
ПРОТИВОДИФТЕРИЙНЫЙ ИММУНИТЕТ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

А.В. Лабушкина, Г.Г. Харсеева, Е.П. Москаленко

Кафедра микробиологии и вирусологии № 2
Ростовский государственный медицинский университет
пер. Нахичеванский, 29, Ростов-на-Дону, Россия, 344022

Изучены уровни антитоксических и антибактериальных противодифтерийных антител у 151 непривитых и 152 привитых АКДС-вакциной и ревакцинированных АДС-М-анатоксином детей (1—15 лет) с аллергическими заболеваниями (бронхиальная астма, атопический дерматит, поллинозы). Уровень антибактериального иммунитета не связан с проводимой вакцинацией противодифтерийными препаратами, а обусловлен естественной циркуляцией возбудителя. Группу риска по дифтерии составляют дети 1—6 лет, имеющие наиболее низкий уровень антибактериальных антител. Процесс формирования противодифтерийных антибактериальных IgG протекает медленнее, чем антибактериальных IgM и IgA, и достигает своего максимального уровня к 7—8 годам, тогда как антибактериальных IgM и IgA — к 4—6 годам.

Ключевые слова: вакцина, иммунитет, антитела.

Ведущая роль в формировании защиты против дифтерии принадлежит антитоксическому иммунитету [1, 3]. Однако антитоксические антитела участвуют в нейтрализации токсина, но не в элиминации возбудителя из организма, что составляет нерешенной проблему дифтерийного бактерионосительства [1, 2]. Носители токсигенных штаммов *C. diphtheriae* поддерживают развитие эпидпроцесса, в том числе скрытое его течение [2]. Поэтому, несмотря на значительное снижение заболеваемости в последние годы, дифтерийная инфекция продолжает представлять серьезную угрозу здоровью населения [3]. Наиболее восприимчивы к развитию заболевания дети с хронической патологией, у которых нарушается календарь прививок и удлиняются сроки проведения плановых ревакцинаций. Поэтому особое значение имеет мониторинг напряженности противодифтерийного иммунитета, позволяющий выявлять среди них контингент повышенного риска.

Целью настоящего исследования явилось определение уровня противодифтерийных антитоксических и антибактериальных антител в сыворотке крови детей с аллергическими заболеваниями различных возрастных групп.

Материалы и методы. Антитоксические и антибактериальные антитела определяли в сыворотке крови детей с аллергическими заболеваниями 1—15 лет, получивших в комплексе первичной вакцинации АКДС-вакцину и ревакцинированных АДС-М-анатоксином (152 чел.) и непривитых (151 чел.). Образцы сывороток крови забирали в условиях муниципального лечебно-профилактического учреждения здравоохранения «Консультативно-диагностический центр» г. Ростова-на-Дону с согласия родителей с 2005 г. по 2008 г. Сыворотки хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Противодифтерийные антитоксические антитела определяли в РПГА с тест-системой НПО «Биомед» им. И.И. Мечникова (г. Москва). Защитный титр антитоксина составлял 1 : 20 (СанПин «Профилактика дифтерии», Москва, 2002).

Содержание антибактериальных антител в сыворотке крови определяли методом ИФА. В качестве антигена использовали дифтерийный диализатный антиген (ДДА), полученный путем диализа дезинтеграта токсигенных *C. diphtheriae* через поры целлофана [4]. ДДА представлял собой гликолипидно-белковый комплекс, в котором не был обнаружен дифтерийный токсин в тестах иммуноблотинга и ИФА. Анализ проводили на стандартном оборудовании и стандартных реактивах для ИФА. Для сенсибилизации использовали полистироловые планшеты «Dynatech», на которых сорбировали ДДА в количестве 10—15 мкг/мл в объеме 100 мкл и выдерживали в течение 18—20 часов при +4 °С. После окончания инкубации планшеты промывали трижды фосфатно-солевым буферным раствором с 0,05% твин-80 (ФСБ-Т). В лунки сенсибилизированных планшет для блокирования свободных от антигенов участков полистирола добавляли по 220 мкл 0,1% раствора альбумина на ФСБ и инкубировали при +37 °С в течение 2 часов. Сенсибилизированные планшеты промывали трижды раствором ФСБ-Т. Образцы испытуемых сывороток крови, предварительно разведенных в 100 раз, добавляли в лунки планшет и трижды промывали раствором ФСБ-Т. В лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении, представляющего собой кроличьи антитела против IgM, IgG, IgA человека, меченые пероксидазой хрена, и инкубировали 1 час при +37 °С. По окончании инкубации лунки трижды промывали раствором ФСБ-Т, после чего в каждую вносили по 100 мкл раствора хромогена (тетраметилбензидин в цитратном буферном растворе с pH 5,0). После 15 минут инкубации при +37 °С реакцию останавливали 50 мкл 0,1 н раствора серной кислоты. Учет реакции осуществляли с помощью мультискана фирмы «Labsystem» при длине волны 450 нм. Расчет количества антител проводили с использованием калибровочной кривой и выражали в мкг/мл.

