

**ЖИРКОВ**  
Антон Анатольевич

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО  
СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ  
И КРОВИ ПРИ МЕНИНГИТАХ У ДЕТЕЙ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

**Автореферат**  
диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М.Никифорова» МЧС России

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук **Алексеева Лидия Аркадьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Гумилевский Борис Юриевич** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кафедра микробиологии, заведующий.

**Соколов Дмитрий Игоревич** – доктор биологических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта», отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий, лаборатория межклеточных взаимодействий, ведущий научный сотрудник.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «4» июня 2024 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М.Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М.Никифорова» МЧС России по адресу: 197345, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, дом 54 и на сайте <https://www.nrcerm.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук доцент

**Санников Максим Валерьевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Инфекционные заболевания центральной нервной системы (ЦНС) остаются серьезной проблемой в связи с тяжестью течения, высоким риском летальных исходов, возможностью формирования неврологического дефицита в резидуальном периоде, а также низкой верификацией возбудителя [Вильниц А.А., 2019; Оганесян А.Н. с соавт., 2019; Морозова Е.А. с соавт., 2020; Скрипченко Н.В. с соавт., 2021]. В современной литературе обсуждается необходимость расширения критериев диагностики заболеваний ЦНС путем более детальной оценки биохимического и клеточного состава цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) [Kowarik M.C. et.al., 2014; Балмасова И.П. с соавт., 2014, 2018; Алексеева Л.А. с соавт., 2017; Венгеров Ю.А. с соавт., 2018].

Проникающие в организм инфекционные агенты запускают каскад механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа, приводящий к нарушению проницаемости гематоэнцефалического/гематоликворного барьеров (ГЭБ/ГЛБ) и развитию воспаления нервной ткани, ключевым моментом которого является инфильтрация клеток из системного кровотока в ЦНС [Железникова Г.Ф. с соавт., 2011]. В развитии адаптивного иммунного ответа центральную роль играют лимфоциты и антиген-презентирующие клетки (АПК). Применение проточной цитофлуориметрии позволяет более детально изучить клеточный состав ЦСЖ и расширить спектр изучаемых субпопуляций лимфоцитов. В настоящий момент по наличию кластеров дифференцировки (CD) выделяют 3 основные субпопуляции: общие Т-лимфоциты с фракциями Т-хелперов (Th) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), натуральные киллеры (NK) и В-лимфоциты [Хайдуков С.В. с соавт., 2009]. Помимо основных популяций дифференцируют множество малых субпопуляций (NKT (Natural Killer T-cells), DN (Double Negative T-cells), DP (Double Positive T-cells),  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ ,  $CD3^-CD8^+NK$ ), обладающих собственными регуляторными и эффекторными характеристиками [Хайдуков С.В. с соавт., 2013]. В частности, показано, что NKT модулируют активность клеток адаптивного иммунного ответа (Т- и В-лимфоцитов) за счёт специфической продукции цитокинов. DN участвуют в супрессии антиген-специфического Т-клеточного ответа, за счёт продукции IL-10. DP и  $CD3^-CD8^+NK$  проявляют цитотоксическую активность за счёт выделения гранул с цитолитическими ферментами.

В современной литературе имеются немногочисленные данные об изменениях субпопуляционного состава лимфоцитов (ССЛ) крови и ЦСЖ при менингитах [Kowarik M.C. et.al., 2014; Балмасова И.П. с соавт., 2014; Венгеров Ю.А. с соавт., 2018]. В ранних работах исследованы только Т- и В-лимфоциты крови и ЦСЖ. В ряде исследований изучались все основные субпопуляции крови и ЦСЖ, включая NK [Балмасова И.П. с соавт., 2014]. В большинстве публикаций исследования ССЛ ЦСЖ проводились только в остром периоде вирусного или бактериального менингита [Kowarik M.C. et.al., 2014; Балмасова И.П. с соавт., 2014]. При этом основная масса работ

выполнена преимущественно на когорте взрослых пациентов [Maxeiner H. et.al., 2009; Kowarik M.C. et.al., 2014; Балмасова И.П. с соавт., 2014], тогда как у детей данные о ССЛ ЦСЖ при менингитах немногочисленны и фрагментарны. Практически отсутствуют сопоставления субпопуляционного состава лимфоцитов с особенностями клинического течения и исхода менингита [Grygorczuk S. et.al., 2020]. Лишь в нескольких публикациях указывается на диагностические и прогностические возможности исследования показателей реакций врождённого и адаптивного иммунитета, включая некоторые субпопуляции лимфоцитов крови и ЦСЖ у взрослых пациентов с бактериальным гнойным менингитом (БГМ) [Куприна Н.П. с соавт., 2015; Балмасова И.П. с соавт., 2018]. Таким образом, анализ современных литературных данных указывает на недостаточную изученность динамики основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ и диагностическую значимость их определения при менингитах у детей. Не охарактеризован субпопуляционный состав лимфоцитов ликвора у детей различного возраста без воспаления оболочек и ткани мозга («норма»), отсутствуют сведения о ССЛ крови и ликвора при менингитах различной этиологии и тяжести течения, что обуславливает актуальность цели и задач настоящего исследования.

**Степень разработанности темы исследования.** Исследования пула лимфоцитов крови и ликвора при менингитах с помощью проточной цитометрии начались в странах северной Европы (Германия, Швеция) и Азии (Япония) на ранних этапах внедрения метода в биомедицинские исследования. Однако, несмотря на теоретическую и практическую значимость, данные литературы, касающиеся этой проблемы, остаются фрагментарны и противоречивы [Maxeiner H. et.al., 2009; Kowarik M.C. et.al., 2014], а для детей подобные исследования на сегодняшний день практически отсутствуют [Ichiyama T. et.al., 2009].

В последнее десятилетие в мире наблюдается подъём интереса к исследованию субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора в целях исследования патогенеза различных заболеваний ЦНС и диагностической значимости его определения [Han S. et.al., 2014; Heming M. et.al., 2019, 2020; Grygorczuk S. et.al., 2020]. Однако работ, посвященных сопоставлению ССЛ при менингитах бактериальной и вирусной природы в доступной литературе не найдено, что не позволяет охарактеризовать особенности интратекального и системного иммунного ответа, выявить роль субпопуляций лимфоцитов в патогенезе вирусного серозного и бактериального гнойного менингита. Предпринимаются попытки связать субпопуляционный состав лимфоцитов с этиологией, тяжестью течения и исходами бактериального гнойного менингита у взрослых пациентов, в частности, установлена связь абсолютного количества НКТ клеток с крайне тяжёлым течением пневмококкового менингита [Балмасова И.П. с соавт., 2014, 2018; Куприна Н.П. с соавт., 2015]. В научной литературе отмечается неспецифичность клинических проявлений менингитов вирусной и бактериальной этиологии,

низкая эффективность методов верификации, стандартных лабораторных показателей крови и ликвора [Шишов А.С. с соавт., 2011; Оганесян А.Н. с соавт., 2019]. Практически не изучена связь субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора с тяжестью течения и исходом менингитов у детей, общепринятыми ликворологическими лабораторными показателями, этиологией, что, в совокупности, не позволяет определить его диагностическое значение.

**Цель исследования:** определить диагностическое значение субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора при вирусных и бактериальных менингитах у детей.

**Задачи:**

1. Провести сравнительную оценку диагностической эффективности стандартных клиничко-лабораторных показателей у детей с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом.

2. Оптимизировать метод проточной цитометрии для исследования состава лимфоцитов ликвора с выявлением его особенностей у детей группы сравнения разного возраста.

3. Охарактеризовать в динамике субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при вирусном серозном и бактериальном гнойном менингите у детей в зависимости от стадии заболевания, этиологии и степени тяжести.

4. Выявить особенности соотношения субпопуляций лимфоцитов ликвора и крови в группе сравнения и при менингитах у детей.

5. Разработать способ дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных менингитов на основе исследования субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора.

**Научная новизна исследования.** Впервые охарактеризован субпопуляционный состав лимфоцитов ликвора у детей группы сравнения (ОРВИ с менингизмом) и установлена его зависимость от возраста.

