

**Vilniaus Universitetas,
Gamtos mokslų fakultetas
Botanikos ir Genetikos Katedra,
Magistratūros studijos, II kursas**

Magistrinis darbas
**Infekuotų *Streptococcus pneumoniae* vaikų serologinių
ir imunologinių parametrų tyrimai**

Vilnius, 2009

**Darbo vadovė: dr. Raimonda Kvietkauskaitė
Darbą atliko Daiva Levinaitė-Zaher**

Turinys

Sutrumpinimai	4 pls.
Santrauka	6 pls.
Summary	7 pls.
Įvadas	8pls.
Literatūros apžvalga	10 pls.
1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10 pls.
2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> genetinė charakteristika	13 pls.
3. Pneumokokai viršutiniuose kvėpavimo takuose	17 pls.
3.1. Pneumokokinių ligų patogenezė	17 pls.
3.2. Mukozinis kelias	18 pls.
3.3. Ūmus vidurinės ausies uždegimas	18 pls.
4. Šeimininko gynyba per pneumokokinę infekciją	19 pls.
4.1. Gleivinės	19 pls.
4.2. Sisteminės vietos	22 pls.
5. Antikūnų formuojamas imunitetas, nukreiptas prieš polisacharidinę kapsulę	22 pls.
5.1. Polisacharidai- kaip antigenai	22 pls.
5.2. Sisteminiai antikūnai prieš polisacharidinius antigenus	25 pls.
5.3. Gleivinėje besiformuojantys antikūnai prieš polisacharidų antigenus	25 pls.
5.4. Antikūnus sekretuojančios ląstelės	26 pls.
6. Imunoglobulinai, jų funkcijos	27 pls.
6.1. Imunoglobulinų funkcijos	32 pls.
6.2. Atskirų imunoglobulinų klasių funkcijos	33 pls.
6.3. Patologijos susijusios su imunoglobulinų kiekio pakitimus	35 pls.
7. Imunodeficitai	37 pls.
7.1. B ląstelių nepakankamumas	38 pls.
7.1.1. IgA ir IgG nepakankamumai	38 pls.
7.1.2. Imunodeficitas su padidintu IgM kiekiu	38 pls.
7.1.3. Kintanti imunodeficito būklė	39 pls.
7.1.4. Pavėluota IgG produkcija kūdikių praeinančios hypogamaglobulinemijos atvejais	40 pls.
7.2. T ląstelių nepakankamumai	40 pls.

7.2.1. Limfocitų nepakankamumas ir skydliaukės neišsivystymas SCID atveju	40 pls.
7.2.2. T pagalbinių ląstelių nepakankamumas	41 pls.
7.2.3. Kintanti imunodeficito būklė	42 pls.
7.2.4. X chromosomos proliferuojantis sindromas	42 pls.
7.2.5. Chromosominiai trūkiai TCR ir imunoglobulino AT gene	43 pls.
7.2.6. T ląstelių defektai Wiskott-Aldrich sindromo atveju	43 pls.
7.3. Komplemento baltymų genetiniai nepakankamumai	43 pls.
7.3.1. HAE yra sukeliama C1 inhibitoriaus nepakankamumo	44 pls.
Metodai, medžiagos	45 pls.
8. Medžiagos ir tyrimo metodai	46 pls.
8.1. Pacientai	46 pls.
8.2. Mikrobiologinių kultūrų auginimas	46 pls.
8.3. Medžiagos, buferiniai tirpalai, terpės	47 pls.
8.4. Imunofermentinis metodas—ELISA	47 pls.
8.4.1. Pagrindiniai ELISA metodo vykdymo etapai ir sąlygos	48 pls.
8.5. Statistinis rezultatų apdorojimas	49 pls.
Rezultatai ir jų aptarimas	50 pls.
9.1. Serologiniai tyrimai	52 pls.
9.2. Imunologiniai tyrimai	52 pls.
9.2.1. Monokloninių antikūnų savybės	52 pls.
9.2.2. Monokloninių antikūnų parinkimas žmogaus atskirų klasių ir specifinių antikūnų nustatymui	52 pls.
9.2.3. Bendro IgM, IgA, sIgA ir IgG klasių kiekio nustatymas seilėse	53 pls.
9.2.4. Specifinių <i>Streptococcus pneumoniae</i> antikūnų IgA, sIgA, IgM, IgG tyrimai	60 pls.
9.2.5. Specifinių <i>Streptococcus pneumoniae</i> ląstelės sienelės polisacharidui (CWPS) antikūnų IgA, S-IgA, IgM, IgG tyrimai	63 pls.
Išvados	64 pls.
Padėka	65 pls.
Literatūros sąrašas	66 pls.

