

## АНТИТОКСИЧНИЙ ІМУНІТЕТ ПРИ ДИФТЕРІЇ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД ВАКЦИНАЛЬНОГО СТАТУСУ

О.Р. Буц, С.О. Крамарєв, В.В. Євтушенко,  
О.В. Виговська, Д.В. Колибо, С.І. Романюк

**Резюме.** У 150 дітей віком від 4 міс. до 14 років, які знаходились на лікуванні в МДКІЛ м. Києва визначали рівень антитоксичних антитіл за допомогою реакції пасивної гемаглютинації та методу непрямого твердофазного імуноферментного аналізу в залежності від вакцинального статусу. У хворих на дифтерію наявність антитоксичних антитіл та їх рівень при першому дослідженні залежали від проведеної вакцинації. Вищий відсоток позитивних результатів та вища питома вага хворих, які мали захисний титр РПГА, спостерігались у дітей, що отримали щеплення за календарем, і найнижчі – у пацієнтів без вакцинації. Вихідний титр РПГА мав статистичний зв'язок з вакцинальним статусом ( $p=0,005$  за критерієм Хі-квадрат). Розвиток ускладнень у хворих на дифтерію залежить від вакцинального статусу.

**Ключові слова:** дифтерія, діти, антитоксичний імунітет, вакцинація, непрямий твердо фазний імуноферментний аналіз, антитоксичні антитіла, реакція пасивної гемаглютинації

Незважаючи на масове проведення вакцинації проти дифтерії, серед населення України продовжують реєструватися випадки дифтерії, бактеріоносійства *Corynebacterium diphtheria*, спостерігається велика кількість ускладнень дифтерії, зберігається високим рівень летальності.

**Мета дослідження** – вивчення можливості використання методу непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (ELIZA) для визначення рівня протидифтерійних антитоксичних антитіл для аналізу залежності рівня антитоксичних антитіл від вакцинального статусу в сировотці крові у дітей, яким було встановлено діагноз дифтерії.

### Матеріали та методи

Обстежено 150 дітей з діагнозом дифтерія у віці від 4 міс. до 14 років, які знаходились на лікуванні в МДКІЛ м. Києва. Легка форма дифтерії була встановлена у 112, середньотяжка – у 27, тяжка – у 11 дітей. У 102 (68,0%) дітей дифтерія мала ускладнений перебіг. Діагноз токсичного міокардиту було встановлено у всіх випадках ускладненого перебігу дифтерії: у 76 (74,5%) було діагностовано легку, у 22 (21,6%) – середньотяжку, у 4 (3,9%) – тяжку форму міокардиту. Діагноз токсичної полінейропатії було встановлено у 10 дітей: у 8 (80,0%) – легку, у 2 (20,0%) – середньотяжку

форму нейропатії, токсичного нефрозо-нефриту – у 2 (20,0%) хворих на дифтерію дітей.

Серед обстежених 111 (74,0%) дітей отримали щеплення дифтерійним анатоксином згідно до календаря профілактичних щеплень, 28 (18,7%) були щеплені з порушенням календаря, 11 (7,3%) дітей взагалі не отримали профілактичних щеплень проти дифтерії.

Визначення рівня антитоксичних антитіл проводили за допомогою реакції пасивної гемаглютинації та методу непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Дослідження проводили відразу після госпіталізації до проведення специфічної терапії антитоксичною протидифтерійною сироваткою (ПДС).

Рівень антитоксичних протидифтерійних антитіл в реакції пасивної гемаглютинації визначали за загальноприйнятою методикою.

Для визначення рівня дифтерійного анти毒素у у сироватках крові обстежених дітей за методом непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) планшет сенсibiliзували протягом 2 год. при  $t=37^{\circ}\text{C}$  розчином дифтерійного токсину (ДТ) в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР),  $C=5\text{мкг/мл}$ . Промивали тричі водою, після промивки в лунки планшету вносили сироватки хворих, розведені в твін-фосфатному буфері (ТФБ) (0,05% твін-20 в ЗФР) у 100, 300, 900, ..., 24300 разів та залишали на 1 год. при  $t=37^{\circ}\text{C}$ . Промивали 3 рази ТФБ, після чого в лунки вносили розчин кон'югату антитіл кози проти імуноглобулінів людини з пероксидазою в ТФБ та витримували 1 год. при  $t=37^{\circ}\text{C}$ . Як субстрат пероксидази використовували розчин ортофенилендіаміну в 0,05 М натрій, калій-фосфатному буфері, рН 6,0, з 0,013%-ною НО. Реакцію зупиняли 2М HSO. Вимірювання оптичної щільності проводили на приладі MR 580, Microelisa Auto Reader («Dynatech», США) при 492 нм.

