

# СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЕТІОТРОПНОЇ ТЕРАПІЇ МАЛЯРІЇ

А.В. Бондаренко, О.І. Могиленець, Я.В. Зоц

**Резюме.** Проведено систематизацію та аналіз інформації щодо резистентності *Plasmodium spp.* до протималарійних препаратів. Наведено сучасні схеми лікування малярії, у тому числі у вагітних.

**Ключові слова:** малярія, резистентність, етіотропна терапія

## MODERN APPROACHES TO ETIOTROPIC THERAPY OF MALARIA

A.V. Bondarenko, O.I. Mohylenets, Ya.V. Zots

**Summary.** The systematization and analysis of information on resistance of *Plasmodium spp.* to antimalarial drugs are conducted. Modern schemes of malaria treatment, including schemes in pregnant women, are represented.

**Key words:** malaria, resistance, etiotropic therapy

УДК 616.931-053.2-06:616.127-002:612.017.1

## РІВЕНЬ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ ТА СТАН АНТИТОКСИЧНОГО ІМУНІТЕТУ У ДІТЕЙ З ДИФТЕРІЄЮ, УСКЛАДНЕНОЮ ТОКСИЧНИМ МІОКАРДИТОМ

О.Р. Буц

**Резюме.** Було вивчено можливість використання вивчення токсину *C. diphtheriae* в крові за допомогою методу твердофазного імуноферментного методу ELISA варіанту "сендвіч", специфічного антитоксичного імунітету за допомогою РІІГА та непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (dot-ELISA), спектру антитоксичних протидифтерійних антитіл за допомогою імуноблотингу для прогнозування розвитку дифтерійних міокардитів та їх ступеню тяжкості у дітей. Встановлено, що токсинемія серед хворих на дифтерію достовірно частіше спостерігається у випадках, ускладнених міокардитом. Низький рівень антитоксичного імунітету, співвідношення антитоксичних антитіл до В та А фракцій дифтерійного токсину (В/А) < 1 мають прогностичне значення щодо розвитку та ступеню тяжкості міокардиту у хворих на дифтерію дітей.

**Ключові слова:** дифтерія, міокардит, токсин, антитоксичні антитіла

Незважаючи на масове проведення вакцинації проти дифтерії, серед населення України продовжують реєструватися випадки дифтерії, бактеріоносійства *Corynebacterium diphtheria*, спостерігається велика кількість ускладнень дифтерії, серед яких перше місце займає токсичний міокардит, зберігається високим рівень летальності [1, 2]. Головним фактором патогенності *C. diphtheriae* є дифтерійний екзотоксин [3]. Останній зумовлює

пошкодження кардіоміоцитів, провідникової системи серця та розвиток аутоімунних процесів у міокарді, порушення регуляції серцевої діяльності та стану центральної гемодинаміки [4, 5, 6].

**Мета дослідження:** прогнозування розвитку дифтерійних міокардитів та їх ступеню тяжкості на основі вивчення значення рівня токсину *C. diphtheriae* в крові, специфічного антитоксичного імунітету та спектру антитоксичних протидифтерійних антитіл.

### **Матеріали та методи**

Обстежено 150 дітей з діагнозом дифтерія у віці від 4 міс. до 14 років, які знаходились на лікуванні в МДКІІ 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 з календарем профілактичних щеплень, 28 (18,7%) були щеплені з порушенням календаря, 11 (7,3%) дітей взагалі не отримали профілактичних щеплень проти дифтерії. Дифтерійний токсин у сироватках крові виявляли за допомогою твердофазного імуноферментного методу ELISA варіанту "сендвіч". Планшет сенсibiliзували протягом 2 годин при  $t=37^{\circ}\text{C}$  розчином протидифтерійних антитоксичних антитіл коня в ЗФР,  $\text{C}=18$  мг/мл. Місця сорбції, які залишилися вільними на планшеті, блокували 3% розчином БСА в ЗФР протягом 2 годин при  $t=37^{\circ}\text{C}$ . Після промивки до лунок планшету вносили сироватки хворих, розведені в ТФБ у 3, 9, 27 разів та нерозведені. Проводили інкубацію 1 годину при  $t=37^{\circ}\text{C}$ . Паралельно наносили розтитрований чистий токсин в ТФБ у межах концентрацій від 0,5 нг/мл до 0,5 мг/мл для побудови калібровочної кривої. Промивали 4-5 разів у ТФБ. Токсин, який зв'язався, виявляли за допомогою біотинільованих антитоксичних антитіл коня та кон'югату екстравідину з полімерною пероксидазою. Згадані реагенти розчиняли у ТФБ, після внесення витримували по 1 годині при  $t=37^{\circ}\text{C}$  та проявляли згідно методики, яка описана вище. Для контролю використовували сироватки крові здорових дітей, а також плазму крові людей, яку отримували на станції переливання крові. Достовірним сигналом, який вказував на наявність токсину, вважали перевищення контролю мінімум у 2 рази. Кількісну оцінку вмісту токсину проводили за калібровочною кривою.