Sutrumpinimai:

ACsS-antikūnus sekretuojanti ląstelė
ADA-adenino deaminazė
AOM-ūmus vidurinės ausies uždegimas
APC-antigeną sekretuojanti ląstelė
AT- ataxia telangiectasia
BALT-bronchų limfinis audinys
CbpAcholiną surišantis baltymas A
CPS-kapsulės polisacharidas
CR-2-kolmplemento receptorius-2
CVID-bendra kintanti imunodeficito būklė
EBV-Epstein Barr virusas
GT-glikoziltransferazė
HAE-paveldimas angioneurinė edema
Hib-*Haemophilus influenzae* tipas b
HIgM-padidėjęs IgM kiekis
HG-homologinė grupė
Hyl-hialurono rūgštis
Ig-imunoglobulinas
ISC-imunoglobulinas-sekretuojanti ląstelė
IT-pradinė transferazė
NanA-neurominidazė A
NanB-neurominidazė B
MAk-monokloniniai antikūnai
MALT-su gleivine susijęs audinys
MEF-vidurinės ausies skystis
LPS-lipopolisacharidas
Lyt A-autolizinas
Pnc-*Streptococcus pneumoniae*, pneumococcus
PNP-purino nukleozido fosforilazė
Ply-pneumolizinas

PsaA-pneumokokinis paviršiaus adhezinai
PspA-pneumokokinis paviršiaus baltymas A
PS-polisacharidas
Rml-ramnozės biosintezės transferazė
RPS-receptorinio polisacharido sintezė
RSV-kvėpavimo gleivinės virusas
SC-sekrecinis komponentas
SCIDSunkus sudėtinis imunodeficitas
S-IgA-sekrecinis imunoglobulinas A
SK-sekrecinis kompleksas
SPA-*Staphylococcus aureus* baltymas
TD-nuo antrūčio liaukos priklausomas
TI-nuo antrūčio liaukos nepriklausomas
TCR-T ląstelių receptorių vietos
Th- T pagalbinės ląstelės
XLP-nuo X chromosomos priklausantis proliferuojantis sindromas
WAS-Wiskott-Aldrich sindromas
WZY-blokuojantčio tipo sintazės kelias

Reikšminiai žodžiai- *Streptococcus pneumoniae*, serotipas, imunoglobulinas, imunodeficitas, ELISA, antikūnai, antigenai, vidurinės ausies uždegimas.

Infekuotų *Streptococcus pneumoniae* vaikų serologinių ir imunologinių parametru tyrimai

SANTRAUKA

Streptococcus pneumoniae-viršutiniuose kvėpavimo takuose sutinkamos gram-teigiamos bakterijos, galinčios sukelti pneumoniją, meningitą, vidurinės ausies uždegimą, sinusitus ir kitus susirgimus. Neatspariausi šiems susirgimams yra vaikai. Vienas šio darbo tikslų buvo ištirti streptokokų paplitimą ikimokyklinio amžiaus grupės sveikų vaikų populiacijoje. Buvo ištirtas 601 nosiaryklės tepinėlis, paimtas iš 2-7 metų amžiaus vaikų, lankančių ikimokyklinės ugdymo įstaigas Vilniaus mieste. *Streptococcus pneumoniae* išaugo 280 vaikų tepinėlių pasėliuose (47 proc.). Viso rasti 22 skirtingi serotipai; nustatyti dažniausiai šioje populiacijoje sutinkami serotipai-19F,23F, 6B, 6A, 3, 18C.

Labai dažnai pneumokokai susitelkia nosiaryklės gleivinės epitelyje nesukeldami jokių ligos simptomų. Šiuo atveju ypatingą reikšmę įgauna žmogaus imuninė sistema, todėl buvo tiriamas atskirų klasių imunoglobulinų (IgG, IgA, IgM) kiekis infekuotų vaikų seilių pavyzdžiuose. Šiems tyrimams buvo panaudoti monokloniniai antikūnai, gauti hibridominės technologijos pagalba. Imunofermentiniu metodu seilių mėginiuose buvo nustatytas IgA, sIgA, IgG, IgM klasių antikūnų kiekis, o taip pat specifinių *S. pneumoniae* antikūnų kiekis; nustatyta, kad koreliacija tarp duomenų grupių (bendras konkrečios klasės imunoglobulinų skaičius, specifinių antikūnų skaičius) yra vidutinė arba silpna. Tačiau gleivinių imuniteto vertinimas imunofermentiniu metodu yra pakankamai informatyvus ir perspektyvus, ypač dėl tos priežasties, kad padeda išvengti kraujo ėmimo iš venos, kas ypač aktualu gydant vaikus.