Впервые при бактериальных гнойных и вирусных серозных менингитах выявлены характерные изменения в составе основных и малых субпопуляций крови и ликвора на разных стадиях заболевания, установлены достоверные различия в зависимости от этиологии и степени тяжести, что может быть использовано с целью дифференциальной диагностики, контроля за течением заболевания и эффективностью терапии.

Впервые проведён расчёт соотношения лимфоцитов ликвора и крови в группе сравнения и у детей с менингитами на разных стадиях заболевания и установлены субпопуляции, изменения которых характерны для интраклеточного и системного адаптивного иммунного ответа при вирусных серозных и бактериальных гнойных менингитах у детей.

Разработан способ дифференциальной диагностики вирусного и бактериального менингита, основанный на определении В-лимфоцитов в ликворе, обладающий высокой чувствительностью (100%) и специфичностью (97,7%).

### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Результаты исследования дополняют и обобщают современное представление о патогенезе вирусного серозного и бактериального гнойного менингита. Доказано участие основных (Т-лимфоциты, включая Th и CTL, NK и В-лимфоциты) и малых субпопуляций лимфоцитов (DN, DP, NKT, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK) крови и ликвора в пато-и саногенезе вирусного серозного и бактериального гнойного менингита, а также их связь со степенью тяжести БГМ. Доказано, что показатели субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора являются характерными маркерами вирусного и бактериального менингита и могут быть использованы для эффективной дифференциальной диагностики менингитов вирусной и бактериальной природы.

Оптимизирован метод проточной цитометрии для исследования малоклеточных популяций лимфоцитов ликвора для диагностики бактериальных и вирусных менингитов.

Разработанный способ дифференциальной диагностики вирусного и бактериального менингита способствует своевременной диагностике менингитов и позволяет корректировать этиотропную терапию.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой диссертации является систематизированное применение экспериментальных и теоретических методов научного познания с целью решения поставленных задач. Работа выполнена в дизайне сравнительного открытого исследования с использованием лабораторных, клинических и статистических методов с разрешения локального этического комитета: протокол № 93 от 07.11.17.

### **Положения, выносимые на защиту диссертации**

1. Широкая область совпадения стандартных лабораторных показателей крови и ликвора (общие лейкоциты и С-реактивный белок крови, общий белок и цитоз ликвора) у детей с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом не позволяет их использование с целью дифференциальной диагностики менингита.

2. Выявленные характерные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора при менингитах у детей зависят от природы (вирусной или бактериальной), стадии и тяжести заболевания и характеризуют интратекальный и системный клеточный иммунный ответ.

3. Разработанный способ дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных менингитов, основанный на определении количества В-лимфоцитов в ликворе методом проточной цитометрии, обладает высокой чувствительностью (100%) и специфичностью (97,7%), что позволяет на ранней стадии заболевания проводить коррекцию этиотропной терапии.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования.**

Степень достоверности результатов определяется обследованием достаточного количества детей (n=152, общее число исследований - 374), применением современных высокоразрешающих лабораторных методов (проточная цитофлуориметрия) и адекватной статистической обработкой

полученных результатов (пакет прикладных программ Microsoft Office Excel 2013, FlowJo 2010 и GraphPad Prism 5.0 для Windows).

Основные результаты работы доложены и обсуждены на XXXVII, XXXIX, XXXXI, XXXXIII итоговых научно-практических конференциях в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России «Актуальные вопросы инфекционных заболеваний у детей» (Санкт-Петербург, 2016, 2017, 2019, 2021), XX Давиденковских чтениях (Санкт-Петербург, 2018), XIX конгрессе детских инфекционистов России: «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики» (Москва, 2020).

**Внедрение результатов научных исследований в практику.** Результаты исследования внедрены в практику работы и используются в ряде учреждений - БУЗ УР «Республиканская клиническая инфекционная больница» (г. Ижевск), ОБУЗ «Шуйская центральная районная больница» (г. Шуя Ивановской области), ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (г. Москва), ГБУЗ «АОДКБ» (г. Архангельск).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (биологические науки), 8 – в материалах научно-практических конференций, получен патент на изобретение №2695359 «Способ дифференциальной диагностики менингитов у детей» - 2019.

**Личный вклад автора в проведенные исследования.** Автором сформулированы цель и задачи исследования, разработан дизайн и методология исследования, проведён анализ биологического материала пациентов, выполнена статистическая обработка, интерпретация и обобщение результатов исследования, а также представление научных данных.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, главы результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейших исследований, списка литературы. Работа иллюстрирована 19 таблицами (включая 4 таблицы приложения А) и 13 рисунками. Список литературы включает 172 источника: отечественных – 32 и иностранных авторов – 140.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы.** Проведено клинико-лабораторное обследование 152 детей с диагнозом: ВМ (n=86) от 0,3 до 17,3 лет, 9,5 (Me), БГМ (n=39) от 0,25 до 15 лет, 2,9 (Me) и 27 детей с острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ, с менингизмом) от 2,4 до 17,8 лет (8 лет по медиане) в качестве группы сравнения. Диагноз установлен на основании клинико-лабораторного обследования и указан в выписном эпикризе истории болезни. Этиологическая диагностика проведена в клинико-диагностической

лаборатории ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России с применением современных бактериологических и серологических методов. В группах детей, переносящих ВМ и БГМ, преобладали мальчики (66% и 59% соответственно). В группе сравнения количество мальчиков и девочек было приблизительно равным (13 мальчиков и 14 девочек).

Кровь и ЦСЖ больных менингитами исследовали в динамике: в остром периоде (в течение первых 5 суток от начала болезни) и в периоде ранней реконвалесценции: через 12-15 дней при ВМ и 6-13 дней при БГМ, у детей с ОРВИ - однократно в остром периоде заболевания. Критерием исключения являлось наличие хронических инфекционных заболеваний (гепатит) и туберкулезного менингита.

**Стандартные лабораторные исследования.** Гематологические исследования выполнены на анализаторе Sysmex XP-300 (Япония). Биохимические исследования выполнены на автоматических анализаторах COBAS c 501 (Roche, Франция) и Taurus (Instrumentation Laboratory, Италия). Стандартное исследование ЦСЖ включало определение общего белка и цитоза с дифференциацией на моно- и полинуклеарные лейкоциты (реагенты Диахим-ЦСЖ, НПФ Абрис<sup>+</sup>, Санкт-Петербург, Россия).

**Иммунофенотипический анализ.** Для иммунофенотипирования лимфоцитов использованы остатки образцов крови и ЦСЖ, поступающие для стандартного лабораторного исследования (табл. 1).

Таблица 1 - Количество исследований (фенотипирование лимфоцитов) в разные периоды вирусного серозного, бактериального гнойного менингита и детей группы сравнения.

Процедура	Жидкость	Количество исследований (n)					Итого
		Группа сравнения	Вирусный серозный менингит		Бактериальный гнойный менингит		
			О.П.	П.Р.	О.П.	П.Р.	
Фенотипирование лимфоцитов	Кровь	8	62	44	24	26	164
	Ликвор	27	82	41	32	28	210
	Всего	35	144	85	56	54	374

Примечание: О.П. - острый период заболевания, П.Р. - период реконвалесценции заболевания

Иммунофенотипирование клеток крови и ЦСЖ осуществляли на проточном цитометре FACSCalibur (Beckton Dickenson, BD, США) по безотмывочной технологии. Для оценки относительного содержания лимфоцитов крови и ЦСЖ использованы тест-системы MultiTEST IMK Kit (BD) (кат № 340503, США) с 4-х цветной панелью антител: CD3/CD8/CD45/CD4 и CD3/CD16+CD56/CD45/CD19, меченых флуорохромами FITC, PE, PerCP и APC. Комплексная оценка субпопуляций лимфоцитов проведена с помощью программы FlowJo, позволяющей на основе экспрессии маркеров на поверхности лимфоцитов выделить основные и малые субпопуляции (общие Т-лимфоциты, NK, В-лимфоциты, а также Th и CTL, DN, DP, NKT, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK). Общее количество анализов составило 374 (табл. 1).

