

А. Е. Гончаров^{1,2}, Е. Г. Рында^{1,2}, О. Ч. Глаз³, С. О. Вельгин³,
А. П. Кудин⁴, В. Г. Гудков¹, С. В. Дорогова¹

ТЕСТ АКТИВАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ И ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск¹,
Институту биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси²,
Городская клиническая инфекционная больница, Минск³,
Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск⁴

Проблема дифференциальной диагностики бактериальной и вирусной этиологии острых кишечных инфекций является чрезвычайно актуальной для здравоохранения, так как клинические проявления вирусных и бактериальных инфекций имеют много общих черт, что не позволяет врачам на раннем амбулаторном и госпитальном этапах достоверно определиться с этиологией заболевания.

Целью исследования являлась разработка метод дифференциальной диагностики ОКИ бактериальной и вирусной этиологии на основе определения маркеров активации нейтрофилов и моноцитов периферической крови.

Материалы и методы. С помощью проточной цитометрии исследованы 18 образцов периферической крови здоровых добровольцев (группа сравнения), 126 образцов венозной крови пациентов Городской клинической инфекционной больницы ($n = 105$, средний возраст – $35,1 \pm 15,6$ лет) и Городской детской инфекционной клинической больницы ($n = 21$, средний возраст – $5,4 \pm 3,6$ лет) с диагнозами, которые можно объединить в группу ОКИ.

Результаты. Исследована экспрессия поверхностных молекул CD11c, CD13, CD16, CD32, CD35, CD62L, CD64, CD66b, CD88, CD38, CD284, HLA-ABC, HLA-DR нейтрофилами и моноцитами периферической крови пациентов с острыми кишечными инфекциями (ОКИ) и группы здоровых добровольцев. Были рассчитаны показатели экспрессии всех исследованных молекул на поверхности нейтрофилов и моноцитов, рассчитана достоверность различий между исследуемыми группами, проведен ROC-анализ с целью установить чувствительность, специфичность и пороговое значение показателей в выявлении бактериальных инфекций среди всех ОКИ. Установлено, что по наилучшему соотношению чувствительности и специфичности в отношении выявления бактериальной этиологии ОКИ, для дифференциальной диагностики могут быть использованы показатели экспрессии молекул CD62L, CD64 и CD16.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, проточная цитометрия, маркеры активации, дифференциальная диагностика.

**A. Y. Hancharou, E. H. Rynda, O. C. Glaz, S. O. Velgin,
A. P. Kudin, V. G. Gudkov, S. V. Dorogova**

PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS AND MONOCYTES ACTIVATION TEST FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF BACTERIAL AND VIRAL ETIOLOGY OF ACUTE INTESTINAL INFECTIONS

Introduction. Problem of differential diagnostics of the bacterial and viral etiology of acute intestinal infections is extremely important for public health, since the clinical manifestations of viral and bacterial infections have many common features, which does not allow doctors to determine the etiology of the disease at the early outpatient and hospital stages.

The aim of the study was to develop a method for the differential diagnostics of acute intestinal infections of bacterial and viral etiology based on the determination of activation markers of neutrophils and peripheral blood monocytes.

Materials and methods. Using flow cytometry 18 peripheral blood samples of healthy volunteers (comparison group), 126 venous blood samples of patients from the City Clinical Infectious Diseases Hospital ($n = 105$, mean age 35.1 ± 15.6 years) and the City Children's Infectious Clinical Hospital ($n = 21$, average age 5.4 ± 3.6 years) with diagnoses that can be combined into a group of acute intestinal infections was researched.

Results. Expression of surface molecules CD11c, CD13, CD16, CD32, CD35, CD62L, CD64, CD66b, CD88, CD38, CD284, HLA-ABC, HLA-DR by neutrophils and monocytes of peripheral blood of patients with acute intestinal infections and groups of healthy volunteers was assessed. Expression indices, significance of differences between studied groups of all studied molecules on the surface of neutrophils and monocytes were calculated. ROC analysis was performed in order to determine the sensitivity, specificity and threshold value of the indicators in the detection of bacterial infections among all acute intestinal infections. It was found that the expression of CD62L, CD64, CD16 can be used for differential diagnosis of bacterial versus viral etiology of acute intestinal infections according to the best sensitivity and specificity.

