

УДК 579.861.2+616.981.25-0.53.2-097

© 2003

В. Д. Іванова, В. К. Позур, В. Г. Пилипенко, Г. Є. Раєвська,  
Т. В. Марушко

### Антитіла до пластівцевоутворюючого фактора у дітей із захворюваннями стафілококової етіології

(Представлено академіком НАН України М. Є. Кучеренком)

*The level of antibodies against the clumping factor (Clf) of Staphylococcus aureus in healthy (32 serum samples) children (aged from 8 to 16 years) and in those with staphylococcal infection (antritis) (26 samples) was studied by immunoenzyme assay (ELISA). Antibody levels against Clf in healthy donors (aged from 20 to 50 years) were also tested. The study revealed that serum of 100% patients contains anti-Clf-antibodies. The antibody levels in healthy children differ from the levels in children with staphylococcal infection. No correlation of age and anti-Clf-antibody levels was found in healthy individuals. The possibility of utilization of the given antigen to the diagnostics of staphylococcal infection was demonstrated.*

Проблема стафілококової інфекції до цього часу залишається актуальною у зв'язку з її широким розповсюдженням, можливістю розвитку важких ускладнень, відсутністю надійних засобів діагностики та профілактики. Пошук профілактичних засобів ведеться безперервно і спрямований на виявлення протективних видоспецифічних антигенів цих бактерій. Перспективними в цьому плані є поверхневі білки стафілококової клітини, які взаємодіють з різними компонентами зовнішньоклітинного матриксу організму хазяїна, одним з яких є пластівцевоутворюючий фактор.

Пластівцевоюутворюючий фактор (ПлФ) — компонент клітинної стінки стафілококів виду *S. aureus* і один з факторів їх потенційної патогенності [1]. Здатність ПлФ зв'язуватися з фібриногеном, з одного боку, забезпечує прикріплення бактерій до поверхні клітин організму-хазяїна та ініціацію інфекції [2, 3], а з іншого (завдяки утворенню агрегатів бактерій) — захищає стафілококів від фагоцитів [4, 5]. Видоспецифічність, поверхнєве розташування та виражені антигенні властивості ПлФ визначають можливість використання цього антигену в імуноферментному аналізі (ІФА) для діагностики захворювань стафілококової етіології, оскільки ця проблема на сьогодні не вирішена. Серед лабораторних методів серодіагностики основними залишаються ті, що направлені на визначення антитіл до таких антигенів стафілокока, як  $\alpha$ -токсин, ліпаза, пептидоглікан, тейхоєві кислоти [6, 7]. Проте жоден з перелічених антигенів не дозволяє точно та своєчасно діагностувати захворювання і обрати найбільш ефективний метод його лікування. Дослідження нових видоспецифічних антигенів *S. aureus* (у тому числі й ПлФ) може допомогти вирішити цю проблему.

Мета даної роботи — вивчення вмісту антитіл класу G до ПлФ у сироватці крові здорових і хворих на стафілококову інфекцію дітей та оцінка діагностичної цінності цього показника.

Дослідження проводили на сироватках крові дітей із стафілококовою інфекцією (26 зразків), отриманих з дитячої клінічної лікарні № 1 м. Києва. У всіх 26 хворих був встановлений діагноз гострого гаймориту. Контрольну групу склали 32 клінічно здорові дитини, що проходили обстеження в плановому порядку, та 74 здорових донори віком від 20 до 50 років (сироватки отримані зі станції переливання крові). Кров для ІФА брали в перші дні перебування хворих у стаціонарі (2–3-й дні хвороби). Стафілококова етіологія захворювання встановлювалась на основі клінічних спостережень, даних анамнезу і підтверджувалась виділенням золотистого стафілокока з урахуванням його патогенних властивостей — плазмокоагулюючої, лецитиназної, гемолітичної активності.

Як антиген у дослідженні використаний рекомбінантний ПлФ (ПлФ41) з молекулярною масою 42 кДа, який синтезувався *E. coli* XLI-Blue рCF41 (штам-продуцент люб'язно наданий нам проф. Т. Фостером (Дублін, Ірландія)). Білковий антиген очищений на колонці з IDA-сефарозою-6В, зарядженій  $Ni^{2+}$ . Чистоту отриманих білків контролювали методом електрофорезу [8], специфічність визначали методом імуноблотингу [9].

