

Дифференциальная диагностика инфекционных и неинфекционных осложнений у пациентов после трансплантации печени на основании мониторинга иммунологических показателей



В.П. Никулина, Г.В. Булава, М.А. Годков

ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Москва

Докладчик – Валентина Петровна Никулина,
sa-to@yandex.ru

V.P. Nikulina, G.V. Bulava, M.A. Godkov

*N.V. Sklifosovsky Research Institute
for Emergency Medicine*

of Moscow Healthcare Department, Moscow

Проведение дифференциальной диагностики воспалительных процессов бактериальной и вирусной природы, острого клеточного отторжения (ОКО) у реципиента в ранние сроки после трансплантации печени (ТП) является сложной задачей. Затрудняют диагностику исходно тяжелое состояние пациента, длительный интраоперационный период, а также многокомпонентная иммуносупрессивная терапия, выполняемая с первых часов после трансплантации. Клинико-биохимические методы диагностики на данном этапе не специфичны. Биопсия трансплантата не всегда возможна из-за высокого риска осложнений, поэтому актуален поиск малоинвазивных методов диагностики осложнений. Воспалительная реакция – это, прежде всего, активация и пролиферация иммунокомпетентных клеток. На современном этапе изучения механизмов формирования иммунного ответа на различные антигены известно, что в пролиферацию вступают и выполняют эффекторную функцию разные клоны иммунокомпетентных клеток. Следовательно, мониторинг иммунологических показателей может позволить определить характер антигена и выраженность иммунного ответа. Для подтверждения этого тезиса в нашем институте проведен лабораторный мони-

торинг реципиентов печени в первые 2 недели после трансплантации на этапе формирования посттрансплантационного иммунитета, который включал помимо клинико-биохимических методов мониторинг иммунологических показателей.

Целью данной работы являлось определение диагностически значимых иммунологических показателей и оптимальных сроков для дифференциальной диагностики воспалительных процессов различной этиологии у пациентов в раннем периоде после ТП (рис. 2).

Нами проанализированы иммунологические показатели 112 реципиентов печени, которые в зависимости от течения послеоперационного периода и диагностированных осложнений были разделены на четыре группы. Контрольную группу составили пациенты без осложнений в первые 2–3 недели после ТП. В 1-ю группу включены больные с осложнениями бактериальной природы. Во 2-ю группу вошли пациенты с реактивацией вирусного гепатита (РВГ) В или С и больные с клинической и лабораторной картиной инфекции, вызванной вирусами семейства *Herpesviridae* (ГВИ – герпесвирусные инфекции). В 3-ю группу включены пациенты с ОКО трансплантата печени, подтвержденным биопсией (рис. 3). На рис. 4

представлены осложнения, диагностированные в наблюдаемых группах.

Всем пациентам проводили комплекс лабораторных методов обследования, включая ежедневный мониторинг иммунологических показателей крови. Статистический анализ полученных данных включал параметрические и непараметрические методы (рис. 5).

В результате мониторинга определены информативные иммунологические показатели, статистически значимо различающиеся по группам, установлены сроки, в которые целесообразно выполнять иммунологическое обследование (рис. 6).

На следующем этапе у пациентов контрольной группы проведен статистический анализ информативных иммунологических показателей на 2-е, 5-е, 12-е и 14-е сутки, определены средние значения. Для наглядного представления большого количества иммунологических показателей мы использовали метод лепестковой диаграммы. Для этого средние показатели интервала референтных значений приняли за 100% и представили в виде лепестковой диаграммы. Средние значения показателей пациентов контрольной группы на 2-е, 5-е, 12-е и 14-е сутки рассчитали в % относительно референтных значений и также представили в виде лепестковых диаграмм. Полученные диаграммы отражали изменения иммунологических показателей больных группы сравнения, т.е. пациентов без осложнений, а также с адекватным иммунным ответом на многочасовую операцию и проводимую иммуносупрессию (рис. 7). Иначе говоря, мы получили графическое изображение «нормы патологии» больных после ТП. Такой метод анализа иммунологических показателей апробирован ранее в нашем институте, в 2008 г. получен патент (рис. 8). Для дальнейшего анализа показатели пациентов контрольной группы в указанные сроки приняли за 100% и относительно них рассчитали в % показатели групп больных с осложнениями (рис. 9).