### Результати дослідження та їх обговорення

Ми проаналізували стан антитоксичного імунітету за рівнем РПГА у хворих на дифтерію в залежності від вакцинального статусу (табл. 1).

При дослідженні під час надходження до стаціонару у щеплених за календарем (111 дітей) в усіх випадках титр антитіл був позитивний. Титр нижче захисного ( $<1:40$ ) спостерігався у 26 (23,4)%, захисний і вище захисного ( $\geq 1:40$ ) – у 85 (27%) дітей. Серед дітей із легкою формою дифтерії титр нижче захисного був у 10 (10,9%), захисний і вище захисного – у 82 (89,1%) дітей. Серед дітей із середньотяжкою формою дифтерії титр нижче захисного був у 16 (84,2%), захисний і вище захисного – у 3 (15,8%) дітей. Серед дітей, щеплених відповідно до календаря, хворих із тяжкою формою дифтерії не було. Неускладнений перебіг дифтерії спостерігався у

## Титр РПГА у хворих на дифтерію з різним вакцинальним статусом

Щеплення	Титр РПГА	Тяжкість дифтерії				Ускладнення	
		легка	середньо-тяжка	тяжка	всього	неускладнена	ускладнена
		п/%	п/%	п/%	п/%	п/%	п/%
За календарем (n=111)	0	0	0	0	0	0	0
	10-20	10/10,9	16/84,2	0	26/23,4	1/24,4	25/35,7
	≥40	82/89,1	3/15,8	0	85/76,6	40/75,6	45/64,3
Всього		92/100,0	19/100,0	0	111/100,0	41/100,0	70/100,0
З порушеннями (n=28)	0	4/20,0	0	1/3,6	5/17,9	0	5/23,8
	10-20	12/60,0	3/60,0	2/7,2	17/60,7	3/42,9	14/66,7
	≥40	4/20,0	2/40,0	0	6/21,4	4/57,1	2/9,5
Всього		20/100,0	5/100,0	3/100,0	28/100,0	7/100,0	21/100,0
Не щеплені (n=11)	0	0	2/66,7	6/75,0	8/72,7	0	8/72,7
	10-20	0	1/33,3	1/12,5	2/18,2	0	2/18,2
	≥40	0	0	1/12,5	1/9,1	0	1/9,1
Всього		0	3/100,0	8/100,0	11/100,0	0	11/100,0

*Примітка:* Встановлена достовірна залежність між титром РПГА і вакцинальним статусом ( $p=0,005$  за критерієм Хі-квадрат).

41 (36,9%) дітей, із них титр нижче захисного (<1:40) був у 1 (2,4)%, захисний та вище захисного ( $\geq 1:40$ ) – у 40 (97,6%) дітей. Серед хворих, у яких дифтерія мала ускладнений перебіг (70 (63,1%) дітей), титр нижче захисного (<1:40) мав місце у 25 (35,7%), захисний і вище захисного ( $\geq 1:40$ ) – у 45 (64,3%) дітей.

Серед хворих, щеплених з порушеннями календаря (28 дітей), «нульовий» титр спостерігався у 5 (17,9%) дітей, у 17 (60,7%) пацієнтів титр був нижче захисного (<1:40) і лише у 6 (21,4%) визначався захисний і вище захисного титр ( $\geq 1:40$ ). Серед хворих із легкою формою дифтерії (20 дітей), «нульовий» титр спостерігався у 4 (20,0%) дітей, у 12 (60,0%) пацієнтів титр був нижче захисного (<1:40) і лише у 4 (20,0%) визначався захисний і вище захисного титр ( $\geq 1:40$ ). Серед хворих із середньотяжкою формою дифтерії (5 дітей), пацієнтів із «нульовими» титрами не було, у 3 (60,0%) пацієнтів титр був нижче захисного (<1:40) і лише у 2 (40,0%) визначався захисний і вище захисного титр ( $\geq 1:40$ ). Серед хворих із тяжкою формою дифтерії (3 дітей), «нульовий» титр спостерігався у 1 (33,3%) пацієнта, а у 2 (66,7%) дітей титр був нижче захисного (<1:40). Хворих із захисним або вище захисного титру не було. Неускладнений перебіг дифтерії спостерігався у 7 (25,0%) дітей, титр нижче захисного (<1:40) – у 3 (42,9)%, захисний і вище захисного ( $\geq 1:40$ ) – у 4 (57,1%) дітей. Серед хворих, у яких дифтерія мала

