

На правах рукописи.

Осипова Марина Аркадьевна

**ФОРСИФИЦИРОВАННАЯ ВАКЦИНАЦИЯ ПРОТИВ
ГЕПАТИТА В ДЕТЕЙ С СОЛИДНЫМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ
ОПУХОЛЯМИ НА ФОНЕ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ**

14.00.14 - онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2007

Работа выполнена в НИИ детской онкологии и гематологии ГУ Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук.

Научные руководители:

Член - корреспондент РАМН, профессор
Доктор медицинских наук, профессор

В.Г. Поляков
О.В. Шамшева

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук Морозова О.В.

Доктор медицинских наук, профессор Костинов М.П.

Ведущее учреждение: ФГУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росздрава.


Защита диссертации состоится «_____» 2007 г. в _____ часов

На заседании Диссертационного совета (К.001.017.01)
ГУ Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН
(115478, Москва, Каширское шоссе, 24)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ РОНЦ РАМН

Автореферат разослан «_____» 2007 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета
Доктор медицинских наук, профессор



Ю.А.Барсуков

Актуальность темы. Гепатит В (ГВ) имеет широкое распространение среди пациентов, находящихся на лечении в онкогематологических отделениях. По данным Рейзис А.Р. [2002], Россиной А.Л. [2004] заболеваемость ГВ среди детей с солидными злокачественными опухолями (СЗО) колеблется от 29% до 36,5%. Обследование детей с гемобластомами на HBV также показывает высокую степень их инфицированности - 22,7%-76%.

К постоянным факторам риска по инфицированию HBV у детей со злокачественными опухолями относятся: массивные гемотрансфузии, парентеральное введение большинства лекарственных средств, инвазивные методы исследования, оперативные вмешательства, тесный контакт с инфицированными пациентами (Учайкин В.Ф., 2003). На практике присоединение ГВ нередко приводит к необходимости прерывания лечения основного заболевания, увеличению перерывов между курсами полихимиотерапии (ПХТ), что, в свою очередь, может вызвать прогрессирование основного заболевания (вплоть до летального исхода), и как следствие - повышение частоты рецидивов, увеличение количества койко - дней, удорожание лечения.

Учитывая многообразие путей передачи вируса ГВ и большое число источников инфекции, а также наличие вакцины против ГВ, наиболее перспективным методом защиты является специфическая иммунизация. Применяя вакцину против ГВ, можно предупредить и случаи одновременного заражения вирусами ГВ и гепатита D, так как патологическое действие вируса гепатита D может реализоваться только при наличии репликации вируса ГВ (Михайлов М.И., 2001). В определенном смысле вакцину против ГВ можно рассматривать и как первую профилактическую вакцину против первичного рака печени (Самочатова Е.В.,1996).

Вирусные гепатиты у детей с онкогематологическими заболеваниями (ОГЗ) отличает значительное своеобразие клинико-лабораторных проявлений и необычное течение. По данным Рейзис А.Р. [1996] основной особенностью клинических и лабораторных проявлений ГВ и гепатита С у данного контингента больных является отсутствие корреляции между их выраженностью и активностью воспалительного процесса в печени.

Нарушение цитотоксической активности иммунокомпетентных клеток ведет к неполноценному иммунному ответу и персистенции вируса в организме, что в свою очередь способствует хронизации инфекционного процесса при ГВ, а впоследствии приводит к развитию цирроза печени и гепатоцеллюлярного рака (Майер К.П., 2000; Предеина Н.С., 2004; Kenji I., 1998-и др.).

После окончания лечения основного заболевания у ряда детей течение ГВ

приобретает тяжелое и злокачественное течение и заканчивается летальным исходом. Т.о. ребенок, излеченный от злокачественного заболевания, может погибнуть от ГВ.

Не остается сомнений, что таких детей необходимо вакцинировать, и как можно раньше, сразу после постановки диагноза. Однако большинство исследователей сходятся во мнении, что иммунизация против ГВ детей с ОГЗ на фоне ГОСТ не приводит к достаточной выработке антител (Гомес Л.А.,1996; Костинов М.П.. 2002; Rokicka-Milewska R., 1993, Meral A., 2000 и др.).

Попытки усилить иммуногенность вакцин до настоящего времени касались модификации схем вакцинопрофилактики, а именно увеличения доз вводимого вакцинного антигена и кратности его введений (Скачкова Л.А., 2000; Предеина Н.С.,2004 и др.) Возможно, что решение этих проблем лежит на пути применения форсифицированных вакцин. Высокий риск инфицирования вирусом ГВ у пациентов со злокачественными опухолями (30) и недостаточная эффективность рекомбинантных гепатитных вакцин ставит вопрос о необходимости усиления специфического иммунного ответа сочетанным введением вакцины и иммуномодуляторов.

Активное использование иммуномодуляторов в онкологической практике началось еще в 70-х гг. прошлого века, когда была выдвинута иммунологическая теория происхождения опухолей и была продемонстрирована возможность изменения иммунологических показателей у онкологических больных при использовании ряда препаратов. С этой позиции, применение иммуномодуляторов у пациентов со 30 способствует уменьшению токсичности химиопрепаратов, сокращению сроков восстановления лейкоцитов, снижению заболеваемости от вирусных инфекций, а в ряде случаев - увеличению продолжительности ремиссии (Кадагидзе З.Г.,2001).

Идея форсифицированной вакцинации впервые была предложена академиками Р.В. Петровым и Р.М. Хаитовым [1998]. Наибольший успех достигнут в разработке форсифицированных вакцин, полученных путем конструирования протективных антигенов в составе с иммуномодуляторами и способных вызывать стимуляцию определенных классов специфических иммуноглобулинов, в том числе и у лиц с иммунодефицитными состояниями. С этой точки зрения заслуживают внимания синтетические пептидные иммуномодуляторы последнего поколения, имеющие различные точки приложения и зарекомендовавшие себя как средства неспецифической иммунотерапии, действие которых основано на способности восстанавливать те или иные нарушения клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Сочетанное применение иммуномодуляторов и традиционных вакцин против ГВ может оказаться крайне перспективным у иммунокомпрометированных лиц, в том числе у детей с ОГЗ.

Цель исследования: Снизить заболеваемость гепатитом В у детей с солидными злокачественными опухолями на фоне полихимиотерапии путем сочетанного введения вакцины и иммуностропных препаратов.