Полученные иммунологические профили наглядно демонстрируют разнонаправленные тенденции в изменении иммунологических показателей по группам. Наиболее выраженные различия зафиксированы между группами пациентов с бактериальными и вирусными осложнениями.

У больных с бактериальными осложнениями (1-я группа) со 2-х по 14-е сутки наблюдалось значительное превышение относительно контрольной группы количества нейтрофилов,

лейкоцитов и активность нейтрофилов в спонтанном НСТ-тесте, что можно оценить как гиперергический иммунный ответ. У пациентов с вирусными осложнениями (2-я группа), напротив, отмечено снижение практически всех анализируемых показателей относительно контрольной группы, т.е. имел место гипоергический ответ. У больных с ОКО (3-я группа) на 2-е сутки выявлено резкое увеличение количества иммунокомпетентных клеток по сравнению с контрольной группой, в последующие сутки на фоне иммуносупрессии число клеток относительно контрольной группы снизилось, за исключением нейтрофилов и абсолютного содержания $CD8^+$ -лимфоцитов, являющихся эффекторными клетками при ОКО. Наиболее выраженные различия по группам наблюдались на 2-е сутки после ТП до появления клинической картины воспаления, что дает возможность судить о значении иммунологического мониторинга для прогноза возможных осложнений (рис. 10). Анализ полученных диаграмм позволил выделить иммунологические показатели, которые составили диагностический комплекс для проведения дифференциальной диагностики воспалительных процессов различной этиологии (рис. 11). При выполнении статистического анализа показателей пациентов с бактериальными осложнениями в периоде формирования воспалительного процесса по сравнению с контрольной группой в те же сроки статистически значимо различалось количество лейкоцитов и нейтрофилов (рис. 12). При проведении ROC-анализа наибольшей диагностической значимостью обладало число лейкоцитов и нейтрофилов (рис. 13).

У пациентов с вирусными осложнениями по сравнению с контрольной группой в те же сроки анализ выявил статистически значимые различия по количеству лейкоцитов и нейтрофилов. Абсолютное содержание $CD8^+$ -лимфоцитов и иммунорегуляторный индекс (ИРИ) статистически значимо различались только у больных с РВГ (рис. 14). У этих же пациентов исследуемые показатели имели высокую диагностическую значимость (рис. 15).

У реципиентов с ОКО по сравнению с контрольной группой в те же сроки статистически значимые различались абсолютное содержание $CD8^+$ -лимфоцитов и ИРИ (рис. 16). ROC-анализ показал высокую значимость этих показателей для диагностики ОКО (рис. 17). Таким образом, на основании проведенных исследований и статистического анализа полученных данных впервые определены иммунологические критерии и

создан алгоритм для дифференциальной диагностики осложнений различной природы в раннем периоде после ТП (рис. 18).

Клинические примеры (рис. 19):

1. У пациента С., 24 лет, при иммунологическом мониторинге на 2-е и 5-е сутки отмечены изменения, характерные для воспалительного процесса бактериальной природы. На 8-е сутки проявилась клиническая картина гнойного холангита, диагноз подтвержден биопсией трансплантата.

2. У пациента К., 37 лет, при проведении иммунологического мониторинга на 2-е и 5-е сутки отмечены изменения, типичные для иммунного ответа на вирусную инфекцию. На 9-е сутки появились клинические признаки герпетической инфекции.



