

网络出版时间: 2018-5-23 14:14 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.030.html>

鉴别鲍曼不动杆菌定植与感染的临床指标研究

宋 骏^{1,2}, 黄升海¹, 钟 民²

摘要 目的 探讨 T 淋巴细胞亚群与细胞因子在鉴别鲍曼不动杆菌定植与感染中的临床意义。方法 选取 109 例痰培养分离出鲍曼不动杆菌的住院患者,根据中华医学会呼吸分会医院获得性肺炎的诊断标准分为鲍曼不动杆菌定植组 53 例和感染组 56 例。另选择 50 例健康人群作为对照组,检测各组外周血 T 淋巴细胞亚群与细胞因子,并比较各组间的差异。应用 Spearman 相关分析,探讨影响 T 淋巴细胞亚群、细胞因子的相关影响因素;应用 Logistic 回归分析,了解 T 淋巴细胞亚群、细胞因子是否为鲍曼不动杆菌感染的独立影响因素。结果 在鲍曼不动杆菌定植组与感染组之间,T 淋巴细胞亚群、TNF- α 、IFN- γ 、IL-17 存在显著性的差异。鲍曼不动杆菌感染与 TNF- α ($r_s = 0.241$, $P = 0.012$)、IFN- γ ($r_s = 0.235$, $P = 0.014$)、IL-2 ($r_s = 0.249$, $P = 0.009$)、IL-4 ($r_s = 0.268$, $P = 0.005$) 和 IL-17 ($r_s = 0.538$, $P < 0.001$) 存在正相关,与 CD3⁺ ($r_s = -0.193$, $P = 0.045$) 和 CD4⁺/CD8⁺ ($r_s = -0.302$, $P = 0.001$) 存在负相关。多因素 Logistic 回归分析显示 IFN- γ ($OR = 1.420$) 和 IL-17 ($OR = 1.511$) 是鲍曼不动杆菌感染的危险因素。结论 血清 IFN- γ 、IL-17 可作为鉴别鲍曼不动杆菌感染与定植的指标,并可为抗菌药物的合理使用以及医院感染的预防、控制提供依据。

关键词 鲍曼不动杆菌; T 淋巴细胞亚群; 细胞因子; 定植; 感染

中图分类号 R 372; R 446.63

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0967-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.030

鲍曼不动杆菌是一种非发酵性的革兰阴性杆菌,广泛存在于自然环境中,可定植于人体皮肤、与外界相通的腔道中。文献^[1]报道,在入院 48 h 内,约 40% 的普通患者可出现鲍曼不动杆菌定植,而重症患者可高达 75%。鲍曼不动杆菌定植是引起医院院内感染的高危因素,也是住院患者呼吸系统获得性感染的重要来源。由于其对多数常用的抗菌药

物耐药,发生感染后的及时治疗非常关键,因此鉴别定植或感染,对于避免抗菌药物的滥用和及时的抗菌治疗具有重要意义。但是,针对住院患者痰等标本培养出来的鲍曼不动杆菌,目前国内外尚无统一标准来判断分离的是定植还是感染。研究^[2-3]表明,鲍曼不动杆菌感染可引起细胞免疫功能的改变,并导致多种细胞因子的表达水平发生显著变化。因此,该研究通过检测鲍曼不动杆菌定植、感染患者的 T 淋巴细胞亚群、血清细胞因子水平,探讨上述指标在鉴别鲍曼不动杆菌下呼吸道定植与感染中的临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2016 年 1 月~11 月在皖南医学院第一附属医院住院治疗,且连续痰培养 2 次以上为鲍曼不动杆菌优势生长的患者。根据中华医学会呼吸病学分会医院获得性肺炎的诊断标准,分为定植组(观察期间未出现医院获得性肺炎)和感染组(发生医院获得性肺炎)。排除标准如下:①下呼吸道分泌物培养出现其他病原菌或在其他部位有感染的患者;②使用激素类及免疫抑制类药物治疗期内的患者;③病程小于 2 周患者。收集来源于同一医院健康管理中心的体检正常者 50 例作为对照。