Задачи исследования:

1. Оценить иммунологическую активность вакцинации против ГВ у детей с СЗО на фоне проводимой терапии при использовании стандартной дозы вакцины и ускоренного режима введения.
2. Изучить показатели специфического иммунитета у детей с СЗО при сочетанном введении вакцин против ГВ и иммуномодулятора Имунофан.
3. Выявить особенности иммунного ответа на вакцинацию против ГВ у детей с СЗО при сочетанном введении вакцины и иммуномодулятора Полиоксидоний.
4. Оценить форсифицирующее влияние иммуномодулятора Гепон на показатели специфического иммунитета у детей с СЗО при его одновременном введении с вакциной против ГВ.
5. Оценить профилактический эффект форсифицированной вакцинации и моновакцинации против ГВ у детей с СЗО.

Научная новизна:

Впервые в результате данного исследования установлено, что форсифицированная вакцинация против ГВ детей с СЗО при применении программной химиотерапии клинически безопасна и эффективна. Изучены особенности формирования специфического иммунитета на вакцинацию против ГВ с использованием различных иммуномодуляторов у детей с СЗО на фоне ПХТ. Показано, что у большинства детей формируется достаточно высокий уровень специфического иммунитета при почти полном отсутствии реакций. При этом у детей с СЗО защитный титр антител удается достоверно повысить путем сочетанного введения вакцины и иммуномодуляторов Гепон и Полиоксидоний при стандартной дозе вакцинного препарата и четырехкратной схеме его введения (0,1,2,6 месяцев).

Научно-практическая значимость:

В результате проведенной работы доказана возможность проведения форсифицированной вакцинации против ГВ детям с СЗО при применении химиотерапии. При этом клинические проявления реакций выявляются в 3,4% случаев. Напряженный специфический иммунитет (>100МЕ/л) формируется в 79% случаев на сочетанное

введение вакцины и иммуномодулятора Полиоксидоний и в 70% случаев на сочетанное введение вакцины и иммуномодулятора Гепон, что говорит о высокой иммуногенности данной схемы вакцинации и гарантирует защиту в случае инфицирования. Введение вакцины против ГВ по схеме 0, 1, 2, 6 месяцев в стандартной дозе в сочетании с иммуномодуляторами Полиоксидоний и Гепон приводит к снижению заболеваемости ГВ в 2,5 раза по сравнению с моновакцинацией и в 8 раз по сравнению с не вакцинированными против ГВ детьми.

Внедрение полученных результатов в практику:

Результаты диссертации внедрены в практику работы НИИ ДОГ ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Материалы диссертации доложены на конгрессах педиатров - инфекционистов в 2003 и 2005 годах, в 2003 году - на ученом совете кафедры детских инфекций и вакцинопрофилактики Московского факультета ГОУ ВПО РГМУ Росздрава.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

Апробация работы.

Состоялась 10 октября 2006 года на совместной научной конференции с участием всех подразделений НИИ ДОГ ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, кафедры детской онкологии РМАПО, кафедры детских инфекций и вакцинопрофилактики Московского факультета ГОУ ВПО РГМУ Росздрава.

Структура и объем диссертации:

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 190 источников. Материалы диссертации изложены на 131 страницах машинописного текста, иллюстрированы 24 таблицами и 7 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 106 детей с СЗО в возрасте от 6 месяцев до 16 лет, получавшие ГОСТ по поводу основного заболевания в НИИ ДОГ ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН г. Москвы в период с 2000 по 2003 г.

76 детей получили специфическую иммунопрофилактику ГВ на фоне ГОСТ в сочетании с иммуномодуляторами и составили исследуемую группу. 30 детей получили специфическую иммунопрофилактику ГВ на фоне ГОСТ без иммуномодуляторов и составили группу сравнения. Соотношение девочек и мальчиков было 1:1,1 и 1:1,7 в исследуемой группе и группе сравнения соответственно. Вакцинации подлежали дети с установленным диагнозом злокачественного новообразования. Диагнозы пациентов, включенных в исследование, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Диагнозы детей, включенных в исследование

Нозологическая форма	Исследуемая группа n = 76		Группа сравнения n = 30	
	Абс. Кол-во	%	Абс.кол-во	%
Ретинобластома	12	16	4	13
Рак носоглотки	6	8	3	10
Нейробластома	9	12	7	24
Нефробластома	12	16	4	13
Остесаркома	16	21	4	13
Рабдомиосаркома	14	18	8	27
Ангиосаркома	1	1	0	0
Гепатобластома	3	4	0	0
Герминогенная опухоль яичников	2	3	0	0
Эстезионейробластома	1	1	0	0
Всего	76	100	• 30	100

Большинство детей получали лечение по протоколам высокого и среднего риска, включающее в себя несколько курсов интенсивной ГОСТ, лучевую терапию, оперативное лечение, часть детей - высокодозную ГОСТ с трансплантацией стволовых клеток. Курс иммунизации начинали как можно раньше, т.е. сразу после постановки диагноза. Остальные дозы вакцинного препарата дети получили в перерывах между курсами ГОСТ, при восстановлении показателей периферической крови (лейкоциты не менее 1,5 тыс.). При этом вакцинации подлежали дети с отрицательными результатами исследования на серологические маркеры ГВ. Из исследования были исключены пациенты, ранее вакцинированные или имеющие положительные маркеры ГВ. В течение всего периода наблюдения за вакцинированными детьми осуществлялся контроль за маркерным спектром HBV -, HCV-, HGV-инфекций.

Иммунизация проводилась рекомбинантными вакцинами против ГВ, а именно «Энджерикс В» и «Комбиотех», из иммуномодуляторов применялись - «Гепон», «Имунофан» и «Полиоксидоний».

На каждого ребенка заполнялась карта обследования, в которой отмечались паспортная часть, развернутый клинический диагноз, анамнестические данные, проводимые терапевтические мероприятия, даты введения каждой дозы вакцины и иммуномодулятора, течение поствакцинального периода, а также результаты лабораторных и инструментальных методов исследования на протяжении всего периода наблюдения. Клинико-лабораторное обследование иммунизированных против ГВ детей с СЗО в течение всего периода наблюдения, который составил 1 год, включало: осмотр, термометрию, УЗИ органов брюшной полости, общий анализ крови, биохимический анализ крови с определением содержания общего белка, билирубина и его фракций, АлАТ, АсАТ, осадочных проб. За иммунизированными детьми после каждого введения вакцины проводилось наблюдение в день вакцинации и в течение трех последующих суток на предмет выявления вакцинальных реакций.