Результаты исследования. При изучении противодифтерийного антитоксического иммунитета у детей с аллергическими заболеваниями, привитых АКДС-вакциной и ревакцинированных АДС-М-анатоксином (152 чел.), установлено, что $86,8 \pm 2,7\%$ из них имели противодифтерийные антитоксические антитела в защитном титре, причем, наиболее высокий уровень дифтерийного антитоксина обнаруживали у детей 10—15 лет, среди которых количество серопозитивных составило $93,9 \pm 4,2\%$, а средняя геометрическая титров антител (СГТ) — 1 : 287,6. Все обследованные дети 1 года (14 чел.) имели защитные титры противодифтерийных антитоксических антител, но СГТ антитоксина у них была наименьшей (1 : 50,9). Следует отметить, что среди обследованных 2—9 лет (105 чел.) наиболее часто обнаруживали детей, не имевших в сыворотке противодифтерийного антитоксина в защитном титре (11,8% обследованных).

При оценке содержания антибактериальных антител у детей с аллергическими заболеваниями в зависимости от прививочного анамнеза (табл. 1) не было обнаружено отличий между привитыми и непривитыми обследованными. Так, содержание антибактериальных противодифтерийных IgG у привитых детей 1—15 лет составило $92,1 \pm 3,0$ мкг/мл, а у непривитых было даже несколько выше — $106,0 \pm 5,0$ мкг/мл. Антибактериальные IgM чаще обнаруживали у привитых детей

($33,1 \pm 1,1$), чем у непривитых ($23,1 \pm 0,9$). Однако это различие невелико и могло быть связано с более широким контактом данной группы детей с циркулирующим в популяции возбудителем, а не с проводимой вакцинацией. По уровню антибактериального противодифтерийного IgA в сыворотке крови привитых и непривитых детей никаких отличий установить не удалось. В то же время авторы [7, 8] сообщают о том, что при иммунизации взрослых АДС-М-анатоксином уровень антибактериальных антител возрастал. Данное наблюдение связывают с присутствием в дифтерийном анатоксине незначительных количеств бактериальных антигенов коринебактерий дифтерии. Однако полученные нами результаты указывали на отсутствие влияния вакцинации на выработку антибактериальных антител у детей.

Таблица 1

Содержание противодифтерийных антибактериальных антител у детей с аллергическими заболеваниями (1—15 лет) в зависимости от прививочного анамнеза

Прививочный анамнез	Кол-во обследованных (чел.)	Содержание противодифтерийных антибактериальных антител, мкг/мл					
		IgG		IgM		IgA	
		мкг/мл	не имеют АТ (% ± m)	мкг/мл	не имеют АТ (% ± m)	мкг/мл	не имеют АТ (% ± m)
Привитые	152	$92,1 \pm 3,0$	2 $1,3 \pm 0,9$	$33,1 \pm 1,1$	— 0	$23,0 \pm 1,1$	7 $4,6 \pm 1,7$
Непривитые	151	$106,0 \pm 5,0$	3 $2,0 \pm 1,1$	$23,1 \pm 0,9$	1 $0,7 \pm 0,7$	$24,4 \pm 1,3$	5 $3,3 \pm 1,5$

Возможно, данный факт может найти объяснение в том, что иммунная система детского организма сформирована не до конца и не может ответить продукцией антибактериальных антител на следовые количества микробных антигенов в АДС-М-анатоксине. Кроме того, следует учитывать и наличие отягощенного аллергологического анамнеза у обследованных детей.