Key words: acute intestinal infections, flow cytometry, activation markers, differential diagnosis.

Клинические проявления вирусных и бактериальных инфекций имеют много общих черт, что не позволяет врачам на раннем амбулаторном и госпитальном этапах достоверно определиться с этиологией заболевания. Это может приводить с одной стороны, к позднему назначению антибактериальных лекарственных средств при бактериальных инфекциях и, как следствие, формированию осложнений и неблагоприятных исходов заболеваний. С другой стороны – к необоснованному назначению антибиотиков при вирусных инфекциях, что способствует формированию антибактериальной резистентности микроорганизмов, возникновению токсических и аллергических осложнений у пациентов, необоснованно увеличивает стоимость лечения.

Существующие в настоящее время методы лабораторной дифференциальной диагностики острых вирусных и бактериальных инфекций, такие как определение содержания С-реактивного белка (СРБ) [3] в сыворотке крови, матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) и растворимой формы CD54 (sICAM-1) в ликворе [1], прокальцитонина (ПКТ) в сыворотке методом иммунохроматографии [9], а также сочетание этих методов, не позволяют в приемлемые сроки получить достоверный результат. Общим недостатком данных методов является невысокая чувствительность и специфичность.

Перспективным направлением для дифференциальной диагностики инфекций бактериальной и вирусной этиологии является проведение теста активации нейтрофилов и моноцитов, который позволяет получить данные об активации лейкоцитов у пациентов, страдающих острыми кишечными инфекциями (ОКИ), в течение первых суток после обращения пациента в учреждение здравоохранения. Метод основан на том, что бактериальные инфекции характеризуются как увеличением числа нейтрофилов в периферической крови, так и значительным усилением экспрессии ряда молекул

на их поверхности. Несмотря на то, что при ряде вирусных инфекций зачастую также выявляют увеличение содержания нейтрофилов в крови, клетки находятся в неактивированном состоянии.

Цель исследования: разработать метод дифференциальной диагностики ОКИ бактериальной и вирусной этиологии на основе определения маркеров активации нейтрофилов и моноцитов периферической крови.

Материалы и методы. Объектами для *in vitro* исследований служили 18 образцов периферической крови здоровых добровольцев (группа сравнения), 126 образцов венозной крови пациентов Городской клинической инфекционной больницы ($n = 105$, средний возраст – $35,1 \pm 15,6$ лет) и Городской детской инфекционной клинической больницы ($n = 21$, средний возраст – $5,4 \pm 3,6$ лет) с диагнозами, которые можно объединить в группу ОКИ. Забирали 5 мл крови из кубитальной вены в пробирку с ЭДТА в качестве антикоагулянта для *in vitro* исследований в течение первых двух суток после поступления пациента в стационар. Пробирку доставляли в лабораторию в течение не более 4-х часов с момента забора образцов. Бактериологическое исследование выполнялось в лаборатории на базе учреждений здравоохранения, а определение вирусов методом ПЦР и ИФА – на базе ГКИБ и РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

В пробирки для проточной цитометрии вносили моноклональные антитела, добавляли 50 мкл крови, тщательно перемешивали и инкубировали в темноте 15 мин. Затем в течение 10 минут лизировали эритроциты, осаждали лейкоциты центрифугированием пробирок ($200-300$ g – 5 минут), сливали надосады. Осадок ресуспендировали в буфере DPBS и проводили учет на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur. Учитывали процент и относительную интенсивность флуоресценции (ОИФ) исследуемых молекул на поверхности нейтрофилов и моно-

