

Цитоплазматические цитокины при генерализованной менингококковой инфекции у детей

Фомин В.В., Хаманова Ю.Б., Чеснакова О.А., Бейкин Я.Б., Павленко Т.П., Лагерева Ю.Г.
 ГОУ ВПО "Уральская государственная медицинская академия" Росздрава,
 МУ ГКБ № 40 г. Екатеринбург

Резюме. Исследовано содержание цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов в периферической крови у детей с генерализованной менингококковой инфекцией, находившихся на лечении в нейроинфекционном отделении МУ ГКБ № 40 г. Екатеринбурга. Проведено изучение динамики цитоплазматических цитокинов, установлено значительное повышение способности иммунокомпетентных клеток больных генерализованной менингококковой инфекцией (ГМИ) к спонтанной продукции ИЛ-2, ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-4. Системный иммунный ответ при менингококковой инфекции характеризуется дисбалансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, в результате непосредственного воздействия эндотоксина. В итоге нарушаются процессы презентации антигена и взаимодействия иммунокомпетентных клеток, развивается диснергия Т-лимфоцитов (не только уменьшается число CD3 клеток, но и снижается их функция). Активация Th2 звена иммунитета приводит нарастанию уровня IgM, что обуславливает благоприятное течение болезни.

Ключевые слова: менингококковая инфекция, провоспалительные цитокины, инфекционно-токсический шок

Менингококковая инфекция (МИ) относится к числу наиболее тяжёлых инфекционных заболеваний детского возраста [2,3,4]. На детей до 14 лет приходится 70-80% всех зарегистрированных случаев МИ [2,3,4]. Кроме того, отмечается тенденция к нарастанию относительного количества генерализованных форм менингококковой инфекции (ГФМИ) [6,5], которые характеризуются тяжёлыми клиническими проявлениями, значительной частотой остаточных явлений и обуславливают значительную летальность [6,7,8].

В настоящий момент достигнуты значительные успехи в исследовании лабораторной диагностики, клиники, патогенеза, лечения и профилактики МИ, но клиницисты до сих пор не знают, почему при МИ у одних пациентов шок развивается, а у других нет.

Противоменингококковая резистентность инициируется следующими факторами - местный барьер слизистой носоглотки, система комплемента, специфический иммунитет и

бактерицидная активность лейкоцитов. Известно, что в остром периоде у больных ГМИ отмечается Т-лимфопения, при чем степень ее коррелирует с тяжестью заболевания [5]. Различными авторами [9-13,15-17] показан исход нейроинфекции в зависимости от уровня содержания разных цитокинов (интерлейкинов 1, 6, 8, 10, фактора некроза опухоли, дефенинов) в плазме или ликворе.

Нами оценена цитокинпродуцирующая способность Т-лимфоцитов периферической крови при генерализованной менингококковой инфекции у детей с помощью внутриклеточного определения цитокинов методом проточной цитофлуориметрии. Преимущества его очевидны. Мы можем фенотипически охарактеризовать популяцию клеток-продуцентов цитокина и/или определить спектр продуцируемых цитокинов отдельными клетками, при этом имеется возможность относительной количественной характеристики этой продукции.

Цель работы - оценить внутриклеточный синтез провоспалительных и противовоспалительных цитокинов Т-лимфоцитами при генерализованной менингококковой инфекции у детей.

Фомин Виталий Васильевич - д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней и клинической иммунологии ГОУ ВПО УГМА Росздрава

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 174 ребенка с генерализованной менингококковой инфекцией в возрасте от 3 месяцев до 14 лет. Изолированный менингит диагностирован у 49 детей, менингококцемия - у 24 больных, смешанная форма - у 104 детей. Инфекционно-токсический шок (ИТШ) развился у 60 детей. Летальность составила 4%. Молниеносная форма инфекции отмечалась у пяти больных в возрасте от семи месяцев до 3,2 лет, летальность при этой форме составила 100%.

Этиологически диагноз подтвержден в 64,4% случаев, превалировали нетипируемые штаммы (45%).