ускладнений перебіг (21 (75,0%) дітей) «нульовий» титр спостерігався у 5 (23,8%) дітей, титр нижче захисного (<1:40) мав місце у 14 (66,7)%, захисний і вище захисного ( $\geq 1:40$ ) – лише у 2 (9,5%) дітей.

У переважної більшості – 8 (72,7%) хворих, які не отримали жодного щеплення проти дифтерії (11 дітей) антитіла до дифтерійного токсину методом РІГА не визначались, у 2 (18,2%) виявлялись титри антитіл, нижчі від захисного (<1:40), і лише у 1 (9,1%) дитини визначався захисний титр антитіл (1:40). Серед нещеплених дітей хворих із легкою формою дифтерії не було. Серед хворих із середньотяжкою формою дифтерії (3 дітей), 2 (66,7%) мали «нульовий» титр антитіл, у 1 (33,3%) пацієнта титр був нижче захисного (<1:40), а хворих із захисним або вище захисного титру не було. Серед хворих із тяжкою формою дифтерії (8 дітей), «нульовий» титр спостерігався у 6 (75,0%) пацієнта, у 1 (12,5%) дитини титр був нижче захисного (<1:40), і лише у 1 (12,5%) пацієнта визначався захисний титр антитіл (1:40). Усі хворі, що не отримали жодного щеплення проти дифтерії, мали ускладнений перебіг дифтерії. Серед них антитіла до дифтерійного токсину методом РІГА не визначались у 8 (72,7%), у 2 (18,2%) виявлялись титри антитіл, нижчі від захисного (<1:40) і лише у 1 (9,1%) хворого визначався захисний титр антитіл (1:40).

Паралельно проводилось визначення титрів антитоксичних антитіл за допомогою методу непрямого твердофазного імуоферментного аналізу (ELIZA). Отримані результати наведені в таблиці 2.

Так, серед дітей, щеплених згідно до календаря, титри антитоксину, що відповідають захисному або вищі від захисного ( $\geq 900$ ), спостерігались у 74 (66,7%) пацієнтів, нижчі від захисного (1:300) – у 32 (28,8%) дітей. Проте у 5 (4,5%) дітей даної групи антитіла за методом ІФА не були знайдені. Серед 92 дітей із легкою формою дифтерії «нульві» титри мали 5 (5,5%) дітей, титр нижче захисного був у 27 (29,3%), захисний і вище захисного – у 60 (65,2%) дітей. Серед 19 дітей із середньотяжкою формою дифтерії титр нижче захисного був у 5 (26,3%), захисний і вище захисного – у 14 (73,7%) дітей. Серед дітей, щеплених відповідно до календаря, хворих із тяжкою формою дифтерії не було. Неускладнений перебіг дифтерії спостерігався у 41 (36,9%) дітей, із них титр нижче захисного був у 8 (19,5%), захисний та вище захисного – у 33 (80,5%) дітей. Серед хворих, у яких дифтерія мала ускладнений перебіг (70 (63,1%) дітей), «нульві» титри мали 5 (7,1%) дітей, титр нижче захисного визначався у 24 (34,3%), захисний і вище захисного – у 41 (58,6%) дітей.