1.2 方法

1.2.1 痰培养 取患者合格痰标本进行培养,采用 VITEK-2 自动微生物分析仪(法国生物梅里埃),按照《全国临床检验操作规程》中华人民共和国卫生部医政司(第 3 版)的检验程序进行细菌鉴定。

1.2.2 标本采集 清晨采用 EDTA-K₂ 抗凝的真空采血管和普通真空采血管,分别抽取空腹的住院患者与体检者肘部静脉血 2、3 ml。

1.2.3 T 淋巴细胞亚群检测 取 5 只流式管,编号为 1、2、3、4、5,分别将 100 μ l 抗凝全血或 Immunotrol 质控血加入 1~5 号试管后,依次各加入 20 μ l 的 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5 于试管 1; CD4-FITC 于试管 2; CD8-PE 于试管 3; CD3-PC5 于试管 4; CD4FITC/CD8PE/CD3PC5 三种抗体混合加于试管 5。振荡混匀后,室温避光反应 20 min;取出试管,每

2018-03-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81371797)

作者单位: ¹ 安徽医科大学基础医学院微生物学教研室,合肥 230032

² 皖南医学院第一附属医院,芜湖 241001

作者简介: 宋 骏,男,硕士研究生;

黄升海,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: huangshh68@aliyun.com

管加入 500 μ l Optilyse C, 即刻震荡混匀后, 室温避光反应 10 ~ 15 min, 管内液体透亮; 每管加 500 μ l 的 PBS, 震荡混匀后, 室温避光反应 10 min 后, 即可上机检测(若不能及时上机, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 24 h 内上机检测)。采用流式细胞仪(FC-500, 贝克曼, 美国)分析和检测。

1.2.4 细胞因子检测 按照试剂盒(Abnova 公司)说明书操作, 分别测定血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4) 和白细胞介素 17 (IL-17) 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件(IBM SPSS, Inc., Chicago, USA) 进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素 ANOVA 分析, 多组间两两比较采用 SNK 法; 计数资料以例数表示, 组间比较采用 χ^2 检验进行比较。变量间相关分析采用 Spearman 相关分析。鲍曼不动杆菌感染的影响因素采用多因素 Logistic 回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组、鲍曼不动杆菌定植组和感染组各项指标的比较 计量资料三组间两两比较结果显示, 感染组、定植组和对照组在年龄、性别上差异无统计学意义($P > 0.05$)。感染组 CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 水平均低于定植组和对照组($P < 0.05$), 而定植组和对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$); 感染组 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$

比值低于定植组和对照组($P < 0.05$); 感染组 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-17 水平均高于定植组和对照组($P < 0.05$), 且定植组也高于对照组($P > 0.05$); 感染组和定植组 IL-2、IL-4 水平均高于对照组($P < 0.05$), 而感染组和定植组间差异无显著性。见表 1。

2.2 鲍曼不动杆菌感染与 T 淋巴细胞亚群、血清细胞因子水平的相关性 Spearson 相关分析表明, 鲍曼不动杆菌感染与 TNF- α ($r_s = 0.241$, $P = 0.012$)、IFN- γ ($r_s = 0.235$, $P = 0.014$)、IL-2 ($r_s = 0.249$, $P = 0.009$)、IL-4 ($r_s = 0.268$, $P = 0.005$)、IL-17 ($r_s = 0.538$, $P = 0.000$) 呈正相关性, 与 CD3 $^{+}$ ($r_s = -0.193$, $P = 0.045$)、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ ($r_s = -0.302$, $P = 0.001$) 呈负相关性。