Визначення рівня антитоксичних антитіл проводили за допомогою реакції пасивної гемаглютинації та методу непрямого твердофазного імуоферментного аналізу (ELIZA). 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 імуоферментного аналізу (ELIZA) 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 імуоглобулінів людини з пероксидазою в ТФБ та витримували 1 год. при  $t=37^{\circ}\text{C}$ . У якості субстрату 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

Дифтерійний токсин був виявлений у 49 з 93 пацієнтів з міокардитом (вибіркова пропорція – 0,53, ДІ 0,43–0,63). Серед хворих з легким перебігом міокардиту позитивний тест на токсин при першому дослідженні відмічався у 31 (48,4%) із 64 дітей (вибіркова пропорція – 0,48, ДІ 0,37–0,60), із середнім ступенем тяжкості – у 18 (62,1%) із 29 хворих (вибіркова пропорція – 0,62, ДІ 0,44–0,77). У групі пацієнтів з перебігом захворювання без міокардиту дифтерійний токсин при першому дослідженні було виявлено лише у 12 з 57 дітей (вибіркова пропорція – 0,21, ДІ 0,13–0,33).

Отримані дані свідчать, що токсинемія серед хворих на дифтерію достовірно частіше спостерігається у випадках, ускладнених міокардитом ( $p<0,001$  за методом ч-квадрату Пірсона). Чутливість позитивного результату обстеження на токсин для прогнозу розвитку міокардиту у хворих на дифтерію була 0,53 (ДІ 0,43–0,63), специфічність – 0,79 (ДІ 0,67–0,88).

Серед хворих з дифтерійним міокардитом частіше токсин виявлявся при середньому ступеню тяжкості міокардиту, ніж при легкому, проте різниця була недостовірною ( $p=0,11$  за методом ч-квадрату Пірсона).

Титр антитоксичних антитіл визначали за допомогою реакції пасивної гемаглютинації (РПГА). Одночасно з РПГА для визначення рівня анти-

токсичних антитіл був використаний метод непрямого твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA). Визначення титру антитоксичних антитіл методом ІФА порівняно з методикою РПГА має переваги у випадках, коли пацієнт отримав терапію кінською протидифтерійною сироваткою. У цих умовах на результати РПГА суттєво впливають циркулюючі чужорідні антитіла, а методика ІФА дозволяє оцінити саме рівень антитілопродукції пацієнта. Дослідження антитоксичного імунітету у хворих проводили відразу після госпіталізації до проведення специфічної терапії антитоксичною протидифтерійною сироваткою (ПДС). Титри антитоксичних антитіл, визначені за допомогою РПГА у хворих на дифтерію залежно від наявності токсичного міокардиту наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

**Титр РПГА у хворих на дифтерію  
залежно від наявності токсичного міокардиту**

Титр РПГА	Всього		Дифтерія неускладнена		Дифтерія, ускладнена міокардитом	
	п	%	п	%	п	%
0	13	8,7	0	0	13	12,7
10–20	45	30,0	4	8,3	41	40,2
≥40	92	61,3	44	91,7	48	47,1
Всього	150	100,0	48	100,0	102	100,0

Як видно з таблиці, серед дітей, хворих на дифтерію, вищі титри антитіл реєструвались у дітей з неускладненим перебігом захворювання, нижчі – у дітей, у яких дифтерія була ускладнена токсичним міокардитом.