Дифференциальная диагностика инфекционных и неинфекционных осложнений у пациентов после трансплантации печени на основании мониторинга иммунологических показателей

Никулина В.П., Булава Г.В., Годков М.А.

Рис. 1

Цель работы: выявить диагностически значимые иммунологические показатели и определить оптимальные сроки для проведения дифференциальной диагностики воспалительных процессов различной этиологии у пациентов в раннем периоде после трансплантации печени

Рис. 2

3. При мониторинге иммунологических показателей пациентки К., 38 лет, отмечены изменения, характерные для высокого риска ОКО: увеличение по сравнению с контрольной группой абсолютного содержания CD8⁺-лимфоцитов, снижение ИРИ. К 9-м суткам у больной определили клиническую и лабораторную картину ОКО.

Заключение: мониторинг иммунологических показателей – количества лейкоцитов, нейтрофилов, CD8⁺-лимфоцитов, ИРИ – на 2-е сутки после ТП позволяет прогнозировать возможные осложнения, а в последующие сутки проводить дифференциальную диагностику осложнений различной этиологии (рис. 20).

Обследованы 112 пациентов после трансплантации печени

	Контрольная группа (n = 28)	1-я группа. Бактериальные осложнения (n = 60)	2-я группа. Вирусные осложнения (n = 16)	3-я группа. Острое клеточное отторжение (n = 8)
ПОЛ, м/ж	13/15	20/40	7/9	5/3
Возраст (M ± SD), годы	46,6 ± 13,7	46,2 ± 11,8	44,1 ± 12,3	40,9 ± 14,5
Этиология цирроза	Вирусная – 14 АИГ – 2; ПСХ – 1 ПБЦ – 6 Болезнь Вильсона – Коновалова – 2 Алкогольный – 3	Вирусная – 37 АИГ – 2; ПСХ – 2; ПБЦ – 8 Болезнь Вильсона – Коновалова – 3 Алкогольный – 5 ГЦР-1 Криптогенная – 1 Синдром Багдда-Киари – 1	Вирусная – 12 Болезнь Вильсона – Коновалова – 1 Криптогенная – 2 ГЦР – 1	Вирусная – 6 Болезнь Вильсона – Коновалова – 1 АИГ – 1
Иммуносупрессия	3-компонентная – 16 4-компонентная – 12	3-компонентная – 38 4-компонентная – 22	3-компонентная – 12 4-компонентная – 4	3-компонентная – 5 4-компонентная – 3

Рис. 3

Группы больных n = 84 (100%)	Осложнения
1-я группа, n = 60 (71,5%)	Пневмония – 27 (32,1%) Постшоковые некрозы с абсцедированием – 14 (16,7%) Сепсис – 14 (16,7%) Перитонит – 6 (7,1%) Холангит – 4 (4,8%) Панкреатит – 2 (2,3%)
2-я группа, n = 16 (19,0%)	Цитомегаловирусная инфекция – CMV – 4 (4,8%) Герпетическая инфекция – HSV 1-го и 2-го типов – 4 (4,8%) Вирус Эпштейна-Барр – EBV – 1 (1,2%) Вирусный гепатит С – HCV – 5 (5,9%) Вирусный гепатит В – HBV – 2 (2,3%)
3-я группа, n = 8 (9,5%)	Острое клеточное отторжение – 8

Рис. 4

Методы исследования

- Иммунологический мониторинг: фенотипирование лимфоцитов: CD3, CD4, CD8, CD3⁺, CD16⁺, CD56⁺, CD19; поглотительная способность нейтрофилов в латекс-тесте и оценка активности кислородного метаболизма нейтрофилов в НСТ-тесте; определение уровней IgA, IgM, IgG
- Клинико-биохимические исследования: клинический анализ крови, определение уровня в ней билирубина, активности АСТ, АЛТ, ГГТП, ЩФ
- Бактериологический анализ биоматериала (кровь, моча, мокрота, отделения из ран и дренажей)
- Молекулярно-генетические методы диагностики: ПЦР и ИФА сыворотки для выявления инфекционных антигенов
- Статистический анализ включал параметрические и непараметрические методы анализа (тест Манна-Уитни), достоверность результата – p < 0,05, определение медианы и величины интерквартильного размаха (25–75%), лепестковые диаграммы. Использовали программы Microsoft Exell 2007 и Graph Pad Prism 5