Характеристика препаратов для форсифицированной вакцинопрофилактики гепатита В

Рекомбинантные вакцины Энджерикс В и Комбиотех зарегистрированы и разрешены к применению в практике здравоохранения РФ. Оба вакцинных препарата представляют собой высокоочищенный поверхностный антиген вируса ГВ (HBsAg), адсорбированный на солях алюминия (адьювант). Используемый в вакцинах HBsAg, продуцируется дрожжевыми клетками с помощью рекомбинантной ДНК-технологии. Таким образом, инъекционное применение вакцин не сопровождается риском инфицирования HBV, ВИЧ и любыми другими вирусами, которые могут быть обнаружены в плазме человека. Жесткие и многократно повторяющиеся белковые структуры, к которым относится, используемый в современных вакцинных препаратах, рекомбинантный HBs-антиген из неинфекционных частиц, индуцируют сильный В-клеточный ответ независимый от Т-лимфоцитов.

Иммунобиологические препараты, используемые в исследовании:

- Рекомбинантная вакцина Комбиотех (ЗАО «НПК «Комбиотех ЛТД», Россия);
- Рекомбинантная вакцина Энджерикс В («ГлаксоСмит Кляйн», Бельгия);
- Гепон (Россия) - синтетический иммуномодулятор. Активное вещество - тетрадекапептид. В одном флаконе содержится 0.002 г. активного вещества;

- Имунофан (Россия) - синтетический гептапептид, в одном флаконе содержится 50 мкг активного вещества.

- Полиоксидоний (Россия) - синтетический иммуномодулятор. Активное вещество - сополимер N-окси 1,4-этиленпиперазина и (М-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазина бромид. В одном флаконе для инъекций содержится 0,003 г. активного вещества.

Схемы и дозы форсифицированной вакцинопрофилактики ГВ

Все 106 детей с СЗО получили рекомбинантные дрожжевые вакцины против ГВ по ускоренной схеме 0, 1, 2, 6 месяца.

Таблица 2. Схемы вакцинации детей с СЗО

Название вакцинного препарата и иммуномодулятора	Количество детей
Энджерикс В	14
Энджерикс В+Имунофан	16
Энджерикс В+Полиоксидоний	17
Комбиотех	16
Комбиотех+Имунофан	10
Комбиотех+Полиоксидоний	17
Комбиотех+Гепон	16
Всего	106

Как видно из таблицы 2, вакцину Энджерикс В получили 47 детей, из них 14 получили только вакцину, 16 - вакцину в сочетании с Имунофаном, 17 - вакцину в сочетании с Полиоксидонием. Вакцину Комбиотех получили 59 детей, из них 16 получили только вакцину, 10 - вакцину в сочетании с Имунофаном, 17 - вакцину в сочетании с Полиоксидонием и 16 - вакцину в сочетании с Гепоном.

Все участники исследования получали препараты в возрастных дозировках. Полиоксидоний вводился внутримышечно, в дельтовидную мышцу, в дозе 3-6 мг из расчета 0,15 мг на кг массы тела ребенка ежедневно в течение трех дней до вакцинации и в день каждой вакцинации внутримышечно. Гепон назначался субlingвально за день до и в день каждой вакцинации в дозе 5-10 мг, соответственно возрасту.

Методы исследования.

В работе проводилась оценка иммунологической активности и профилактической эффективности форсифицированной вакцинации у детей с СЗО на фоне ПХТ.

Иммунологическую активность иммунизации оценивали с помощью определения концентрации антител к HBsAg. Количественную характеристику анти-HBs проводили до начала иммунизации, через месяц после 3-й и 4-й вакцинаций, как в сочетании с иммуномодуляторами, так и без них.

При этом выделяли три варианта ответа на вакцинацию:

- при титре антител менее 10 МЕ/л иммунизация считалась неэффективной (отрицательный результат);
- при титре антител в интервале от 10 до 99 МЕ/л - недостаточный (слабый) иммунный ответ;
- при титре 100 МЕ/л и более - высокий иммунный ответ (эффективная иммунизация).

Выявление серологических маркеров в сыворотке крови детей, подлежащих вакцинации против ГВ, также как и уровень специфических антител у иммунизированных детей, проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих тест-систем «Abbot» (США), «Organon» (Голландия), на оборудовании и фотометре «Quantum-П» фирмы «Abbot» в лаборатории кафедры детских инфекций РГМУ (зав. лаб.-доцент В.А. Конев). Так же в группах детей оценивался уровень сероконверсии.

Профилактическая эффективность форсифицированной вакцинации оценивалась по результатам инфицированности ГВ среди детей, получивших курс иммунизации по схеме 0, 1, 2, 6 месяцев без иммуномодуляторов, с применением иммуномодуляторов, а также среди не вакцинированных против ГВ детей. Оценка эффективности проводилась в течение года после окончанного курса сочетанной иммунизации.

В оценке переносимости сочетанного применения вакцин и иммуномодуляторов использовались понятия поствакцинальной реакции (ПВР) и поствакцинального осложнения (ПВО). С целью сбора ПВР использовались клинические признаки общих и местных прививочных реакций. Степень реактогенности препаратов оценивалась по суммарной частоте и выраженности местных и общих реакций на введение препарата через 30 минут после инъекции или его перорального применения и далее в течение 3 дней с помощью термометрии, опроса о самочувствии и осмотра места введения препарата. Общие реакции оценивались по степени подъема температуры. Так, слабой реакцией считали подъем температуры до 37,5 С при отсутствии симптомов интоксикации; средней - от 37,6 С до 38,5 С с умеренно выраженной интоксикацией и сильной - более 38,5 С с выраженными явлениями интоксикации. Оценка выраженности местной реакции проводилась по величине инфильтрата и площади гиперемии. При этом слабой реакцией считали гиперемию и инфильтрат в месте инъекции до 2,5 см в диаметре; средней - от 3 до 5см и выраженная - более 5 см., а также гиперемию 8 см. в диаметре и

более. ПВО считали клинические проявления стойких патологических изменений в организме, связанные с вакцинацией, как-то: выраженная местная реакция, абсцесс в месте введения, лимфаденит, судороги, тяжелые аллергические реакции и др.

