

Эпидемиологические предпосылки и способ экстренной профилактики Лайм-боррелиоза

А.Н. ЗИНЧУК

Установлено, что присасывание клещей является распространенным явлением среди жителей западного региона Украины. Предложен способ определения показаний для экстренной профилактики (превентивного лечения) Лайм-боррелиоза. Для этого создавали нозогеографическую карту административного региона с нанесением данных о количестве заражений и количестве эндемических территорий. С помощью математического анализа определяли районы с высокой частотой заражений, что являлось критерием для проведения экстренного превентивного лечения доксициклином.

Ключевые слова: Лайм-боррелиоз, экстренная профилактика, клещи, кластерный анализ, доксициклин, юнидокс

Epidemiological risk assessment and method of post-exposure prophylaxis of Lyme-borreliosis

A. ZINCHUK

The article is dedicated to the new method of detection of the indications for urgent prophylaxis (preventive treatment) of Lyme-borreliosis in persons with tick-bites with the use of noso-geographical maps of administrative regions. The method is characterized by the use of mathematics analysis which allows to detect the regions with the high level of infection and should be considered as an indication for urgent preventive treatment by doxycycline.

Key words: Lyme-borreliosis, urgent prophylaxis, ticks, cluster analysis, doxycycline, unidox

УДК 616.995.42-02-036.22-07-08

Визначення сенсibiliзації імуніцитів у хворих на Лайм-бореліоз за вмістом цитокінів у культурі лейкоцитів, стимульованих антигенами борелій

О.М. ЗІНЧУК

У статті розглянуті питання визначення сенсibiliзації імуніцитів при Лайм-бореліозі, методом індикації синтезу цитокінів у культурі лейкоцитів, стимульованій рекомбінантними антигенами борелій, у пацієнтів з органічними ураженнями та локалізованими еритемними формами. Було доведено, що використання антигену на твердій фазі для стимуляції лімфоцитів робить метод чутливішим і стабільнішим у відтворенні результатів.

Ключові слова: Лайм-бореліоз, цитокіни, імуніцити, антигени

Лайм-бореліоз (ЛБ) – ендемічний спірохетоз з трансмісивним шляхом передачі, який часто має хронічний, рецидивуючий перебіг з поліорганими ураженнями. ЛБ широко поширений в середній смузі північної півкулі, реєструється у теплу пору року відповідно до біології переносника і характеризується у більшості випадків наявністю мігруючої еритеми на місці присмокування кліща, а також схильністю до хронізації з ураженнями центральної і периферичної нервової системи, опорно-рухового апарату, серця, очей. В останнє десятиріччя захворюваність на ЛБ невпинно зростає в Європейському регіоні. Не є винятком і Україна. Відповідно до офіційних даних, захворюваність на ЛБ в Україні в останні роки сягає 0,5–3 та 100 тис, що значно менше, ніж у сусідніх країнах. Так, захворюваність на ЛБ у Російській Федерації у різні роки становила 5–5,5, в Польщі – 9–12 та 100 тис. населення.

При ЛБ, як і при інших гострих і хронічних інфекційних хворобах спостерігається сенсibilізація до антигенів збудника, яка значною мірою визначає перебіг хвороби та її наслідки. Рівень сенсibilізації до антигенів збудника характеризує стан клітинного імунітету – підвищену чутливість сповільненого типу (ПЧСТ). Показники ПЧСТ у дослідях *in vitro* корелюють із результатами внутрішньошкірних діагностичних проб [4], а тому можуть використовуватись у тих випадках, коли діагностика *in vivo* із певних причин неможлива або небажана. При ЛБ вивчення сенсibilізації до антигенів збудника *in vivo* не знайшло свого застосування, а тому пошук інших способів виявлення ПЧСТ має велике теоретичне і практичне значення.

Метою дослідження було визначення сенсibilізації імуніцитів при ЛБ, в основі якого є індикація синтезу цитокінів IFN-g та TNF-а у культурі лейкоцитів (КЛ), стимульованій рекомбінантними антигенами борелій на твердій фазі, причому вміст цитокінів у супернатанті визначається методом імуноферментного аналізу за допомогою комерційних тест-систем [2].

Матеріали і методи

Обстежено 16 хворих на ЛБ. Серед них 9 жінок і 7 чоловіків. Вік хворих становив від 23 до 69 років. За особливостями клінічного перебігу хворі поділені на дві групи. До першої увійшли 5 пацієнтів з локалізованими еритемними формами. До другої включені 11 хворих з органічними ураженнями. Органні ураження, що свідчили про генералізацію розподілялися наступним чином: артрит раннього періоду хвороби – 7 хворих, полірадикулоневропатія раннього періоду – 2 хворих і артрит пізнього періоду – 4 хворих. У всіх хворих в анамнезі спостерігалось присмокування кліщів і діагноз підтверджений виявленням протибореліозних антитіл класу IgM або IgG. Мігруюча еритема передувала розвитку органічних ураження у 8 з 11 хворих (72,7%).

