



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2013129101/15, 25.06.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.06.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.06.2013

(45) Опубликовано: 27.07.2014 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: (см. прод.)

Адрес для переписки:

614045, г.Пермь, ул. Монастырская, 82, ФБУН  
"ФНЦ медико-профилактических технологий  
управления рисками здоровью населения",  
директору Н.В. Зайцевой

(72) Автор(ы):

**ЗАЙЦЕВА** Нина Владимировна (RU),  
**УСТИНОВА** Ольга Юрьевна (RU),  
**МАКАРОВА** Венера Галимзяновна (RU),  
**ДОЛГИХ** Олег Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки  
"Федеральный научный центр медико-  
профилактических технологий управления  
рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ  
медико-профилактических технологий  
управления рисками здоровью населения")  
(RU)

**(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ СНИЖЕНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА К ДИФТЕРИИ У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВРЕДНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к способам оценки влияния неблагоприятных химических факторов антропогенного происхождения на изменение поствакцинального иммунитета у детей к дифтерии. Изобретение включает следующие стадии: на территории проживания определяют перечень химических веществ-загрязнителей среды обитания, для которых иммунная система является мишенью, далее для установленных веществ-загрязнителей осуществляют оценку риска развития нарушений со стороны иммунной системы по критерию индекса опасности ИИ более 1,0 и проводят отбор проживающих в указанных условиях детей, которым была выполнена плановая вакцинация и/или ревакцинация вакциной АКДС - адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной, и у которых отсутствуют заболевания иммунной системы. Затем у указанных детей выполняют отбор пробы крови, в пробе устанавливают количество выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания и выделяют лиц, у которых это

количество превышает фоновый региональный уровень не менее чем на 20%, и в сыворотке крови выбранных лиц методом иммуноферментного анализа со специфическими тест-системами определяют количество поствакцинальных антител класса иммуноглобулина G IgG к дифтерийному анатоксину. Из них выделяют лиц, у которых это количество ниже протективного уровня, устанавливают для этих лиц корреляционную связь снижения количества указанных антител от содержания в крови выбранных химических веществ и при одновременном установлении достоверных зависимостей: повышенное содержание в крови ребенка свинца более 0,04 мг/дм<sup>3</sup> и о-крезола более 0 мг/дм<sup>3</sup> и пониженное по сравнению с протективным уровнем количество поствакцинальных антител класса IgG к дифтерийному анатоксину, диагностируют снижение поствакцинального иммунитета ребенка к дифтерии. Применение изобретения позволяет обеспечить достоверную диагностику нарушения

поствакцинального иммунитета у детей, токсикантов среды обитания. 2 ил., 4 табл.  
подверженных воздействию химических

(56) (продолжение):

RU2463605 C1, 10.10.2012 RU2414713 C1, 20.03.2011 С.В. ИЛЬИНА, Е.Д. САВИЛОВ. Техногенное загрязнение окружающей среды и эффективность вакцинопрофилактики у детского населения. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. Найдено в Интернет, [онлайн], найдено на <http://www.epidemvac.ru/arhiv/2009/08/tehnogennoe-zagryaznenie-okruzhayushey-sredy-i-effektivnost-vaktsinoprofilaktiki-u-detskogo-naseleniya>, 17.08.2009

R U 2 5 2 4 6 3 6 C 1

R U 2 5 2 4 6 3 6 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013129101/15, 25.06.2013

(24) Effective date for property rights:  
25.06.2013

Priority:

(22) Date of filing: 25.06.2013

(45) Date of publication: 27.07.2014 Bull. № 21

Mail address:

614045, g.Perm', ul. Monastyrskaja, 82, FBUN  
"FNTs mediko-profilakticheskikh tekhnologij  
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija", direktoru  
N.V. Zajtsevoj

(72) Inventor(s):

ZAJTseVA Nina Vladimirovna (RU),  
USTINOVA Ol'ga Jur'evna (RU),  
MAKAROVA Venera Galimzjanovna (RU),  
DOLGIK Oleg Vladimirovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki  
"Federal'nyj nauchnyj tsentr mediko-  
profilakticheskikh tekhnologij upravlenija  
riskami zdorov'ju naselenija" (FBUN "FNTs  
mediko-profilakticheskikh tekhnologij  
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija") (RU)

(54) **DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR POSTVACCINAL IMMUNITY TO DIPHTHERIA IN CHILDREN LIVING ON TERRITORY OF EXPOSURE TO HAZARDOUS CHEMICAL FACTORS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention involves the following stages: chemical environmental contaminants targeting the immune system on the territory of residence are listed. For the listed contaminants, a risk of immune disorders is assessed by a hazard index. If HI is more than 1.0, the children living in the specified conditions and vaccinated up to a schedule and/or re-vaccinated with a DPT vaccine - diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine - and suffering from no immune diseases are selected. Blood is sampled from the above children; the sample is examined to measure an amount of the specified chemical environmental contaminants to detect individuals with the above amount exceeding an ambient regional level by not less than 20%; an amount of postvaccinal immunoglobulin G (IgG) antibodies to diphtherial anatoxin is measured in the blood

serum of the selected individuals by ELISA with specific test-systems. The individuals with the above amount being less than the protective level are selected and assigned with a correlation of the above antibodies from the blood concentration of the listed chemicals, and if stating the reliable relations simultaneously: high blood concentration of lead more than 0.04 mg/dm<sup>3</sup> and of o-cresol more than 0 mg/dm<sup>3</sup> and lower concentration of postvaccinal IgG antibodies to diphtherial anatoxin as compared to the protective level, a decrease of the postvaccinal immunity to diphtheria is diagnosed in the child.

EFFECT: applying the invention enables providing the reliable diagnosis of the postvaccinal immunity in the children exposed to chemical environmental toxic agents on the territory of living.