Серед 28 хворих, які отримали щеплення дифтерійним анатоксином з порушенням календаря, тільки 4 (14,2%) дітей мали захисний або вищий від захисного титр антитіл ( $\geq 900$ ), у 11 (39,3%) пацієнтів титр був нижче

### Титр антитоксину (АТ) у хворих на дифтерію з різним вакцинальним статусом

Щеплення	Титр АТ	Тяжкість дифтерії				Ускладнення	
		легка	середня	тяжка	всього	неускладнена	ускладнена
		п/%	п/%	п/%	п/%	п/%	п/%
За календарем (n=111)	0	5/5,5	0	0	5/4,5	0	5/7,1
	300	27/29,3	5/26,3	0	32/28,9	8/19,5	24/34,3
	≥900	60/65,2	14/73,7	0	74/66,7	33/80,5	41/58,6
Всього		92/100,0	19/100,0	0	111/100,0	41/100,0	70/100,0
З порушеннями (n=28)	0	12/60,0	1/20,0	0	13/46,5	1/14,3	12/57,2
	300	6/30,0	4/80,0	1/33,3	11/39,3	5/71,4	6/28,6
	≥900	2/10,0	0	2/66,6	4/14,2	1/14,3	3/14,2
Всього		20/100,0	5/100,0	3/100,0	28/100,0	7/100,0	21/100,0
Не щеплені (n=11)	0	0	3/100,0	5/62,5	8/72,7	0	8/72,7
	300	0	0	3/37,5	3/27,3	0	3/27,3
	≥900	0	0	0	0	0	0
Всього		0	3/100,0	8/100,0	11/100,0	0	11/100,0

*Примітка:* Встановлена достовірна залежність між титром РПГА і вакцинальним статусом ( $p < 0,001$  за критерієм Хі-квадрат).

захисного (1:300), «нульовий» титр визначався у 13 (46,5%) дітей. Серед 20 хворих із легкою формою дифтерії «нульовий» титр спостерігався у 12 (60,0%) дітей, у 6 (30,0%) пацієнтів титр був нижче захисного і лише у 2 (10,0%) дітей визначався захисний і вище захисного титру. Серед 5 хворих із середньотяжкою формою дифтерії «нульовий» титр спостерігався у 1 (20,0%) дітей, у 4 (80,0%) пацієнтів титр був нижче захисного, захисного титру не мала жодна дитина. Серед хворих із тяжкою формою дифтерії (3 дітей), пацієнтів із «нульовим» титром не було, титр нижче захисного визначався у 1 (33,3%) дитини, 2 (66,7%) хворих мали захисний і вище захисного титр антитоксину. Неускладнений перебіг дифтерії спостерігався у 7 (25,0%) дітей, «нульовий» титр мав 1 (14,3%) хворий, титр нижче захисного визначався у 5 (71,4%), захисний і вище захисного – у 1 (14,3%) дитини. Серед хворих, у яких дифтерія мала ускладнений перебіг (21 (75,0%) дітей) «нульовий» титр спостерігався у 12 (57,2%) дітей, титр нижче захисного мав місце у 6 (28,6)%, захисний і вище захисного – лише у 3 (14,2%) дітей.

Серед 11 хворих, які не отримали щеплення проти дифтерії, у 8 (72,7%) антитоксин не знайдений, у 3 (27,3%) титр був нижче захисного (1:300), а захисного титру не було визначено у жодного пацієнта. Серед нещеплених дітей хворих із легкою формою дифтерії не було. Усі хворі із середньотяж-

кою формою дифтерії (3 дітей), мали «нульовий» титр антитіл. Серед хворих із тяжкою формою дифтерії (8 дітей), «нульовий» титр спостерігався у 5 (62,5) пацієнтів, а у (37,5%) дітей титр був нижче захисного, жоден хворий не мав захисного титру антитоксину. Усі хворі, що не отримали жодного щеплення проти дифтерії, мали ускладнений перебіг дифтерії. Серед них антитоксин не визначався у 8 (72,7%) пацієнтів, а 3 (27,3%) дітей мали титр антитоксину, нижчий від захисного, та жоден хворий не мав захисного титру антитоксину.

Таким чином, у хворих на дифтерію наявність антитоксину та його рівень при першому дослідженні залежали від проведеної вакцинації. Більший відсоток позитивних результатів та вищі значення антитоксину спостерігались у дітей, які отримали щеплення за календарем, а у пацієнтів без вакцинації антитоксин взагалі не було виявлено. Вихідний титр антитоксину мав статистичний зв'язок із вакцинальним статусом ( $p < 0,001$  за критерієм Хі-квадрат).

Ми порівняли показники антитоксичного імунітету отримані за допомогою РПГА та ІФА. Виявлена середня кореляція ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,05$  за методом рангової кореляції Спірмена).

