

РОЗРОБКА СПОСОБУ ВИЗНАЧЕННЯ ІМОВІРНОСТІ ЗНИЖЕННЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ У ОСІБ З ГЕРПЕСВІРУСНИМ НАВАНТАЖЕННЯМ

Смілянська М.В.¹, Кашпур Н.В.¹,
Перемог С.Д.¹, Ходак Л.А.², Навст Т.І.²

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології
ім.І.І.Мечникова НАМН України»

²Харківська медична академія післядипломної
освіти, кафедра дитячих інфекційних хвороб

Найбільш ефективним методом боротьби з інфекційними захворюваннями є вакцинація населення. Кожна країна розробляє свій календар щеплень, який враховує особливості епідемічної ситуації, наявність зареєстрованих вакцин, фінансові можливості та інші фактори [1].

Відомо, що різні люди неоднаково відповідають на одну й ту ж вакцину. Існують групи осіб із сильною та слабкою імунною відповіддю на кожен вакцину. Відсутність імунної відповіді та слабка імунна відповідь при вакцинації спостерігається у 5-15% практично здорових осіб. Більше 10% осіб слабо реагують на окремі види вакцин: 11,7% - на живу корову вакцину, 13,5% - на рекомбінантну вакцину проти гепатиту В [2]. Крім того, великий відсоток практично здорових людей погано відповідає на низько імуногенні вакцини. Друга сторона проблеми – надлишкова імунізація. У зв'язку з постійною циркуляцією збудників деяких інфекцій відбувається природна імунізація людей без вакцинації. Деякі особи спроможні продукувати високі титри антитіл після первинної вакцинації, що ставить під питання проведення ревакцинації [3].

Експериментальні та клінічні дослідження показали, що вакцини здатні викликати як супресію, так і активацію окремих імунних функцій, причому кожна вакцина має свій спектр впливу на кількісні і функціональні характеристики імунного статусу. Імуномодуюча дія вакцин залежить від виду збудника, технології їх приготування, шляхів і схеми введення, від індивідуальних імуногенетичних особливостей формування поствакцинального імунітету [4].

Існує необхідність корекції формування імунітету при вакцинації з урахуванням факторів, що впливають на інтенсивність специфічної відповіді на введення вакцин. Вченими пропонується використання принципів індивідуалізації вакцинації (ревакцинації), в першу чергу, в групах підвищеного ризику, до яких також відносяться особи з персистуючою герпесвірусною інфекцією [5].

Усі заходи зі специфічної профілактики керованих інфекцій спрямовані на створення колективного імунітету. Для оцінки ефективності таких заходів і стану колективного імунітету проводиться серологічний моніторинг. Основним завданням комплексу методів, які пропонуються на

поствакцинальному етапі, є аналіз ефективності проведеної вакцинації шляхом визначення напруженості імунітету до кожної введеної вакцини. В ідеалі бажано мати уявлення про напруженість імунітету людини до конкретної інфекції ще до проведення вакцинації.

Існують методи математичного прогнозування імунологічної ефективності вакцинації (ревакцинації), які засновані на імунологічному моніторингу великих колективів людей [6]. Однак проблема прогнозування розвитку імунітету на вакцину у окремих людей практично не розробляється. Труднощі такого прогнозування полягають у тому, що імунна відповідь на вакцину завжди різна, кожен організм не однаково реагує на різні вакцини.

Існує кілька способів визначення показників, за якими можна було б опосередковано судити про імунологічні потенціали організму. Ці показники можуть бути специфічними, пов'язаними з конкретним антигеном (вакциною), або неспецифічними, що характеризують стан неспецифічних факторів імунітету. Оцінку імунітету можна проводити до і після первинної імунізації або на будь-якій стадії циклу вакцинації. Це дозволяє визначити необхідність подальшої імунізації, скасування вакцинації, або навпаки, вжиття заходів щодо посилення імунної відповіді у щепленого [7].

Метою роботи було: встановлення комплексу прогностичних критеріїв, які дають можливість за імовірним часом зниження специфічного імунітету визначити можливий строк, через який слід пройти чергову ревакцинацію, що сприятиме своєчасному застосуванню індивідуальних схем вакцинації та ревакцинації пацієнтів, у тому числі й тих, що мають хронічну герпесвірусну патологію.

Матеріали та методи

Проводилося імунологічне обстеження, що включало визначення концентрації цитокінів TNF α , IL10, IFN γ , рівнів CD3+CD4+ та CD3+CD8+, рівнів субкласів 1 та 3 специфічних IgG-антитіл, вірусного навантаження (HVL). Матеріалом для дослідження слугувала кров в обсязі 3,0-5,0 мл, що брали з вени з дотриманням звичайних правил асептики.