2 dwg, 4 tbl

Изобретение относится к области медицины, в частности к способам оценки влияния неблагоприятных химических факторов антропогенного происхождения на изменение поствакцинального иммунитета у детей к дифтерии. Метод может быть использован для проведения эпидемиологических исследований, расследований, экспертиз и направлен на объективную оценку иммунологической эффективности вакцинопрофилактики и выявление контингента детей, проживающих в условиях воздействия вредных химических факторов среды обитания, в отношении которых необходимо осуществление дополнительных мероприятий, направленных на повышение эффективности вакцинации вакциной АКДС - адсорбированной (цельноклеточной) коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной.

Для понимания существа вопроса ниже приведены следующие пояснения.

В 2011 г. вакцинопрофилактика дифтерии была осуществлена у 98,1% детей РФ. Ретроспективный анализ эпидемии дифтерии (1993-1996 гг.) показал, что среди заболевших высокий удельный вес составляли привитые лица (74-81%), что свидетельствует о недостаточном уровне поствакцинального иммунитета у отдельных категорий населения. Установлено, что антропогенное загрязнение среды обитания является одним из ведущих факторов риска формирования у 35-51,9% детей низкого уровня специфических поствакцинальных антител. На территориях антропогенного загрязнения среды обитания число детей с максимальным содержанием поствакцинальных антител в 7-8 раз ниже аналогичного показателя у лиц, проживающих в условиях относительного санитарно-гигиенического благополучия. По данным литературы у детей 10-14 лет, проживающих на территориях антропогенного загрязнения, установлено отсутствие защитных уровней антител к дифтерии в 20-25% случаев, несмотря на проведение плановой вакцинации.

Следует отметить, что в настоящее время отсутствуют методические подходы к оценке нарушений поствакцинального иммунитета у детей, проживающих в условиях антропогенного загрязнения среды обитания, не разработан алгоритм формирования доказательной базы роли химических токсикантов в развитии этих нарушений, наличие которой позволит разработать комплекс дополнительных мероприятий, направленных на повышение эффективности вакцинопрофилактики дифтерии у детей.

Из Методических указаний "МУ 3.1.2943-11. 3.1. Профилактика инфекционных болезней. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)" (утв. Роспотребнадзором 15.07.2011) известен способ определения количества антител к дифтерии методом РПГА (реакция непрямой гемагглютинации). Однако указанный известный метод дает определение не поствакцинальных антител, а всех антител к возбудителю дифтерии. Его результаты зачастую являются недостоверными и не выявляют детей с нарушениями именно поствакцинального иммунитета, т.к. защиту ребенка при встрече с возбудителем дифтерии обеспечивают не все антитела, а именно поствакцинальные. Кроме того, этот известный способ не учитывает влияния химических веществ-загрязнителей на количество антител к дифтерии, что также снижает достоверность выводов.

Также известен способ определения напряженности клеточного поствакцинального иммунитета *in vitro* (заявка на патент РФ №2008136596), согласно которому проводят инкубацию периферической крови пациента с физиологическим раствором в качестве контрольной пробы и водным раствором исследуемой вакцины в качестве опытной пробы, последующую обработку опытной и контрольной проб гемолизирующей смесью

и определение в каждой пробе СрИФ с помощью лазерного проточного цитофлюориметра, при этом в тест-системе in vitro используют широкий спектр вакцин (АКДС, АДСМ, коревую, паротитную, полиомиелитную, гепатитную, против краснухи и др.), определяют коэффициент напряженности (КН) по формуле:

$$5 \quad \text{КН} = \frac{\text{СрИФ опытной пробы} - \text{СрИФ контрольной пробы}}{\text{СрИФ контрольной пробы}} \times 100\%,$$

и если значение КН находится в пределах менее 20%, делают заключение об отсутствии защитного поствакцинального иммунитета, в пределах от 20 до 40% делают заключение о гипоэргической, в пределах от 40 до 60% - нормэргической, превышает 60% - гиперэргической напряженности клеточного поствакцинального иммунитета.

Однако указанный известный способ имеет следующие недостатки:

- не является селективным именно в отношении дифтерии;
  - не принимает во внимание антропогенные характеристики среды обитания ребенка,
- 15 что приводит к снижению точности.

Также известен способ определения показаний к проведению профилактической прививки против дифтерии (патент РФ №2414713), согласно которому в сыворотке венозной крови обследуемого и контрольном образце сыворотки венозной крови определяют уровни специфических IgG к дифтерийному анатоксину, соответственно

20  $\text{IgG}_{\text{ДА}}^0$  и  $\text{IgG}_{\text{ДА}}^{\text{К}}$ . В слюне обследуемого и контрольном образце слюны определяют уровни специфических секреторных IgA к дифтерийному диализатному антигену, соответственно  $\text{sIgA}_{\text{ДДА}}^0$  и  $\text{sIgA}_{\text{ДДА}}^{\text{К}}$ . Полученные значения  $\text{sIgA}_{\text{ДДА}}^0$  и  $\text{sIgA}_{\text{ДДА}}^{\text{К}}$

25 сравнивают между собой, полученные значения  $\text{IgG}_{\text{ДА}}^0$  и  $\text{IgG}_{\text{ДА}}^{\text{К}}$  также сравнивают между собой. При выполнении условий  $\text{IgG}_{\text{ДА}}^0 \leq \text{IgG}_{\text{ДА}}^{\text{К}}$  и  $\text{sIgA}_{\text{ДДА}}^0 \leq \text{sIgA}_{\text{ДДА}}^{\text{К}}$  проведение профилактической прививки против дифтерии считают показанной. Указанный известный способ позволяет более достоверно определять показания к проведению

30 профилактической прививки против дифтерии. Однако этот способ также является недостаточно точным, т.к. не учитывает наличия химических веществ-загрязнителей среды обитания ребенка, которые оказывают существенное влияние на поствакцинальный иммунитет.