цитов. Моноклональные антитела, использованные в работе: CD11c APC клон B-ly6, CD13 PerCP клон WM15, CD16 FITC клон 3G8, CD32 PE клон 2E1, CD35 (CR1) PE клон E11, CD62L PE клон LT-TD180, CD64 APC клон 10.1, CD66b FITC клон 80H3, CD88 (C5R1) APC клон S5/1, CD38 PerCP HIT2, CD284 APC HTA125, HLA-ABC FITC B9.12.1, HLA-DR FITC Immu-357. Данные анализировали при помощи программы FACSDiva 7.0. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica версии 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й перцентилей. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения групп независимых данных был использован метод рангового анализа вариаций Краскела-Уоллиса. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения. У всех пациентов был проведен бактериологический и вирусологический анализ образцов фекалий. Среди 126 пациентов с ОКИ бактериальная этиология заболевания была подтверждена у 68. *Klebsiella pneumoniae* выявлена у 15 пациентов, *Proteus mirabilis* – у 4 пациентов, *Clostridium difficile* – у 3 пациентов, *Klebsiella oxytoca* – у 5 пациентов, *Salmonella typhimurium* – у 5 пациентов, *Shigella sonnei* – у 4 пациентов, *Pseudomonas aeruginosa* – у 6 пациентов, *Citrobacter freundii* – у 4 пациентов, *Salmonella infantis* – у 3 пациентов, *Salmonella enteritidis* – у 19 пациентов. Методом ПЦР и ИФА у 8 пациентов

был обнаружен норовирус, у 40 – ротавирус. Таким образом, из 126 пациентов с ОКИ, подтвержденный диагноз ОКИ вирусной этиологии имели 48 человек, а бактериальной – 68 пациент. У 10 пациентов этиология ОКИ не была установлена.

Экспрессия маркеров активации нейтрофилов и моноцитов. На поверхности моноцитов и нейтрофилов исследована экспрессия следующих молекул: CD11c, CD13, CD16, CD32, CD35, CD38, CD62L, CD64, CD66b, CD88, CD284, HLA-ABC и HLA-DR. Были рассчитаны показатели экспрессии всех исследованных молекул на поверхности нейтрофилов и моноцитов у пациентов с ОКИ и здоровых добровольцев (таблица 1).

Рассчитана достоверность различий между исследуемыми группами, проведен ROC-анализ с целью установить чувствительность, специфичность и пороговое значение показателя в выявлении бактериальных инфекций среди всех ОКИ (таблица 2).

Высокий показатель экспрессии на нейтрофилах и моноцитах был отмечен для CD62L – молекулы клеточной адгезии семейства лектинов C-типа [7], CD35 на нейтрофилах [6] и CD64 на моноцитах [5]. Частично данное обстоятельство объясняется тем, что такие маркеры как CD64 для моноцитов и CD35 для нейтрофилов являются популяционными. Также на моноцитах был зафиксирован высокий уровень интенсивности экспрессии молекулы клеточной адгезии CD38 [4]. Высокий процент экспрессии показали молекулы CD16 [10] и CD13 [8] на нейтрофилах и моноцитах, однако, достоверные различия между исследуемыми группами были установлены лишь для молекулы CD16 на нейтрофилах. Остальные исследованные показатели экспрессии нейтрофилов и моноцитов не различались достоверно между группами К, ОКИ БАКТ и ОКИ ВИР ($p > 0,05$, тест Краскела-Уоллиса).