2.3 鲍曼不动杆菌感染的多因素 Logistic 回归分析 单因素 Logistic 回归分析显示, CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、TNF- α 、IFN- γ 和 IL-17 是鲍曼不动杆菌的感染的因素($P < 0.05$), 而 IL-2 和 IL-4 对鲍曼不动杆菌的感染无影响($P > 0.05$)。根据纳入($\alpha = 0.05$)与排除($\beta = 0.10$)标准, CD3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 、TNF- α 、IFN- γ 和 IL-17 6 个因素进入多因素 Logistic 回归分析(逐步回归法)显示, IL-17 ($OR = 1.511$) 和 IFN- γ ($OR = 1.420$) 是鲍曼不动杆菌的感染的危险因素($P < 0.05$); CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ ($OR = 0.025$)、CD4 $^{+}$ ($OR = 0.854$) 和 CD3 $^{+}$ ($OR = 0.885$) 是鲍曼不动杆菌的感染的保护因素($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 对照组、鲍曼不动杆菌定植组和感染组多项指标的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 ($n=50$)	定植组 ($n=53$)	感染组 ($n=56$)	F/χ^2 值	P 值
年龄(年)	68.32 $\pm$ 14.23	67.13 $\pm$ 16.21	68.39 $\pm$ 16.21	0.109	0.897
性别(男/女)	31/19	34/19	33/23	0.318	0.853
CD3 $^{+}$ (%)	69.43 $\pm$ 4.38	68.42 $\pm$ 3.95	66.31 $\pm$ 5.02 *	6.772	0.002
CD4 $^{+}$ (%)	35.37 $\pm$ 3.17	34.97 $\pm$ 2.79	32.66 $\pm$ 7.23 *	4.801	0.009
CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$	1.83 $\pm$ 0.20	1.28 $\pm$ 0.26 *	1.13 $\pm$ 0.15 *	158.192	0.000
TNF- α (pg/ml)	2.31 $\pm$ 0.25	5.02 $\pm$ 3.20 *	6.84 $\pm$ 3.06 *	40.406	0.000
IFN- γ (pg/ml)	2.70 $\pm$ 0.24	5.65 $\pm$ 2.58 *	7.16 $\pm$ 2.48 *	61.139	0.000
IL-2 (pg/ml)	2.24 $\pm$ 0.42	2.47 $\pm$ 0.37 *	2.60 $\pm$ 0.54 *	8.582	0.000
IL-4 (pg/ml)	5.71 $\pm$ 1.33	6.78 $\pm$ 0.84 *	7.00 $\pm$ 0.78 *	24.722	0.000
IL-17 (pg/ml)	2.54 $\pm$ 0.47	5.15 $\pm$ 3.41 *	10.24 $\pm$ 3.20 *	108.644	0.000

与对照组比较: $^{*} P < 0.05$; 与定植组比较: $^{*} P < 0.05$

表 2 鲍曼不动杆菌感染的多因素 Logistic 回归分析

项目	β	$S. E.$	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	$OR(95\% CI)$
CD3 $^{+}$	-0.122	0.062	3.920	0.048	0.885	0.784 ~ 0.999
CD4 $^{+}$	-0.158	0.061	6.706	0.010	0.854	0.757 ~ 0.962
CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$	-3.673	1.745	4.432	0.035	0.025	0.001 ~ 0.776
IFN- γ	0.351	0.120	8.568	0.003	1.420	1.123 ~ 1.797
IL-17	0.412	0.082	25.511	0.000	1.511	1.287 ~ 1.773
Contant	12.599	5.541	5.171	0.023	-	-

3 讨论

鲍曼不动杆菌在各种环境中均易于生存和繁殖。随着各类抗菌药物的广泛使用,多重耐药鲍曼不动杆菌的感染发生率也出现显著增加^[4]。尤其在免疫力低下的患者中,由于缺乏有效的药物治疗,其安全和医疗质量受到极大的影响^[5-6]。细菌定植是发生医院院内感染的先兆,及时发现鲍曼不动杆菌的定植并采取相应措施控制其感染意义重大,但根据患者的初期临床表现或者细菌培养结果无法确定为感染菌或定植菌^[7-8]。本研究期望从免疫水平方向寻找一些有力的证据。

研究^[9]表明鲍曼不动杆菌的感染往往可引起患者局部和全身的免疫应答,导致免疫细胞和细胞因子水平的改变。在机体免疫系统中,T淋巴细胞具有重要功能的一个细胞群,依据其细胞表面抗原可分为不同的亚群。当机体免疫功能异常,例如细菌感染时,T淋巴细胞亚群可发生数量的改变^[10]。CD3⁺代表的是成熟的活性T淋巴细胞,是细胞免疫中主要的活性细胞,CD3⁺细胞又可进一步被分为辅助性T淋巴细胞(CD3⁺CD4⁺)和细胞毒性T淋巴细胞(CD3⁺CD8⁺)。研究^[10]表明CD4⁺/CD8⁺的比值是评估机体内免疫平衡的敏感指标,该比值的下降往往提示机体免疫功能的降低。Jeong et al^[11]发现在机会致病菌(包括鲍曼不动杆菌)引起院内感染的高龄患者中,死亡患者的CD4⁺T淋巴细胞的数量及CD4⁺/CD8⁺的比值均呈现显著下降。本研究的结果显示,鲍曼不动杆菌感染患者的CD4⁺T淋巴细胞数量及CD4⁺/CD8⁺比值显著低于鲍曼不动杆菌定植患者和正常对照,并且鲍曼不动杆菌感染与CD4⁺/CD8⁺比值存在负相关。