Известен способ определения сроков ревакцинации обследуемого против дифтерии (патент РФ №2463605). Сущность способа: предварительно определяют методом иммуноферментного анализа уровень защищенности от дифтерии и индекс авидности. Затем строят график изменения индекса авидности (%) во времени (мес), основанный на зависимости:  $\text{IND\_AVID} = (14,5108) * T * \exp(-(0,094) * (T+1)^{0,934})$ , где IND\_AVID - индекс авидности, T - время в месяцах. На графике определяют время, когда индекс

40 авидности снизится до критической отметки (10%). По разнице между определенным в этой точке временем и временем прошлой вакцинации определяют срок, через который следует пройти очередную ревакцинацию. Использование способа предполагает индивидуальный подход к обследуемым лицам и повышенное внимание к представителям из группы риска.

45 Недостатком этого способа также является недостаточная достоверность в определении нарушения поствакцинального иммунитета в условиях проживания обследуемых детей на неблагополучной в экологическом плане территории.

Технический результат, достигаемый предлагаемым способом, заключается в

обеспечении диагностики нарушения поствакцинального иммунитета у детей, подверженных воздействию химических токсикантов среды обитания.

Поставленный технический результат достигается предлагаемым способом диагностики снижения поствакцинального иммунитета к дифтерии у детей, проживающих в условиях воздействия вредных химических факторов среды обитания, согласно которому на территории проживания определяют перечень химических веществ-загрязнителей среды обитания, для которых иммунная система является мишенью, для установленных веществ-загрязнителей осуществляют оценку риска развития нарушений со стороны иммунной системы по критерию индекса опасности НИ более 1,0, проводят отбор проживающих в указанных условиях детей, которым была выполнена плановая вакцинация и/или ревакцинация вакциной АКДС - адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной и у которых отсутствуют заболевания иммунной системы, у указанных детей выполняют отбор пробы крови, в пробе устанавливают количество выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания и выделяют лиц, у которых это количество превышает референтный или фоновый уровень не менее чем на 20%, в сыворотке крови выбранных лиц методом иммуноферментного анализа со специфическими тест-системами определяют количество поствакцинальных антител класса иммуноглобулина G IgG к дифтерийному анатоксину, выделяют лиц, у которых это количество ниже протективного уровня, устанавливают для этих лиц корреляционную связь снижения количества указанных антител от содержания в крови выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания, и при одновременном установлении достоверных зависимостей: повышенное содержание в крови ребенка свинца более 0,04 мг/дм<sup>3</sup> и о-крезола более 0 мг/дм<sup>3</sup> и пониженное по сравнению с протективным уровнем количество поствакцинальных антител класса IgG к дифтерийному анатоксину, диагностируют снижение поствакцинального иммунитета ребенка к дифтерии.

Указанный технический результат обеспечивается за счет следующего.

Благодаря тому, что на территории проживания определяют перечень конкретных химических веществ-загрязнителей среды обитания, для которых иммунная система является мишенью, обеспечивается практически полный учет приоритетных химических факторов риска для формирования поствакцинального иммунитета к дифтерии ребенка, что позволяет учесть их негативное влияние и повысить достоверность определения. При этом из источника информации «Воздействие на организм человека опасных и вредных экологических факторов. Метрологические аспекты», (в 2-х томах) под редакцией Исаева Л.К. - М. - 1997. - Т.1. - 509 с. известно, что, например, такие вещества, как свинец, хром, марганец и ароматические углеводороды, негативно влияют на иммунную систему человека.

Благодаря тому, что для установленных веществ-загрязнителей осуществляют оценку риска развития нарушений со стороны иммунной системы по критерию индекса опасности НИ более 1,0 («Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду» Р 2.1.10.1920-04), обеспечивается определение селитебных территорий, на которых у детского населения развитие нарушений формирования поствакцинального иммунитета к дифтерии является наиболее вероятным.

Отбор вакцинированных детей, проживающих в указанных условиях, у которых отсутствуют заболевания иммунной системы, обусловлен тем, что важным фактором является выявление таких детей с низким поствакцинальным иммунитетом к дифтерии еще на ранней стадии без клинических проявлений, чтобы в дальнейшем была

возможность провести профилактические мероприятия для этих детей с целью исключения их заболевания дифтерией.

Благодаря использованию в качестве исследуемого материала пробы венозной крови, обеспечиваются простота и надежность исследований, а также получение нужной информативности. Установление содержания химического контаминанта (вещества-загрязнителя) именно в крови обусловлено тем, что кровь является самой гомеостатичной средой (управляемость и регулируемость концентраций составляющих ее компонентов) и единственной, имеющей реферерируемые константы в отношении техногенных химических веществ.

При дальнейшем отборе детей для проведения исследований использовали такой критерий, как: в пробе крови количество выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания, превышало референтный (для металлов) или фоновый региональный уровень (для ароматических углеводородов) не менее чем на 20%. Это обусловлено тем, что согласно источнику информации («Биомаркеры эффекта при воздействии техногенных химических факторов окружающей и производственной среды в системе санитарно-гигиенического анализа» О.В. Долгих, М.А. Землянова. Гигиенические и медико-профилактические технологии управления рисками здоровью населения в промышленно развитых регионах. Мат. Научно-практ. Конф. С международным участием (Пермь, 6-8 октября 2010 г., с.14-19), именно при таком превышении обеспечивается достоверное влияние химических токсикантов на основные показатели гомеостаза организма ребенка.