Всем детям проводились стандартные клинико-лабораторные и иммунологические исследования (лаборатория клинической иммунологии Диагностического центра лабораторной диагностики ВИЧ, инфекционной патологии и болезней матери и ребенка, гл. врач - д.м.н., проф., Я.Б. Бейкин). Содержание лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов определялось с помощью гематологического анализатора Cobas Minos Stex (ABX). Фенотипирование лимфоцитов осуществлялось методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител производства ООО "Сорбент" (г. Москва). Регистрация результатов проводилась методом лазерной проточной цитометрии на цитофлюорометре FACScan (Becton Dickinson). Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фикоколверографина (1,077 г/см³). Спонтанную продукцию ИЛ2, ИЛ4, ИФН- γ и ФНО- α Т-лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брeфельдина А при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали PMA ("Sigma", 50ng/ml) плюс иономицин ("Sigma", 1ng/ml). Иммунофенотипирование проводили с использованием ФИТЦ-меченых анти-CD3-моноклональных антител (ООО "Сорбент", г.Москва) PE-конъюгированных анти-ИЛ2, ИЛ4, ИФН- γ и ФНО- α -антител (Caltag) [1]. Для оценки внутриклеточного киллинга (бактерицидной активности лейкоцитов) и поглотительной активности нейтрофилов и моноцитов использовался метод, разработанный в лаборатории клинической иммунологии Института иммунологии Минздрава РФ. Функционирование НАДФ-оксидазной системы нейтрофилов оценивали при помощи спонтанного НСТ-теста (Демин 1981). Полученные данные обраба-

тывались с помощью программного пакета MS Office 98.

Результаты и их обсуждение

Клиническая картина заболевания не отличалась от ранее описанной в литературе [3,4]. Острое начало отмечено в 98% случаев. При развитии менингококцемии типичная сыпь геморрагического характера появлялась в первые сутки заболевания у 70% детей.

У детей со смешанной формой МИ, а также у детей с изолированным менингитом общие мозговые симптомы наблюдались у 81%, менингеальные знаки встречались у 92% пациентов. У детей с клиникой ИТШ I - II степени наблюдалось острейшее начало болезни. У всех больных отмечались тахипноэ, тахикардия, нарушение сознания - у 67%, множественная геморрагическая сыпь с тенденцией к слиянию - 60%, гипотония - у 50% и субкомпенсированный ацидоз - у 27%.

Анализ гемограмм выявил следующее: лейкоцитоз ($p < 0,05$) отмечен у 85% детей, нейтрофилез ($p < 0,05$) - у 89,6% детей, моноцитоз - у 46% детей, лимфопения - у 61% детей, ускоренная СОЭ - у 100% больных; в иммунограмме - увеличение числа фагоцитирующих моноцитов ($0,35 \pm 0,19 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) и нейтрофилов ($10,30 \pm 1,46 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$), но при этом поглотительная способность (АФ) нейтрофилов и моноцитов периферической крови была снижена: АФ моноцитов - $71,50 \pm 3,62\%$, $p > 0,05$; АФ нейтрофилов - $84,39 \pm 2,78\%$, $p < 0,05$; повышение бактерицидной активности (БА) лейкоцитов ($38,17 \pm 3,03\%$), высокие показатели ЦИК ($75,60 \pm 7,80$ ед., $p < 0,05$), Т-лимфопения ($p < 0,05$), нормальные показатели НСТ-теста и уровня комплемента.

У больных с клиникой ИТШ наблюдались более высокие показатели лейкоцитоза ($p < 0,05$), число фагоцитирующих моноцитов и нейтрофилов было равно $0,31 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ и $12,33 \pm 2,97 \times 10^9/\text{л}$ соответственно; АФ моноцитов - $63,60 \pm 6,49\%$, АФ нейтрофилов $80,15 \pm 4,37\%$, БА - $39,28 \pm 7,85\%$ и снижение уровня Ig M - менее 0,8г/л ($p > 0,05$ по сравнению с детьми без клиники ИТШ). Несмотря на увеличение абсолютного числа нейтрофилов и моноцитов, участвующих в фагоцитозе, поглотительная способность этих клеток при ГМИ у детей была снижена.