Результаты исследования

С целью формирования группы сравнения для дальнейшего исследования, 30 детей с СЗО, находящихся на лечении в стационаре и получающих цитостатическое лечение по поводу основного заболевания, были иммунизированы против ГВ без включения в схему иммуномодулятора. 16 детей получили вакцину Комбиотех, 14 - вакцину Энджерикс В по единой схеме 0-1-2-6 месяцев. Наблюдения в поствакцинальном периоде показали, что ни у одного из привитых против ГВ детей с СЗО на фоне ПХТ не было выявлено обострения основного заболевания, связанного непосредственно с вакцинацией. У погибшего ребенка с диагнозом саркома Юинга, получавшего вакцину Энджерикс В, летальный исход наступил вследствие прогрессирования основного заболевания, при этом не было зарегистрировано каких-либо вакцинальных реакций.

Через месяц после третьей вакцинации из 14 детей вакцинированных Энджерикс В, серонегативной оставалась половина детей (50%), в то время как из 16 детей, вакцинированных Комбиотех, 87% приобрели защитные антитела. Средний геометрический титр антител (СГТА) в группе детей, вакцинированных Энджерикс В составил $58,36 \pm 28,01$ МЕ/л, а в группе детей, получивших вакцину Комбиотех - $90,04 \pm 22,87$ МЕ/л. ($p > 0,05$).

Через месяц после законченного курса вакцинации Комбиотех протективный уровень антител определялся уже у 15 из 16 вакцинированных детей, что составило 94%. Среди детей, привитых Энджерикс В, показатель сероконверсии составил 50%, т.е. практически не изменился.

Таблица 3. Показатели специфического иммунного ответа через 1 месяц после V4 (четвертая вакцинация) у детей с СЗО, иммунизированных Энджерикс В и Комбиотех по схеме 0-1-2-6 мес. (n=26)

Название вакцины	Серопозитивные	Титры антител (МЕ/л)				СГТА
		<10	10-100	100-1000	> 1000	Вабс. числах
Энджерикс В (n=10)	5 (50%)	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)	0	239,40 + 12,11
Комбиотех (n=16)	15 (94%)	1 (6%)	9 (56%)	5 (32%)	1 (6%)	286,81 ± 63,09

Анализ полученных данных показал, что среди детей, не ответивших антителообразованием на четырехкратное введение вакцин, преобладали дети, получавшие интенсивную ГОСТ. Мы не выявили существенных закономерностей, выражающих зависимость антителообразования от генеза злокачественной опухоли.

После четвертой вакцинации отмечалось нарастание титра антител в целом по группам, и он был достаточно высоким уже в 10 - 32%; у одного ребенка (привитого вакциной Комбиотех) он был высоким (> 1000 МЕ/л). У остальных детей СГТА характеризовался как недостаточный, т.е. был в пределах от 10 до 100 МЕ/л.

В среднем по группе у детей, вакцинированных Энджерикс В, СГТА составил 239,40 ± 12,11 и 286,81 ± 63,09 - у детей, получивших Комбиотех, т.е. превышал минимальный протективный уровень в 24 - 29 раз. При этом не было выявлено статистически достоверной разницы между уровнями антител, формируемыми на разные вакцины (p>0,05).

Результаты проведенных исследований показывают, что дети с иммуносупрессией, индуцированной злокачественной опухолью и полихимиотерапией, способны отвечать на введение рекомбинантных вакцин против ГВ продукцией специфических антител, однако частота сероконверсий, а главное СГТА не могут удовлетворить, поскольку не гарантируют, длительную защиту в случае инфицирования, что не противоречит проведенным ранее исследованиям (Вербняк В.А., 1999; Гомес Л.А., 1996, Шамшева О.В., 2001; Rokicka-Milewska R., 1993; Somjee S., 2002 и др.).

Форсифицированную вакцинацию против ГВ получили 76 детей с СЗО, находящихся на лечение в стационаре и получающих цитостатическое лечение.

Иммуномодулятор Имунофан в сочетании с вакциной Комбиотех получили 10 пациентов и 16 - в сочетании с вакциной Энджерикс В. Наблюдение за детьми в поствакцинальном периоде показало отсутствие каких-либо ПВР и ПВО у всех детей.

Через месяц после 3-й сочетанной вакцинации Комбиотех + Имунофан серопозитивными оказались 80% детей, что несколько ниже показателя сероконверсий у детей, вакцинированных только Комбиотех (87%). Процесс антителообразования практически не отличался от такового в ответ на введение вакцины без иммуномодулятора. Средний титр антител по группе составил 90,04 ± 22,87 МЕ/л на трехкратное введение вакцины Комбиотех и 108,70 ± 47,37 МЕ/л - на сочетанную вакцинацию Комбиотех + Имунофан (p>0,05).

Через месяц после законченного курса сочетанной вакцинации Комбиотех + Имунофан только один ребенок не выработал защитных титров антител. При этом показатель

сероконверсий составил 90%, что практически не отличалось от показателя сероконверсий у детей, получивших только вакцину (94%).

Таблица 4. Показатели специфического иммунитета через 1 месяц после V4 у детей с СЗО, иммунизированных только вакциной Комбиотех и Комбиотех + Имунофан (n=26)

Вакцина	Серопозитивные	Титры антител (МЕ/л)				СГТА
		<10	10-100	100-1000	>1000	В абс. числах
Комбиотех (n=16)	15 (94%)	1 (6%)	9 (56%)	5 (32%)	1 (6%)	286,81±36,09
Комбиотех + Имунофан (n=10)	9 (90%)	1 (10%)	4 (44%)	1 (11%)	4 (35%)	540,40±127,52

Однако наблюдалось нарастание среднего значения титра антител, которое оказалось почти в 2 раза выше по сравнению с детьми, вакцинированными только Комбиотех, но без статистически достоверной разницы (p>0,05). Продолжала расти и доля лиц с защитным титром антител выше 1000 МЕ/л, которые определялись уже в 35% случаев у детей, получивших сочетанную вакцинацию и только в 6% - среди лиц, вакцинированных Комбиотех. Средние титры антител в 11% случаев были от 100 до 1000 МЕ/л и в 44% - от 10 до 100 МЕ/л. СГТА составил 540,40 ± 127,52 МЕ/л у детей, вакцинированных Комбиотех + Имунофан и 286,81 ± 36,09 - у детей, вакцинированных Комбиотех (p>0,05).

