

Антитіла до пластівцевоутворюючого фактора *Staphylococcus aureus* у хворих на кістково-гнійну інфекцію

З. Д. Іванова, В. К. Позур, С. І. Бідненко¹, О. Б. Лютко¹,
Г. Є. Раєвська², В. Г. Пилипенко²

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

Інститут травматології та ортопедії АМН України
вул. Воровського, 27, Київ, 01601, Україна

АТЗТ НПК «ДіаПроф Мед»
вул. Светлицького, 35, Київ, 04123, Україна

Досліджено особливості гуморальної імунної відповіді на пластівцевоутворюючий фактор (ПлФ) золотистого стафілокока у хворих на кістково-гнійну інфекцію. Обстежено 69 хворих та 74 здорових донори у віці від 20 до 50 років. Встановлено, що анти-ПлФ-антитіла виявляються в сироватках здорових та хворих людей у 100 % випадків, при цьому титри антитіл до ПлФ у сироватках крові хворих вірогідно вищі, ніж у здорових донорів.

Вступ. Пластівцевоутворюючий фактор (ПлФ) є субстанцією клітинної стінки стафілококів виду *S. aureus*, якій притаманні антигенні властивості [1, 2]. Участь зв'язаного з клітиною ПлФ в ініціюванні інфекції та здатність очищеного білка спричинювати адгезію стафілококів [3, 4] зумовлюють можливість використання його як компонента прогистафілококових вакцин. Видоспецифічність, поверхневе розташування та антигенні властивості дозволяють розглядати ПлФ як можливий діагностичний маркер стафілококової інфекції.

Незважаючи на значну увагу дослідників до ПлФ, його вплив на формування реакцій клітинного та гуморального імунітету практично не вивчався, а наявні дані не дозволяють скласти чіткого уявлення щодо його ролі в антистафілококовому імунітеті. Визначення особливостей імунної відповіді (особливо гуморальної її ланки) на ПлФ сприятиме створенню нових засобів для діагностики та профілактики інфекцій, викликаних золотистим стафілококом.

Метою даної роботи було дослідження гумо-

ральної імунної відповіді на ПлФ у хворих з кістково-гнійною інфекцією стафілококової етіології та з'ясування діагностичної цінності рівнів анти-ПлФ-антитіл.

Матеріали і методи. Досліджено сироватки крові 69 хворих на остеомієліт та 74 здорових донорів (сироватки отримані зі станції переливання крові) віком від 20 до 50 років. Хворі знаходились на лікуванні в Інституті травматології та ортопедії АМН України.

Стафілококова етіологія захворювання підтверджувалася виділенням *S. aureus* з урахуванням його патогенних властивостей (плазмокоагулюючої, лецитиназної, гемолітичної активності) та/або за допомогою серологічних досліджень. На присутність мікроорганізмів аналізували виділення з ран, вміст нориць, абсцесів, шматочки ураженої тканини, які брали під час операції чи перев'язування. Мікробіологічні дослідження включали мікроскопію нативного матеріалу, кількісний його посів на поживні середовища з наступним виділенням чистих культур мікроорганізмів, ідентифікацію та визначення антибіотикорезистентності за діючими методиками [5]. Серологічні дослідження включали вивчення сироваток в реакції аглютинації (РА) з

живою та грітою культурами ізолюваних від хворих мікроорганізмів [6] та в реакції пасивної геммаглютинації (РПГА) з видоспецифічним антигеном *S. aureus* виробництва НДІ ЕМІХ (Казахстан) [7]. Діагностичним титром антитіл в РА для *S. aureus* вважали наявність аглютинації в розведенні сироватки хворого не нижче за 1:640, *Pseudomonas aeruginosa* — 1:140, бактерій роду *Proteus* — 1:80 і більше. Діагностичним титром РПГА вважали 1:6400 та вище. Антитіла до *Streptococcus pyogenes* групи А визначали за рівнем антистрептолізину О (АСЛО) в сироватках крові з комерційним препаратом виробництва Ленінградського НДІВС. За діагностичний рівень приймали 250 МО/мл АСЛО в сироватці.

Титри антитіл класу G до ПЛФ у сироватці крові визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА). Як антиген у дослідженні використано очищений рекомбінантний ПЛФ (CF41) з молекулярною масою 42 кДа, який синтезувався *Escherichia coli* XLI-Blue pCF41 (штам-продуцент люб'язно надано нам проф. Т. Фостером, Дублін, Ірландія). Рекомбінантний білок є фрагментом нативного ПЛФ і містить лігандзв'язуючий домен ПЛФ (221—559 амінокислотних залишків) та додатковий фрагмент з шести залишків гістидину на N-кінці. Білковий антиген був очищений на колонці з IDA-сефарозою-6В, зарядженій Ni^{2+} . Чистоту отриманих білків контролювали електрофоретично за Леммлі [8], специфічність визначали методом імуноблотингу [9].