Основными клетками-продуцентами цитокинов являются Т-хелперы и макрофаги. Известно, что Т-хелперы являются неоднородной клеточной популяцией, а также то, что разные типы Т-хелперов поддерживают различные ветви иммунитета. Т-хелперы 1 (Тх1) типа продуцируют ИЛ-2 и ИФН- γ , тогда как

Таблица 1. Динамика содержания ИФН - γ , ИЛ-2, ИЛ- 4, ФНО- α - продуцирующих Т-лимфоцитов при генерализованной менингококковой инфекции у детей

Показатель	1 исследование		2 исследование		P
	M \pm m	Индекс стимуляции	M \pm m	Индекс стимуляции	
		M \pm m		M \pm m	
CD3 ⁺ /ИФН γ *	0,05 \pm 0,01*		0,06 \pm 0,01*		>0,05
спонтанный		6,65 \pm 1,03*		16,02 \pm 4,18	
CD3 ⁺ /ИФН γ *	0,29 \pm 0,05*		0,50 \pm 0,06	p<0,05	<0,05
стимулированный					
CD3 ⁺ /ФНО α *	0,065 \pm 0,01*		0,067 \pm 0,01*		>0,05
спонтанный		8,04 \pm 1,34*		12,30 \pm 1,48*	
CD3 ⁺ /ФНО α *	0,40 \pm 0,07*		0,63 \pm 0,07	p<0,05	<0,05
стимулированный					
CD3 ⁺ /ИЛ2*	0,06 \pm 0,01*		0,09 \pm 0,04*		>0,05
спонтанный		8,11 \pm 2,44*		6,43 \pm 1,05*	
CD3 ⁺ /ИЛ2*	0,27 \pm 0,05*		0,32 \pm 0,05*	p>0,05	>0,05
стимулированный					
CD3 ⁺ /ИЛ4*	0,06 \pm 0,06		0,08 \pm 0,03*		>0,05
спонтанный		1,90 \pm 0,28		1,14 \pm 0,18	
CD3 ⁺ /ИЛ4*	0,08 \pm 0,01*		0,07 \pm 0,01*	p>0,05	>0,05
стимулированный					
Индекс поляризации	-0,17		-0,25		

Примечание: * - достоверность различий с группой здоровых детей: p<0,05

P - достоверность различий между показателями в динамике: p<0,05

Таблица 2. Динамика содержания ИФН - γ , ИЛ-2, ИЛ- 4, TNF- α - продуцирующих Т-лимфоцитов при инфекционно-токсическом шоке у детей

Показатель, x 10 ⁹ /л	Группы больных			
	Больные с клиникой ИТШ, n=10		Больные без клиники ИТШ, n=23	
	1 исследование, M \pm m	2 исследование, M \pm m	1 исследование M \pm m	2 исследование, M \pm m
Спонтанная продукция				
CD3 ⁺ /ИФН γ *	0,05 \pm 0,02	0,11 \pm 0,03*	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
CD3 ⁺ /ФНО α *	0,05 \pm 0,01	0,12 \pm 0,03*	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
CD3 ⁺ /ИЛ2*	0,09 \pm 0,03*	0,22 \pm 0,13*	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
CD3 ⁺ /ИЛ4*	0,07 \pm 0,02*	0,17 \pm 0,08*	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01*
Стимулированная продукция				
CD3 ⁺ /ИФН γ *	0,21 \pm 0,07*	0,61 \pm 0,12	0,32 \pm 0,06*	0,46 \pm 0,06
CD3 ⁺ /ФНО α *	0,38 \pm 0,14	0,76 \pm 0,16	0,40 \pm 0,07*	0,58 \pm 0,07
CD3 ⁺ /ИЛ2*	0,37 \pm 0,12	0,37 \pm 0,08	0,23 \pm 0,04*	0,30 \pm 0,06*
CD3 ⁺ /ИЛ4*	0,10 \pm 0,03*	0,12 \pm 0,04*	0,08 \pm 0,01*	0,05 \pm 0,01

Примечание: * - достоверность различий с группой здоровых детей: p<0,05

- выделены показатели, достоверно различающиеся между группами в динамике, p<0,05

Таблица 3. Уровень коэффициента стимуляции CD3⁺-клеток при инфекционно-токсическом шоке у детей

Коэффициент стимуляции	Группы больных			
	Больные с клиникой ИТШ, n=10		Больные без клиники ИТШ, n=23	
спонтанный	1 исследование M±m	2 исследование M±m	1 исследование M±m	2 исследование M±m
ИНФγ*	6,42±1,65*	8,31±1,57*	6,76±1,31*	19,27±6,41
ФНОα*	9,83±2,92*	8,15±1,63*	7,36±1,49*	13,84±1,95* p<0,05
ИЛ2*	3,03±0,72	3,38±0,48*	5,56±0,91*	7,81±1,48*, p<0,02
ИЛ4*	0,92±0,14	1,03±0,24*	2,05±0,24	1,12±0,24*