Analysis of serological and immunological parameters in *Streptococcus pneumoniae* infected children

SUMMARY

Streptococcus pneumoniae is a gram-positive bacterial organism that colonizes the upper respiratory tract and causes diseases such as pneumonia, meningitis, otitis media, sinusitis and others. Disease rates are particularly high in young children. One of the aims of this study was to assess the prevalence rates of streptococcal infection among the population of healthy children of preschool age. 601 nasopharyngeal samples were tested from 2-7 years age kindergardeners in Vilnius. *Streptococcus pneumoniae* were grown from 280 samples (47 % of collected samples). 22 different serotypes were identified; the most frequent serotypes were determined-19F, 23F, 6B, 6A, 3, and 18C.

Frequently *S.pneumoniae* colonizes mucosal epithelium at nasopharynx without causing any symptoms. In that case the immunity of an organism is of great significance. The second aim of this study is to evaluate the immune response to pneumococcal infection. The amount of separate immunoglobuline classes (IgG, IgA, and IgM) were assessed in saliva samples of infected children. Monoclonal antibodies developed by hybridoma technology were applied. The amounts of classes IgA, sIgA, IgG, IgM antibodies were determined parallel to amount of specific antibodies to *S.pneumoniae*. Correlation between data groups (total amount of actual immunoglobulin class, concentration of specific antibodies) was weak or moderate. Generally, evaluation of mucosal immunity by enzyme immunoassay is informative and perspective especially by the possibility to avoid venepuncture of children.

Ivadas

Mus supantys mikrobai, pastoviai atakuoja mūsų kūną. Su patogenais organizmas kovoja pasitelkdamas nespecifinius ir specifinius apsauginius imuninės sistemos mechanizmus. Specifinė imuninė sistema turi unikalią savybę atpažinti specifinį patogeną, nukreipti į jį apsauginę sistemą ir atpažinti tą patį patogeną net gi po daugybės metų.

Kiekvienas patogenas turi savo strategiją prasiskverbti į žmogaus kūną, taipogi imuninė sistema pasižymi specifinėmis taktikomis kovoti su patogenu. Todėl yra svarbu, tirti ligos patogenezę ir žmogaus apsaugos prieš patogeną mechanizmus tam, kad sukurti prevencinius ir terapinius būdus, -vakcinas prieš ligą.

Streptococcus pneumoniae yra viena plačiausiai paplitusių ligas sukeliančių bakterijų, kurios kolonizuojasi viršutiniuose kvėpavimo takuose ir sukelia nuo nesunkių negalavimų iki gyvybei pavojingų ligų tokių, kaip vidurinės ausies uždegimas, sinusitas, pneumonija, bakteriemija (bakterijos kraujyje), meningitas (Mufson, 1990). Besimptomė streptokokų kolonizacija nosiaryklėje yra pagrindinis infekcijos šaltinis. Šiomis ligomis dažniausiai serga maži vaikai, vyresnio amžiaus žmonės ir pacientai su blužnies disfunkcija, chroniškais medicininėmis būklėmis ar imunosupresinėmis ligomis, ypač AIDS (Jonhson, 1991).

Kiekvienais metais 5 mln. pasaulio vaikų jaunesnių nei 5 metai, miršta nuo plaučių uždegimo, sukulto *S. pneumoniae*. Tik JAV per metus yra užregistruojama daugiau nei pusė milijono pneumokokinio plaučių uždegimo atvejų, iš kurių 5-7 proc. yra mirtini (Jernigan ir kt, 1996), ir maždaug apie 7 mln. vidurinės ausies uždegimų atvejų. Literatūros duomenimis, 30-60 proc. vaikų iki 1 metų amžiaus gali pasireikšti vienas ūminio vidurinės ausies uždegimo epizodas ir net 10-20 proc. vaikų pirmaisiais gyvenimo metais ūminiu vidurinės ausies uždegimu gali sirgti iki 3 kartų (National center of health statistics 1975-1990). JAV per metus buvo užregistruota 3000 meningito atvejų ir 50000 bakteriemijos atvejų (Stool, Field, 1989). Pneumokokinė bakteriemija 60-87 proc. suaugusiųjų pacientų sukelia pneumoniją (Alexander ir kt, 1994). Šio patogeno sukeltas mirtingumo dažnis 40000 atvejų per metus yra didesnis negu mirtingumo dažnis, sukeltas, kurio nors kito bakterinio patogeno (Baker, Edwards, 1995).