**Статистический анализ.** Получение и обработка данных осуществлялась с помощью специализированных программ MultiSET (BD,

США), CellQuest (BD, США) и FlowJo. Статистический анализ данных производился с помощью программы GraphPad Prism 5.0. Для проверки гипотезы нормального распределения использовали критерий Колмогорова. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха - Me [Q<sub>25</sub> – Q<sub>75</sub>]. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали непараметрический U критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Показатели в динамике оценивались с применением парного критерия Вилкоксона и парного t-критерия Стьюдента, в зависимости от характера распределения признаков. Чувствительность и специфичность показателей субпопуляционного состава лимфоцитов рассчитывали с использованием ROC-анализа, с оценкой AUC (площадь под кривой).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Клинико-лабораторная характеристика детей с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом*

В ходе проведённого исследования установлено, что в этиологической структуре ВМ преобладали энтеровирусы – 53,5% (n=46), у 1,2% (n=1) пациента причиной развития ВМ стал цитомегаловирус и у 45,3% (n=39) человек этиология ВМ не установлена. Среди больных БГМ у 61% (n=24) установлен менингококковый менингит (ММ, возбудитель *Neisseria meningitidis*), у 7 (18%) – гемофильный менингит (ГМ, возбудитель *Haemophilus influenzae*), у 7 (18%) – пневмококковый менингит (ПМ, возбудитель *Streptococcus pneumoniae*), у 1 (3%) человека этиология возбудителя не установлена. В группе сравнения у 2 детей выявлен энтеровирус (7,4%), у 1 – энтеровирус и риновирус (3,7%) и у 24 (88,9%) этиология возбудителя не установлена.

Степень тяжести заболевания оценивалась на момент проведения диагностической люмбальной пункции и взятия образцов периферической крови. У всех пациентов с ВМ она характеризовалась как среднетяжёлая (100% случаев). При БГМ степень тяжести на день исследования оценивалась по 4 критериям: нахождение ребёнка на искусственной вентиляции лёгких, наличие синдрома полиорганной недостаточности, выраженное системное воспаление (уровень СРБ > 50 мг/л, лейкоцитоз или лейкопения, белок в ЦСЖ > 1 г/л). При наличии менее 2-х критериев – степень тяжести характеризовалась как тяжёлая (51,6%, n=16), 2-х и более – крайне тяжёлая (48,4% случаев, n=15).

Сравнение клинического анализа крови при менингитах показало, что в остром периоде БГМ относительно ВМ увеличено содержание лейкоцитов, нейтрофилов (относительное и абсолютное), тогда как содержание эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, тромбоцитов снижено. В период реконвалесценции при БГМ в сравнении с ВМ выше содержание лейкоцитов,

тромбоцитов, абсолютное количество лимфоцитов и ниже содержание эритроцитов, гемоглобина. Анализ выборки показал, что у 98% детей при ВМ и 71% детей при БГМ общее количество лейкоцитов в крови находилось в широком диапазоне от 4 до  $20 \cdot 10^9$  кл/л. Относительное содержание нейтрофилов и лимфоцитов в крови детей с ВМ и БГМ пересекалось в широком диапазоне. Так, у 100% детей с ВМ и БГМ относительное содержание нейтрофилов в крови находилось в диапазоне от 37 до 95%. Относительное содержание лимфоцитов в крови у 100% детей с ВМ и 89% детей с БГМ располагалось в диапазоне от 4 до 50%. Установлено, что при ВМ лимфопения обнаружена у 58% обследованных детей, лимфоцитоз у 10%. При БГМ лимфопения встречалась у 79% обследованных детей, лимфоцитоз у 4%.

Сравнение биохимических показателей при менингитах показало, что при БГМ в сыворотке крови в сравнении с ВМ выше содержание мочевины, глюкозы и СРБ, тогда как содержание креатинина и билирубина ниже. В период реконвалесценции в крови детей с БГМ в сравнении с ВМ выше содержание глюкозы и СРБ, ниже содержание креатинина, билирубина и общего белка, при этом большинство показателей находились в пределах референтных интервалов. В клинической лабораторной диагностике принято считать значения СРБ ниже 50 мг/л характерными для вирусных инфекций, а превышающие 50 мг/л – для бактериальных. Однако, анализ выборки при менингитах показал, что у детей с ВМ уровень СРБ в 22% случаев превышал 50 мг/л, достигая в крайних случаях 229 мг/л, тогда как при БГМ в 17% случаев значения были ниже 50 мг/л.

При БГМ в сравнении с ВМ в острую фазу заболевания значения стандартных параметров ликвора оказались выше. В динамике менингитов наблюдалась тенденция к их снижению в ликворе, однако они оставались достоверно выше значений группы сравнения. Характер плеоцитоза определялся по соотношению нейтрофилов и лимфоцитов: нейтрофильный при количестве нейтрофилов  $\geq 80\%$ , лимфоцитарный - при количестве лимфоцитов  $\geq 80\%$ . Во всех остальных случаях плеоцитоз характеризовался как смешанный. При ВМ в 55% случаев выявлен лимфоцитарный плеоцитоз ликвора, при БГМ в 63% - нейтрофильный (рис. 1).

В 37% случаев при вирусном и 34% при бактериальном гнойном менингите наблюдался смешанный плеоцитоз, часто с преобладанием не характерных для данных нозологических форм клеточных популяций. Так, в 39% случаев смешанного плеоцитоза ликвора при ВМ выявлено равное или большее содержание нейтрофилов в сравнении с лимфоцитами. При БГМ у пациентов со смешанным плеоцитозом в ЦСЖ в 33,5% случаев преобладали мононуклеары. Отдельно стоит отметить, что у 8% пациентов с диагнозом серозный менингит в ликворе выявлен нейтрофильный плеоцитоз, а у 3% с диагнозом БГМ – лимфоцитарный (рис. 1).



Рисунок 1 - Частота встречаемости различных видов плеоцитоза при вирусных и бактериальных менингитах (в % от общего количества).

Таким образом, выявлены широкие области перекрытия стандартных лабораторных показателей крови и ликвора при ВМ и БГМ, что не позволяет их использование с целью дифференциальной диагностики вирусной или бактериальной природы заболевания.

#### ***Характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора детей группы сравнения***

Возраст детей в группе сравнения (ОРВИ с менингизмом) колебался в диапазоне от 2,4 до 17,8 лет, 8 лет по медиане. Анализ относительного содержания субпопуляций в ЦСЖ выявил доминирование Т-лимфоцитов (95,2%), среди которых Th (53,4%) преобладали над CTL (28,2%), малое количество NK (2,2%) и В-лимфоцитов (0,7%).

Корреляционный анализ показал увеличение в ЦСЖ с возрастом относительного количества общих Т-лимфоцитов ( $r=0,44$ ,  $p<0,05$ ) и Th ( $r=0,62$ ,  $p<0,05$ ) и снижение количества CTL ( $r= -0,45$ ,  $p<0,05$ ), DN ( $r= -0,63$ ,  $p<0,05$ ) и NK ( $r= -0,51$ ,  $p<0,05$ ).

Полученные результаты характеризуют особенности лимфоцитарного пула ЦСЖ у детей без воспалительного процесса в ЦНС (белок и цитоз ликвора в пределах нормальных значений).

#### ***Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при вирусном серозном менингите у детей***

При сопоставлении субпопуляционного состава лимфоцитов крови в остром периоде ВМ с показателями группы сравнения выявлено увеличение относительного содержания НКТ и снижение Th (как и коэффициента Th/CTL). В динамике заболевания содержание большинства субпопуляций нормализовалось. При этом содержание НКТ оставалось выше, а коэффициент Th/CTL ниже показателей группы сравнения (табл. 2).