### Висновки

1. Питома вага дітей, які мають захисні титри антитіл, найвища серед пацієнтів, які отримали щеплення проти дифтерії відповідно до календаря.
2. Вихідний рівень антитоксичного імунітету у дітей, хворих на дифтерію, мав статистично достовірний зв'язок із вакцинальним статусом.
3. Існує кореляція між показниками антитоксичного імунітету, визначеного за допомогою РПГА та ІФА.
4. Метод імуноферментного аналізу може бути використаний для виявлення протидифтерійних антитоксичних антитіл

### Література

1. Возианова Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни: В 3 т. / Ж.И. Возианова. – К. : Здоровье, 2000. – Т. 1.
2. Мельникова А.В. Гуморальные факторы иммунной защиты и иммунорегуляции при различных клинических формах дифтерии у детей: Автореф. дис. ... к. б. н. / А.В. Мельникова. – М., 1997.
3. Иммунохимия в клинической лабораторной практике / Под ред. А.М. Уорда, Дж.Т. Уигера. – М. : Медицина, 1981. – С. 44–58.
4. Иванова В.В. Современные методы диагностики и лечения дифтерии / В.В. Иванова, А.Д. Швалко, А.Н. Сиземов [и др.] // Рос. вестник перинатологии и педиатрии. – 1996. – Т. 41. – № 1. – С. 25–30.
5. Santoso H. Anti-diphtheric toxin antibodies in healthy children in kindergartens using the immunoenzymatic assay method / H. Santoso, L.P. Suwendra, I.K. Kari // Paediatr. Indones. – 1990. – Vol. 30, № 9. – P. 248–253.

6. Егоров А.Н. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.Н. Егоров, А.П. Осипов, Б.Г. Дзантиев [и др.]. – М. : Высшая школа, 1991.–228 с.

7. Цыганова И.В. Метод иммуноферментного анализа в диагностике дифтерии / И.В. Цыганова, З.Ш. Паранук, Н.С. Хиштова // Клиническая лабораторная диагностика. – 1995. – № 1. – С. 31–33.

## **АНТИТОКСИННЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ДИФТЕРИИ У ДЕТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВАКЦИНАЛЬНОГО СТАТУСА**

**О.Р. Буц, С.О. Крамарев, В.В. Евтушенко,  
О.В. Выговская, Д.В. Колибо, С.И. Романюк**

**Резюме.** У 150 детей в возрасте от 4 мес. до 14 лет, которые находились на лечении в ГДКИБ м. Киева определяли уровень антитоксичных антител с помощью реакции пассивной гемагглютинации и метода непрямого твердофазного иммуноферментного анализа в зависимости от вакцинального статуса. У больных дифтерией наличие антитоксичных антител и их уровень при первом исследовании зависели от проведенной вакцинации. Высший процент позитивных результатов и высший удельный вес больных, которые имели защитный титр РПГА, наблюдались у детей, которые получили прививку по календарю, и самые низкие – у пациентов без вакцинации. Исходный титр РПГА имела статистическая связь с вакцинальным статусом ( $p=0,005$  за критерием хи-квадрат). Развитие осложнений у больных дифтерией зависит от вакцинального статуса.

**Ключевые слова:** дифтерия, дети, антитоксичный иммунитет, вакцинация, не-прямой твердофазный иммуноферментный анализ, антитоксичные антитела, реакция пассивной гемагглютинации.

## **ANTITOXIC IMMUNITY AT DIPHTHERIA AMONG CHILDREN DEPENDING ON VACCINAL STATUS**

**O. Buts, S. Kramarev, V. Evtushenko,  
O. Vygovska, D. Kolybo, S. Romanyuk**

**Summary.** For 150 children aged 4 mths – 14 yrs which were on treatment in infectious hospital in Kiev the level of antitoxic antibodies by the reaction of passive gemagglutination and method indirect ELISA depending on vaccinal status are determined. For patients with diphtheria the presence of antitoxic antibodies and their level at the first research depended on the conducted vaccination. Higher percent of positive results and higher specific gravity of patients, which had a protective title of RPGA, observed for children which got an inoculation on a calendar, and the lowest – for patients without a vaccination. Statistical connection had an initial title of RPGA with vaccinal status ( $p=0,005$  after a criteria chi-square). Development of complications for patients depends diphtheria on vaccinal status.

**Keywords:** diphtheria, children, antitoxic immunity, vaccination, ELISA, antitoxic antibodies, reaction of passive gemagglutination.