Таким образом, проведенные исследования показали, что законченная сочетанная иммунизация вакциной Комбиотех по схеме 0, 1, 2, 6 месяцев с иммуномодулятором Имунофан, формирует специфический иммунитет в 90% случаев у детей с СЗО на фоне ПХТ, что практически не отличается от показателя сероконверсий у детей, вакцинированных только Комбиотех (94%). Тем не менее, применение Имунофана в качестве форсификатора специфического иммунного ответа привело к появлению лиц с титром антител > 1000 МЕ/л в 35% случаев против 6% - среди лиц, вакцинированных Комбиотех без иммуномодулятора. Средний геометрический титр антител статистически достоверно не различался между обеими группами.

16 детей с СЗО были иммунизированы на фоне ПХТ вакциной Энджерикс В в сочетании с Имунофаном.

Через месяц после третьей инъекции, так же как и у детей вакцинированных только Энджерикс В, протективный иммунитет сформировался в половине случаев (50%).

Средний титр антител был несколько выше в группе детей, получивших сочетанную вакцинацию, чем в группе детей, получивших только вакцину, и составил $80,94 \pm 39,17$ и $58,36 \pm 28,01$ соответственно, но без статистически достоверной разницы ($p > 0,05$).

Через месяц после четвертой вакцинации из 13 обследованных детей (трое серопозитивных детей выбыло из исследования по независящим от нас причинам) протективный иммунитет сформировался у 5 из ответивших ранее детей. Таким образом, показатель сероконверсии составил 42%, т.е. практически не отличался от показателя сероконверсии среди детей, получивших только вакцину (50%).

Таблица 5. Показатели специфического иммунного ответа у детей с СЗО через 1 месяц после V4 Энджерикс В и Энджерикс В + Имунофан ($n=23$)

Вакцина	Серопозитивные	Титры антител (МЕ/л)				СГТА В абс. числах
		<10	10-100	100-1000	>1000	
Энджерикс В ($n=10$)	5 (50%)	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)	0	239,70±88,25
Энджерикс В + Имунофан ($n=13$)	5 (42%)	8 (58%)	2 (17%)	1 (8%)	2 (17%)	463,83+198,05

Средний титр антител был почти в два раза выше в группе детей, получивших сочетанную вакцинацию, по сравнению с детьми, получившими моновакцину ($463,83 \pm 198,05$ МЕ/л и $239,70 \pm 88,25$ МЕ/л. соответственно), но без статистически достоверной разницы ($p > 0,05$).

Причина отсутствия влияния Имунофана на уровень сероконверсии очевидно лежит в механизме его действия. Известно, что иммуностимулирующее действие Имунофана имеет фазный характер, при этом в течение быстрой фазы (первые 2-3 суток) усиливается антиоксидантная защита организма и проявляется детоксикационный эффект; в течение средней фазы (начиная со 2 - 3 до 7 - 10 суток) происходит усиление реакций фагоцитоза; в течение медленной фазы (начиная с 7 - 10 суток до 4 месяцев) проявляется иммуностимулирующее действие - восстановление нарушенных показателей клеточного и гуморального иммунитета и увеличение продукции специфических антител (Караулов А.В., 2000). Так, применение Имунофана в качестве форсификатора иммунного ответа привело к повышению доли лиц с титром антител > 1000 МЕ/л, которая составила 17% - 35% соответственно при сочетанной вакцинации Энджерикс В и Комбиотех с иммуномодулятором и всего лишь 0% - 6% - среди лиц, получивших только вакцины. Тем

не менее, средний геометрический титр антител статистически достоверно не различался между обеими группами.

В отличие от Имунофана, иммуностимулирующее действие Полиоксидония начинается практически сразу после введения и проявляется в увеличении содержания и повышении функциональной активности клеток и усилении глобулиновой продукции (Некрасов А.В., 1999; Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1998).

Нами изучены показатели специфического иммунитета у 34 детей с СЗО, находящихся на лечение цитостатиками. 17 (50%) пациентов получили Полиоксидоний в сочетании с вакциной Комбиотех и 17 (50%) - в сочетании с вакциной Энджерикс В. Наблюдение за детьми в поствакцинальном периоде показало наличие местных и общих реакций слабой и средней силы в 3,8% случаев. У двух детей после первой вакцинации отмечалась субфебрильная температура, и у двух - отек и гиперемия в месте инъекции диаметром 4 - 5см, что в одном случае явилось результатом подкожного введения вакцины. Все реакции проходили самостоятельно и не требовали специального лечения.

Через месяц после третьей сочетанной вакцинации Комбиотех и Полиоксидоний серопозитивными оказались 12 из 16 детей (один ребенок после V2 (второй вакцинации) был инфицирован HBV и выбыл из исследования), что составило 76%. Этот показатель практически несколько ниже показателя сероконверсии у детей, вакцинированных только Комбиотех (87%). У 4 детей (24%) титры антител были ниже протективного уровня.

Анализ данных показал, что серонегативные дети имели IV стадию по основному заболеванию и получали лечение по протоколам высокого риска. СГТА был выше в 1,5 раза в группе детей, получивших сочетанную вакцинацию по сравнению с детьми, получившими только вакцину, и составил $126,51 \pm 36,47$ МЕ/л против $90,04 \pm 22,87$ МЕ/л, но без статистически достоверной разницы ($p > 0,05$).

Четвертую сочетанную вакцинацию получили 12 из 16 детей: 2 серонегативных и 2 серопозитивных ребенка выбыли из исследования по причине прогрессирования основного заболевания. Показатель сероконверсии составил 92% и 94% соответственно в группе детей, получивших сочетанную вакцинацию и в группе детей, вакцинированных Комбиотех.