Титри антитіл класу G до ПлФ у сироватці крові визначали за допомогою твердофазного ІФА. Аналіз проводили на полістиролових планшетах MaxiSorp («Nunc», Данія), які сенсibiliзували ПлФ41 в концентрації 2 мкг/мл (у 0,05 М карбонат-бікарбонатному буфері протягом 16–18 год при 4 °С). Після кожного етапу лунки промивали 4–5 разів натрій-фосфатним буфером (рН 7,5) з додаванням 0,05% Твіну-20 («Merck», Німеччина). В лунки вносили по 100 мкл досліджуваної сироватки у відповідних розведеннях (сироватки титрували двократно, починаючи з розведення 1/25) та інкубували 60 хв при 37 °С. Антитіла виявляли з допомогою кон'югату білка А *S. aureus* з пероксидазою хрому («Sigma», США) протягом 30 хв при 37 °С. Ставили два контролі: контроль сироватки (лунки не сенсibiliзували антигеном), контроль кон'югату (не вносили сироватку). Після промивання вносили розчин хромогену — о-фенілендіамін у концентрації 0,9 мг/мл на 0,02 М цитратно-фосфатному буфері (рН 5,2) з додаванням 0,006% пероксиду водню. Реакцію зупиняли через 30 хв внесенням у лунки 2,5 М розчину сірчаної кислоти. Значення оптичної густини вимірювали на спектрофотометрі «Multiscan MS» («Labsystems», Фінляндія) при основній довжині хвилі 492 нм. Облік реакції здійснювали за титром антитіл, за який приймали розведення сироватки, при якому оптична густина перевищувала суму значень двох контролів.

Статистичну обробку результатів проводили згідно з рекомендаціями Т. Сайдулдіна [4] з використанням критерію Стьюдента.

Проведене дослідження показало, що антитіла класу G до ПлФ *S. aureus* виявляються в 100% випадків у сироватці хворих та здорових дітей. При цьому їх рівні в обох групах варіюють в широких межах: максимальний та мінімальний титри в групі хворих дітей складають 1 : 200 і 1 : 1600, у групі здорових — 1 : 50 і 1 : 800 (табл. 1). У сироватках 12,5% здорових дітей анти-ПлФ-антитіла містяться у низьких титрах (1 : 50), нехарактерних для групи хворих. Підвищені рівні антитіл до ПлФ (титри, вищі за 1 : 400) зустрічаються в сироватках 12,5% здорових та 27% хворих дітей. Високий титр (1 : 1600) характерний лише для хворих на стафілококову інфекцію та виявляється у 15% дітей цієї групи. Незважаючи на значні коливання показника в межах кожної з груп, середнє значення титру (1 : 400) вірогідно вище ( $p < 0,01$ ) у хворих на гнійну інфекцію, ніж у здорових дітей (1 : 245) (табл. 1), що свідчить про підвищення рівня антитіл до ПлФ під час стафілококової інфекції.

Нами досліджено рівні сироваткових анти-ПлФ-антитіл у здорових людей різних вікових категорій. Залежно від віку здорові донори були умовно розділені на дві групи: I — 74 чоловіки у віці 20–50 років; II — 32 дитини віком 8–16 років. Залежності зміни досліджуваного показника від віку не зафіксовано (табл. 1). Різниця між виділеними категоріями людей за частотою виявлення антитіл у сироватці крові майже немає. Встановлено лише, що в групі здорових дітей анти-ПлФ-антитіла в титрі 1 : 400 зустрічаються частіше (у 40,6%), ніж у групі дорослих (14,9%). У той же час антитіла в титрі 1 : 200 виявлено у 43% дорослих здорових осіб і лише у 19% дітей (рис. 1).

Наявність антитіл до поверхневого антигену золотистого стафілокока в сироватках здорових донорів не є несподіваною. Сенсibilізація організму до ПлФ може бути наслідком здорового носійства стафілококів або результатом перенесеної інфекції. Подібні результати одержані і для інших поверхневих антигенів стафілококів, наприклад для пептидоглікану [6], тейхоевих кислот [10].

Підвищені титри анти-ПлФ-антитіл у частини здорових дітей можуть свідчити про нещодавно перенесену інфекцію, оскільки встановлено [11], що рівень цих антитіл у ході інфекції постійно збільшується, і у пацієнтів, що видужують, він вищий, ніж у пацієнтів під час гострої фази. У той же час низький титр антитіл у дітей, хворих на гайморит, може свідчити про початкові стадії інфекції. Продукція антитіл у відповідь на бактеріаль-

Таблиця 1. Титри анти-ПлФ-антитіл класу G у сироватці крові здорових та хворих на стафілококову інфекцію

Група обстежених, діагноз (кількість сироваток)	Частота виявлення антитіл класу G (IgG) в титрі, %						Середній титр <sup>1</sup>
	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	
Гайморит (n = 26)	—	—	42,31	30,77	11,54	15,38	400* +11,0% -10,0%
Здорові діти (n = 32)	12,5	15,62	18,75	40,63	12,5	—	245 +12,5% -11,1%
Здорові дорослі (n = 74)	8,11	24,32	43,24	14,87	9,46	—	1 : 188 +6,4% -6,0%

<sup>1</sup> Величини обчислені за Сайдулдіним. \* Різниця показника у порівнянні з контролем є достовірною ( $p < 0,01$ ).