Рис. 5

«Норма патологии» у пациентов группы сравнения в указанные сутки после ТП

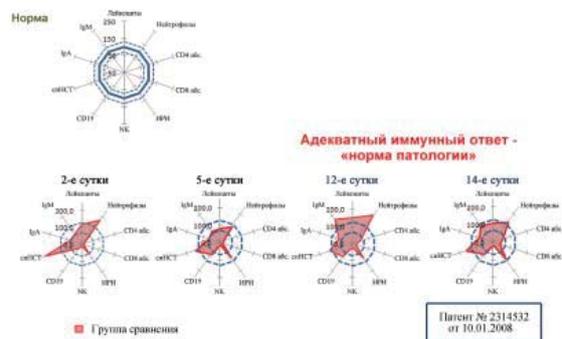


Рис. 8

В ходе ежедневного иммунологического мониторинга определены:

- наиболее информативные иммунологические показатели, имеющие статистически значимые различия у пациентов сравниваемых групп:
 - Количество лейкоцитов
 - Количество нейтрофилов
 - Количество CD8⁺ лимфоцитов
 - Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8)
 - Количество В-лимфоцитов (CD19⁺)
 - Количество NK-клеток
 - Уровень IgM и IgA
 - Активность нейтрофилов в спонтанном НСТ-тесте
- сутки (2-е, 5-е, 12-е и 14-е) после трансплантации печени, в которые зафиксированы статистически значимые изменения анализируемых иммунологических показателей по группам

Рис. 6

«Норма патологии» у пациентов группы сравнения в указанные сутки после ТП

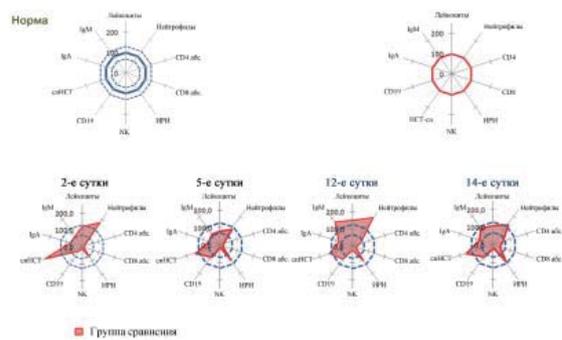


Рис. 9

Иммунологические показатели у пациентов группы сравнения в указанные сутки

Показатели (M ± σ)	Сутки после ТП				Референтный интервал
	2-е	5-е	12-е	14-е	
Лейкоциты, кл/мкл	7874,7±3694	5425,6±2782,2	9860,5±4511,6*	7273±2633,3	5500±2500
Нейтрофилы, кл/мкл	7467,3±3078*	4771,8±2649	8554±4054*	5821,5±2422	3900±1900
CD4 ⁺ , кл/мкл	140,5±102,7*	144,3±108,4*	489,8±227,*	551,5±238,1*	1008±453
CD8 ⁺ , кл/мкл	97,6±50,2*	78,9±54,1*	237,5±140,1*	250,5±121,9*	675±341
ИРИ, CD4/CD8	1,4±0,5	1,9±1,0	2,1±0,5	2,3±0,7	1,9±0,4
NK, кл/мкл	36,4±20,2*	41,7±24,3*	86,2±43,8*	65,4±43,6*	340±185
CD19, кл/мкл	117,8±79,6*	256,3±128,9*	364,4±176,6	324,9±189,6	375±295
спонтанный НСТ-тест, %	23±10,2*	15±4,4	14,1±4,5	16,2±5,8	10,0±5,0
IgA, г/л	1,6±0,6	1,5±0,4	1,6±0,6	1,8±0,5	2,1±0,4
IgM, г/л	1,2±0,5	1,3±1,2	2,8±0,6*	1,9±0,9	1,6±0,5

*p < 0,05 относительно референтного интервала.