Примечание: * - достоверность различий с группой здоровых детей: p<0,05
- курсивом выделены показатели, достоверно различающиеся между групп в динамике, p<0,05

T-хелперы 2 типа (T_H2) - ИЛ-4,-5,-10. Th1 осуществляют хелперную функцию в формировании клеточного иммунитета, а Th2 - гуморального [14]. Тканевые макрофаги, нейтрофилы, естественные киллеры, активированные бактериальными антигенами, образующимися в процессе фагоцитоза возбудителя, продуцируют провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО, ИЛ-8, ГМ-КСМ и др.).

Данные, характеризующие цитокинпродуцирующую активность Т-лимфоцитов периферической крови детей при генерализованной менингококковой инфекции, представлены в табл. 1.

В первые 7 дней болезни было выявлено повышение спонтанной цитокинпродуцирующей способности Т-клеток: CD3⁺/ИНФγ⁺ -, CD3⁺/ФНОα⁺ -, CD3⁺/ИЛ2⁺ -, CD3⁺/ИЛ4⁺-лимфоцитов, количество их превышало нормативные показатели в 2 - 3 раза (p<0,05). Уровень стимулированной цитокинсинтезирующей способности CD3⁺/ИНФγ⁺ -, CD3⁺/ФНОα⁺ -, CD3⁺/ИЛ2⁺-клеток был снижен в 1,5 раза (p<0,01), а CD3⁺/ИЛ4⁺-лимфоцитов - повышен в 2 раза (p<0,01).

Коэффициент стимуляции цитокинов при этом был снижен по сравнению со здоровыми детьми: ИНФγ⁺ - в 3,6 раза (p<0,01); ФНОα⁺ - в 2,5 раза (p<0,01); ИЛ2⁺ - в 2,3 раза (p<0,01); ИЛ4⁺ - в 1,2 раза (p>0,05).

В динамике болезни спонтанная экспрессия ИНФγ⁺, ФНОα⁺ осталась на том же уровне; увеличилось число CD3-лимфоцитов, содержащих ИЛ-2, ИЛ-4 в 1,3-1,5 раза (p<0,05, p>0,05 соответственно). Индуцированная экспрессия ИНФγ⁺ и ФНОα⁺ увеличилась в 1,5 раза (p<0,05 и p>0,05 соответственно) и была идентична здоровым детям. Количество

стимулированных CD3⁺/ИЛ2⁺-клеток в динамике не изменялось и было снижено по сравнению с нормой в 1,5 раза (p<0,05). Уровни спонтанной и стимулированной экспрессии цитокина ИЛ-4 были равны и превышали нормативные показатели в 2,5 раза (p<0,01). Коэффициент стимуляции цитокинов при динамическом наблюдении возрастал: ИНФγ⁺ - в 2,4 раза (p<0,05); ФНОα⁺ - в 1,5 раза (p<0,05); отмечалось угнетение стимуляции ИЛ2⁺ - в 0,8 раза (p>0,05); ИЛ4⁺ - в 0,6 раза (p>0,05). Следует отметить, что коэффициенты стимуляции так и не достигали нормативных значений в период реконвалесценции.

Таким образом у детей при ГМИ повышен уровень в периферической крови CD3⁺/ИНФγ⁺ -, CD3⁺/ФНОα⁺ -, CD3⁺/ИЛ2⁺ -, CD3⁺/ИЛ4⁺-лимфоцитов; стимуляция поликлональными активаторами (форбол 12-миристан-13-ацетат и иономицин) этих же клеток снижена, кроме CD3⁺/ИЛ4⁺-лимфоцитов, возможно, это указывает на угнетение функции Th первого порядка и цитотоксических лимфоцитов. Увеличение количества Т-клеток, экспрессирующих ИЛ-4, возможно, является компенсаторной реакцией в этой ситуации.

Данные, характеризующие цитокинпродуцирующую активность Т-лимфоцитов периферической крови детей при инфекционно-токсическом шоке, представлены в табл. 2.