Титри антитоксичних антитіл, визначені за допомогою непрямого твердофазного імуоферментного аналізу (dot-ELISA) у хворих на дифтерію залежно від наявності токсичного міокардиту наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

**Титр антитоксину (АТ) у хворих на дифтерію  
залежно від наявності токсичного міокардиту**

Титр антитоксину (АТ)	Всього		Дифтерія неускладнена		Дифтерія, ускладнена міокардитом	
	п	%	п	%	п	%
0	26	17,3	1	2,1	25	24,5
300	46	30,7	13	27,1	33	32,4
≥900	78	52,0	34	70,8	44	43,1
Всього	150	100,0	48	100,0	102	100,0

При визначенні титру специфічних антитоксичних антитіл за допомогою непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (dot-ELISA), як видно з таблиці, також вищі титри антитіл реєструвались у дітей з неускладненим перебігом захворювання, нижчі – у дітей з дифтерією, ускладненою токсичним міокардитом.

При порівнянні показників антитоксичного імунітету, отриманих за допомогою РПГА та ІФА, виявлена середня кореляція ( $r=0,54$ ,  $p<0,05$  за методом рангової кореляції Спірмена). Проте метод ІФА має більшу специфічність щодо визначення людських імуноглобулінів.

Дифтерійний токсин складається з двох зв'язаних фрагментів (субодиниць): А і В. У хворих на дифтерію у відповідь на проникнення в кров нативного дифтерійного токсину синтезуються переважно антитіла до субодиниці А токсину [7, 8].

Тому метою даного обстеження стало вивчення можливості використання визначення спектру протидифтерійних антитоксичних антитіл для прогнозування розвитку та ступеню тяжкості дифтерійного міокардиту.

У таблиці 3 наведені середні показники В/А у хворих на дифтерію, у яких захворювання ускладнювалось міокардитом, та дітей з неускладненим перебігом.

Таблиця 3

**Співвідношення В/А у крові хворих на дифтерію, ускладнену міокардитом різної тяжкості, та без міокардиту**

	Номер дослідження					
	1		2		3	
	М	SD	М	SD	М	SD
Дифтерія, ускладнена міокардитом (n=93)	0,705	0,835	0,409	0,296	1,318	1,423
У т.ч. за тяжкістю міокардиту:						
легка форма (n=64)	0,819	0,957	0,371	0,255	1,573	1,637
середньотяжка форма (n=29)	0,549	0,334	0,411	0,342	0,706	0,404
Дифтерія неускладнена (n=57)	2,124	2,032	0,465	0,298	1,161	1,076

Як видно з наведених даних, відношення В/А при першому дослідженні у хворих на дифтерію, ускладнену міокардитом, було втричі менше, ніж у пацієнтів з неускладненим перебігом ( $p<0,001$  за тестом Колмогорова-Смірнова). При цьому у дітей з середньотяжким перебігом міокардиту показник В/А виявився достовірно нижчим за такий у групі хворих з легким перебігом міокардиту ( $p=0,002$  за тестом Колмогорова-Смірнова). Ми оцінили у хворих на дифтерію прогностичне значення показника В/А, от-

риманого під час першого дослідження, у відношенні розвитку міокардиту. У дітей з дифтерією без міокардиту лише у 21,1% рівень В/А був менше 1, у хворих з міокардитом – у 81,1%. Специфічність В/А < 1 щодо розвитку міокардиту становила 0,79 (ДІ 0,67–0,88), чутливість – 0,81 (ДІ 0,71–0,88), вірогідність позитивного значення – 3,85 (ДІ 2,30–6,44). При другому дослідженні ми спостерігали у всіх групах тенденцію до зниження показника В/А. У більшій мірі це зниження проявлялось у пацієнтів з неускладненим перебігом, у яких середній показник В/А знизився майже у 5 разів. Менш виразною була динаміка у хворих з міокардитом – 39,2% у дітей з середньо-тяжким міокардитом та 54,7% – при легкому перебігу міокардиту. При третьому дослідженні у всіх хворих на дифтерію спостерігалось зростання середнього показника В/А. При цьому він майже вдвічі перевищував вихідний рівень у дітей з міокардитом, а у пацієнтів без міокардиту був нижчим за вихідний рівень.