Початковим етапом наших досліджень була оптимізація умов проведення ІФА з виявлення антитіл до ПЛФ *S. aureus*: досліджували сорбційні властивості різних полістиролових носіїв, умов сорбції рекомбінантного антигену, склад розчинів для розведення сироваток і кон'югата.

Антиген у концентрації 2 мкг/мл іммобілізували на полістиролових планшетах MaxiSorp («Nunc», Данія) у 0,05 М карбонат-бікарбонатному буфері протягом 16—18 год при температурі 4 °С. Після кожного етапу лунки промивали 4—5 разів натрій-фосфатним буфером (рН 7,5) з додаванням 0,05 % твіну-20 («Merck», Німеччина) (PBS-T). Досліджувані сироватки у відповідних розведеннях (титрували двократно, починаючи з 1/25) вносили в лунки та інкубували впродовж 60 хв при 37 °С. Ставили контролю на неспецифічну сорбцію: контроль сироватки (лунки не сенсibilізували антигеном), контроль кон'югату (не вносили сироватки).

Антитіла виявляли за допомогою кон'югату рекомбінантного білка А *S. aureus* з пероксидазою хрому (ДіаПроф Мед, Україна) протягом 30 хв при 37 °С. Після промивання вносили о-фенілєндіамін

в концентрації 0,9 мг/мл на 0,02 М цитратно-фосфатному буфері (рН 5,2) з додаванням 0,006 % перекису водню. Значення оптичної густини (ОГ) вимірювали на спектрофотометрі «Multiscan MS» («Labsystems», Фінляндія) при довжині хвилі 492 нм. Для обліку реакції визначали титр антитіл, яким вважали розведення сироватки, за якого ОГ перевищувала суму значень двох контролів.

Результати обробляли статистично згідно з рекомендаціями Сайдулдіна [10] з використанням критерію Ст'юдента за допомогою комп'ютерної програми Statgraphics 2.6.

Результати і обговорення. Хворих розподіляли на три групи: першу склали хворі на остеомієліти стафілококової етіології (31 чоловік), другу — особи (10 чоловік) з інфекцією, викликаною асоціацією *S. aureus* та грамнегативних мікроорганізмів (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*), третю — пацієнти, у яких запальний процес був викликаний мікроорганізмами видів *S. pyogenes* та *S. aureus* (28 чоловік). У 8 (25,8 %) хворих I групи з досліджуваного матеріалу виділено *S. aureus* в монокультурі й підтверджено етіологічну роль цих бактерій серологічно в РА з аутокультурою та в РПГА з видоспецифічним антигеном *S. aureus*. У 23 (74,2 %) хворих I групи збудників гнійно-запальних процесів не виділено, а стафілококову етіологію захворювання доведено виявленням у сироватках крові високих діагностичних титрів (1:12800 та 1:25600) антистафілококових антитіл в РПГА. Етіологічну роль стафілокока у всіх хворих II групи підтверджено за допомогою комплексу мікробіологічних та серологічних досліджень. У 10 (35,7 %) хворих III групи етіологічний діагноз встановлено за результатами мікробіологічних та серологічних досліджень, у 18 (64,3 %) хворих, від яких культуру *S. aureus* не було виділено, етіологічну роль збудника доведено в РПГА за діагностичними титрами антитіл. У сироватці всіх 28 (100 %) хворих цієї групи виявлено високий рівень АСЛО, що перевищує 625 МО/мл.

Результати дослідження методом ІФА показали, що IgG-антитіла до ПЛФ золотистого стафілокока виявляються у сироватці крові всіх здорових донорів. При цьому їхні титри варіюють у широких межах, а максимальний та мінімальний титри складають відповідно 1:50 (8 % осіб) і 1:800 (9,5 % осіб) (табл. 1). У групі хворих на остеомієліт також спостерігається значне коливання титрів IgG-антитіл до ПЛФ, проте максимальним титром, що виявляється у 3 % хворих I, III та 10 % — II груп, є 1:6400, а мінімальним — титр 1:400, який виявлено у 39 % хворих I, 30 % — II та 18 % — III груп.