Таблица 1. Значения показателей экспрессии молекул на поверхности нейтрофилов и моноцитов у пациентов с ОКИ и здоровых добровольцев

Показатель	Значения показателей в группах		
	здоровые добровольцы (К, n = 18)	ОКИ бактериальной природы (БАК, n = 68)	ОКИ вирусной природы (ВИР, n = 48)
CD62L (нейтр.), усл. ед.	108,8 (84,7–116,6)	225,8(205,2–274,1)	52,8(41,6–78,2)
CD35 (нейтр.), усл. ед.	80,8 (46,5–103,4)	72,1 (53,9–105,0)	54,4 (46,1–73,5)
CD64 (нейтр.), усл. ед.	8,7 (8,1–9,3)	33,6 (22,6–44,7)	11,7 (8,3–14,8)
CD64 (нейтр.), %	33,0 (22,8–41,8)	79,7 (54,4–95,5)	32,4 (22,3–39,4)
CD16 (нейтр.), %	99,5 (99,3–99,6)	99,0 (98,8–99,4)	98,5 (97,6–99,0)
CD13 (нейтр.), %	45,3 (37,5–63,8)	46,6 (29,3–55,4)	25,4 (19,1–33,7)
CD62L (мон.), усл. ед.	178,5 (153,3–192,5)	302,1(226,1–357,8)	94,6 (65,6–123,5)
CD64 (мон.), усл. ед.	61,0 (48,8–66,6)	148,2 (119,5–187,2)	85,8 (64,5–110,2)
CD38 (мон.), усл. ед.	65,3 (59,8–70,4)	140,1(109,1–170,6)	101,8 (90,6–115,9)
CD16 (мон.), %	41,6 (35,9–56,6)	75,8 (67,4–85,5)	33,1 (20,3–42,3)
CD13 (мон.), %	58,0 (46,1–79,2)	93,1 (87,5–95,6)	77,5 (68,4–86,6)

Таблица 2. Показатели достоверности различий между группами (критерий Краскела-Уоллиса, критерий Манна-Уитни) бактериальных (БАК), вирусных инфекций (ВИР) и между контролем (К)

Показатель	Достоверность различий, p			
	Между гр. (кр-й Краскела-Уоллиса)	БАК и ВИР (кр-й Манна-Уитни)	К и ВИР (кр-й Манна-Уитни)	К и БАК кр-й Манна-Уитни)
CD62L (нейтр.), усл. ед.	< 0,000001	< 0,00001	0,0001	< 0,00001
CD35 (нейтр.), усл. ед.	0,011	0,003	0,083	0,903
CD64 (нейтр.), усл. ед.	< 0,000001	< 0,00001	0,028	< 0,00001
CD64 (нейтр.), %	< 0,000001	< 0,00001	0,676	< 0,00001
CD16 (нейтр.), %	< 0,000001	0,001	0,00001	0,004
CD13 (нейтр.), %	< 0,000001	0,0002	0,00003	0,500
CD62L (мон.), усл. ед.	< 0,000001	< 0,00001	< 0,00001	< 0,00001
CD64 (мон.), усл. ед.	< 0,000001	< 0,00001	0,0003	< 0,00001
CD38 (мон.), усл. ед.	< 0,000001	0,00009	< 0,00001	< 0,00001
CD16 (мон.), %	< 0,000001	< 0,00001	0,013	< 0,00001
CD13 (мон.), %	< 0,000001	< 0,00001	0,089	< 0,00001

Был проведен ROC-анализ с целью установить чувствительность, специфичность и пороговое значение показателя в выявлении бактериальных инфекций среди всех ОКИ (рисунок).

Из всех определенных показателей нами были выбраны следующие, по наилучшему соотношению чувствительности и специфичности в отношении выявления бактериальной этиологии ОКИ: CD62L (ОИФ, нейтрофилы), CD62L (ОИФ, моноциты), CD64 (ОИФ, нейтрофилы), CD64 (%), CD16 (%), CD13 (%).

Таким образом, установлено, что диагностическими критериями ОКИ бактериальной этиологии являются значения показателей: CD62L (ОИФ, нейтрофилы) выше 145,4 усл. ед., CD62L (ОИФ, моноциты) – выше 159,1 усл. ед., CD64 (ОИФ, нейтрофилы) – выше 19 усл. ед., CD64 (%), нейтрофилы) – выше 44,0 %, CD16 (%), моноциты) – выше 59,0 %.