Использование для исследования метода иммуноферментного анализа (ИФА) со специфическими тест-системами, посредством которого определяют количество поствакцинальных антител класса иммуноглобулина G к дифтерийному анатоксину в сыворотке крови, обусловлено следующим. Основными преимуществами ИФА являются: высокая чувствительность и специфичность, возможность одновременного исследования большого количества проб с определением специфических антител различных классов, объективная оценка результатов с помощью спектрофотометра (автоматического ИФА-анализатора), простота постановки и возможность использования внутреннего контроля. В результате этого анализа выявляют лиц, у которых количество поствакцинальных антител к дифтерийному анатоксину ниже протективного уровня.

Благодаря тому, что при реализации предлагаемого способа устанавливают для этих лиц корреляционную связь снижения количества указанных антител от содержания в крови выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания, обеспечивается доказательство влияния повышенного содержания химических токсикантов на формирование поствакцинального иммунитета к дифтерии.

А достоверное прогнозирование снижения поствакцинального иммунитета ребенка к дифтерии при реализации предлагаемого способа обеспечивается в том случае, если выявлены одновременно достоверные зависимости: повышенное содержание в крови ребенка свинца более  $0,04 \text{ мг/дм}^3$  и о-крезола более  $0 \text{ мг/дм}^3$  и пониженное количество поствакцинальных антител класса IgG к дифтерийному анатоксину по сравнению с протективным уровнем. Числовые значения количества свинца и о-крезола были установлены экспериментальным путем (рис.1 и рис.2). На рис.1 показана связь снижения содержания поствакцинального IgG к дифтерийному анатоксину при увеличении в крови концентрации свинца. На рис.2 показана связь снижения содержания поствакцинального IgG к дифтерийному анатоксину при увеличении в крови концентрации о-крезола. И как неожиданно оказалось, они характеризуют максимально недействующую концентрацию этих веществ на организм ребенка. При этом указанную

максимально недействующую концентрацию определяли согласно методике количественной оценки неканцерогенного риска факторов среды обитания (Шур П.З., Зубарев А.Ю., Шарифов А.Т. Методические подходы к разработке критериев для количественной оценки неканцерогенного риска факторов среды обитания по результатам эпидемиологических исследований // Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 140-летию образования первой гигиенической кафедры в России «Профилактическая медицины в России: истоки и современность». - Казань: ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет Росздрава». - 2009. - Т.2. - С.105-106). И эти данные о концентрации были подтверждены и нижеприведенными исследованиями, характеризующими пример реализации предлагаемого способа.

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

1. Выбирают территорию экологического риска, характеризующуюся наличием вредных химических факторов, обусловленных экологической средой обитания. На выбранной территории проживания детей группы наблюдения (крупный промышленный центр с многопрофильным производством) ежегодно в атмосферный воздух от стационарных источников поступает более 900 тонн загрязняющих веществ (в том числе соединения хрома, марганца, свинца, фенола и крезолов), среди которых вещества 1-3 классов опасности составляют более 77% (759,6 т/год). Натурные исследования атмосферного воздуха в зонах экспозиции позволили идентифицировать в отобранных пробах хром, свинец, марганец в концентрациях до 1,5 ПДКс.с. и о-крезолы, фенол - до 2,3-4,0 ПДКс.с. Все эти вещества в концентрациях выше 1 ПДКс.с. способны вызывать нарушения со стороны иммунной системы согласно «Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду» (Руководство Р 2.1.10.1920-04). - М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. - 143 с.

Одновременно выбирали территорию экологического благополучия на территории проживания детей группы сравнения (поселок городского типа), качество атмосферного воздуха в котором соответствовало гигиеническим нормативам как по данным мониторинговых наблюдений, так и по результатам натурных исследований. Факторы антропогенного происхождения в концентрациях менее 1 ПДКс.с.

2. Далее проводили оценку риска развития у детского населения нарушений со стороны иммунной системы по критерию индекса опасности ( $HI > 1,0$ ) (Оценка риска развития нарушений со стороны иммунной системы осуществляется по стандартизированной методике в соответствии с «Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду». (Руководство Р 2.1.10.1920-04). - М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. - 143 с.).

В ходе исследований, проведенных на указанной выбранной территории проживания детей группы наблюдения, установлен неприемлемый риск развития иммунных нарушений ( $HI > 1,0$ ) при ингаляционном поступлении установленных соединений (хром, свинец, марганец, о-крезолы, фенол). Результаты эпидемиологических исследований выявили причинно-следственную связь между изучаемыми химическими факторами риска и возникновением иммунных нарушений ( $ОШ$  - отношение шансов = 2,56; ДИ - доверительный интервал = 1,05-6,26). Поэтому все установленные вещества принимаются во внимание при установлении нарушения поствакцинального иммунитета к дифтерии.

Оценка риска развития иммунных нарушений, связанных с неблагоприятным воздействием химических факторов среды обитания, выполненная на территории



проживания детей группы сравнения, показала отсутствие риска ( $HI < 1,0$ ).

3. Проводят отбор детей, проживающих на указанной территории. В исследование были включены 276 детей (219 - группа наблюдения, 57 - группа сравнения) в возрасте 4-6 лет, у которых, в соответствии с «Национальным календарем прививок», была выполнена плановая вакцинация вакциной АКДС (базовая вакцинация в возрасте 3; 4,5 и 6 месяцев жизни и первая ревакцинация в 18 месяцев) и не имевших поствакцинальных реакций. Из исследования исключены дети с патологией, сопровождающейся развитием иммунных нарушений.