Рис. 7

Иммунологические профили пациентов в анализируемых группах и группе сравнения

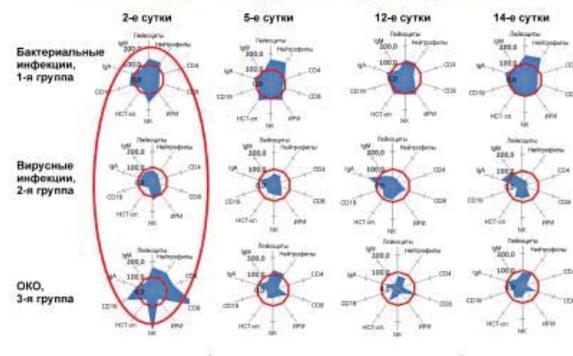


Рис. 10

Диагностический комплекс для проведения дифференциальной диагностики воспалительных процессов

Кровь:

- Количество лейкоцитов
- Количество нейтрофилов
- Количество CD8⁺-лимфоцитов
- Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8)

Рис. 11

Анализ иммунологических показателей пациентов с вирусной инфекцией

Показатели	Контрольная группа		Пациенты с вирусной инфекцией		P		
	Среднее значение, M	Медиана; 25 и 75%	Среднее значение, M	Медиана; 25 и 75%			
Лейкоциты, кл/мкл	7421,2	7800 5790;9550	3068,5	3045; 2233; 3907	0,0001		
Нейтрофилы, кл/мкл	6494,3	6800; 5244; 8098	1968,3	1970; 1510;2400	0,0003		
Активность в спонтанном НСТ-тесте, %	17,4	18; 14;20	14,0	14,0; 9,3; 19,6	0,9598		
	Контрольная группа		ГВИ	РВГ	ГВИ	РВГ	
ИРИ, CD4/CD8	2,3	2,3; 1,9; 2,5	2,1	0,7	2,1; 1,5;2,5	0,7; 0,5;0,9	0,9063 0,0001
CD8 ⁺ -лимфоциты, кл/мкл	146,2	137; 65;198	69,4	203,6	61,0; 14,0;118	187; 104;323	0,0615 0,0245

Рис. 14

Анализ иммунологических показателей пациентов с бактериальными осложнениями

Показатели	Группа сравнения		Пациенты с бактериальными осложнениями		P
	Среднее значение, M	Медиана; 25 и 75%	Среднее значение, M	Медиана; 25 и 75%	
Лейкоциты, кл/мкл	6384,2	5580,0 4990,0;7580,0	11652,6	11293; 6925;14915	0,0172
Нейтрофилы, кл/мкл	5510,9	4976; 3870; 5830	11597,2	11210; 7050;13850	0,0245
Активность нейтрофилов в спонтанном НСТ-тесте, %	13,6	14,0; 10,0;19,0	17,0	16,0; 8,0; 25,0	0,3004
ИРИ, CD4/CD8	2,1	2,0; 1,6; 2,5	2,5	2,4; 1,7; 3,2	0,5981
CD8 ⁺ -лимфоциты, кл/мкл	114,6	111,0; 86 п; 137 п	110,8	76,0; 40 п; 141 п	0,1926

Рис. 12

Диагностическая значимость иммунологических показателей пациентов с вирусными осложнениями по сравнению с пациентами группы сравнения (ROC-анализ)