В ЦСЖ в остром периоде ВМ установлено увеличение содержания Th, NK и DN Т-клеток, снижение CTL и её фенотипов ( $CD3^+CD8^{dim}$ ,  $CD3^+CD8^{br}$ ), НКТ и DP Т-клеток относительно группы сравнения. Коэффициент Th/CTL

в острый период ВМ в ЦСЖ был почти в 2 раза выше аналогичного показателя детей группы сравнения. В динамике заболевания наблюдалось достоверное снижение в ликворе общих Т-клеток, Th, увеличение CTL, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup>, DP Т-клеток и В-лимфоцитов, нормализация соотношения Th/CTL. Однако содержание малых субпопуляций (DP и DN Т-клеток, NKT, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>NK) в ЦСЖ в период реконвалесценции достоверно отличалось от группы сравнения. Также отмечено, что содержание В-лимфоцитов в динамике ВМ увеличивалось, и в период реконвалесценции было достоверно выше уровня в группе сравнения (табл. 2).

Таблица 2 - Относительное содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора у детей с вирусным серозным менингитом и группы сравнения.

Популяции лимфоцитов	Содержание (%). Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]					
	КРОВЬ			ЛИКВОР		
	Группа сравнения	Вирусный серозный менингит		Группа сравнения	Вирусный серозный менингит	
	(n=8)	О.П. (n=62)	П.Р. (n=44)	(n=27)	О.П. (n=82)	П.Р. (n=41)
T-cells	72,4 [67,1 - 77,7]	68,8 [59,7 - 74,1]	71,1 ** [67,6 - 74,8]	95,2 [94,3 - 97,6]	95,7 [93,4 - 96,9]	94,8 ** [91,3 - 96,7]
Th	45,6 [36,6 - 52,9]	35,5 * [31,9 - 42,2]	39,3 ** [34,8 - 43,8]	53,4 [47,0 - 61,6]	66,9 * [59,6 - 71,3]	53,5 ** [42,6 - 65,9]
CTL	22,7 [21,3 - 24,5]	24,4 [20,7 - 28,1]	26,2 ** [21,5 - 28,5]	28,2 [20,1 - 34,8]	17,1 * [13,8 - 22,5]	25,3 ** [19,2 - 29,7]
NK	6,8 [2,4 - 10,5]	9,1 [5,4 - 15,4]	10,1 [6,1 - 12,7]	2,2 [1,0 - 3,1]	3,3 * [1,7 - 5,2]	2,7 [1,7 - 4,7]
B-cells	17,6 [13,8 - 20,3]	20,1 [16,0 - 22,8]	16,0 ** [13,8 - 19,3]	0,7 [0,2 - 1,7]	0,4 [0,2 - 1,2]	1,2 *, ** [0,6 - 3,1]
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> NK	2,6 [1,2 - 3,6]	2,8 [2,0 - 6,5]	3,6 [2,1 - 5,8]	0,3 [0,0 - 1,2]	0,6 [0,3 - 1,0]	0,7 * [0,4 - 1,2]
NKT	0,9 [0,5 - 2,7]	2,5 * [1,7 - 3,5]	2,2 * [1,4 - 3,2]	9,3 [5,9 - 16,9]	4,1 * [2,1 - 8,9]	4,5 * [2,4 - 8,7]
DN	3,4 [2,3 - 5,4]	4,6 [3,5 - 6,6]	4,8 [3,6 - 6,5]	5,3 [2,4 - 8,2]	7,2 * [5,3 - 11,6]	7,5 * [5,0 - 12,9]
DP	0,6 [0,4 - 1,4]	0,6 [0,5 - 0,9]	0,6 [0,5 - 0,9]	4,0 [2,8 - 7,9]	1,2 * [0,8 - 1,9]	2,2 *, ** [1,3 - 3,9]
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>	20,8 [19,1 - 22,6]	21,4 [18,0 - 25,0]	22,5 ** [18,2 - 24,8]	23,8 [16,0 - 33,6]	13,3 * [11,1-18,8]	20,5 ** [14,0 - 26,1]
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>	3,1 [2,0 - 3,8]	3,8 [3,0 - 5,3]	3,9 [3,0 - 5,1]	7,3 [5,1 - 12,9]	4,1 * [3,4 - 6,0]	5,8 ** [4,2 - 8,3]
Th/CTL	2,1 [1,7 - 2,5]	1,5 * [1,2 - 1,9]	1,6 * [1,2 - 1,9]	2,0 [1,5 - 2,6]	4,1 * [2,5 - 4,9]	2,0 ** [1,4 - 3,0]

Примечание: \* - отличие от группы сравнения, \*\* - отличие показателей от острого периода. О.П. – острый период, П.Р. – период реконвалесценции.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов в зависимости от этиологии показал, что в остром периоде и в период реконвалесценции ВМ в крови и ЦСЖ статистически значимых различий субпопуляционного состава лимфоцитов в группе энтеровирусного менингита и серозного менингита неустановленной этиологии не выявлено.

**Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора при  
бактериальном гнойном менингите у детей**

При БГМ в остром периоде заболевания в крови выявлено снижение содержания Т-лимфоцитов, Th, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, в то время как доля В-клеток более чем вдвое превышала аналогичный показатель в группе сравнения (табл. 3).

Таблица 3 - Относительное содержание основных и малых субпопуляций лимфоцитов крови и ликвора у детей с вирусным серозным менингитом и группы сравнения.

Содержание (%). Ме [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ]						
Популяции лимфоцитов	КРОВЬ			ЛИКВОР		
	Группа сравнения (n=8)	Бактериальный гнойный менингит		Группа сравнения (n=27)	Бактериальный гнойный менингит	
		О.П. (n=24)	П.П. (n=26)		О.П. (n=32)	П.П. (n=28)
T-cells	72,4 [67,1 - 77,7]	50,7 * [43,7 - 61,9]	70,9 ** [62,7 - 76,9]	96,2 [94,3 - 97,6]	79,5 * [72,2 - 86,5]	88,4 *, ** [83,7 - 93,8]
Th	45,6 [36,6 - 52,9]	30,9 * [25,4 - 37,7]	41,4 ** [34,7 - 48,0]	53,4 [47,0 - 61,6]	49,0 * [31,3 - 54,7]	51,1 [39,5 - 57,7]
CTL	22,7 [21,3 - 24,5]	16,0 [11,7 - 23,2]	23,1 ** [17,2 - 28,5]	28,2 [20,1 - 34,8]	19,0 * [13,7 - 23,2]	26,8 ** [20,7 - 31,7]
NK	6,8 [2,4 - 10,5]	3,2 [1,8 - 5,4]	3,5 [1,4 - 5,7]	2,2 [1,0 - 3,1]	3,6 * [2,1 - 7,4]	3,8 * [1,9 - 7,4]
B-cells	17,6 [13,8 - 20,3]	43,8 * [29,1 - 52,4]	21,5 ** [15,2 - 33,0]	0,7 [0,2 - 1,7]	12,8 * [7,1 - 19,6]	4,2 *, ** [1,7 - 6,8]
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> NK	2,6 [1,2 - 3,6]	1,4 [0,8 - 1,9]	1,3 [0,9 - 2,7]	0,3 [0,0 - 1,2]	0,8 * [0,6 - 1,4]	0,9 * [0,6 - 1,9]
NKT	0,9 [0,4 - 2,7]	0,4 [0,2 - 1,4]	0,8 [0,3 - 2,3]	9,3 [5,9 - 16,9]	3,7 * [1,7 - 5,7]	3,5 * [1,9 - 6,6]
DN	3,4 [2,3 - 5,4]	2,1 [1,3 - 4,6]	3,0 [1,8 - 5,1]	5,3 [2,4 - 8,2]	7,4 [4,2 - 11,0]	8,0 * [5,5 - 10,0]
DP	0,6 [0,4 - 1,4]	0,5 [0,3 - 0,8]	0,8 ** [0,6 - 1,2]	4,0 [2,8 - 7,9]	1,6 * [0,8 - 2,4]	1,8 * [1,2 - 2,9]
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>br</sup>	20,8 [19,1 - 22,6]	15,0 [10,5 - 22,0]	20,7 ** [16,2 - 27,0]	23,8 [16,0 - 33,6]	14,7 * [11,6 - 22,3]	24,4 ** [16,4 - 29,2]
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>dim</sup>	3,1 [2,0 - 3,8]	1,6 * [1,1 - 2,3]	2,3 ** [1,9 - 3,5]	7,3 [5,1 - 12,9]	4,8 * [3,0 - 6,4]	5,0 * [3,9 - 6,0]
Th/CTL	2,1 [1,7 - 2,5]	2,0 [1,3 - 2,7]	1,7 [1,4 - 2,5]	2,0 [1,5 - 2,6]	2,6 [1,5 - 3,4]	2,0 ** [1,2 - 2,4]

Примечание: \* - отличие от группы сравнения, \*\* - отличие показателей от острого периода. О.П. – острый период, П.П. – период реконвалесценции.