Для визначення концентрації цитокінів TNF α , IL10, IFN γ в сироватці крові використовували ІФА тест-системи «Вектор-Бест»: Гамма-інтерферон-ІФА- БЕСТ, Інтерлейкін - 10 - ІФА- БЕСТ, Альфа-ФНО- ІФА- БЕСТ.

Визначення антигенів (Ag) родини Herpesviridae проводили імунофлуоресцентним методом з використанням специфічних моноклональних мишачих антитіл фірми Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA) та встановленням вірусного навантаження (herpes viral load, HVL) [8].

CD3+CD4+ та CD3+CD8+ вивчали методом проточної цитометрії на CYTOMICSC500 (Beckman Coulter, США) за допомогою панелі МКАТ (Beckman Coulter, США).

Субкласи специфічних IgG-антитіл визначаються методом ІФА в модифікації. При

цьому використовуються 96-лункові панелі, покриті антигенами відповідно комерційного набору для визначення специфічних IgG-антитіл (Euroimmun або Human, Німеччина). Сироватки додаються в розведенні 1:50. Кон'югатом є мічені пероксидазою анти-IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4 моноклональні антитіла («Полигност») в концентрації 1 мкг/мл [9]. Розрахункові формули для визначення динаміки комплексного інтегрального показника в часі отримані за вихідними даними визначення рівнів специфічних вакцинальних антитіл і комплексного інтегрального показника за допомогою математичного моделювання лінійними і нелінійними функціями експоненціального розподілу.

Результати

В осіб із персистуючою герпесвірусною інфекцією встановлено ряд особливостей параметрів лімфоцитарної ланки імунної системи. Відзначено зниження відносного вмісту CD3+CD4+-лімфоцитів при незмінному абсолютному їх вмісті. Кількість цитотоксичних CD3+CD8+-лімфоцитів підвищується. Дані зміни призводять до порушення співвідношення лімфоцитів з індукторною і цитотоксичною активністю, і імунорегуляторний індекс знижується в 1,3 рази.

Відомо, що персистуюча герпесвірусна інфекція, при якій висока ймовірність ураження вірусом імунних клітин, призводить до виражених імунологічних змін, що, в свою чергу, може впливати на формування специфічної імунної відповіді на вакцинацію.

Комплексне вивчення гуморальних факторів імунітету, таких як специфічні IgG та їх субкласи, TNF α , IFN γ , IL10 дозволяє прогнозувати характер формування специфічної імунної відповіді на вакцину, що важливо при виборі тактики вакцинації. Гуморальна імунна відповідь може характеризуватися підвищеною або зниженою концентрацією в крові як різних класів, так і підкласів імуноглобулінів. Кількісне визначення підкласів IgG (загальних, а головне, специфічних антитіл) може бути використано для більш ефективної діагностики багатьох станів, точного виявлення їх стадії, в тому числі й типу специфічної імунної відповіді на вакцинацію, прогнозу розвитку вакцинальних невдач, а також для контролю за адекватністю імунореабілітації.

Зниження рівня окремих субкласів буває причиною рецидивуючих інфекцій. При цьому дефіцит іноді важко виявити, так як загальний показник IgG може перебувати в межах референтних значень. Дефіцит або гіперпродукція сумарного IgG можуть бути ізольованими або поєднуватися зі зміною рівня інших класів імуноглобулінів. Наприклад, недостатній рівень IgG2 і IgG4 нерідко супроводжує дефіцит IgA. Надлишкова продукція імуноглобуліну G може бути пов'язана з гіперстимуляцією всіх клонів плазматичних клітин або окремого клону IgG продукуючих В-клітин. Опубліковані результати досліджень, які свідчать

про те, що в організмі людини є загальний механізм ініціації синтезу IgE і IgG4. У цілому, вважають, що протівірусні антитіла у людини в основному належать до IgG1 і IgG3. Саме дисбаланс цих підкласів IgG виявлено нами у дітей з високим герпесвірусним навантаженням.

Слід, однак, відзначити, що в різних популяційних групах один і той же фактор може викликати дефіцит IgG різних підкласів. Кількісне визначення сироваткових IgG паралельно з іншими класами імуноглобулінів є одним із обов'язкових аналізів при дослідженні імунного статусу людини. Визначення IgG та IgM, специфічних до збудників різних захворювань, повсюдно використовується в серодіагностиці багатьох інфекцій. Кількісний же аналіз підкласів IgG в клініко-діагностичних лабораторіях проводиться поки що досить не часто. А саме дисбаланс IgG одного або декількох підкласів може бути причиною часткового порушення в системі регуляції гуморальної імунної відповіді (наприклад, зниження рівня продукції цитокінів).