4. Далее у указанных детей были взяты пробы крови, в которых устанавливали количество выбранных вредных химических веществ среды обитания (хром, свинец, марганец, о-крезолы, фенол). Химико-аналитические исследования содержания металлов (марганец, свинец, хром) в биосубстратах (кровь) проводится методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на спектрофотометре PERKIN-ELMER-3110 (США) (регистрационный номер в Государственном реестре №14427-95) с атомизацией в пламени и масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS фирмы Agilent 7500сх (США) (регистрационный номер в Государственном реестре №24863-08). Исследование содержания фенола и о-крезола в биосубстратах (кровь) проводится методом капиллярной газовой хроматографии и парафазного анализа в соответствии с методическими указаниями (МУК 4.1.763-4.1.779-99; МУК 4.1.2102-4.1.2116-06). Все исследования выполняются с использованием газового хроматографа (модели 6890, 6890N, 6850, 7890А, Рег. №15118-07, страна-производитель США), аппаратно-программного комплекса «Хроматэк-Кристалл-5000» (№ ФСР 2009/04091, ТУ 9443-004-12908609-99). Данные, полученные в ходе испытаний, приведены в таблице 1.

25

Таблица 1

Содержание химических веществ антропогенного происхождения в крови детей исследуемых групп, мг/дм<sup>3</sup>

Вещество	Группа наблюдения	Группа сравнения	Референтный (р)/Фоновый (ф) уровень [Тиц, 2003]	p
Марганец	0,021±0,003	0,013±0,0024	1,09·10 <sup>-2</sup> -6,0·10 <sup>-4</sup> (р)	0,0001
Свинец	0,131±0,013	0,109±0,009	0,1 (р)	0,006
Хром	0,0191±0,0035	0,0107±0,0020	0,007-0,028 (р)	0,03
Фенол	0,0494±0,0071	0,0087±0,0004	0,01±0,005 (ф)	0,0001
О-крезол	0,0143±0,0046	0,0033±0,0012	0(ф)	0,0001

р - достоверность различий группы наблюдения и группы сравнения.

35

Статистическая обработка материала проводится с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Office Excel 2010» и Statistica 6.0. При оценке содержания в крови химических веществ и соединений рассчитываются средние величины и ошибки средних. Статистическую достоверность различий оценивают по непарному t-критерию Стьюдента. Для отклонения нулевой гипотезы (отсутствие различий) принимают уровни статистической значимости  $p < 0,05$ .

40

Результаты исследования крови (таблица 1) детей группы наблюдения показали, что содержание марганца ( $0,021 \pm 0,003$  мг/дм<sup>3</sup>), свинца ( $0,131 \pm 0,013$  мг/дм<sup>3</sup>), хрома ( $0,0191 \pm 0,0035$  мг/дм<sup>3</sup>), фенола ( $0,0494 \pm 0,0071$  мг/дм<sup>3</sup>) и о-крезола ( $0,0143 \pm 0,0046$  мг/дм<sup>3</sup>) достоверно ( $p = 0,01 - 0,0001$ ) в 1,4-4 раз превышало референтные/фоновые уровни. Кроме того, содержание данных химических веществ было в 1,2-4,9 раза выше аналогичных показателей детей группы сравнения (марганец -  $0,013 \pm 0,0024$  мг/дм<sup>3</sup>, свинец -  $0,109 \pm 0,009$  мг/дм<sup>3</sup>, хром -  $0,0107 \pm 0,0020$  мг/дм<sup>3</sup>, фенол -  $0,0087 \pm 0,0004$  мг/дм<sup>3</sup>, о-крезол -  $0,0033 \pm 0,0012$  мг/дм<sup>3</sup>;  $p = 0,03 - 0,0001$ ).

5. Для дальнейшего исследования из числа детей в группе наблюдения были выбраны дети, у которых количество вредных веществ превышало референтный (по металлам) или фоновый (по органическим соединениям) уровень не менее чем на 20%. Такой подход обусловлен установленным порогом развития нарушений реакций поддержания гомеостаза у детей при повышении концентрации химических веществ техногенного происхождения в крови относительно референтных/фоновых («Биомаркеры эффекта при воздействии техногенных химических факторов окружающей и производственной среды в системе санитарно-гигиенического анализа» О.В. Долгих, М.А. Землянова. Гигиенические и медико-профилактические технологии управления рисками здоровью населения в промышленно развитых регионах. - Мат. Научно-практ. Конф. С международным участием (Пермь, 6-8 октября 2010 г., с.14-19).

6. Далее в сыворотке крови выбранных лиц определяют количество поствакцинальных антител класса IgG к дифтерийному анатоксину. Для этого использовали метод иммуноферментного анализа на полуавтоматическом иммуноанализаторе «ELx808» с использованием тест-системы «Anti-Diphtheria Toxoid ELISA», предназначенной для количественного определения *in vitro* антител класса IgG к дифтерийному анатоксину (Diphtheria Toxoid) в сыворотке крови. Набор «Anti-Diphtheria Toxoid ELISA» откалиброван в Международных единицах (МЕд) с использованием международной референтной сыворотки NIBSC 911534 (National Institute for Biological Standards Control, Hertfordshire, England).

Оценка состояния поствакцинального иммунитета к дифтерии проведена через три, четыре и пять лет после первой ревакцинации АКДС на основании исследования содержания циркулирующих специфических поствакцинальных антител. Данные, полученные в ходе испытаний, приведены в таблице 2.

Анализ среднегрупповых показателей содержания поствакцинальных антител к дифтерии показал, что их уровень в обеих исследуемых группах в анализируемые сроки после первой ревакцинации/вакцинации соответствует протективному. В группе наблюдения уровень поствакцинальных антител к токсину дифтерии составлял:  $\min - 0,089$  Мед/мл (протективный уровень -  $0,1-2,0$  Мед/мл,  $p=0,82$ ),  $\max - 0,365$  Мед/мл ( $p \leq 0,001$ ). В то же время у детей группы наблюдения через 3 года после первой ревакцинации АКДС уровень антител к токсину дифтерии ( $0,089 \pm 0,096$  Мед/мл) в 4,8-10,4 раза ниже показателей группы сравнения ( $0,429 \pm 0,131$  Мед/мл  $p=0,002-0,0001$ ).