К стадии реконвалесценции содержание общих Т-лимфоцитов, Th, CTL и их субпопуляций (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>), DP Т-клеток достоверно увеличивалось, а доля В-лимфоцитов сокращалась. Коэффициент Th/CTL в оба периода заболевания не отличался от показателя в группе сравнения.

В отличие от крови в ЦСЖ в остром периоде БГМ наблюдалось увеличение относительного содержания NK и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> NK (табл. 3). Распределение других субпопуляций лимфоцитов в ЦСЖ были аналогичны изменениям в крови. Так, в остром периоде заболевания обнаружено существенное снижение общих Т-клеток, Th, CTL и их субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, NKT, DP Т-лимфоцитов при значительно большем количестве В-клеток, NK, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>NK и DN Т-лимфоцитов относительно группы сравнения (табл. 3). В динамике заболевания выявлено достоверное увеличение общих Т-клеток, CTL, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>br</sup> и снижение В-лимфоцитов по

сравнению с острым периодом, однако, содержание большинства субпопуляций отличалось от группы сравнения. Коэффициент Th/CTL к стадии реконвалесценции нормализовался.

При сопоставлении субпопуляционного состава лимфоцитов крови при БГМ разной этиологии установлены максимальные отклонения от группы сравнения в остром периоде гемофильного менингита (ГМ). При этом обнаружено сниженное содержание CTL и их субпопуляции  $CD3^+CD8^{br}$  у детей с ГМ в сравнении с менингококковым менингитом (ММ). В отличие от крови максимальное отклонение от группы сравнения в остром периоде выявлены в субпопуляционном составе лимфоцитов ЦСЖ детей, переносящих ММ. Кроме того, в ЦСЖ обнаружено увеличение содержания CTL у детей с ГМ и пневмококковым менингитом (ПМ) по сравнению с ММ.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов крови у детей с БГМ не выявил значимых различий в относительном содержании лимфоцитов в зависимости от степени тяжести. При этом в ЦСЖ на момент диагностической люмбальной пункции у детей с крайне тяжёлой формой БГМ выявлено более высокое содержание CTL,  $CD3^+CD8^{dim}$ , DN и NKT и сниженное количество В-лимфоцитов, наблюдалась тенденция к снижению Th. Коэффициент Th/CTL у группы крайне тяжёлых детей также статистически значимо ниже (табл. 4).

Таблица 4 - Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов ликвора в остром периоде бактериального гнойного менингита у детей в зависимости от тяжести.

Относительное содержание (%) Me [Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> ].			
Группы (n)	Тяжелая степень БГМ (n=14)	Крайне тяжелая степень БГМ (n=13)	p
T-cells	77,4 [71,9 – 80,9]	83,9 [77,3 – 89,9]	0,17
Th	51,4 [43,5 – 61,3]	44,3 [27,2 – 52,7]	0,1
CTL	16,4 [12,7 – 19,6]	20,1 [17,5 – 25,6] *	<0,05
DN	5,1 [3,8 – 9,2]	8,3 [6,3 – 15,9] *	<0,05
DP	1,3 [0,7 – 1,8]	2,2 [1,1 – 3,0]	0,11
NK	2,8 [1,5 – 7,2]	7,0 [3,6 – 8,1]	0,09
B-cells	16,4 [11,4 – 19,8]	10,0 [4,0 – 14,5] *	<0,05
$CD3^+CD8^{br}$	13,1 [11,3 – 15,7]	17,3 [14,4 – 22,8]	0,06
$CD3^+CD8^{dim}$	3,9 [2,8 – 5,0]	5,9 [4,9 – 7,8] *	<0,05
$CD3^+CD8^+NK$	0,8 [0,5 – 1,7]	1,0 [0,7 – 1,6]	0,57
NKT	1,6 [0,9 – 3,5]	5,3 [3,2 – 6,1] *	<0,005
Th/CTL	3,0 [2,4 – 4,4]	2,3 [1,2 – 2,8] *	<0,05

Примечание: \* - отличия от группы с тяжёлой формой БГМ, p - уровень значимости.

Степень тяжести менингита обусловлена как факторами патогенности возбудителя, так и недостаточностью иммунного ответа в целом, включая количественное перераспределение лимфоцитов, влияющее на характер течения заболевания. Тяжесть БГМ, по всей видимости, обусловлена недостаточно выраженным гуморальным иммунным ответом при усилении клеточного, который менее эффективен при бактериальной инфекции.

Для характеристики диагностической значимости субпопуляционного состава лимфоцитов в оценке тяжести состояния детей при БГМ проведён ROC-анализ наиболее значимых показателей субпопуляций лимфоцитов крови и ЦСЖ. Высокую чувствительность и специфичность для оценки

тяжести БГМ показали: относительное содержание NKT, DN, CTL, коэффициент Th/CTL, а также относительное содержание В-лимфоцитов в ЦСЖ. Максимальной чувствительностью (78,6%) и специфичностью (84,6%) обладало определение относительного содержания NKT. Предположительно, NKT в ЦНС реализуют иммуносупрессорные функции за счёт экспрессии цитокинов, тем самым подавляя воспалительные реакции и снижая интенсивность иммунного ответа на инфекционный агент.

Таким образом, при БГМ выявлены различия субпопуляционного состава лимфоцитов в зависимости от стадии заболевания, этиологии и степени тяжести. Увеличение количества В-лимфоцитов в крови и особенно ЦСЖ острого периода и периода реконвалесценции БГМ свидетельствует о стимуляции гуморального звена иммунитета.

### **Соотношение субпопуляций лимфоцитов ликвора и крови при менингитах**

Для выявления особенностей интратекального и системного клеточного иммунного ответа проведены расчёты коэффициентов ЦСЖ/кровь для исследованных субпопуляций лимфоцитов у детей с менингитами и в группе сравнения. В последней установлено превалирование в ЦСЖ относительного содержания большинства субпопуляций (коэффициенты варьировали от 1,2 до 16,4), за исключением В-клеток, NK и  $CD3^+CD8^+NK$ , относительное количество которых в ЦСЖ было снижено по сравнению с кровью (коэффициенты варьировали от 0,07 до 0,31) (рис. 2).

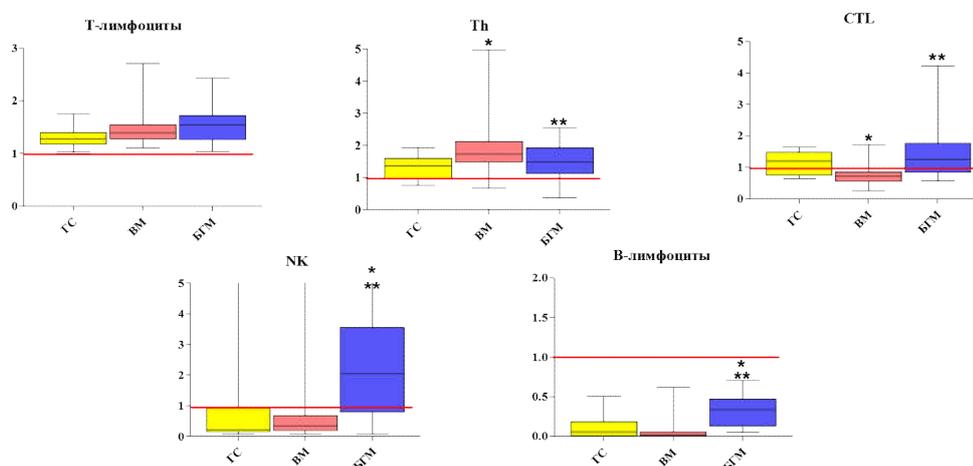


Рисунок 2 - Соотношение относительного содержания субпопуляций лимфоцитов ликвор/кровь в группе сравнения и при менингитах у детей в остром периоде. ГС – группа сравнения, VM – вирусный серозный менингит, БГМ – бактериальный гнойный менингит. \* - отличие от группы сравнения, \*\* - отличие от вирусного серозного менингита.