Таблиця 1

Анти-ПлФ-антитіла класу G у сироватці крові здорових та хворих на стафілококову інфекцію

Група обстежених, діагноз	Кількість хворих	Частота виявлення антитіл класу G (IgG) в титрі							
		1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
I, остеомієліт стафілококової етіології	31	—	—	—	12 (38,7)	12 (38,7)	3 (9,7)	3 (9,7)	1 (3,2)
II, остеомієліт, викликаний асоціацією <i>S. aureus</i> та грамнегативних мікроорганізмів	10	—	—	—	3 (30)	2 (20)	2 (20)	2 (20)	1 (10)
III, остеомієліт, викликаний асоціацією <i>S. aureus</i> та <i>S. pyogenes</i>	28	—	—	—	5 (17,8)	6 (21,4)	8 (28,6)	8 (28,6)	1 (3,6)
Здорові	74	6 (8,1)	18 (24,3)	32 (43,2)	11 (14,9)	7 (9,5)	—	—	—

Примітка. Цифрами в дужках позначено відсоток від загальної кількості хворих даної групи.

Таблиця 2

Титри анти-ПлФ-антитіл у сироватці крові хворих на кістково-гнійну інфекцію

Група обстежених	Кількість досліджень	Середні значення титрів анти-ПлФ-антитіл*
I	31	800** (+12,5 %, -11,1 %)
II	10	1213** (+32,9 %, -24,8 %)
III	28	1300** (+14,1 %, -12,3 %)
Здорові	74	188 (+6,4 %, -6,0 %)

Примітка. *Зворотні величини обчислені за Сайдулдінім; **різниця показників у порівнянні з контролем є достовірними ($p < 0,01$).

Незважаючи на істотні коливання титрів анти-ПлФ-антитіл класу G в межах кожної групи, при порівнянні груп хворих та здорових спостерігається чітка тенденція до різниці за даним показником — титри вірогідно вищі ($p < 0,01$) у хворих як з моноінфекцією (середній титр склав 1:800), так і з інфекцією, викликаною асоціацією *S. aureus* з грамнегативними мікроорганізмами (1:1213) та з *S. pyogenes* (1:1300), ніж у здорових людей (1:188) (табл. 2). Різниця за даним показником між I, II та III групами хворих не є вірогідною, що може свідчити про значну етіологічну роль золотистого стафілокока в розвитку інфекції навіть за присутності інших збудників.

Наявність у сироватці здорових людей антитіл до ПлФ, враховуючи високу частоту носійства *S. aureus* серед практично здорових осіб (його ви-

являють у 15—50 % клінічно здорових дорослих людей), є свідченням постійної експресії антигену та сенсibilізації до нього організму. Високі титри анти-ПлФ-антитіл можуть бути й наслідком нещодавно перенесеної інфекції, адже встановлено [11], що їхній рівень у сироватці пацієнтів, що одужують, вищий, ніж під час гострої фази інфекції.

Отримані дані свідчать про те, що під час кістково-гнійної стафілококової інфекції відбувається значне підвищення рівня антитіл до ПлФ. Розбіжності в частоті виявлення анти-ПлФ-антитіл у хворих, скоріш за все, є свідченням різної імунореактивності організмів. Враховуючи результати дослідження сироваток здорових донорів, мінімальним діагностичним титром анти-ПлФ-антитіл, що може вказувати на стафілококову інфекцію, можна вважати титр, вищий за 1:200. Титри анти-ПлФ-антитіл, вищі за 1:800, які характерні лише для хворих на стафілококову інфекцію, можуть слугувати безумовним діагностичним критерієм при підтвердженні даної етіології захворювань. На наш погляд, отримані дані можуть бути корисними для створення нових підходів для діагностики стафілококової інфекції.

Поверхнєве розташування, видоспецифічність та антигенність ПлФ вбачаються перспективними властивостями для застосування цього антигену стафілокока з діагностичною метою [11]. Проте діагностична значимість антигену визначається й можливістю відрізнити за допомогою специфічних до нього антитіл поточну інфекцію від перенесеної раніше, перебіг інфекційного процесу від здорового носійства збудника. Враховуючи це, даний показник не є абсолютно надійним, оскільки антитіла до ПлФ знаходяться й у сироватках крові здорових донорів, хоча титри їх нижчі. З іншого боку,

виявлення анти-ПлФ-антитіл в титрах від 1:400 до 1:800 за наявності у хворого комплексу клінічних та мікробіологічних критеріїв захворювання також може бути цінним при встановленні етіологічного діагнозу.

Визначення стафілококової етіології захворювання є надзвичайно важливим та складним, особливо за відсутності виражених клінічних проявів патології, неможливості виділення збудника з вогнища запалення та бактеріологічного його дослідження. Крім того, враховуючи належність *S. aureus* до умовно-патогенних мікроорганізмів, не можна вважати об'єктивним показником лише факт його виділення з патологічного матеріалу. Етіологічний діагноз повинен враховувати ряд клініко-лабораторних критеріїв, у тому числі й серологічних.