Выводы. Выполнен анализ экспрессии молекул CD11c, CD13, CD16, CD32, CD35, CD62L, CD64, CD66b, CD88, CD38, CD284, HLA-ABC, HLA-DR на поверхности нейтрофилов и моноцитов периферической

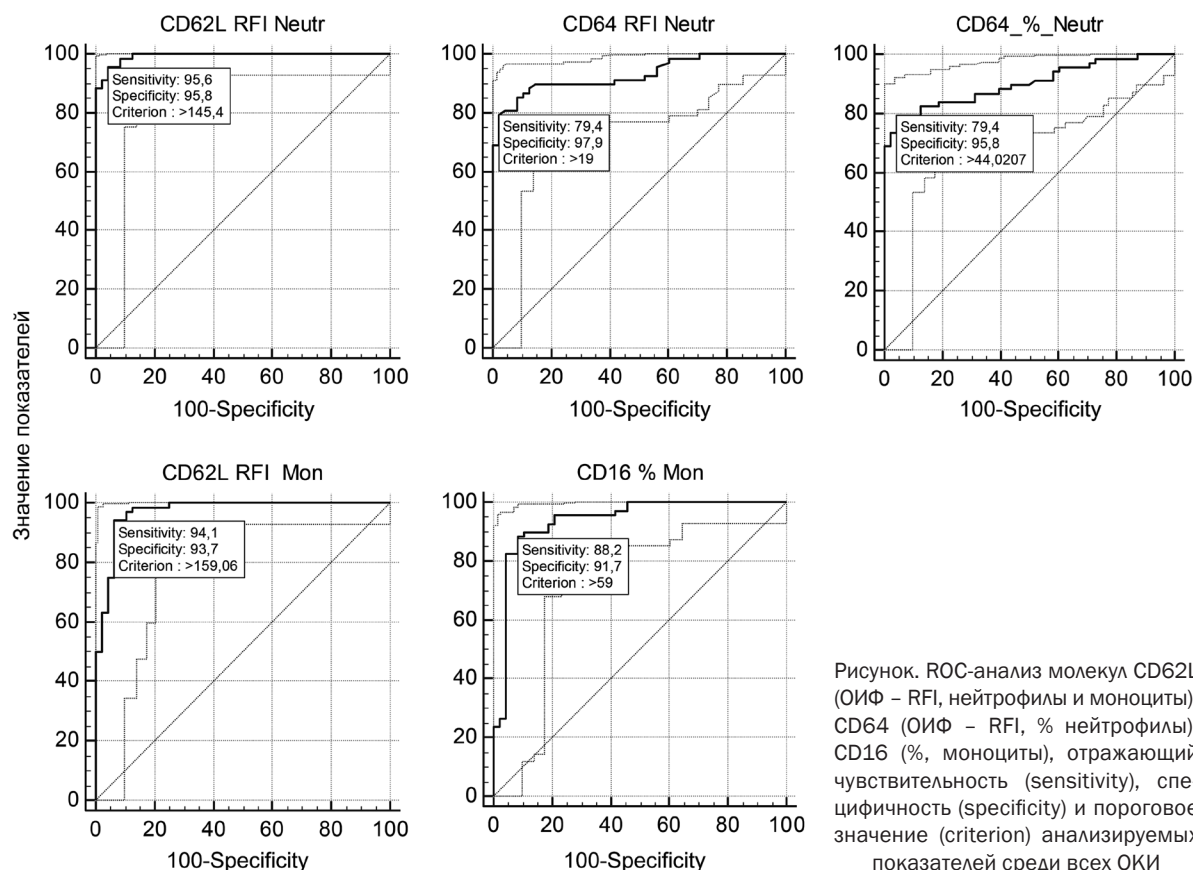


Рисунок. ROC-анализ молекул CD62L (ОИФ – RFI, нейтрофилы и моноциты), CD64 (ОИФ – RFI, % нейтрофилы), CD16 (%), моноциты), отражающий чувствительность (sensitivity), специфичность (specificity) и пороговое значение (criterion) анализируемых показателей среди всех ОКИ