При VM, в отличие от группы сравнения, в остром периоде коэффициент ЦСЖ/кровь был выше для Th и DN, ниже для CTL, NKT,  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ , что может свидетельствовать о значительном контроле проницаемости ГЭБ/ГЛБ для иммунокомпетентных клеток. При

БГМ в остром периоде значительно увеличен коэффициент ЦСЖ/кровь для НК (в 9,7 раз по отношению к группе сравнения, в 5,8 раз по сравнению с ВМ) и В-клеток (в 4,9 раз по отношению к группе сравнения, в 17 раз по сравнению с ВМ). Соотношение ЦСЖ/кровь для СТЛ при БГМ сопоставимо с показателем в группе сравнения и выше, чем в острый период ВМ (коэффициент 1,26 при БГМ vs. 0,73 при ВМ). При этом коэффициент ЦСЖ/кровь всех малых субпопуляций в остром периоде БГМ был выше в сравнении с ВМ, что свидетельствует об особенностях адаптивного системного и интрацеребрального иммунного ответа, обусловленного природой возбудителя.

В период реконвалесценции коэффициент ЦСЖ/кровь для большинства субпопуляций, за исключением общих Т-лимфоцитов и Th при ВМ и БГМ имеет тенденцию к нормализации при сохранении достоверных отличий между нозологическими формами.

Таким образом, выявлены существенные различия в соотношении субпопуляций в ЦСЖ и крови при ВМ и БГМ в разные периоды заболевания, отражающие различную проницаемость ГЭБ/ГЛБ для патогенетически значимых субпопуляций лимфоцитов. Можно предположить, что ГЭБ являются активными участниками контроля иммунного гомеостаза нервной системы в норме и патологии.

Обобщая полученные данные, можно констатировать, что в остром периоде ВМ и БГМ относительное содержание общих Т-лимфоцитов, Th, а также клеток малых субпопуляций — NKT, DP и DN Т-клеток, а при БГМ и  $CD3^+CD8^{dim}$  Т-клеток значительно выше в ЦСЖ в сравнении с кровью, что может свидетельствовать об участии этих субпопуляций в механизмах локальной иммунной защиты при менингитах у детей. Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов могут свидетельствовать о различных механизмах иммунопатогенеза, обусловленных вирусами или бактериальными микроорганизмами. Анализ соотношений субпопуляций ликвора и крови позволил оценить особенности интрацеребрального и системного иммунного ответа при БГМ и ВМ, в частности его лимфоцитарного состава. Коэффициент ликвор/кровь для всех субпопуляций лимфоцитов при ВМ в сравнении с БГМ достоверно отличается, что свидетельствует о значимых патогенетических особенностях менингитов вирусной и бактериальной природы. Максимальное значение при ВМ имеет динамика Th и СТЛ, в то время как у больных БГМ - В-лимфоцитов, НК клеток и DN-лимфоцитов. При этом значение большинства малых субпопуляций (NKT, DP,  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ ,  $CD3^-CD8^+NK$ ) при БГМ выше в сравнении с ВМ, что может говорить о вовлечении большего количества компонентов иммунной системы в противобактериальный иммунный ответ.

Выявленные патогенетические особенности интрацеребрального клеточного иммунного ответа легли в основу разработки метода эффективной дифференциальной диагностики менингитов у детей.

### **Дифференциально-диагностическая значимость показателей субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора при вирусных и бактериальных менингитах**

Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов при ВМ и БГМ выявил существенные отличия, как в крови, так и в ЦСЖ (рис. 3, 4). В острую фазу ВМ в крови наблюдается более высокое в сравнении с БГМ, относительное содержание всех популяций лимфоцитов, кроме В-клеток (рис. 3а). К периоду реконвалесценции содержание общих Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови сопоставимо при обеих нозологических формах, тогда как содержание NK, DN,  $CD3^+CD8^+NK$ , NKT и  $CD3^+CD8^{dim}$  в крови при БГМ остаётся ниже, а В-лимфоцитов выше, чем при ВМ (рис. 4а)

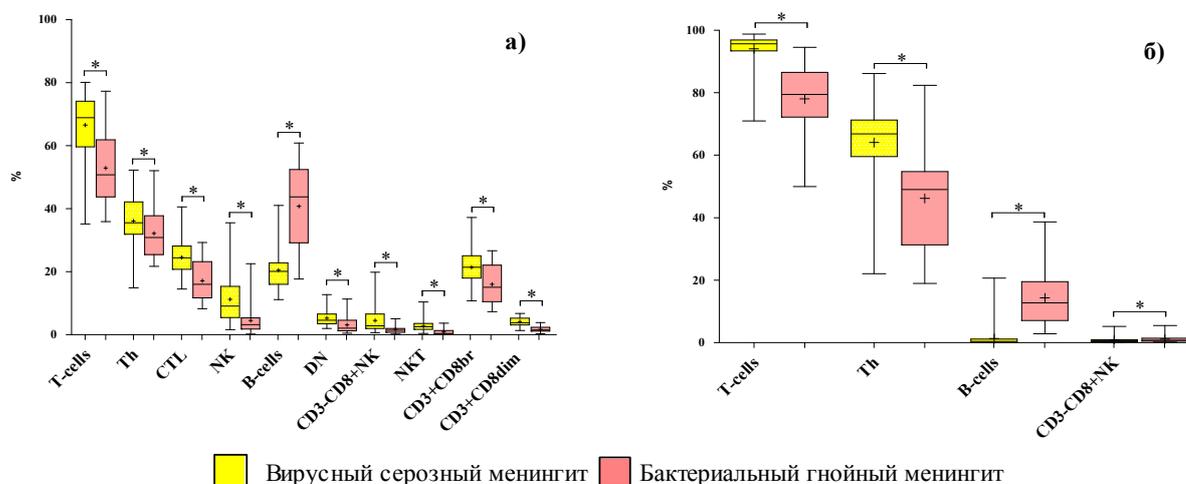


Рисунок 3 - Сопоставление относительного содержания субпопуляций лимфоцитов крови (а) и цереброспинальной жидкости (б) детей с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом в остром периоде заболевания (\* -  $p < 0,05$ ).

В ЦСЖ детей в остром периоде БГМ в сравнении с ВМ выявлено более низкое содержание общих Т-лимфоцитов, Th и более высокое содержание  $CD3^+CD8^+NK$  и В-лимфоцитов (рис. 3б).

В стадии реконвалесценции относительное содержание Т- и В-лимфоцитов при БГМ также достоверно отличается от ВМ (рис. 4б).

Полученные данные позволили рекомендовать исследование субпопуляционного состава лимфоцитов с целью дифференциальной диагностики вирусной и бактериальной природы менингита у детей. В крови максимальная чувствительность и специфичность ( $AUC > 0,9$ ) выявлена для относительного содержания  $CD3^+CD8^{dim}$  и В-клеток. Так, содержание  $CD3^+CD8^{dim}$  менее 2,5% и В-клеток более 24,9% с высокой вероятностью указывает на инфекцию бактериальной природы, тогда как содержание  $CD3^+CD8^{dim}$  более 2,5% и В-клеток менее 24,9% - на инфекцию вирусной природы.