Таблица 6. Показатели специфического иммунного ответа через 1 месяц после V4 у детей с СЗО, иммунизированных только Комбиотех и Комбиотех + Полиоксидоний (n=26)

Вакцина	Серопозитивные	Титры антител (МЕ/л)				СГТА
		<10	10-100	100-1000	> 1000	Вабс. числа
Комбиотех (n=16)	15 (95%)	1 (5%)	9 (57%)	5 (32%)	1 (6%)	286,81±63,09
Комбиотех + Полиоксидоний (n=12)	11 (92%)	1 (8%)	2 (17%)	6 (50%)	3 (25%)	588,92±124,19

На сочетанное введение вакцины и иммуномодулятора отмечался значительный рост доли лиц с высокими значениями титров антител, что не наблюдалось среди детей, получавших только вакцину. Так, наибольшее число случаев (50%) в общей структуре антителообразования было отмечено среди детей с уровнем антител от 100 до 1000 МЕ/л, а наименьшее (17%) - от 10 до 100 МЕ/л. Кроме того, в 25% случаев титры антител превышали 1000 МЕ/л, что свидетельствует о высокой иммуногенности данной схемы иммунизации. Кроме того, было выявлено статистически значимое повышение СГТА в группе детей, получивших полный курс сочетанной иммунизации Комбиотех с Полиоксидонием, по сравнению с этим показателем у детей, вакцинированных только Комбиотех. При этом СГТА составил 588,92 ± 124,19 МЕ/л и 286,81 ± 63,09 МЕ/л соответственно (p<0,05).

17 детей с СЗО были иммунизированы на фоне ПХТ вакциной Энджерикс В в сочетании с Полиоксидонием.

Через месяц после третьей инъекции отмечался рост показателя сероконверсии в группе детей, получивших сочетанную вакцинацию по сравнению с детьми, получившими только Энджерикс В, который составил 82% и 50% соответственно. При этом отмечалось статистически достоверное повышение среднего титра антител у детей, находящихся на сочетанной иммунизации, по сравнению с таковым у детей, иммунизированных вакциной Энджерикс В без иммуномодулятора - 121,86 ± 39,80 МЕ/л и 58,36 ± 28,01 МЕ/л соответственно (p<0,05), тем не менее, он превышал минимальный протективный всего в 12 раз.

Через месяц после четвертой сочетанной вакцинации протективный иммунитет выработался у 14 из 15 обследованных детей, что составило 92%. Два серонегативных ребенка после третьей вакцинации выбили из исследования: один ребенок умер от

прогрессирования основного заболевания, другой серонегативный ребенок заболел ГВ. Анализ данных показал, что среди 14 серопозитивных были 13 ранее ответивших детей и 1 ребенок, у которого антитела в протективных значениях появились только после четвертой сочетанной иммунизации. В группе сравнения уровень сероконверсии после законченного курса вакцинации Энджерикс В не изменился и составил 50%.

Таблица 7. Частота сероконверсии и СГТА через 1 месяц после V4 у детей с СЗО, иммунизированных только вакциной Энджерикс В и Энджерикс В + Полиоксидоний (n=25).

Вакцина	Серопозитивные (n=19)	Титры антител (МЕ/л)				СГТА
		<10	10-100	100-1000	>1000	Вабс. числа
Энджерикс В (n=10)	5 (50%)	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)	0	239,70+88,22
Энджерикс В + Полиоксидоний (n=15)	14 (92%)	1 (8%)	2 (13%)	9 (59%)	3 (20%)	575,40+153,52

СГТА у детей, вакцинированных Энджерикс В в сочетании с Полиоксидонием оказался достоверно выше, чем у детей, вакцинированных без иммуномодулятора и составил 575,40 +153,52 и 239,70 ± 88,22 МЕ/л соответственно (p<0,05), т.е. превышал минимальный протективный титр в 58 раз.

При этом уровень антител среди серопозитивных детей в 13% достигал значений от 10 до 100 МЕ/л, в 59% - от 100 до 1000 МЕ/л, в 20% - больше 1000 МЕ/л, тогда как при моновакцинации ни один из детей не ответил титром антител, превышающим 1000 МЕ/л.

Таким образом, введение Полиоксидония в сочетании с вакциной Энджерикс В привело к увеличению числа серопозитивных лиц с 50 до 92%. При этом показатели сероконверсии среди детей, вакцинированных Комбиотех и Энджерикс В в сочетании с Полиоксидонием не различались.

СГТА при форсифицированной вакцинации достоверно вырос по сравнению со СГТА при вакцинации без иммуномодулятора и составил 588,92 ± 124,19 МЕ/л после иммунизации Комбиотех + Полиоксидоний (p<0,05) и 575,40 ± 153,52 после вакцинации Энджерикс + Полиоксидоний (p<0,05). Между собой эти показатели достоверно не различались (p>0,05).

Включение Полиоксидония в схему вакцинации ГВ привело также к значительному росту доли лиц с высокими титрами антител (в 79% случаев при

вакцинации Энджерикс В и в 75% - Комбиотех), что не произошло в группе детей, получивших только вакцину. Данный факт свидетельствует о высокой иммуногенности сочетанной схемы иммунизации, обеспечивающей формирование прочного и длительного специфического иммунитета.

Полученные данные позволяют рекомендовать для стимуляции иммунного ответа на вакцинацию против ГВ у иммуносупрессированных детей иммуномодулятор Полиоксидоний. Режим дозирования иммуномодулятора окончательно не установлен. С учетом имеющихся данных вполне очевидно, что Полиоксидоний можно вводить из расчета 0,15 мг на кг массы тела ребенка ежедневно в течение трех дней до вакцинации и в день каждой вакцинации. Возможно, что при изменении режима дозирования иммунокорректора можно добиться еще большего усиления продукции специфических антител на вакцинацию и не исключено, что оптимальный иммунный ответ будет достигнут только при конъюгации иммуномодулятора с вакциной.

16 детей с СЗО получили сочетанную вакцинацию против ГВ вакциной Комбиотех с иммуномодулятором Гепон.

Наблюдение за привитыми в поствакцинальном периоде показало, что реакции на вакцину отмечались лишь у одного ребенка, что составило 6% случаев. При этом после V2 отмечался однократный подъем температуры до 37,4 С, что было расценено как реакция слабой силы.

Через месяц после третьей инъекции у 14 из 16 обследованных детей сформировался протективный иммунитет, что составило 87%, так же как у детей, вакцинированных только Комбиотех. Кроме того, более высокий уровень антител отмечен в группе детей, получивших сочетанную вакцинацию, по сравнению с детьми, вакцинированными только Комбиотех (90,04±22,87 МЕ/л. и 193,42±209,39 МЕ/л. соответственно), со статистически достоверной разницей (p<0,05).