Как видно из таблицы 2, стартовые показатели CD3⁺-клеток, содержащих в цитоплазме провоспалительные цитокины ИНФγ⁺, ФНОα⁺ были идентичны в обеих группах и превышали нормативные данные (p>0,05). В группе детей с клиникой ИТШ количество CD3⁺/ИЛ2⁺ -, CD3⁺/ИЛ4⁺-клеток было выше по сравнению со второй группой

($p > 0,05$). Количество Т-лимфоцитов, синтезирующих ИФН γ , ИЛ2 под действием дополнительной стимуляции у больных первой группы было снижено ($p > 0,05$), а количество клеток продуцирующих ИЛ2, ИЛ4 - повышено по сравнению с больными второй группы ($p > 0,05$).

В динамике у детей первой группы нарастает спонтанная экспрессия более чем в 2 раза не только провоспалительных цитокинов, но и интерлейкина 4, в отличие от больных без клиники ИТШ ($p < 0,02$). Возможно, это связано с дополнительной антигенной стимуляцией, возникающей при шоковых состояниях.

При определении цитокинов в супернатанте ФМА+иономицин-стимулированных клеток, оказалось, что мононуклеары периферической крови у детей с клиникой шока продуцировали повышенное количество ИФН γ , ФНО α , ИЛ-2, ИЛ4 по сравнению со здоровыми детьми и детьми второй группы ($p > 0,05$), но при этом коэффициенты стимуляции провоспалительных цитокинов были ниже в 1,5-2 раза чем у детей без ИТШ (табл. 3).

У детей без клиники шока стимулированная продукция цитокинов ИФН γ , ФНО α не отличалась от нормы, ИЛ2 - была снижена в 1,5 раза ($p < 0,05$), ИЛ4 - была снижена в 1,3 раза ($p > 0,05$).

Для оценки субпопуляций активированных Т-лимфоцитов нами предложен индекс поляризации иммунного ответа (ИП), который представляет собой соотношение Т-лимфоцитов, экспрессирующих ИФН γ , ИЛ-2, ИЛ-4, TNF α . Расчет производился по формуле:

$$ИП = \frac{(CD\ 3 + I\ INF\ \gamma) - (CD\ 3 + I\ ИЛ\ 4)}{CD\ 3 + I\ ИЛ\ 4}$$

У здоровых детей индекс поляризации при спонтанном синтезе равен 0,38, при стимулированном - 12,41. В остром периоде генерализованной менингококковой инфекции у детей без клиники шока, индекс поляризации спонтанного синтеза равнялся 0, стимулированного - 3. При наличии симптомов инфекционно-токсического шока ИП приобретает отрицательные значения: -0,285, при стимулированном синтезе - равен 1,1. В период

санации ликвора соотношение Th1/Th2 при спонтанном синтезе у детей без клиники ИТШ составило 0,25, при стимулированном - 8,2, а у детей с наличием ИТШ - (-0,35) и 4,08 соответственно. Неоднородность значений коэффициента у больных с клиникой шока и без него, возможно, казывает на более глубокий дисбаланс между про- и противовоспалительными факторами иммунной системы.

Несмотря на снижение общего числа Т-лимфоцитов при ГМИ, количество ИФН γ , TNF α , ИЛ-4, ИЛ-2 продуцирующих CD3+ клеток было выше нормативных показателей в 2,5 раза.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что при генерализованной менингококковой инфекции в остром периоде болезни под влиянием эндотоксина происходит нарастание спонтанной экспрессии провоспалительных цитокинов (ИФН γ , TNF α , ИЛ-2) в 1,5-2 раза, приводящих к увеличению числа эффекторных популяций гранулоцитов и моноцитов. Стимулированная экспрессия CD3 клетками ИФН γ , TNF α , ИЛ-2 была значительно ниже, возможно это указывает на угнетение функции Th первого порядка и цитотоксических лимфоцитов. Увеличение количества Т-клеток, экспрессирующих ИЛ-4, возможно является компенсаторной реакцией в этой ситуации.