在小鼠模型中,经气管接种鲍曼不动杆菌后,小鼠肺部可出现多种病理改变,并刺激产生多种细胞因子,例如TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IL-23等^[12]。正常情况下CD4⁺T淋巴细胞通常处于前体状态,在特异性抗原的刺激和不同细胞因子作用下可进一步分化为Th1、Th2细胞。Th1型免疫反应可增强机体对微生物感染的免疫能力和防御功能,而Th2型免疫反应主要与感染的进展、持续化和慢性化有关^[13]。有研究^[14]表明在鲍曼不动杆菌感染可通过激活树突状细胞,刺激CD4⁺T淋巴细胞向Th1分化,引起Th1/Th2比值的升高。TNF- α 、IFN- γ 、主要由Th1细胞分泌产生,本研究观察到鲍曼不动杆菌感染组患者的血清TNF- α 、IFN- γ 水平显著高于定植组以及

对照组。IL-2、IL-4主要由Th2细胞分泌产生,所以在鲍曼不动杆菌感染组和定植组之间,本研究未发现血清IL-2和IL-4水平存在显著性差异。Spearson相关分析证实鲍曼不动杆菌感染与血清TNF- α ($r_s = 0.241$, $P = 0.012$)、IFN- γ ($r_s = 0.235$, $P = 0.014$)水平存在正相关,与上述报道结果相一致。多因素Logistic回归分析筛选出血清IFN- γ 水平升高是鲍曼不动杆菌感染的危险因素。

Breslow et al^[2]在鲍曼不动杆菌肺部感染的小鼠模型中,可观察到肺部组织中性粒细胞的大量募集,并且证实中性粒细胞是免疫应答过程中主要的免疫细胞。鲍曼不动杆菌感染后,IL-17通过诱导趋化因子的大量产生在中性粒细胞募集并最终清除细菌的过程中发挥关键作用^[15]。本研究显示鲍曼不动杆菌感染组患者血清IL-17($r_s = 0.538$, $P = 0.000$)水平显著升高,并且与鲍曼不动杆菌的感染存在正相关。多因素Logistic回归分析筛选出血清IL-17水平升高是鲍曼不动杆菌感染的危险因素。

本研究还存在一定的不足。首先,在严格控制入选标准下纳入的样本量较小;其次,来源于不同报道的血清细胞因子测定值差异较大,血清细胞因子的临床检测还有待进一步的标准化;再次,由于鲍曼不动杆菌定植与感染的判断需要回顾性分析,目前尚无法进行前瞻性随访研究。因此,T淋巴细胞亚群、血清细胞因子对鉴别鲍曼不动杆菌定植与感染的临床价值有待大样本、多中心研究的进一步证实。

综上所述,鲍曼不动杆菌感染导致患者免疫系统功能发生明显变化,与定植患者存在显著差异,表现为CD4⁺/CD8⁺比值降低、血清TNF- α 、IFN- γ 及IL-17显著升高。血清IFN- γ 、IL-17可作为鉴别鲍曼不动杆菌感染与定植的指标,并且可为抗菌药物的合理使用以及医院感染的预防、控制提供依据。

参考文献

- [1] Apisarnthanarak A, Pinitchai U, Thongphubeth K, et al. A multifaceted intervention to reduce pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in 3 intensive care units in a Thai tertiary care center: a 3-year study[J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(6): 760-7.
- [2] Breslow J M, Meissler J J Jr, Hartzell R R, et al. Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance[J]. Infect Immun, 2011, 79(8): 3317-27.
- [3] Jun S H, Lee J H, Kim B R, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71751.