крови здоровых добровольцев и пациентов, страдающих ОКИ. Из исследуемых молекул в качестве маркеров для дифференциальной диагностики бактериальной и вирусной этиологии ОКИ нами были выбраны следующие, благодаря наилучшему соотношению чувствительности и специфичности в отношении выявления бактериальной этиологии ОКИ: CD62L (ОИФ, нейтрофилы), CD62L (ОИФ, моноциты), CD64 (ОИФ, нейтрофилы), CD64 (%, нейтрофилы), CD16 (%, моноциты). Для каждой из этих молекул было установлено пороговое значение показателя, которое является диагностически значимым критерием определения бактериальной этиологии ОКИ. В случае если у пациента значения как минимум 3 из 5 показателей соответствуют вышеприведенным диагностическим критериям, диагностируют ОКИ бактериальной этиологии [2].

Литература

1. Антонова, С. С. Дифференциальная диагностика бактериального и вирусного лимфаденита у детей / С. С. Антонова, В. В. Ботвиньева, И. Г. Ситников // Вопросы современной педиатрии. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 76–78.
2. Инструкция по применению «Метод выбора тактики лечения острых кишечных инфекций»: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 14.12.18. – Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2018. – 4 с.
3. Кудин, А. П. Клинико-лабораторные особенности бактериальных менингитов у детей первых 3-х месяцев жизни / А. П. Кудин, А. В. Явгель, А. А. Астапов // Медицинская панорама. – 2007. – № 9. – С. 58–76.
4. Deaglio, S. CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target / S. Deaglio, S. Aydin, T. Vaisitti,

L. Bergui // Trends in molecular medicine. – 2008. – Т. 14, № 5. – С. 210–218.

5. Fjaertoft, G. Neutrophil CD64 (FcγRI) expression is a specific marker of bacterial infection: a study on the kinetics and the impact of major surgery / G. Fjaertoft, L. Douhan Håkansson, K. Pauksens, G. Sisask // Scandinavian journal of infectious diseases. – 2007. – Т. 39, № 6–7. – С. 525–535.
7CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target / S. Deaglio [et al.] // Trends in Molecular Medicine. – 2008. – Vol. 14. – P. 210–218.

6. Jalava-Karvinen, P. Simultaneous quantitative analysis of FcγRI (CD64) and CR1 (CD35) on neutrophils in distinguishing between bacterial infections, viral infections, and inflammatory diseases / P. Jalava-Karvinen, U. Hohenthal, I. Laitinen, P. Kotilainen, A. Rajamäki, J. Nikoskelainen // Clinical Immunology. – 2009. – Т. 133, № 3. – С. 314–323.

7. Li, O. CD62L is required for the priming of encephalitogenic T cells but does not play a major role in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis / O. Li, J. Q. Liu, H. Zhang, P. Zheng, Y. Liu // Scandinavian journal of immunology. – 2006. – Т. 64, № 2. – С. 117–124.

8. Matteo, P. D. Enhanced expression of CD13 in vessels of inflammatory and neoplastic tissues / P. D. Matteo, G. L. Arrighi, L. Alberici, A. Corti, C. Gallo-Stampino, C. Traversari // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 2011. – Т. 59, № 1. – С. 47–59.

9. Shapiro, S. et al. Expression of matrix metalloproteinases, sICAM-1 and IL-8 in CSF from children with meningitis / S. Shapiro, A. Miller, N. Lahat, E. Sobel, A. Lerner // Journal of the neurological sciences. – 2003. – Т. 206, № 1. – С. 43–48.

10. Trotta, R., Dal Col J., Yu J. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells / R. Trotta, J. Dal Col, J. Yu // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181(6). – P. 3784–3792. DOI: 10.4049/jimmunol.181.6.3784.

Поступила 02.09.2020 г.