Показатели	Лейкоциты	Нейтрофилы	CD8 ⁺ -лимфоциты		ИРИ	
			ГВИ	РВГ	ГВИ	РВГ
AUC	0,94	0,97	0,77	0,77	0,5	0,99
Чувствительность, %	87	93	77	77	53	99
Специфичность, %	78	85	67	67	21	92,3
При cut-off	< 4388 кл/мкл	< 3693 кл/мкл	≤ 95 кл/мкл	<	—	≤ 1,1

Рис. 15

Диагностическая значимость иммунологических показателей пациентов с бактериальными осложнениями (ROC-анализ)

Показатели	Лейкоциты	Нейтрофилы	ИРИ
AUC	0,71	0,87	0,67
Чувствительность, %	72,5	81	81
Специфичность, %	60	70	27
При cut-off	> 7430 кл/мкл	> 5844 кл/мкл	≥ 1,7

Рис. 13

Анализ иммунологических показателей пациентов с острым клеточным отторжением

Показатели	Контрольная группа		Пациенты с ОКО		P
	Среднее значение, M	Медиана; 25 и 75%	Среднее значение, M	Медиана; 25 и 75%	
Лейкоциты, кл/мкл	6580,0	7010 6150; 7610	7399,0	6005; 4520; 9963	0,7533
Нейтрофилы, кл/мкл	5130,9	5400; 3763; 5893	6241,2	4426; 3760; 9407	0,9626
Активность в спонтанном НСТ-тесте, %	20,5	25; 16; 28	17,2	15; 11; 18	0,0620
ИРИ, CD4/CD8	2,1	2,0; 1,7; 2,6	0,8	0,8; 0,6; 1,1	0,0001
CD8 ⁺ -лимфоциты, кл/мкл	197,2	152; 88; 308	323,8	302; 134; 420	0,0027

Рис. 16

Диагностическая значимость иммунологических показателей пациентов с острым клеточным отторжением (ROC-анализ)

Показатели	CD8 ⁺ -лимфоциты	ИРИ
AUC	0,78	0,98
Чувствительность, %	75	99
Специфичность, %	85	93
При cut-off	≥ 185 кл/мкл	< 1,4

Рис. 17

Клинические примеры:

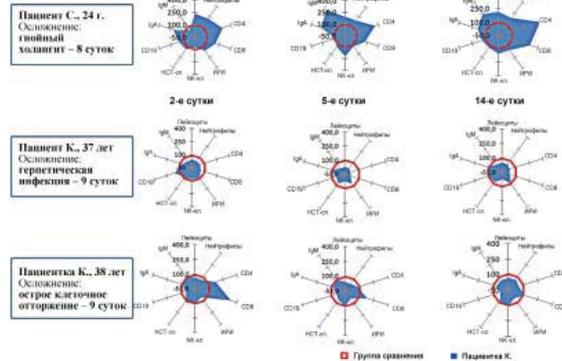


Рис. 19

Алгоритм дифференциальной диагностики воспалительных процессов различной этиологии в раннем периоде после трансплантации печени

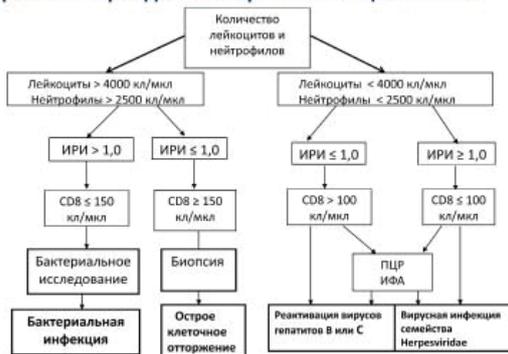


Рис. 18

Вывод:

Мониторинг иммунологических показателей – количества лейкоцитов, нейтрофилов, CD8⁺-лимфоцитов, ИРИ – на 2-е сутки после ТП позволяет прогнозировать возможные осложнения, а в последующие сутки проводить дифференциальную диагностику осложнений различной этиологии

Рис. 20