Анализ содержания противодифтерийных антибактериальных антител в сыворотке крови детей с аллергическими заболеваниями в зависимости от возраста (табл. 2) свидетельствовал о постепенном нарастании их уровня. Так, содержание антибактериальных IgG у детей 1—2 лет было наиболее низким ($54,3 \pm 4,2$ мкг/мл) по сравнению с обследованными других возрастных групп, причем у $9,3 \pm 3,1\%$ детей их вообще не выявляли. В возрасте 3 лет антибактериальные IgG обнаруживали у всех обследованных, а уровень их достоверно возрос и составил $82,2 \pm 6,1$ мкг/мл. Возможно, такое существенное увеличение содержания антибактериальных IgG могло быть связано как с формирующейся иммунной системой, так и с расширением контактов детей при поступлении в детские дошкольные учреждения. Далее с возрастом уровень антибактериальных IgG достоверно повышался и достигал максимального уровня у детей школьного возраста (7—8 лет), составляя $134,0 \pm 5,9$ мкг/мл. У обследованных 9—10 и 11—15 лет уровень антибактериальных IgG существенно не изменялся по сравнению с таковым у детей 7—8 лет. Уровень антибактериальных IgM и IgA приближался к максимальному уже к 4—6 годам ($31,0 \pm 1,2$ мкг/мл и $27,4 \pm 1,9$ мкг/мл соответственно) и претерпевал в дальнейшем лишь незначительные колебания.

Содержание противодифтерийных антибактериальных антител у детей с аллергическими заболеваниями в зависимости от возраста

Возраст	Кол-во обследованных (чел.)	Содержание противодифтерийных антибактериальных антител, мкг/мл					
		IgG		IgM		IgA	
		мкг/мл	не имеют АТ (% ± m)	мкг/мл	не имеют АТ (% ± m)	мкг/мл	не имеют АТ (% ± m)
2 года	86	54,3 ± 4,2	5 9,3 ± 3,1	20,4 ± 1,4	1 1,2 ± 1,2	19,3 ± 1,6	8 9,3 ± 3,1
3 года	32	82,2 ± 6,1	— 0	26,7 ± 2,0	— 0	24,4 ± 2,4	1 3,1 ± 3,1
4—6 лет	70	110,0 ± 4,7	— 0	31,0 ± 1,2	— 0	27,4 ± 1,9	1 1,4 ± 1,4
7—8 лет	46	134,0 ± 5,9	— 0	32,3 ± 1,9	— 0	27,9 ± 2,2	— 0
9—10 лет	29	125,0 ± 8,1	— 0	33,3 ± 2,4	— 0	24,2 ± 1,9	— 0
11—15 лет	40	129,0 ± 7,0	— 0	32,2 ± 2,0	— 0	21,2 ± 2,0	2 5,0 ± 3,4

В человеческой популяции в межэпидемический период постоянно происходит циркуляция возбудителя дифтерии со скрытыми токсигенными свойствами [1, 5], что приводит к естественной иммунизации населения и, по всей видимости, выработке антибактериального иммунитета. Этот факт, безусловно, имеет положительное значение, но только при условии попадания коринебактерий дифтерии в иммунный организм. В противном случае неминуема реверсия токсигенных свойств возбудителя и развитие заболевания. Антитоксический противодифтерийный иммунитет является основным фактором невосприимчивости населения к дифтерии [1]. Однако антибактериальный иммунитет также имеет важное значение в формировании защиты против дифтерии, предотвращая адгезию возбудителя на эпителиальных клетках на ранних этапах инфекционного процесса. Поэтому определение контингентов детей, особенно с имеющимися у них хроническими и, в частности, аллергическими заболеваниями, имеющих низкий уровень антибактериального иммунитета, позволит выделить среди них группы риска по развитию дифтерии. В ходе анализа заболеваемости дифтерией в период вспышки данной инфекции в период 1994—1996 гг. в г. Ростове-на-Дону [6], было установлено, что наиболее часто тяжелые формы дифтерии (токсическая и субтоксическая) регистрировались у детей 4—6 лет ($44,9 \pm 7,1\%$ пациентов). В нашем исследовании уровень антибактериальных IgG у детей 1—6 лет был ниже, чем у обследованных старших возрастных групп. Полученные данные свидетельствовали о прямой связи уровня антибактериальных IgG и формирования тяжелых форм дифтерии. Поэтому дети ранних возрастов (1—6 лет) могут быть выделены как группа риска развития дифтерии и нуждаются в тщательном наблюдении, связанном с проведением мер как специфической, так и неспецифической профилактики данной инфекции.