Лейкоцитарну масу виділяли з гепаринізованої венозної крові (4000 од на 20 мл крові) шляхом відстоювання у силіконових пробірках під кутом 45° при температурі 37°C протягом 60–80 хв. При сповільненій ШОЕ попередньо проводили центрифугування при 100 g протягом 3-х хв. Лейкоцитарну масу відсмоктували і двічі відмивали не менше, ніж у п'ятикратному об'ємі середовища № 199, центрифугуючи при 400 g протягом 5 хв. Осад ресуспензували у середовищі № 199 до кінцевої концентрації $4-5 \times 10^6$ клітин на 1 мл. До культурального середовища додавали пеніцилін та стрептоміцин по 100 од/мл.

Всі етапи дослідження виконували стерильно. Підготовка посуду відповідає вимогам до посуду для культури тканин, основні етапи дослідження проводять у ламінарній шафі (боксі). Культуральне середовище з лейкоцитами переносили у флакони, до яких додавали антиген на твердій фазі. Попередньо його тричі відмивали 0,9% розчином NaCl по 40 с. Культивування проводили в атмосфері CO₂ при 37°C протягом 48–72 годин. Для забезпечення нормального газообміну об'єм газу перевищував об'єм середовища у 8–10 разів.

Клітини осаджували центрифугуванням, а у супернатанті визначали вміст TNF-α та IFN-γ методом ІФА. Для визначення TNF-α та IFN-γ у сироватці крові використовують комерційну тест-систему фірми «Протеиновый контур».

Для визначення вмісту TNF-α та IFN-γ за допомогою методу твердофазного ІФА використовували два типи моноклональних антитіл: один – іммобілізований на полістиролі, другий – до незалежного епітопу молекул TNF-α та IFN-γ – знаходиться у вигляді кон'югату з біотином. Індикаторним компонентом є кон'югат пероксидази хрому зі стрептавідином, що споріднений до біотину. Після відповідної інкубації та промивання визначали активність зв'язаної пероксидази за допомогою субстрату методом фотометрії. Для обліку результатів, згідно з інструкцією виробника тест-систем, будували калібрувальну криву із використанням стандартних розчинів з відомим вмістом TNF-α та IFN-γ.

У якості контролю використовували КЛ, виділених з крові здорових, які не мали антигенів до борелій (за даними ІФА) і у анамнезу яких не було присмоктування кліщів та мігруючої еритеми. Результат оцінювали як позитивний, якщо в контролі синтезу цитокінів не відбулося. Дослідження проводилося на базі молекулярно-генетичної лабораторії кафедри інфекційних хвороб ЛНМУ ім. Данила Галицького МОЗ України.

Результати досліджень та їх обговорення

У всіх культурах лейкоцитів від хворих на ЛБ з органічними ураженнями виявлено синтез IFN-γ та TNF-α. Про це свідчить їх вміст в супернатанті за відсутності синтезу до початку культивування у культурі не стимульованих клітин.

Дані табл. 1 свідчать, що у культурі лейкоцитів хворих 2-ї групи після стимуляції рекомбінантними антигенами борелій спостерігався активніший синтез IFN-g, порівняно з хворими 1-ї групи. Так, у супернатанті культур лейкоцитів з крові 8 хворих із 11 (72,7%), що склали 2-у групу, виявлено синтез IFN-g понад 100 пг/мл, в той час, як у 1-й групі хворих з синтезом IFN-g понад 100 пг/мл не було ($p < 0,001$). У 1-й групі тільки у одного хворого після стимуляції антигенами борелій виявлено синтез IFN-g, який сягав 65 пг/мл.

Виявлено, що у культурі сенсibilізованих лейкоцитів в присутності рекомбінантних антигенів борелій синтез TNF-а був активнішим, порівняно з IFN-g (табл. 2). Так, у хворих 2-ї групи після стимуляції вміст TNF-а у культуральній рідині понад 100 пг/мл спостерігався у 9 хворих з 11 (81,8%), в той час, як у культурах лейкоцитів з крові хворих 1-ї групи синтезу TNF-а понад 100 пг/мл не було ($p < 0,001$).