Угнетение поглотительной способности фагоцитов периферической крови при ГМИ у детей носит транзиторный характер, возможно, это ограничивает высвобождение эндотоксина, уменьшая тем самым антигенную нагрузку. Системный иммунный ответ при менингококковой инфекции характеризуется дисбалансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, в результате непосредственного воздействия эндотоксина. В итоге нарушаются процессы презентации антигена и взаимодействия иммунокомпетентных клеток, развивается диснергия Т-лимфоцитов (не только уменьшается число CD3 клеток, но и снижается их функция). Активация Th2 звена иммунитета приводит к нарастанию уровня IgM, что обуславливает благоприятное течение болезни.

Литература

- Бейкин Я.Б., Лагерева Ю.Г., Богданова Л.В. Ищенко Н.В. Характеристика иммунного статуса здоровых детей дошкольного возраста. Адаптационно-компенсаторные иммунологические реакции в норме и патологии у детей: Сб. науч. Статей. Под ред. В.В. Фомина, А.И. Ольховикова, С.А. Царьковой, О.А. Чеснаковой. Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2003: 25-30.
- Демина А.А. Эпидемиологический надзор за менингококковой инфекцией и гнойными бактериальными менингитами. Эпидемиология и инфекционные болезни 1998; 2: 25-28.

3. Коршунов М.Ф. Менингококковая инфекция у детей. Воронеж: Изд-во ВГУ 1991: 184.
4. Покровский В.И., Фаворова Л.А., Костюкова Н.Н. Менингококковая инфекция. М.: Медицина, 1976: 275.
5. Сорокина М.Н., Иванова В.В., Скрипченко Н.В. Бактериальные менингиты у детей. М. Медицина, 2003: 320.
6. Фомин В.В., Козлова С.Н., Князев Ю.А. Гипоталамо-гипофизарная система и иммунный ответ при инфекционных заболеваниях у детей. Свердловск, 1991: 240.
7. Швец О.Л., Цинзерлинг В.А., Сорокина М.Н. Морфология современной менингококковой инфекции у детей. Архив патологии 1993; 5: 12-16.
8. Феклисова Л.В. Многолетнее наблюдение за показателями заболеваемости и летальности при менингококковой инфекции у детей Московской области. Инфекционные болезни 2004; 3: 68-72.
9. Chavanet P, Bonnotte B, Guiguet M, Zeller V, Solary E, Maurice L, Casasnovas O, Caillot D, Waldner A, Kisterman JP, et al. High concentrations of intrathecal interleukin-6 in human bacterial and nonbacterial meningitis. *J Infect Dis* 1992 Aug 166: 2 428-31.
10. Dinarello C.A. Role of pro- and antiinflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings *J of Biological Regulation & Homeostatic Agents* 1997; (11) 91-103
11. Emre Alhan, MD, Dincer Yildizdas, MD, Hayri Levent Yilmaz, MD et al. Serum and Cerebrospinal Fluid Interleukin-6 and Interleukin-8 Levels in Children with Tuberculous, Bacterial and Aseptic Meningitis *Ann Med Sci* 2001; 10: 123-127.
12. Glimaringker M, Kraghsbjerg P, Forsgren M, Olceacuten P. Tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: high levels of TNF alpha indicate bacterial meningitis. *J Infect Dis* 1993; 167: 4 882-9.
13. K. Shimoda, S. Okamura, Y. Mizuno et al. Human macrophage colonystimulating factor levels in cerebrospinal fluid *Cytokine* 1999; 5: 250-254.
14. Immunology and Inflammation: Basic Mechanisms & Clinical Consequences /Eds.: L.H.Sigal, Y.Ron.-New York etc.: Mc Graw-Hill, Inc., 1994: 805.
15. Kepa L, Adamek B, Stolarz W. Diagnostic value of tumor necrosis factor-alpha (TNF-Alpha) determination in cerebrospinal fluid (CSF) in the course of neural infections. *Neurol Neurochir Pol* 1998; 32 (3) 533-42.
16. Kondrusik M; Hermanowska-Szpakowicz T. The assessment of tumor necrosis factor (TNF) alpha and interleukin (IL)-1 beta levels in cerebrospinal fluid (CSF) and serum in patients with purulent meningitis. *Neurol Neurochir Pol.* 1997; 31 (6): 1119-31.
17. McCracken GH, Mustafa MM, Ramilo O, Olsen KD, Risser RC. Cerebrospinal fluid interleukin 1-beta and tumor necrosis factor concentrations and outcome from neonatal gram-negative enteric bacillary meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: 155-159.