Выводы.

1. Уровень антибактериального иммунитета у детей с аллергическими заболеваниями не связан с проводимой вакцинацией противодифтерийными препаратами, а обусловлен естественной циркуляцией возбудителя.

2. Группу риска по дифтерии составляют дети ранних возрастных групп (1—6 лет), имеющие наиболее низкий уровень антибактериального противодифтерийного иммунитета.

3. Процесс формирования антибактериальных IgG у детей с аллергическими заболеваниями протекает медленнее, чем антибактериальных IgM и IgA, и достигает своего максимального уровня к 7—8 годам, тогда как антибактериальных IgM и IgA — к 4—6 годам.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Костюкова Н.Н.* Уроки дифтерии // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. — 1999. — № 2. — С. 92—96.
- [2] *Костюкова Н.Н., Гукасян Л.А.* Патогенез дифтерийного бактерионосительства в иммунологическом аспекте // Журн. гиг., эпидемиол., микробиол. и иммунол. — 1977. — Т. 21. — № 4. — С. 394—398.
- [3] *Маркина С.С., Максимова Н.М., Черкасова В.В. и др.* Эпидемиологическая ситуация по дифтерии // Вакцинация. — 2006. — № 1. — С. 7—9.
- [4] *Москаленко Е.П., Харсеева Г.Г., Сылка О.И.* Способ получения дифтерийного антигенного диагностикума. Патент № 2000132169. — 21 декабря 2000 г.
- [5] *Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Трухачев А.Л., Митрофанова Т.В.* Патогенные свойства *C. diphtheriae*, циркулирующих в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области в межэпидемический период // Журн. микробиол. — 2006. — № 6. — С. 6—9.
- [6] *Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Федорук С.И., Иноземцева Г.А.* Состояние противодифтерийного иммунитета у детей при использовании АКДС-вакцины и АДС-М-анатоксина // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. — 2006. — № 1. — С. 67—68.
- [7] *Шмелева Е.А., Макарова С.И., Батурина И.Г. и др.* Специфические антитела и их роль в формировании противодифтерийного иммунитета // Журн. микробиол. — 2005. — № 1. — С. 38—43.
- [8] *Шмелева Е.А., Батурина И.Г., Парамонова Ю.А. и др.* Гуморальный противодифтерийный иммунитет // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. — 2007. — № 4. — С. 11—15.

ANTIDIPHTHERIA IMMUNITY AT CHILDREN WITH ALLERGIC DISEASES

A.V. Labushkina, G.G. Kharseeva, E.P. Moskalenko

Department of microbiology and virology №2

Rostov state medical university

Nahichevansky str., 29, Rostov-on-Don, Russia, 344022

tel. +79114636467, email: somvoz@live.ru

Levels of antitoxic and antibacterial antibodies against diphtheria were estimated at 151 children without vaccination and 152 vaccinated ones with DPT-vaccine and revaccinated children with ADT-M anatoxine (1—15 years) with allergic diseases (bronchial asthma, atopic dermatitis, pollynosis). State of antibacterial immunity not correlated with process of antidiphtheria medicines' vaccination, but depends on natural circulation of incinant. Risk group to diphtheria consisted of 1—6 years children, having the lowest level of antibacterial antibodies. Process of antidiphtherial antibacterial IgG formation is slower than antibacterial IgM and IgA formation and reaches their maximal level at 7—8 years, while IgM and Ig A — to 4—6 years.

Key words: a vaccine, immunity, antibodies.