### Висновки

1. Токсинемія серед хворих на дифтерію достовірно частіше спостерігається у випадках, ускладнених міокардитом ( $p < 0,001$ ). Чутливість позитивного результату обстеження на токсин для прогнозу розвитку міокардиту у хворих на дифтерію була 0,53, специфічність – 0,79.
2. Низький рівень антитоксичного імунітету має прогностичне значення щодо розвитку та ступеню тяжкості міокардиту у хворих на дифтерію дітей.
3. Існує кореляція між показниками антитоксину, що отримані за допомогою РПГА та ІФА при першому дослідженні
4. Низький рівень В/А має прогностичне значення щодо розвитку та ступеню тяжкості міокардиту у хворих на дифтерію дітей.

### Література

1. Бобровицкая А. И. Дифтерийные миокардиты у детей / А.И. Бобровицкая, Э.В. Голосной, Т.А. Шалунова // Таврич. мед.-биол. вестник. – 2010. – № 2. – С. 117–118.
2. Ornek E. Diphtheria myocarditis in Turkey after years / E. Ornek, C.M. Ureyen, A. Kurtul, F. Oksez // Anadolu. Kardiyol. Derg. – 2012. – Vol. 12. – N 3. – P. 279–280.
3. Никандров В.Н. Физиолого-биохимические особенности и молекулярные механизмы патогенности коринебактерий: новые аспекты проблемы / В.Н. Никандров // Здравоохранение. – Минск. – 2004. – № 10. – С. 59–62.
4. Макарова В. И. Изменения вегетативной регуляции сердечной деятельности при дифтерийном поражении миокарда у детей / В.И. Макарова, И.В. Шепина, Л. В. Титова, Л.И. Меньшикова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – № 2. – С. 35–38.
5. Ющук Н.Д. Клинические и структурные параллели изменений проводящей системы сердца и миокарда у больных дифтерией / Н.Д. Ющук, Ю.Г. Пархоменко, А.В. Чукбар [и др.] // Терапевт. архив. – 2002. – № 11. – С. 33–37.

6. Vülzke H. Association between cardiac disorders and a decades-previous history of diphtheria / H. Vülzke, C. Warnke, M. Dúrg [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 25, N. 10. – P. 651–656.

7. Здановский А.Г. Структура и функции дифтерийного токсина / А.Г. Здановский, М.В. Здановская, Н.К. Янковский // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. – 1988. – № 12. – С. 3–10.

8. Mitamura T. Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity / T. Mitamura, S. Higashiyama, N. Taniguchi [et al.] // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270, N 3. – P. 1015–1019.

## УРОВЕНЬ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА И СОСТОЯНИЕ АНТИТОКСИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ С ДИФТЕРИЕЙ, ОСЛОЖНЕННОЙ ТОКСИЧЕСКИМ МИОКАРДИТОМ

О.Р. Буц

**Резюме.** Изучена возможность использования изучения токсина *C. diphtheriae* в крови с помощью метода твердофазного иммуноферментного метода ELISA варианта «сэндвич», специфического антитоксического иммунитета с помощью РПГА и непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (dot-ELISA), спектра антитоксических противодифтерийных антител с помощью иммуноблоттинга для прогнозирования развития дифтерийных миокардитов и их степени тяжести у детей. Установлено, что токсинемия среди больных дифтерией достоверно чаще наблюдается в случаях, осложненных миокардитом. Низкий уровень антитоксического иммунитета, соотношение антитоксических антител к В и А фракциям дифтерийного токсина (В/А) <1 имеют прогностическое значение для развития и тяжести миокардита у больных дифтерией детей.

**Ключевые слова:** дифтерия, миокардит, токсин, антитоксические антитела

## A LEVEL OF DIPHTHERIA TOXIN AND THE STATE OF ANTITOXIC IMMUNITY IN CHILDREN WITH DIPHTHERIA'S TOXIC MYOCARDITIS

A.R. Buts

**Summary.** Studied the possibility of using learning toxin *C. diphtheriae* in the blood by the method of solid-phase ELISA ELISA method option "sandwich" of a specific antitoxic immunity by RPHA and indirect solid phase enzyme immunoassay (dot-ELISA), antidiphtheritic spectrum antitoxic antibodies by immunoblotting for the prediction of diphtheria myocarditis and their severity in children. Found that toxinemia among patients with diphtheria significantly more common in cases complicated by myocarditis. Low levels of antitoxic immunity ratio antitoxic antibodies to B and A fractions of diphtheria toxin (B/A) <1 have predictive value for the development and severity of myocarditis in patients with diphtheria children.

**Key words:** diphtheria, myocarditis, toxin, antitoxic antibody