutrophils in patients with familial mediterranean fever[J]. *Clin Exp Immunol*,2011,164(3):365-372.
- [5] 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.
- [6] Bhandari V,Wang C,Rinder C, et al. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker[J]. *Pediatrics*,2008,121(2):129-134.
- [7] 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治指南[J]. *中华肝病杂志*,2000,8(3):324-329.
- [8] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis[J]. *J Hepatol*,2010,53(4):397-417.
- [9] Ccardi M,Erickson Y,Kilborn S, et al. CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients [J]. *J Clin Microbiol*,2009,47(148):3914-3919.
- [10] Daeron M. Fc receptor biology[J]. *Ann Rev Immunol*,1997,15(2):203-234.
- [11] Okayama Y,Kirshenbaum AS,Metcalf DD. Expression of a functional high-affinity IgG receptor,fcgr1, on human mast cells:up-regulation by IFN- γ [J]. *J Immunol*,2000,164(40):4332-4339.
- [12] Danikas DD,Karakantza M,Theodorou GL, et al. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression[J]. *Clin Exp Immunol*,2008,154(1):87-97.
- [13] Mussap M,Degrandi R,Cataldi L, et al. Biochemical markers for the early assessment of neonatal sepsis: the role of proaleitonin[J]. *Chemother*,2007,19(1):35-43.
- [14] Spada S,Cuccu A,Mussap M, et al. Reliability of procalcitonin in neonatology. Experience in 59 preterm newborns[J]. *Matern Fetal Neonatal Med*,2009,22(1):96-101.
- [15] Schuetz P,Albrich W,Mueller B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future[J]. *BMC Med*,2011,9(1):107-116.

(收稿日期:2013-06-01 修回日期:2013-06-28)