Через месяц после V4 показатель сероконверсии был практически одинаковым в группе детей иммунизированных только вакциной, и в группе детей получивших сочетанную вакцинацию, и составил 92% и 94% соответственно.

Таблица 8. Показатели специфического иммунного ответа через 1 месяц после V4 у детей с СЗО, иммунизированных Комбиотех и Комбиотех + Гепон по схеме 0,1,2,6 мес.(n= 30)

Вакцина	Серо- позитив- тивные	Титры антител (МЕ/л)				СГТА Вабс. цифрах
		<10	10-100	100-1000	>1000	
Комбиотех (n=16)	15 (94%)	1 (5%)	9 (57%)	5 (23%)	1 (6%)	286,81± 63,09
Комбиотех +Гепон (n=14)	13 (92%)	1 (8%)	3 (22%)	6 (42%)	4 (28%)	609,07± 138,71

Титры антител в группе серопозитивных детей, получивших сочетанную вакцинацию, распределились таким образом, что в 42% случаев титры были высокими и только в 22% - низкими. В группе сравнения наоборот 56% случаев они были низкими и лишь в 32% - высокими.

Кроме того, в группе детей, получивших сочетанную вакцинацию, отмечалось статистически достоверное повышение СГТА по сравнению с этим показателем в группе вакцинированных без иммуномодулятора детей: 286,81±63,09 МЕ/л и 609,07±138,71 МЕ/л соответственно (p<0,05).

Таким образом, проведенные исследования показали, что сублингвальное введение иммуномодулятора Гепон с вакциной Комбиотех по схеме 0,1,2,6 формирует специфический иммунитет в 92% случаев среди детей с СЗО на фоне ПХТ, что практически не отличается от показателя сероконверсии, полученного при вакцинации без иммуномодулятора и составляющего 94%.

Для выбора тактики вакцинопрофилактики ГВ у пациентов с СЗО важное значение имеет скорость заражения вирусом ГВ после начала специфического лечения. Слабый иммунный ответ на вакцинацию (10 - 100 МЕ/л), формируемый к 3-4 месяцу после начала курса иммунизации, увеличивает вероятность инфицирования HBV. В группе детей, получивших форсифицированную вакцинацию, отмечалось достоверное повышение среднего значения уровня антител, по сравнению с этим показателем у детей, вакцинированных только Комбиотех. При этом СГТА превышал минимальный протективный уровень в 60 раз. Выявлен значительный рост доли лиц с высокими титрами антител, при практически полном его отсутствии в группе сравнения.

Полученные данные позволяют рекомендовать для стимуляции иммунного ответа на вакцинацию против ГВ у иммуносупрессированных детей иммуномодулятор Гепон.

Режим дозирования иммуномодулятора - сублингвально за день до - и в день каждой вакцинации в возрастной дозе.

Для оценки профилактической эффективности различных схем иммунизации нами было сформировано три группы детей.

В первую группу вошли 30 детей, вакцинированные против ГВ, во вторую - 76 детей, получившие вакцину в сочетании с иммуномодулятором, и в третью - 54 ребенка, не вакцинированных против ГВ (группа сравнения).

Как показывают проведенные исследования, из 54 не вакцинированных против ГВ детей, у 19 был обнаружен HBsAg, что составило 35%.

Таким образом, полученные данные подтверждают результаты исследований, проведенных Кагановым Б.С., (1992), Учайкиным В.Ф., (1997), Рейзис А.Р., (2002), в которых частота распространения ГВ среди этих пациентов колеблется в пределах 30%-36,5%.

Из 30 вакцинированных против ГВ детей, HBsAg был выявлен у 3-х детей, что составило 10%. При этом у двух детей специфические антитела отсутствовали после трехкратной иммунизации с интервалом 1 месяц; у 1 ребенка после трехкратной вакцинации с интервалом 1 месяц наблюдался слабый иммунный ответ, при котором уровень антител превышал минимальный всего в 2,5 раза.

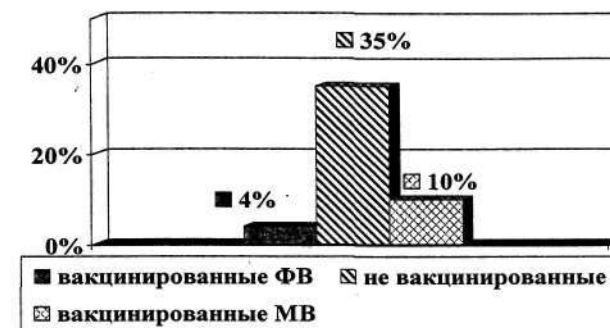
Из 76 детей, вакцинированных против ГВ в сочетании с иммуномодуляторами, HBsAg был обнаружен у 3-х, что составило всего 4%.

Анализ данных показал, что у всех 3-х детей признаки HBV инфекции были выявлены после третьей вакцинации Комбиотех с иммуномодулятором Полиоксидоний (2) или иммуномодулятором Гепон (1). При этом двое детей оставались серонегативными на протяжении всего курса вакцинации, и у одного ребенка защитные титры антител превышали минимальный протективный уровень всего в три раза. Необходимо отметить, что эти дети имели 4 стадию заболевания и получали лечение по протоколам высокого риска. Однако мы не выявили существенных закономерностей, выражающих зависимость антителообразования от генеза СЗО.

Полученные данные говорят о высокой профилактической эффективности форсифицированной вакцинации против ГВ у детей с СЗО.

Наибольшая частота распространения ГВ отмечается среди не вакцинированных детей и составляет 35%. Специфическая профилактика ГВ приводит к снижению заболеваемости у этих детей в 3,5 раза, а форсифицированная вакцинация - в 8 раз (рис.№1).