Виявлення в сироватці хворих підвищених рівнів антитіл до видоспецифічних антигенів *S. aureus* (особливо поверхневих, таких як ПлФ) дає змогу однозначно встановити вид збудника запального процесу. Проте ні один серед існуючих лабораторних методів серодіагностики *S. aureus* (визначення антитіл до α -токсину, ліпази, пептидоглікану, тейхоевих кислот [12, 13]) не дозволяє точно та своєчасно діагностувати захворювання. Подальше, більш глибоке дослідження гуморальної імунної відповіді на ПлФ дозволить сформулювати нові критерії діагностики захворювань стафілококової етіології, що сприятиме своєчасному призначенню адекватної антибактеріальної терапії та профілактиці розвитку інфекційного процесу.

V. D. Ivanova, V. K. Pozur, S. I. Bidnenko, O. B. Lyutko,
G. E. Rayev's'ka, V. G. Pylypenko

Antibodies against clumping factor of *Staphylococcus aureus* in patients with osteopurulent infection

Summary

The peculiarities of humoral immune response against clumping factor (Clf) of *Staphylococcus aureus* in healthy individuals (74 serum samples) and in those with osteopurulent infection (69 samples) were studied. The study revealed that 100 % serum samples of both healthy and infected individuals contain anti-Clf-antibodies. However, the antibody level against Clf was shown to be considerably higher in the patients with staphylococcal infection.

В. Д. Иванова, В. К. Позур, С. И. Бидненко, О. Б. Лютко,
Г. Е. Раевская, В. Г. Пилипенко

Антитела к хлопьеобразующему фактору *Staphylococcus aureus* у больных костно-гнойной инфекцией

Резюме

Исследованы особенности гуморального иммунного ответа на хлопьеобразующий фактор (ХОФ) золотистого стафилококка у больных гнойной инфекцией кости. Обследованы 69 больных и 74 здоровых донора в возрасте от 20 до 50 лет. Установле-

но, что анти-ХОФ-антитела обнаруживаются в сыворотке здоровых и больных людей в 100 % случаев, при этом титр антител к ХОФ в сыворотках крови больных достоверно выше, чем у здоровых доноров.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. McDevitt D., Francois P., Vaudaux P., Foster T. J. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) *Staphylococcus aureus* // Mol. Microbiol.—1994.—11, N 2.—P. 237—248.
2. Espersen F., Clemmensen I. Immunization of mice with the fibronectin-binding protein and clumping factor from *Staphylococcus aureus*: antibody response and resistance against intraperitoneal infection // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C].—1985.—93, N 2.—P. 53—58.
3. Moreillon P., Entenza J. M., Francioli P., McDevitt D., Foster T. J., Francois P., Vaudaux P. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis // Infect. Immunol.—1995.—63, N 12.—P. 4738—4743.
4. Vaudaux P. E., Francois P., Proctor R. A., McDevitt D., Foster T. J., Albrecht R. M., Lew D. P., Wabers H., Cooper S. L. Use of adhesion-defective mutants of *Staphylococcus aureus* to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arterio-venous shunts // Infect. Immunol.—1995.—63, N 2.—P. 585—590.
5. Приказ № 535 МЗ СССР от 22.04.85 «Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностической лаборатории лечебно-профилактических учреждений».—Москва, 1985.—126 с.
6. Серологическая диагностика стафилококковых заболеваний.—Л.: ЛенГИ ДУВ, 1980.—16 с.
7. Дерябин П. Н., Карильник Б. В., Ванеева Н. П., Сластухин Б. А., Терещенко Л. И. Серологическая диагностика гнойно-септических заболеваний стафилококковой этиологии // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.—1987.—№ 7.—С. 38—41.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 259.—P. 680—685.
9. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 9.—P. 4350—4354.
10. Сайдуллин Т. С. Статистическая обработка результатов серологических исследований // Ветеринария.—1981.—№ 7.—С. 62—64.
11. Colque-Navarro P., Palma M., Soderquist B., Flock J.-I. Antibody responses in patients with *Staphylococcal* septicemia against two *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins: clumping factor and an extracellular fibrinogen binding protein // Clin. and Diagn. Lab. Immunol.—2000.—7, N 1.—P. 14—20.
12. Christensson B., Espersen F., Hedstrom S. A., Kronwall G. Serological assays against *Staphylococcus aureus* peptidoglycan, crude staphylococcal antigen and staphylolysin in the diagnosis of serious *S. aureus* infections // Scand. J. Inf. Dis.—1985.—17, N 1.—P. 47—53.
13. Nagel J. G., Tuazon C. U., Cardella T. A., Sheagren J. N. Teichoic acid serological diagnosis of staphylococcal endocarditis. Use of gel diffusion and counterimmunoelectrophoretic methods // Ann. Int. Med.—1975.—82, N 1.—P. 13—17.

УДК 579.361.2 + 616.71-018.46
Надійшла до редакції 05.04.02