Для углубленной оценки иммунологической эффективности вакцины АКДС в изучаемых группах была проанализирована частота нарушений формирования поствакцинального иммунитета (таблица 3).

Результаты исследования, приведенные в таблице 3, показали, что у 50-67% детей группы наблюдения и 21-46% детей группы сравнения содержание поствакцинальных антител не обеспечивало протективного уровня иммунитета к дифтерии, при этом частота случаев формирования у привитых детей группы наблюдения низких титров поствакцинальных антител была в 1,8-2,0 раза выше группы сравнения ( $p=0,03-0,0001$ ).

В группе наблюдения в исследуемые сроки поствакцинального периода протективный уровень противодифтерийных антител имело только 33-48% привитых детей, что достоверно в 1,5-2,0 раза меньше группы сравнения (67-71%,  $p=0,003-0,0001$ ). В целом в группе наблюдения количество детей, имеющих низкое содержание поствакцинальных противодифтерийных антител, в 1,8-2,0 раза ( $p=0,001-0,003$ ) превышало показатель группы сравнения. Кроме того, в анализируемые сроки поствакцинального периода (с 3-х лет до 5) число детей с содержанием противодифтерийных антител ниже протективного уровня в группе наблюдения увеличивается на 28,9%, в то время как в

группе сравнения только на 13,8% ( $p=0,03$ ).

7. Выделяют лиц, у которых количество поствакцинальных антител класса IgG к дифтерийному анатоксину ниже протективного уровня, и устанавливают для этих лиц корреляционную связь снижения количества указанных антител от содержания в крови выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания. Статистическая обработка материала проводится с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Office Excel 2010» и Statistica 6.0. При оценке содержания в крови химических веществ и соединений рассчитываются средние величины и ошибки средних. Статистическую достоверность различий оценивают по непарному t-критерию Стьюдента. Для отклонения нулевой гипотезы (отсутствие различий) принимают уровни статистической значимости  $p < 0,05$ . Математическое моделирование включает анализ отношения шансов изменения показателей поствакцинального иммунитета при возрастании концентрации химических веществ в биологических средах.

8. Далее устанавливают причинно-следственную связь снижения количества антител класса IgG к дифтерийному анатоксину от содержания в крови выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания. Анализ показателя отношения шансов изменения уровня поствакцинального специфического иммунитета при различном уровне токсикантной нагрузки позволил установить достоверную связь: повышенное содержание в крови ребенка свинца более  $0,04 \text{ мг/дм}^3$  и о-крезола более  $0 \text{ мг/дм}^3$  и пониженное количество поствакцинальных антител класса IgG к дифтерийному анатоксину. Результаты приведены на рис.1 и рис.2. С другими химическими токсикантами (марганец, хром, фенол) причинно-следственная связь снижения количества антител класса IgG к дифтерийному анатоксину не выявлена.

Данные, приведенные на рис.1 и рис.2, доказывают установление причинно-следственной связи нарушения поствакцинального иммунитета к дифтерии от влияния таких токсикантов антропогенного происхождения, как свинца и о-крезола, при указанном их количественном содержании (достоверно значимое снижение содержания IgG к дифтерийному анатоксину при увеличении в крови концентрации свинца (недействующий уровень -  $0,04 \text{ мг/дм}^3$ ;  $R_2=0,09$ ;  $p < 0,0001$ ) и о-крезола (недействующий уровень -  $0,0 \text{ мг/дм}^3$ ;  $R_2=0,48$ ;  $p < 0,0001$ ). Из всего спектра установленных вредных веществ-загрязнителей в крови ребенка именно эти два вещества оказывают влияние на снижение поствакцинального иммунитета к дифтерии.

Для доказательства того, что у детей из группы наблюдения, по сравнению с детьми из группы сравнения, снижен поствакцинальный иммунитет, было проведено изучение показателей системного иммунитета. При этом было установлено, что у детей, проживающих в условиях антропогенного загрязнения среды обитания, достоверно более низкое, относительно группы сравнения, абсолютное содержание лимфоцитов CD19+ и CD16+56+ ( $p=0,01-0,001$ ) и сывороточного иммуноглобулина А ( $p=0,02$ ) (таблица 4). Данные, приведенные в таблице 4, показывают, что у детей группы наблюдения по сравнению с детьми группы сравнения достоверно на 30% ниже содержание антителопродуцирующих клеток (CD19+) ( $p \leq 0,01$ ), в 1,8 раза выше содержание клеток-киллеров (CD16+56+) ( $p \leq 0,001$ ) и более чем на 10% ниже уровень иммуноглобулина А ( $p \leq 0,02$ ). Эти показатели как раз и характеризуют снижение именно поствакцинального иммунитета к дифтерии.

Предлагаемый способ позволяет оценить влияние неблагоприятных химических факторов антропогенного происхождения на адекватность поствакцинального иммунитета к дифтерии с целью выявления контингента детей, в отношении которых

необходимо осуществление дополнительных мероприятий, направленных на повышение эффективности вакцинопрофилактики. При этом рекомендуется диспансерное наблюдение таких детей у аллерголога-иммунолога с проведением специализированных программ, например контроль уровня поствакцинального иммунитета - 2 раза в год, иммунограмма - 2 раза в год, разработка индивидуальных программ вакцинопрофилактики.