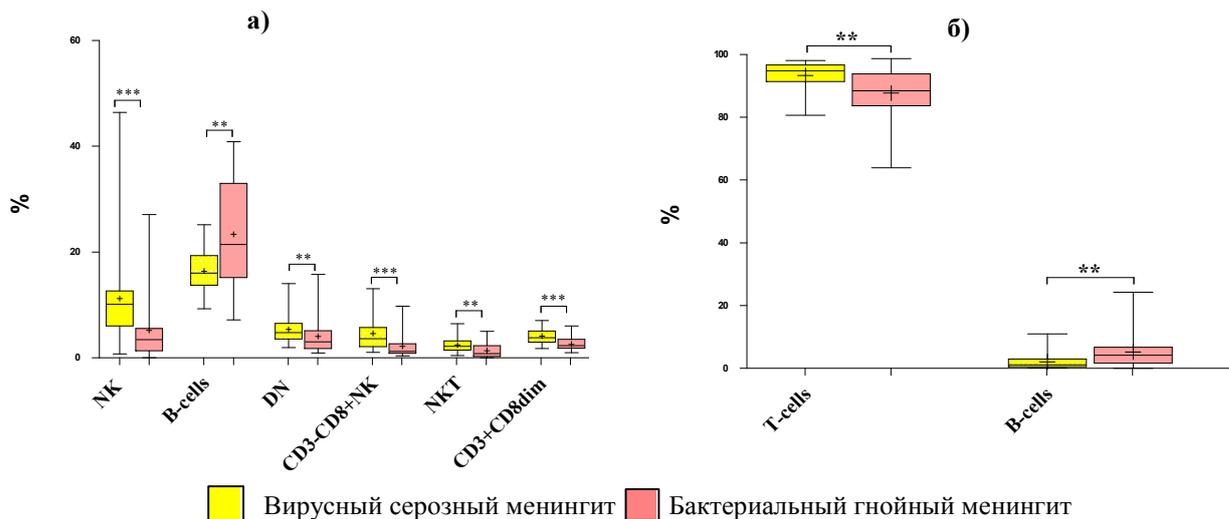


Рисунок 4 - Сопоставление относительного содержания субпопуляций лимфоцитов крови (а) и ликвора (б) пациентов с вирусным серозным и бактериальным гнойным менингитом в период реконвалесценции заболевания (\* -  $p < 0,05$ ).

В ЦСЖ высокими показателями чувствительности и специфичности для дифференциальной диагностики ВМ и БГМ обладало относительное содержание общих Т-лимфоцитов, Th и коэффициент отношения Th/CTL, а наиболее значимым показателем являлось относительное содержание В-лимфоцитов. В целом по группе детей с менингитами установлено, что относительное содержание В-лимфоцитов в ЦСЖ в остром периоде заболевания выше 2,72% было характерно для бактериального менингита, равное, или менее 2,72% - для вирусного при специфичности и чувствительности данного критерия 100% и 97,73% соответственно.

ROC-анализ, проведенный отдельно по возрастным группам 2-6 и 6-12 лет, подтвердил высокую эффективность использования определения относительного содержания В-лимфоцитов в ликворе для дифференциальной диагностики менингитов, но в разных возрастных диапазонах cut-off различался. Так, в группе детей 2-6 лет cut-off составил 2,37% при 100% чувствительности и специфичности, а в группе детей 6-12 лет составил 2,82% при 100% чувствительности и 96,3% специфичности.

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ЦСЖ позволяет в кратчайшие сроки (в течение часа) провести дифференциальную диагностику менингита вирусной и бактериальной природы, основываясь на результатах субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора (рис. 5).

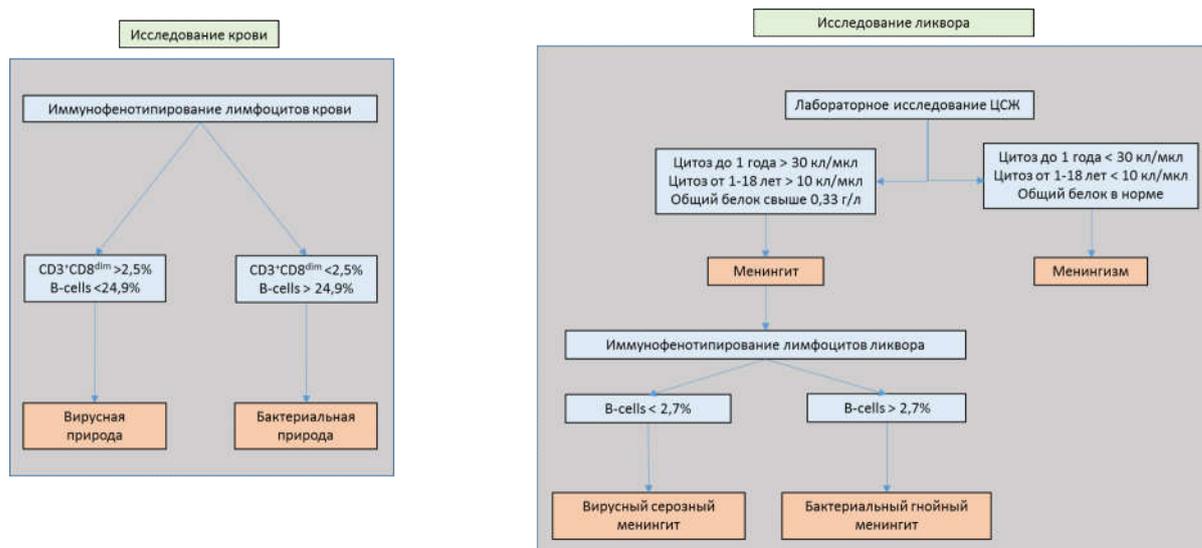


Рисунок 5 – Схема диагностики менингита с применением стандартных методов ликворологической лабораторной диагностики и иммунофенотипирования лимфоцитов крови и ликвора.

Проведение люмбальной пункции, обязательное во всех случаях подозрения на менингит, обуславливает включение в схему лабораторного обследования дополнительного проведения иммунофенотипирования лимфоцитов, существенно повышающего эффективность дифференциальной диагностики. Определение относительного содержания В-лимфоцитов (пороговое значение 2,7%) позволяет с максимальной чувствительностью и специфичностью провести дифференциальную диагностику вне зависимости от характера цитоза ликвора и возраста ребёнка.

Фенотипирование лимфоцитов крови также может быть использовано для предварительного дифференциального диагноза в случае невозможности проведения люмбальной пункции по медицинским показаниям, например, при подозрении на дислокацию мозга. У детей, поступающих с подозрением на менингит увеличение содержания  $CD3^+CD8^{dim}$  выше 2,5% и снижение В-лимфоцитов ниже 24,9% с высокой достоверностью указывает на вирусную, а не на бактериальную природу инфекционного процесса. Более значительное увеличение  $CD3^+CD8^{dim}$  при вирусной природе процесса по сравнению с бактериальной может быть обусловлена функциональными свойствами этой минорной субпопуляции. Показано, что  $CD3^+CD8^{dim}$  проявляют слабую цитотоксическую активность, имеют замедленную пролиферацию, нарушенную передачу сигналов Т-клеточного рецептора и экспрессируют отличный от  $CD45^+CD3^+CD8^{br}$  профиль цитокинов. Повышенное содержание  $CD3^+CD8^{dim}$  лимфоцитов в оба периода ВМ может быть связано с воздействием вируса на дифференциацию CTL, что отмечалось и при других вирусных инфекциях [Eller M.A. et.al., 2016]. Увеличение содержания В-лимфоцитов в крови и ликворе при БГМ, свидетельствует о преимущественно гуморальном типе иммунного ответа при бактериальной инфекции.

Таким образом, дополнительное исследование ликвора с определением основных субпопуляций лимфоцитов (при этом наиболее диагностически значимыми являются В-клетки), позволяет в кратчайшие сроки в остром периоде, независимо от характера цитоза и возраста, дифференцировать вирусную или бактериальную природу заболевания, корректировать этиотропную терапию. Обнаруженная взаимосвязь субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора с тяжестью БГМ в перспективе может позволить разработку новых терапевтических подходов, направленных на снижение цитотоксической и иммуносупрессивной активности лимфоцитов, для снижения риска развития осложнений, инвалидизации и летальных исходов. Полученные результаты расширяют возможности клинической лабораторной диагностики менингитов у детей.