Цитокіни взаємопов'язані і утворюють цілісну систему взаємодіючих елементів – цитокінову мережу. Важливою особливістю дії цитокінів є каскадна саморегуляція. Цитокіни виконують функції міжклітинних медіаторів, що забезпечують передачу сигналів активації або інгібування від одних клітин до інших.

Відомо, що формування будь-якого процесу, в тому числі інфекційного, багато в чому залежить від адекватності і своєчасності імунної відповіді організму, реакції цитокінів крові. Окремі автори стверджують, що саме сукупність дії і ступінь фізіологічного балансу між ефектами прозапальних (TNF α , IL1 β , IFN γ та ін.) і протизапальних цитокінів (IL4, IL10 та ін.) лежать в основі розвитку клінічної картини, перебігу і наслідків захворювання.

Поєднання зниженої продукції протизапальних цитокінів з підвищеним рівнем прозапальних цитокінів на фоні імунного дисбалансу сприяє підтримці запального процесу, провокуючи його хронізацію з формуванням глибокого імунного дисбалансу. Дослідженнями показано, що найбільш кореляційними та достовірними для прогнозування типу вакцинальної відповіді є співвідношення про- та протизапальних цитокінів: TNF α /IL10 та IFN γ /IL10.

Таким чином, ми пропонуємо визначення співвідношення таких імунологічних показників: специфічні IgG1_{sp}/IgG3_{sp}; імунорегуляторний індекс CD4/CD8; співвідношення TNF α /IL10, IFN γ /IL10 та герпесвірусне навантаження HVL (herpes viral load) і за формулою $IgG1_{sp}/IgG3_{sp} \cdot CD4/CD8 \cdot 0,1 \cdot TNF\alpha/IL10 \cdot 0,01 \cdot IFN\gamma/IL10 \cdot HVL$ (ум.од.) в подальшому проводити обчислення комплексного інтегрального показника (СІІ). За зміною комплексного інтегрального показника в часі (за графіком) можна судити про ймовірність зниження поствакцинального імунітету обстежуваного.

На рис.1 представлена математична модель динаміки комплексного інтегрального показника (крива експоненціального спаду), де СІІ (ум.од.) - комплексний інтегральний показник, T (рік) - час

можливого зниження вакцинального імунітету нижче протективного рівня (роки). Середня похибка моделі становить 2%.