10

Таблица 2  
Содержание поствакцинальных антител к дифтерии в крови детей, проживающих в различных условиях антропогенного загрязнения среды обитания

Нозология	Период после последней вакцинации/ревакцинации (годы)			Содержание антител				Протективный уровень антител
	Группа наблюдения	Группа сравнения	Достоверность различий	Группа наблюдения	Группа сравнения	Достоверность различий группы наблюдения		
						с группой сравнения	с защитным уровнем антител	
15 Дифтерия (Мед/мл)	3,22±1,18	3,40±0,68	0,79	0,089±0,016	0,429±0,131	0,0001	0,82	0,1-2,0
	4,50±0,26	4,24±0,22	0,13	0,365±0,084	0,264±0,154	0,25	<0,001	
	5,16±0,38	5,10±0,20	0,83	0,289±0,089	0,261±0,120	0,71	<0,001	

20

Таблица 3  
Частота нарушений формирования защитного уровня поствакцинального иммунитета к дифтерии у детей, проживающих в различных условиях антропогенного загрязнения среды обитания (%)

Нозология	Период после последней вакцинации/ревакцинации (годы)			Группа наблюдения			Группа сравнения			Достоверность различий		
	Группа наблюдения	Группа сравнения	Достоверность различий	Ниже протективного уровня	Соответствует протективному уровню	Выше протективного уровня	Ниже протективного уровня	Соответствует протективному уровню	Выше протективного уровня	p1	p2	p3
25 Дифтерия	3,22±1,18	3,40±0,68	0,79	52	46	2	29	71	0	0,003	0,001	-
	4,50±0,26	4,24±0,22	0,13	52	48	0	46	54	0	0,44	0,44	-
	5,16±0,38	5,10±0,20	0,83	67	33	0	33	67	0	0,001	0,001	-

30

p1 - достоверность различий частоты формирования поствакцинального иммунитета ниже протективного уровня у детей группы наблюдения и группы сравнения  
 p2 - достоверность различий частоты встречаемости протективного уровня поствакцинальных антител у детей группы наблюдения с группой сравнения  
 p3 - достоверность различий частоты формирования поствакцинального иммунитета выше протективного уровня у детей группы наблюдения и группы сравнения

Таблица 4  
Показатели системного иммунитета у детей, проживающих в различных условиях антропогенного загрязнения среды обитания (%)

Показатель	Физиологический уровень	Группа наблюдения	Группа сравнения	P
35 Процент фагоцитоза (%)	35-60	56,0±2,5	56,5±4,5	0,92
Фагоцитарное число (у.е.)	0,8-1,2	1,05±0,08	1,0±0,09	0,40
Фагоцитарный индекс (у.е.)	1,5-2,0	1,85±0,08	1,70±0,12	0,06
Абсолютный фагоцитоз (109/дм <sup>3</sup> )	0,964-2,988	2,541±0,247	2,170±0,323	0,07
CD3+-лимфоциты отн. (%)	55-84	67,5±2,0	66,5±6,5	0,89
40 CD3+-лимфоциты абс. (109/дм <sup>3</sup> )	0,690-2,540	2,037±0,213	2,160±0,276	0,48
CD3+CD4+-лимфоциты отн. (%)	31-60	34,5±2,5	38,0±4,0	0,64
CD3+CD4+-лимфоциты абс. (109/дм <sup>3</sup> )	0,410-1,590	1,047±0,132	1,233±0,166	0,08
CD3+CD8+-лимфоциты отн. (%)	13-41	25,5±2,0	23,0±3,0	0,71
CD3+CD8+-лимфоциты абс. (109/дм <sup>3</sup> )	0,190-1,140	0,773±0,089	0,757±0,112	0,82
CD19+-лимфоциты отн. (%)	6-25	13,5±1,5	17,0±2,5	0,52
45 CD19+-лимфоциты абс. (109/дм <sup>3</sup> )	0,090-0,660	0,417±0,065	0,545±0,079	0,01
CD16+56+-лимфоциты отн. (%)	5-27	15,5±2,5	8,0±1,5	0,16
CD16+56+-лимфоциты абс. (109/дм <sup>3</sup> )	0,090-0,590	0,463±0,084	0,253±0,05	0,001
CD3+CD25+-лимфоциты отн. (%)	5,5	4,5±0,5	4,5±0,5	1,0

CD3+CD25+-лимфоциты абс. (10 <sup>9</sup> /дм <sup>3</sup> )	0,155	0,136±0,023	0,154±0,021	0,26
IgA (г/дм <sup>3</sup> )	2,0-2,8	1,14±0,07	1,29±0,11	0,02
IgM (г/дм <sup>3</sup> )	1,0-1,6	1,09±0,04	1,17±0,09	0,1
IgG (г/дм <sup>3</sup> )	12,0-16,0	10,01±0,33	10,25±0,73	0,35
p - достоверность различий показателей системного иммунитета у детей группы наблюдения и группы сравнения.				

### Формула изобретения

Способ диагностики снижения поствакцинального иммунитета к дифтерии у детей, проживающих в условиях воздействия вредных химических факторов среды обитания, характеризующийся тем, что на территории проживания определяют перечень химических веществ-загрязнителей среды обитания, для которых иммунная система является мишенью, для установленных веществ-загрязнителей осуществляют оценку риска развития нарушений со стороны иммунной системы по критерию индекса опасности ИИ более 1,0, проводят отбор проживающих в указанных условиях детей, которым была выполнена плановая вакцинация и/или ревакцинация вакциной АКДС - адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакциной и у которых отсутствуют заболевания иммунной системы, у указанных детей выполняют отбор пробы крови, в пробе устанавливают количество выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания, и выделяют лиц, у которых это количество превышает референтный или фоновый уровень не менее чем на 20%, в сыворотке крови выбранных лиц методом иммуноферментного анализа со специфическими тест-системами определяют количество поствакцинальных антител класса иммуноглобулина G IgG к дифтерийному анатоксину, выделяют лиц, у которых это количество ниже протективного уровня, устанавливают для этих лиц корреляционную связь снижения количества указанных антител от содержания в крови выбранных химических веществ-загрязнителей среды обитания, и при одновременном установлении достоверных зависимостей: повышенное содержание в крови ребенка свинца более 0,04 мг/дм<sup>3</sup> и о-крезола более 0 мг/дм<sup>3</sup> и пониженное по сравнению с протективным уровнем количество поствакцинальных антител класса IgG к дифтерийному анатоксину, диагностируют снижение поствакцинального иммунитета ребенка к дифтерии.