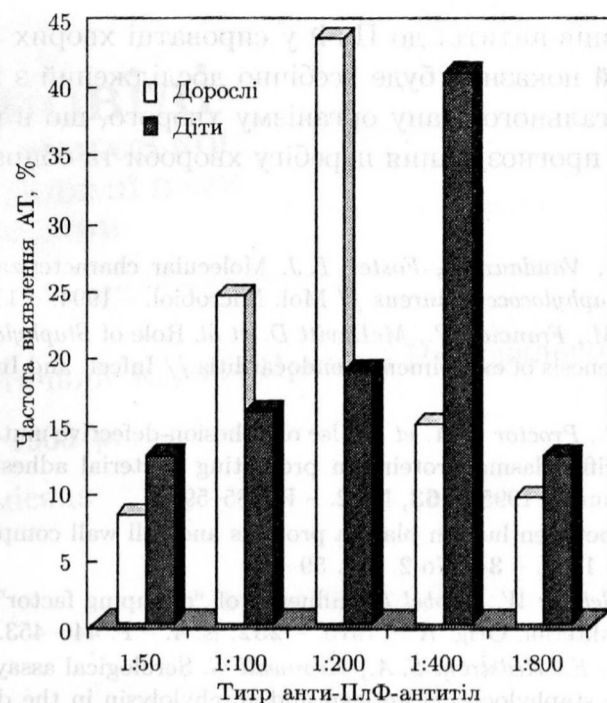


Рис. 1. Вміст анти-ПлФ-антитіл у сироватці крові здорових донорів різних вікових категорій

ну інфекцію залежить не тільки від інтенсивності запального процесу, але й від загальної реактивності організму. Тому низький рівень антитіл у хворих на стафілококову інфекцію дітей може бути пов'язаний з нездатністю даного організму виробляти анти-ПлФ-антитіла у значних кількостях внаслідок індивідуальних його особливостей, при цьому низька продукція анти-ПлФ-антитіл у таких індивідуумів може бути причиною більш важкого та тривалого перебігу хвороби.

Видоспецифічний антиген *S. aureus* — пластівцевоютворюючий фактор — є перспективним діагностичним антигеном [11], поверхнєве розташування та виражені антигенні властивості ПлФ також свідчать на користь цього припущення. Проте, як відомо, діагностична значущість антигену визначається не тільки його специфічністю для певного захворювання, але й можливістю відрізнити за допомогою специфічних до нього антитіл, по-перше, поточну інфекцію від перенесеної раніше, по-друге, перебіг інфекційного процесу від здорового носійства збудника.

Одержані нами результати свідчать про існування різниці за титрами анти-ПлФ-антитіл між здоровими та хворими дітьми, що, на нашу думку, вказує на можливість використання ПлФ для серодіагностики захворювань стафілококової етіології. У результаті дослідження в ІФА сироваток здорових донорів встановлено, що титри анти-ПлФ-антитіл, вищі за 1 : 800, характерні тільки для хворих на стафілококову інфекцію, а отже, можуть бути діагностичним критерієм при підтвердженні даної етіології захворювань. З огляду на наявність антитіл у сироватці здорових донорів, дослідження з виявлення антитіл до ПлФ може бути застосоване лише в межах комплексного лабораторного обстеження.

На наш погляд, одержані дані можуть бути корисними при створенні нових підходів для діагностики стафілококової інфекції. Подальші дослідження повинні бути спрямовані на більш глибоке вивчення рівнів антитіл, специфічних до ПлФ, встановлення можливого снування зв'язку між рівнем їх продукції та локалізацією інфекції, як це показано для антитіл до тейхоевих кислот при інфекційному ендокардиті [7, 10]. Існує можливість, що

значущість визначення рівнів антитіл до ПЛФ у сироватці хворих на стафілококові інфекції збільшиться, якщо цей показник буде всебічно досліджений з позицій залежності від стадії захворювання та загального стану організму хворого, що в подальшому дозволить розробити нові підходи до прогнозування перебігу хвороби та обирати правильну тактику лікування.

1. McDevitt D., Francois P., Vaudaux P., Foster T. J. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus* // Mol. Microbiol. – 1994. – **11**, No 2. – P. 237–248.
2. Moreillon P., Entenza J. M., Francioli P., McDevitt D. et al. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis // Infect. and Immun. – 1995. – **63**, No 12. – P. 4738–4743.
3. Vaudaux P. E., Francois P., Proctor R. A. et al. 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. and Immun. – 1995. – **63**, No 2. – P. 585–590.
4. Espersen F. Interactions between human plasma proteins and cell wall components of *Staphylococcus aureus* // Dan. Med. Bull. – 1987. – **34**, No 2. – P. 59–69.
5. Hasche K., Bruckler J., Schaeg W., Blobel H. Influence of “clumping factor” from *Staphylococcus aureus* on phagocytosis // Zbl Bakteriolog. Orig. A. – 1975. – **232**, is. 4. – P. 446–453.
6. 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. Infect. Diseases. – 1985. – **17**, is. 1. – P. 47–53.
7. 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. Intern. Med. – 1975. – **82**, No 1. – P. 13–17.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**, No 259. – P. 680–685.
9. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – **76**, No 9. – P. 4350–4354.
10. Granstrom M., Julander I., Mollby R. Serological diagnosis of deep *Staphylococcus aureus* infections by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for staphylococcal hemolysins and teichoic acid // Scand. J. Infect. Diseases. Suppl. – 1983. – **41**. – P. 132–139.
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 Diagnostic Lab. Immun. – 2000. – **7**, No 1. – P. 14–20.

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

АТЗТ НВК «ДіаПроф Мед», Київ

Київська академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика

Надійшло до редакції 24.04.2002