- [4] 胡伟,张婷,孙成,等. 某三甲医院2012-2015年抗菌药物使用强度与鲍曼不动杆菌耐药性的相关性分析[J]. 安徽医药, 2017, 21(7): 653-5.
- [5] 宋晓萍,陈佳红,翟军清,等. 青岛地区重症监护病房分离的鲍曼不动杆菌耐药特征及碳青霉烯酶基因型的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(3): 216-20.
- [6] 赵洪峰,任淑华,蔡艺飞. ICU患者鲍氏不动杆菌定植感染的调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(4): 693-5.
- [7] 白国强,董磊,李昂,等. 鲍曼不动杆菌定植与感染鉴定方法的对照研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(21): 1705-8.
- [8] 韩忠学,刘静,巩静. 降钙素原在鲍曼不动杆菌定植与感染鉴别中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(3): 407-8.
- [9] 陈森,邹志玲,陈雪梅. 鲍曼不动杆菌感染和IL-17介导的免疫过程[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(4): 514-6.
- [10] 陈少艳,刘基铎,肖明锋,等. 淋巴细胞亚群检测在感染性疾病中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(2): 206-8.
- [11] Jeong S J, Yoon S S, Han S H, et al. Evaluation of humoral immune response to nosocomial pathogen and functional status in elderly patients with sepsis [J]. Arch Gerontol Geriatr, 2014, 58(1): 10-4.
- [12] 张瑞凌,洗盈,张扣兴. 鲍曼不动杆菌感染与免疫研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(2): 224-8.
- [13] de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, et al. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii* [J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10732.
- [14] Lee J S, Lee J C, Lee C M, et al. Outer membrane protein A of *Acinetobacter baumannii* induces differentiation of CD4⁺ T cells toward a Th1 polarizing phenotype through the activation of dendritic cells [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 74(1): 86-97.
- [15] Yan Z, Yang J, Hu R, et al. *Acinetobacter baumannii* infection and IL-17 mediated immunity [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 9834020.

The study of clinical indicators for identification of colonization and infection of *Acinetobacter baumannii*

Song Jun^{1,2}, Huang Shenghai¹, Zhong Min²

(¹Dept of Microbiology, Anhui Medical university, Hefei 230032;

²The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001)

Abstract Objective To explore the clinical significance of T lymphocyte subsets and cytokines in the identification of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection. **Methods** A total of 109 patients in hospital who had *A. baumannii* in sputum were collected. All patients were divided into colonization group (53 cases) and infection group (56 cases) according to the diagnostic criteria of hospital-acquired pneumonia by respiratory society, Chinese medical association. Another 50 healthy cases as control group. T lymphocyte subgroup and cytokines in peripheral blood were measured, the differences of T lymphocyte subgroup or cytokines between the groups were also compared. The factors of T lymphocyte subgroup or cytokines were analyzed by Spearman correlation analysis. Logistic regression analysis was used for investigating the predictors for the infection of *A. baumannii*. **Results** Between colonization group and infection group, the significant differences were been found in T lymphocytes subgroup, TNF- α , IFN- γ and IL-17. The *A. baumannii* infection was positively associated with TNF- α ($r_s = 0.241$, $P = 0.012$), IFN- γ ($r_s = 0.235$, $P = 0.014$), IL-2 ($r_s = 0.249$, $P = 0.009$), IL-4 ($r_s = 0.268$, $P = 0.005$) and IL-17 ($r_s = 0.538$, $P = 0.000$), whereas which was negatively associated with CD3⁺ ($r_s = -0.193$, $P = 0.045$) and CD4⁺/CD8⁺ ($r_s = -0.302$, $P = 0.001$). IFN- γ and IL-17 was the independent factors for discrimination of *A. baumannii* infection by multivariate Logistic regression analysis. **Conclusion** Serum IFN- γ , IL-17 can be used as an indicator of *Acinetobacter baumannii* infection and colonization, and can provide a basis for the rational use of antimicrobial agents and nosocomial infection prevention and control.

Key words *Acinetobacter baumannii*; T lymphocytes subgroup; cytokine; colonization; infection