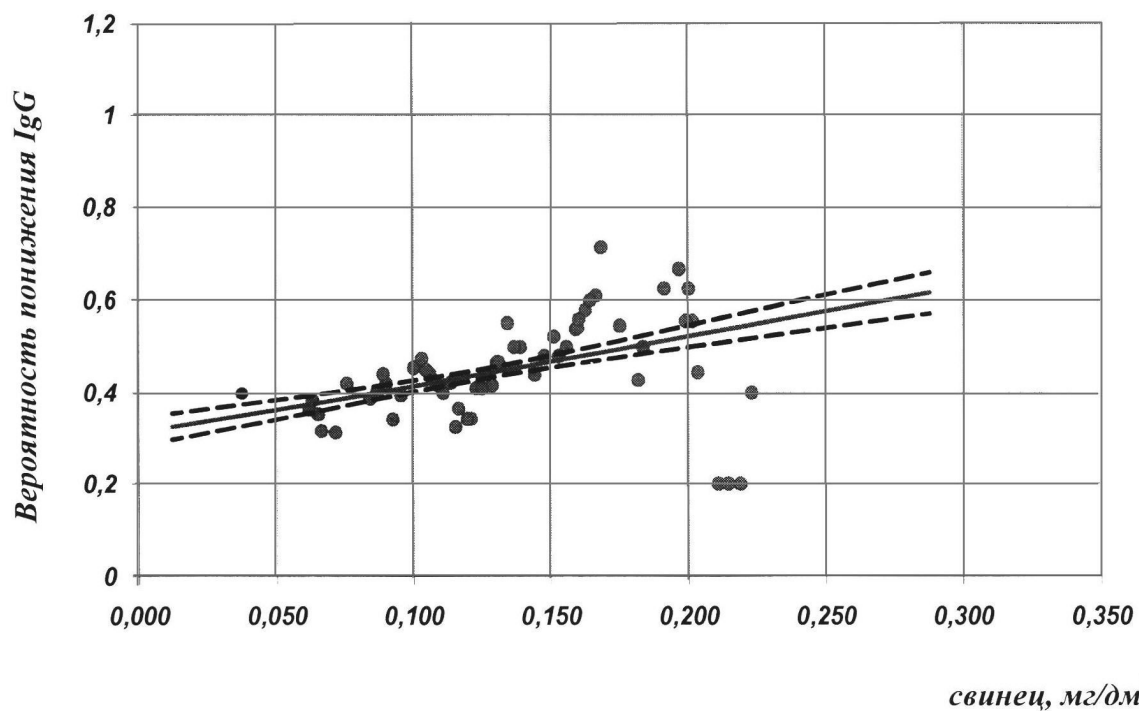


РИС.1

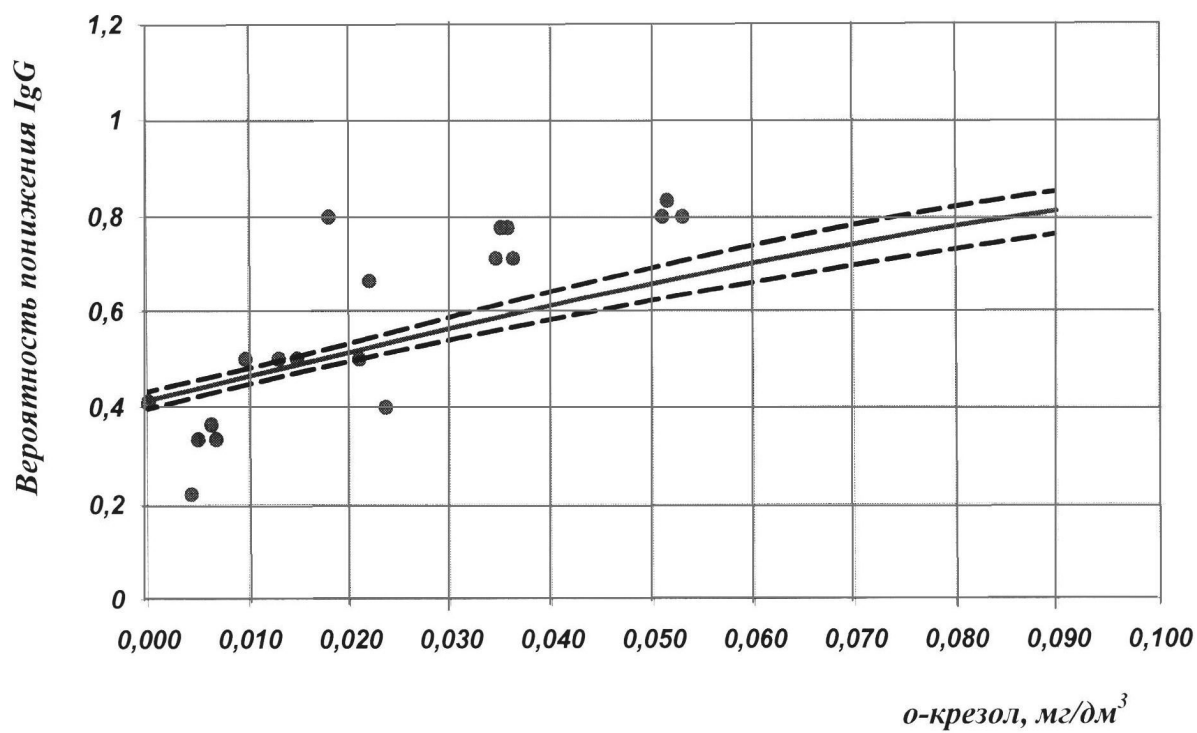


РИС.2