### ВЫВОДЫ

1. Обнаружены широкие области совпадения стандартных показателей крови и ликвора (общее количество лейкоцитов и уровень С-реактивного белка в крови, плеоцитоз ликвора) при вирусном серозном и бактериальном гнойном менингите у детей, что снижает их диагностическую эффективность и ограничивает использование в целях дифференциальной диагностики.

2. Оптимизирован метод проточной цитометрии для исследования популяций лимфоцитов ликвора для диагностики бактериальных и вирусных менингитов.

3. В ликворе детей группы сравнения выявлено доминирование Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов при незначительном количестве НК и В-лимфоцитов и установлено увеличение с возрастом относительного количества Т-лимфоцитов и Т-хелперов, снижение цитотоксических Т-лимфоцитов, НК и двойных негативных Т-лимфоцитов.

4. При вирусном серозном менингите у детей в остром периоде в крови относительно группы сравнения выявлено снижение содержания Т-хелперов и увеличение НКТ-клеток, тогда как в ликворе - увеличение содержания Т-хелперов, НК, двойных негативных Т-лимфоцитов, снижение цитотоксических Т-лимфоцитов и всех малых субпопуляций, что свидетельствует о преимущественном развертывании локального клеточного иммунного ответа.

5. При бактериальном гнойном менингите у детей в остром периоде в крови относительно группы сравнения выявлено снижение содержания общих Т-лимфоцитов, Т-хелперов,  $CD3^+CD8^{dim}$  и увеличение В-лимфоцитов, в ликворе - снижение общих Т-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и их субпопуляций  $CD3^+CD8^{br}$ ,  $CD3^+CD8^{dim}$ , НКТ, двойных положительных Т-лимфоцитов при значительном увеличении количества В-клеток, НК и их субпопуляции  $CD3^-CD8^+NK$ , DN, что, в целом, свидетельствует о развертывании преимущественно гуморального как системного, так и интрацеребрального иммунного ответа.

6. Более тяжелое течение бактериального гнойного менингита ассоциировано с увеличением в ликворе относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов и их субпопуляций  $CD3^+CD8^{dim}$ , DN, NKT при снижении содержания Т-хелперов и В-лимфоцитов.

7. Выявлены достоверные различия соотношений субпопуляций ликвор/кровь для вирусных и бактериальных менингитов, что свидетельствует о патогенетических особенностях интратекального и системного иммунного ответа при этих нозологических формах.

8. Для дифференциальной диагностики бактериального и вирусного менингита в остром периоде заболевания наиболее информативным является содержание В-лимфоцитов в ликворе (пороговое значение 2,7%), превышение этого показателя свидетельствует о бактериальной, а снижение – о вирусной природе менингита (специфичность 100%, чувствительность 97,7%).

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Проведённое исследование и его результаты позволяют сформулировать ряд практических рекомендаций врачам-инфекционистам, врачам клинической лабораторной диагностики и биологам:

1. Оптимизированный метод проточной цитометрии рекомендуется использовать для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов цереброспинальной жидкости при менингитах различной этиологии.

2. При подозрении на менингит в остром периоде болезни рекомендуется назначение и проведение большим иммунофенотипирования лимфоцитов ликвора оптимизированным способом с определением в составе лимфоцитов основных субпопуляций. Метод позволяет проводить дифференциальную диагностику вирусной или бактериальной природы менингита. При содержании В-лимфоцитов более 2,7% диагностируют бактериальный менингит, при содержании В-лимфоцитов менее 2,7% - вирусный менингит (специфичность – 100%, чувствительность 97,7%, AUC-1,0).

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Для уточнения патогенеза менингита, оценки влияния дисбаланса различных субпопуляций на тяжесть течения и исход заболевания, а также поиска эффективных диагностических маркеров перспективным является углублённое исследование в крови и ликворе различных субпопуляций Т-лимфоцитов (Th и CTL типа 1, 2, 17, 9 и регуляторных Т-клеток) и В-лимфоцитов (В1- и В2-лимфоциты, В-клетки памяти).

**Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, а также международных базах данных, для опубликования основных научных результатов диссертации по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика**

1. Алексеева, Л.А. Субпопуляции лимфоцитов и цитокины в крови и цереброспинальной жидкости при вирусных и бактериальных менингитах у детей / Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова, А.А. Жирков, Н.В. Скрипченко, А.А. Вильниц, Н.Е. Монахова, Т.В. Бессонова // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т.6, № 1. – С. 33–44.

2. Жирков, А.А. Субпопуляционный состав лимфоцитов цереброспинальной жидкости детей с острой респираторной вирусной инфекцией, протекающей с синдромом менингизма / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова, Н.Е. Монахова, Т.В. Бессонова // Медицинская иммунология – 2019. – Т. 21, №6. – С. 1033-1042.

3. Жирков, А.А. Основные и малые субпопуляции лимфоцитов крови и цереброспинальной жидкости при менингитах у детей / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова, Н.В. Скрипченко, Н.Е. Монахова, Т.В. Бессонова // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11, №1. – С. 111-122.

**Тезисы и прочие публикации:**

4. Патент № RU 2695359 C1, G01N 33/48. Способ дифференциальной диагностики менингитов. Номер заявки: 2018125196. Дата регистрации: 09.07.2018. Дата публикации: 23.07.2019 / Алексеева Л.А., Жирков А.А., Вильниц А.А., Монахова Н.Е., Скрипченко Н.В. Патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства". 9 с.

5. Жирков, А.А. Динамика относительного содержания субпопуляций лимфоцитов ликвора у детей с серозными менингитами / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Н.Е. Монахова // Журнал Инфектологии. Приложение. – 2017. – Т. 9, № 1. - С. 65.

6. Жирков, А.А. Субпопуляции лимфоцитов ликвора у детей с бактериальным гнойным менингитом / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Н.Е. Монахова, Г.Ф. Железникова // Лабораторная служба. – 2017. – №3. – С. 38.

7. Алексеева, Л.А. Диагностическое и прогностическое значение исследования субпопуляционного состава лимфоцитов ликвора при нейроинфекциях / Л.А. Алексеева, А.А. Жирков, Н.В. Скрипченко // Сборник тезисов XX Давиденковских чтении. – 2018. – С. 16-17.

8. Жирков, А.А. Характеристика клеточного и гуморального звена иммунитета при гнойном менингите менингококковой этиологии у детей / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Н.Е. Монахова // Журнал Инфектологии. Приложение 1. – 2019. – Т. 11, № 1. – С. 55.

9. Жирков, А.А. Возрастные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови и ликвора детей с серозным менингитом / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова, Н.Е. Монахова // Журнал Инфектологии. Приложение 1. – 2020. – Т. 12, № 4. – С. 61-62.

10. Жирков, А.А. Субпопуляции лимфоцитов ликвора при бактериальном гнойном менингите у детей разного возраста / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова и др. // Журнал Инфектологии. Приложение 1. – 2021. – Т. 13, № 4. – С. 48.

11. Жирков, А.А. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови и ликвора у детей при бактериальном гнойном менингите различной степени тяжести / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Г.Ф. Железникова и др. // Журнал Инфектологии. Приложение 1. – 2021. – Т.13, №2. – С. 36.

12. Жирков, А.А. Диагностическая значимость субпопуляций лимфоцитов при бактериальном гнойном менингите менингококковой этиологии у детей / А.А. Жирков, Л.А. Алексеева, Н.Е. Монахова и др. // Журнал Инфектологии. Приложение 1. – 2022. – Т. 11, №1. – С. 14.

### **Список сокращений**

CD - кластер дифференцировки

CTL – цитотоксические Т-лимфоциты

NK – натуральные/нормальные киллеры

NKT - натуральные/нормальные Т - киллеры

Th – Т-хелперные лимфоциты

БГМ – бактериальный гнойный менингит

ВМ – вирусный серозный менингит

ГМ – гемофильной менингит

ММ – менингококковый менингит

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ПМ – пневмококковый менингит

СРБ – С-реактивный белок

ССЛ – субпопуляционный состав лимфоцитов

ЦНС – центральная нервная система

ЦСЖ – цереброспинальная жидкость (или ликвор)