Таблиця 1

Вміст IFN-g у супернатанті культури лейкоцитів хворих на Лайм-бореліоз, стимульованих антигенами *B. burgdorferi* (n=16)

Групи хворих	Хворі на ЛБ	Вміст IFN-g у супернатанті (пг/мл)				
		<50	51–100	101–150	151–200	> 200
Хворі на локалізовані еритемні форми (1-а група), n=5	абс.	4	1	0	0	0
	%	80,0	20,0	0	0	0
Хворі з органічними ураженнями (2-а група), n=11	абс.	0	3	5	2	1
	%	0	27,3	45,4	18,2	9,1

Виявлена пряма кореляція між тривалістю хвороби і вмістом як IFN-g ($r_s = 0,83$; $p < 0,01$), так і TNF-а ($r_s = 0,78$; $p < 0,01$) у супернатанті культури лейкоцитів із крові хворих 2-ї групи після стимуляції антигенами борелій. В той же час, не виявлено кореляції між вмістом аналізованих цитокінів у супернатанті стимульованих антигеном лейкоцитів і вмістом цих цитокінів у периферичній крові. Це дозволяє зробити обґрунтований, на нашу думку, висновок, що секреція цитокінів у стимульованій антигеном культурі лімфоцитів залежить від рівня сенсibilізації клітин до певного антигену – саме такий механізм їх активації здається нам найімовірнішим.

Запропонований спосіб визначення сенсibilізації організму до антигенів збудника має, на наш погляд, переваги перед відомою реакцією специфічної бластотрансформації лімфоцитів (БТЛ), яка ґрунтується на здатності лімфоцитів периферичної крові у культурі лейкоцитів перетворюватися у клітини

Вміст TNF-а у супернатанті культури лейкоцитів хворих на Лайм-бореліоз, стимульованих антигенами *B. burgdorferi* (n=16)

Групи хворих	Хворі на ЛБ	Вміст TNF-а у супернатанті (пг/мл)				
		<50	51–100	101–150	151–200	> 200
Хворі на локалізовані еритемні форми (1-а група), n=5	абс.	3	2	0	0	0
	%	60,0	40,0	0	0	0
Хворі з органними ураженнями (2-а група), n=11	абс.	0	2	3	4	2
	%	0	18,2	27,3	36,3	18,2

попередники – бласти під впливом антигену, до якого донора лейкоцитів сенсibilізовано у процесі хвороби [3]. Спосіб БТЛ є складним, довготривалим (займає 6–7 днів). До того ж, на показники сенсibilізації значною мірою впливає функціональний стан клітин, зокрема, можливе ушкодження (особливо при вірусних інфекціях) їх хромосомного апарату. Складним і недостатньо відтворюваним є облік результатів досліду – за інтенсивністю синтезу ДНК або за підрахунком клітин, що ідентифіковані як бласти. Морфологічні зміни лімфоцита, які є заключним етапом складного процесу трансформації, не завжди завершуються утворенням бластної форми.

Перевага запропонованого способу полягає у тому, що він враховує початкові етапи трансформації – активізацію внутрішньоклітинних біохімічних процесів, з яких починається специфічна БТЛ, а саме синтез IFN-g та TNF-а за його вмістом в супернатанті клітин. Синтез цитокінів відбувається і у випадках незавершених морфологічних перетворень. Результати дослідження враховують вже на 2–4 день культивування, тобто значно швидше, аніж за способом БТЛ. Визначення вмісту IFN-g та TNF-а методом ІФА за допомогою комерційної тест-системи спрощує облік результатів і дозволяє їх автоматизувати.

Використання антигену на твердій фазі має ряд переваг, порівняно з використанням рідкого антигену, а саме:

- 1) Більша чутливість методу і стабільніша відтворюваність результатів;
- 2) При використанні антигену на твердій фазі відпадає необхідність індивідуального підбору дози, що значно полегшує проведення дослідження. Переваги використання антигену на твердій фазі також були продемонстровані в дослідженнях В.А. Бурлева та співавт. при вивченні специфічної реактивності імуніцитів до HBsAg в реакції БТЛ [1].

Запропонований спосіб визначення специфічної сенсibilізації організму при ЛБ за синтезом цитокінів культури лімфоцитів, які стимульовані анти-

генами борелій, розширює можливості вивчення механізмів специфічної активації імункомпетентних клітин, тим паче, що дослідження сенсibiliзації *in vivo* (шкірні алергічні проби) при ЛБ не знайшло широкого застосування. Його доцільно використовувати для наукових досліджень із вивчення підвищеної чутливості сповільненого типу при ЛБ.