Заболеваемость ГВ детей с СЗО



Предпринятые в данной работе попытки форсифицировать иммунный ответ на вакцинацию введением иммуномодуляторов показывают перспективность такого подхода. В конечном итоге, у детей с иммуносупрессией после введения иммуностимулятора возрастает способность к продукции специфических антител на рекомбинантную вакцину. Однако однозначно оценить полученные результаты при форсифицированной вакцинации не представляется возможным. Достоверные различия во всех сериях опыта получены только при анализе среднегеометрических титров. Уровень антител на введение Имунофана, Полиоксидония и Гепона практически всегда возрастал в среднем в 46 - 60 раз. Причина отсутствия влияния Имунофана на уровень сероконверсии очевидно лежит в механизме его действия. Известно, что иммуностимулирующее действие Имунофана имеет фазный характер, при этом в течение быстрой фазы (первые 2 - 3 суток) усиливается антиоксидантная защита организма и проявляется детоксикационный эффект; в течение средней фазы (начиная со 2 - 3 до 7 - 10 суток) происходит усиление реакций фагоцитоза; в течение медленной фазы (начиная с 7 - 10 суток до 4 месяцев) проявляется иммуностимулирующее действие - восстановление нарушенных показателей клеточного и гуморального иммунитета и увеличение продукции специфических антител (Караулов А.В., 2000).

В отличие от Имунофана, иммуностимулирующее действие Полиоксидония и Гепона начинается практически сразу после введения и проявляется в увеличении содержания и повышении функциональной активности клеток и усилении глобулиновой продукции.

Полученные данные позволяют рекомендовать для стимуляции иммунного ответа на вакцинацию против ГВ у иммуносупрессированных детей Полиоксидоний и Гепон. Режим дозирования иммуностимуляторов окончательно не установлен. С учетом имеющихся данных вполне очевидно, что Полиоксидоний можно вводить из расчета 0,15 мг на кг массы тела ребенка, внутримышечно, ежедневно в течение трех дней до вакцинации и в день каждой вакцинации, а Гепон - сублингвально за день до - и в день каждой вакцинации в возрастной дозе 3-6 мг.

Очевидно, что при изменении режима дозирования иммунокорректора можно добиться еще большего усиления продукции специфических антител на вакцинацию и не исключено, что оптимальный иммунный ответ будет достигнут только при конъюгации иммуномодулятора с вакциной. Сегодня принципиально важно, что метод форсифицированной вакцинации можно считать актуальным, он открывает перспективы совершенствования вакцин в решении важного вопроса формирования протективного иммунитета, в том числе у лиц с иммунодефицитами.

Выводы:

1. Иммунизация детей с солидными злокачественными опухолями во время полихимиотерапии стандартной дозой вакцины против гепатита В и по ускоренной схеме 0-1-2-6 приводит к выработке специфических антител в 50%-94% случаев с превышением минимального протективного уровня антител (10 МЕ/л.) всего в 24-28 раз ($p > 0,05$).
2. Сочетанная вакцинация против гепатита В с иммуномодулятором Имунофан приводит к недостоверному повышению среднего геометрического титра антител почти в 2 раза по сравнению с моновакцинацией, превышая минимальный протективный уровень в 46-54 раза ($p > 0,05$) при одинаковом уровне сероконверсии.
3. Включение иммуномодулятора Полиоксидоний в схему вакцинации против гепатита В приводит к достоверному повышению среднего геометрического титра антител ($p < 0,05$) при одинаковом с моновакцинацией уровне сероконверсии. При этом среднее значение титра антител превышает минимальный протективный уровень в 58 раз.
4. Форсифицирующее влияние иммуномодулятора Гепон на вакцинацию против гепатита В у детей с солидными злокачественными опухолями во время полихимиотерапии определяется достоверным повышением среднего геометрического титра антител по сравнению с детьми, получающими только вакцину ($p < 0,05$) при неизменном показателе сероконверсии. При этом среднее значение уровня антител превышает минимальный протективный уровень в 60 раз.
5. Форсифицированная вакцинация против гепатита В детей с солидными злокачественными опухолями во время полихимиотерапии приводит к снижению заболеваемости гепатита В в 2,5 раза по сравнению с вакцинированными без иммуномодулятора детьми и в 8 раз по сравнению с не вакцинированными против гепатита В детьми.

Практические рекомендации:

1. Для эффективной и длительной защиты против гепатита В детей с онкогематологическими заболеваниями, получающих комплексную противоопухолевую терапию, рекомендуется сочетанное введение вакцины и иммуномодуляторов Полиоксидоний или Гепон.

2. Вакцинация против гепатита В должна проводиться по ускоренной схеме 0, 1, 2, 6 месяцев.

3. Первая доза вакцинного препарата должна вводиться до начала лечения основного заболевания, остальные дозы в перерывах между курсами полихимиотерапии, при восстановлении показателей периферической крови.

4. Полиоксидоний вводится однократно в течение трех дней до и в день вакцинации из расчета 0,15 мг на килограмм массы тела ребенка в/м.

Гепон - за день до - и в день каждой вакцинации сублингвально в дозе 3-6 мг, соответственно возрасту.

Список сокращений:

ЗО - злокачественные образования

ИФА - иммуноферментный анализ

МЕ/л - международная единица на литр

ПХТ - полихимиотерапия

anti-HBs - антитела к вирусу гепатита В

HBsAg - поверхностный антиген вируса гепатита В

ГВ - гепатит В

СЗО - солидные злокачественные опухоли

ОГЗ - онкогематологические заболевания

АлАт - аланиламинотрансфераза

АсАт - аспаратаминотрансфераза

СГТА - средний геометрический титр антител

ПВР - поствакцинальные реакции

ПВО - поствакцинальные осложнения

V — вакцинация

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Осипова М.А., Поляков В.Г., Шамшева О.В. и др. Форсифицированная вакцинация против гепатита В у детей с солидными злокачественными опухолями. // Аллергия, астма и клиническая иммунология. - №9.-2003.- С. 107-112.
2. Осипова М.А., Поляков В.Г., Учайкин В.Ф. и др. Повышение эффективности вакцинации против гепатита В с помощью иммуномодуляторов у детей со злокачественными опухолями. // Детская онкология. - № 3- 2005-С. 24-28.
3. Шамшева О.В., Осипова М.А., Поляков В.Г. Форсифицированная вакцинация против гепатита В у детей со злокачественными опухолями. // Детские инфекции. - №4,2003.-С. 10-13.
4. Шамшева О.В., Осипова М.А. Особенности вакцинации против гепатита В детей с онкогематологической патологией. // Сборник тезисов II конгресса педиатров - инфекционистов 8-10 декабря 2003 год. - С. 212.
5. Шамшева О.В., Осипова М.А. Форсифицированная вакцинация против гриппа и гепатита В у детей с хроническими заболеваниями. // Сборник тезисов II конгресса педиатров - инфекционистов 8-10 декабря 2003 год. - С. 213.