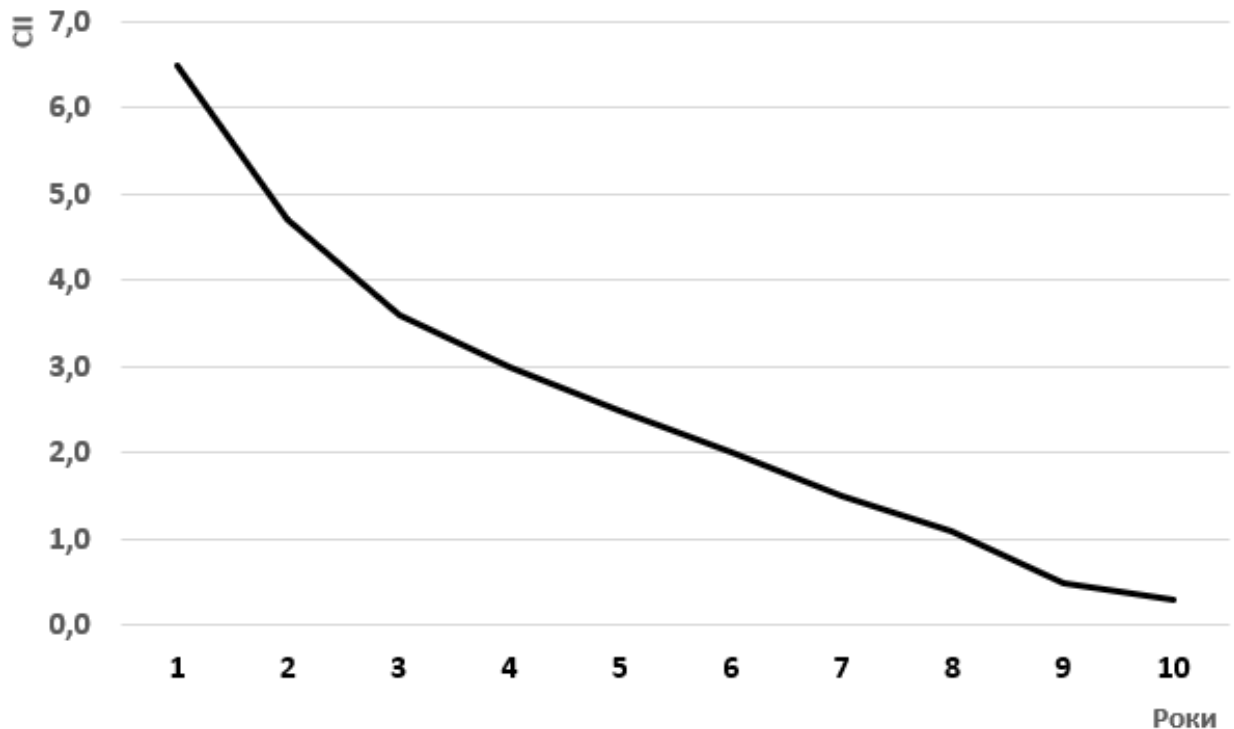


Рис.1. Динаміка комплексного інтегрального показника (CII) в часі (рока) (графік щільності експоненціального розподілу)

Дієвість розробленого способу доводять приклади його використання.

Приклад №1. Дитина К., 2012 р.н., яка щеплена згідно календаря, тобто 2 дози КПК і 5 доз АДС. Розрахуємо час зниження титрів протикорових і протидифтерійних антитіл. Для протикорового імунітету: $IgG1/IgG3 = 1,1$; $CD4/CD8 = 1,9$; $TNF\alpha/IL10 = 6,9$; $IFN\gamma/IL10 = 42,1$; $HVL = 1,4$. Таким чином $CII = 1,1 * 1,9 * 0,1 * 6,9 * 0,01 * 42,1 * 1,4 = 0,85$. Для протидифтерійного: $IgG1_{sp}/IgG3_{sp} = 0,9$; $CD4/CD8 = 2,1$; $TNF\alpha/IL10 = 5,8$; $IFN\gamma/IL10 = 40,2$; $HVL = 1,3$. Таким чином $CII = 0,9 * 2,1 * 0,1 * 5,8 * 0,01 * 40,2 * 1,3 = 0,57$. Співвідносимо отримані значення з графіком ймовірного зниження вакцинального титру і знаходимо, що протикоровий імунітет досягне критичних значень через 8,5 років, а протидифтерійний імунітет знизиться нижче захисного через 9 років.

Приклад №2. Дитина С., 2015 р.н., що щеплена згідно календаря, тобто 1 доза КПК і 4 дози АДС. Наступна планова вакцинація передбачається згідно наказу через 2 роки. Розрахуємо час зниження титрів протикорових і протидифтерійних антитіл. Для протикорового імунітету: $IgG1_{sp}/IgG3_{sp} = 6,5$; $CD4/CD8 = 1,2$; $TNF\alpha/IL10 = 9,1$; $IFN\gamma/IL10 = 34,7$; $HVL = 2,8$. Таким чином $CII = 6,5 * 1,2 * 0,1 * 9,1 * 0,01 * 34,7 * 2,8 = 6,89$. Для протидифтерійного: $IgG1_{sp}/IgG3_{sp} = 5,9$; $CD4/CD8 = 1,1$; $TNF\alpha/IL10 = 10,1$; $IFN\gamma/IL10 = 33,6$; $HVL = 2,8$. Таким чином $CII = 5,9 * 1,1 * 0,1 * 10,1 * 0,01 * 33,6 * 2,8 = 6,17$. Співвідносимо отримані значення з графіком

ймовірного зниження вакцинального титру і знаходимо, що протикоровий і протидифтерійний імунітет досягне критичних значень вже менш ніж через рік.

Висновки

Розробка нового способу визначення ймовірності зниження поствакцинального імунітету в осіб з герпесвірусним навантаженням спрямована на підвищення оцінки захищеності організму стосовно керованих інфекцій і допомагає прийняти рішення про необхідність ревакцинації або її відстрочення на певний проміжок часу, який розраховується в індивідуальному порядку. Кінцевий результат – зниження захворюваності населення на інфекційні захворювання.

Development of a method for determining the probability of a decrease in post-vaccination immunity in individuals with herpesvirus load Smilianska M. V., Kashpur N.V., Peremot S.D., Khodak L.A., Naviet T.I.