Висновки

У хворих на ЛБ з органічними ураженнями виявлено високий рівень підвищеної чутливості сповільненого типу до антигенів борелій: синтез IFN- γ та TNF- α у культурі лейкоцитів у більшості хворих (відповідно 72,7% і 81,8%) перевищував 100 пг/мл, в той час, як у хворих на локалізовані еритемні форми синтезу подібної інтенсивності взагалі не було.

Використання антигену на твердій фазі для стимуляції лімфоцитів робить метод чутливішим і стабільнішим у відтворенні результатів.

Література

1. А. с. 1193850 СССР Способ диагностики сенсibilизации организма к вирусу гепатита В / В.Л. Бурлев, Б.А. Герасун, В.М. Титов, Л.Ю. Шевченко (СССР) – опубл. 22.02.1985г.
2. Патент № 26600 України, МПК (2007) G01N 33/50. Спосіб визначення сенсibilізації організму при інфекційних хворобах / О.Б. Герасун, А.М. Задорожний, О.М. Зінчук (Україна); заявник і патентовласник Львівський НМУ ім. Д.Галицького (Україна) – u 2007 06475; заявл. 11.06.2007; опубл. 25.09.2007, Бюлетень № 15.
3. Эшмен Р.Ф. Активация лимфоцитов / Р.Ф. Эшмен // В кн.: Иммунология в 3 т., под ред. У. Пола; [перевод с англ.]. – М.: Мир, 1987. – Т. 1. – 476 с.
4. Якобисяк М. Імунологія / М. Якобисяк // за редакцією проф. В.В. Чоп'як [переклад з польської]. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 672 с.

Определение сенсibilизации иммуноцитов у больных Лайм-боррелиозом по содержанию цитокинов в культуре лейкоцитов, стимулированных антигенами боррелий

А.Н. ЗИНЧУК

В статье рассмотрены вопросы определения сенсibilизации иммуноцитов при Лайм-боррелиозе, методом индикации синтеза цитокинов в культуре лейкоцитов, стимулированной рекомбинантными антигенами боррелий, в пациентов с органичними поражениями и локализованными эритемными формами. Было доведено, что использование антигена на твердой фазе для стимуляции лимфоцитов делает метод более чувствительным и более стабильным в получении результатов.

Ключевые слова: Лайм-боррелиоз, цитокины, иммуноциты, антигены

Determination of immunocyte sensitization in patients with Lyme-borreliosis by contents of cytokines in culture of white blood cell who were stimulated by antigens of Borrelia

A. ZINCHUK

In the article problems of determination of immunocytes sensitization in patients with Lyme-borreliosis by method of indication of cytokines synthesis in culture of white blood cell who were stimulated by recombinant antigens of Borrelia at patients with organ lesions and local erythematous types were considered. It was proved that a usage of solid phase antigen for stimulation of lymphocytes makes the method more sensitive and more stabile to receipt of results.

Key words: Lyme-borreliosis, cytokines, immunocytes, antigens

УДК [579.887.111+578.825.11]:616.24-002-057.36

Мікоплазмо-герпесвірусна асоціація: роль в розвитку негоспітальної пневмонії у військовослужбовців

**І.І. КИРИЧЕНКО, Н.Г. ПОПОВА, Л.О. ПАНЧЕНКО,
І.В. КОРОВАЄВА, О.І. РАДЧЕНКО**

Встановлено роль мікоплазмо-герпесвірусної асоціації в розвитку негоспітальної пневмонії у військовослужбовців. Розроблено алгоритм імуноферментної діагностики поєднаної мікоплазмо-герпесвірусної інфекції для практичного використання.

Ключові слова: негоспітальна пневмонія, *Mycoplasma pneumoniae*, *Herpes simplex virus*, військовослужбовці

Негоспітальна пневмонія (НП) – одна із найбільш актуальних і до цього часу невирішених проблем сучасної інфекційної пульмонології. В останнє десятиліття відмічається значне зростання в світі, в тому числі і в Україні, захворюваності на НП і обумовленою нею летальності [1–4, 11, 12].

Серед загальної захворюваності у військовослужбовців в мирний час, за даними В.І. Кучера (2006), хвороби органів дихання посідають перше місце. Серед них частка пневмоній у військах складає 5–6%. В останні роки захворюваність на НП зросла більш, ніж на 50%. При цьому відмічається збільшення атипичних, малосимптомних і затяжних форм, що обумовлює складність ранньої діагностики і прогноз виходів захворювання [5–7].

У значній мірі такий стан захворюваності можна пояснити тим, що клініко-лабораторна діагностика продовжує залишатися серйозною проблемою. Провідні вітчизняні і зарубіжні дослідники відмічають, що навіть при використанні різноманітних лабораторних методів, етіологічний діагноз вдається встановити у < 50% випадків [1, 8, 13].