Introduction. The most effective way to combat infectious diseases is to vaccinate the population. Each country develops its own vaccination schedule, which takes into account the specifics of the epidemic situation, the availability of registered vaccines, financial opportunities and other factors. Experimental and clinical studies have shown that vaccines can cause both suppression and activation of individual immune functions, with each vaccine having its own spectrum of

effects on the quantitative and functional characteristics of the immune status. There is a need to correct the formation of immunity during vaccination, taking into account factors affecting the intensity of a specific response to vaccine administration. It is proposed to use the principles of individualization of vaccination (revaccination), primarily in high-risk groups, which include people with persistent herpes virus infection.

Material & methods. An immunological examination was carried out, including determination of the concentration of cytokines TNF α , IL10, IFN γ , levels of CD3 + CD4 + and CD3 + CD8 +, levels of subclasses 1 and 3 of specific IgG antibodies, viral load (HVL). The study material was blood in a volume of 3.0-5.0 ml, which was taken from a vein in compliance with the usual rules of asepsis. To determine the concentration of TNF α , IL10, IFN γ cytokines in blood serum, the Vector-Best ELISA test systems were used: Gamma-interferon IFA-BEST, interleukin-10 - IFA-BEST, Alpha-TNF IFA-BEST. Herpesviridae family antigens (Ag) were determined by immunofluorescence using specific monoclonal mouse antibodies from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA) and viral load (herpes viral load, HVL). CD3 + CD4 + and CD3 + CD8 + were studied by flow cytometry on a CYTOMIC500 (Beckman Coulter, USA) using the MKAT panel (Beckman Coulter, USA). Subclasses of specific IgG antibodies are determined by ELISA in modification. In this case, 96-well panels coated with antigens are used, respectively, according to a commercial kit for the determination of specific IgG antibodies (Euroimmun or Human, Germany). Serum is added at a 1:50 dilution. The conjugate is peroxidase-labeled anti-IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 monoclonal antibodies ("Polygnost") at a concentration of 1 μ g / ml [9]. Calculation formulas for determining the dynamics of the complex integral indicator over time were obtained from the initial data for the determination of the levels of specific vaccination antibodies and complex integral indicator using mathematical modeling of linear and non-linear functions of the exponential distribution.

Results & discussion. According to the results of studies, we propose to determine the ratio of such immunological parameters: specific IgG1sp / IgG3sp; immunoregulatory index CD4 / CD8; TNF α / IL10, IFN γ / IL10 ratio and herpes virus load HVL (herpes viral load); Using the formula $IgG1sp / IgG3sp * CD4 / CD8 * 0.1 * TNF\alpha / IL10 * 0.01 * IFN\gamma / IL10 * HVL$ (c.u.), the complex integral index (CII) is calculated. The probability of a decrease in the post-vaccination immunity of the subject is judged by the change in the complex integral indicator over time (according to the chart).

Conclusion. The development of a new method for determining the probability of a decrease in post-vaccination immunity in individuals with herpesvirus load is aimed at increasing the assessment of the body's immunity against controlled infections and helps to decide on the need for revaccination or its delay for a certain period of time, which is calculated individually. The end result is a reduction in the incidence of infectious diseases.

Keywords: herpes virus, postvaccination effects, immunity

References

1. World Health Organization. Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012–2020. Geneva: WHO 2012. URL: <http://www.who.int/immunization/newsroom>
2. Medunysyn NV. Individual vaccination // Epidemiology and Infectious Diseases. 2000. N. 3. P. 8-13.
3. Vasneva ZhP., Beliaeva LV., Shaposhnykova SV. Post-vaccination humoral immunity in children // Collection of scientific papers "Organizational, diagnostic and therapeutic aspects of the activities of health care institutions". Voronezh. 2005. P. 187-190.
4. Riabchuk FN., Aleksandrova VA., Pyrohova ZY. Persistent infections in young and older children // SPb. 2009. P. 11–12.
5. Medunitsyn NV., Olefir YV., Merkulov VA. [et al.] Vaccination contribute to the development of personal and herd immunity // BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2016. Vol. 16. N. 4. P. 195-207.
6. RU. Patent. N. 2463605. The method for determining the timing of revaccination of the subject against diphtheria.
7. RU. Patent. N. 2461834. A method for predicting the formation of a virological response in patients with chronic hepatitis C.
8. UA. Patent. N. 97513. Determination method of viral load.
9. Toptygina AP., Pukhalskiy AL., Mamaeva TA. [et al.] The spectrum of subclasses of measles immunoglobulins G in patients with measles // Bull. Exp. Biol. 2004. Vol. 137. N. 3. P. 293-295.