Darbo tikslas-Įvertinti *Streptococcus pneumoniae* paplitimą Lietuvos ikimokyklinėse įstaigose, ištirti bendrą vaikų humoralinio imuniteto lygį pagal pagrindinių imunoglobulinų (IgM, IgG, IgA) produkciją bei specifinį imuninį atsaką į pneumokokinę infekciją. Šio darbo etapai:

- ištirti *Streptococcus pneumonine* infekcijos paplitimą Lietuvos ikimokyklinėse įstaigose;
- nustatyti dažniausiai sutinkamus *Streptococcus pneumoniae* serotipus;
- imunofermentiniu ELISA metodu įvertinti bendrą *Streptococcus pneumoniae* infekuotų vaikų imuninės sistemos būklę pagal produkuojamų imunoglobulinų IgM, IgG, IgA lygį;
- netiesioginės ELISA metodu nustatyti specifinių pneumokokams antikūnų lygį pagal atskiras imunoglobulinų klases;
- įvertinti koreliaciją tarp bendro imunoglobulino lygio ir specifinių antikūnų lygio pagal atskiras imunoglobulinų klases.

Literatūros apžvalga

1. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus, Pnc), yra gram-teigiamas, inkapsuluotas, fakultatyvinis anaerobinis kokas, smailios arkos formos (lanceto). *S. pneumoniae* pirmiausia yra žinomas kaip diplokokas, nes jis randamas porose, todėl buvo manoma, kad jis priklauso genčiai atsiskyrusiai nuo *Streptococcus*. Šios morfologinės savybės padeda identifikuoti bakteriją. Pnc (*pneumococcus*) paviršiuje gali būti išskiriami trys morfologiniai sluoksniai: plazminė membrana, ląstelės sienelė ir kapsulė (1 pav.).

S. pneumoniae bakterija turi tankią polisacharidinę kapsulę, kuri dengia vidines bakterijos struktūras (Sorensen ir kt, 1988). Tam tikri baltymai ir fermentai, esantys gram-teigiamų organizmų paviršiuje, labai padidina patogeniškumą. Dažnai šie baltymai tiesiogiai sąveikauja su šeimininko audinių ląstelėmis ar maskuoja bakterinį paviršių nuo šeimininko apsauginių mechanizmų. *S. pneumoniae* yra ne išimtis šiuo požiūriu. Praeityje buvo manoma, kad polisacharido kapsulė yra pirmas *S. pneumoniae* virulentiškumo faktorius, kadangi be apvalkalo bakterija yra beveik nežalinga, lyginant su tokia pačia inkapsuluota atmaina. Mikroorganizmo gebėjimas išvengti fagocitozės (Wood ir Smith, 1949), bei pagrindinis pneumokokų virulentiškumo faktorius-kapsulė (Lee ir kt, 1991), įgalina pneumokoką gyventi ir daugintis šeimininke.

Pneumokokai, pagal kapsulės antigeniškumo variabilumą, yra klasifikuojami į 90 serotipų (Henrichsen, 1995). Į 21 serogrupių sudėtį įeina 65 serotipai, likę yra numeruojami individualiai. Klasifikuojama, remiantis dvejomis nomenklatūromis-Amerikos ir Danų (Kauffman ir kt, 1960), pastaroji Danų nomenklatūra plačiai taikoma nuo 1980 m..

S. pneumoniae ląstelės sienelė yra atsakinga už uždegiminės reakcijos intensyvumą (Carlsen ir kt, 1992). Paskutiniai tyrimai vis dėlto rodo, kad tam tikri pneumokokų baltymai, tokie kaip hialuronato liažė (Hyl) (Lock, Paton, Hansman, 1988), pneumolizinas (Ply) (Feldman ir kt., 1992), dvi neurominidazės (NanA ir NanB), pagrindinis autolizinas (Lyt A), choliną surišantis baltymas A (CbpA) (Rosenow ir kt., 1997), pneumokokinis paviršiaus antigenas

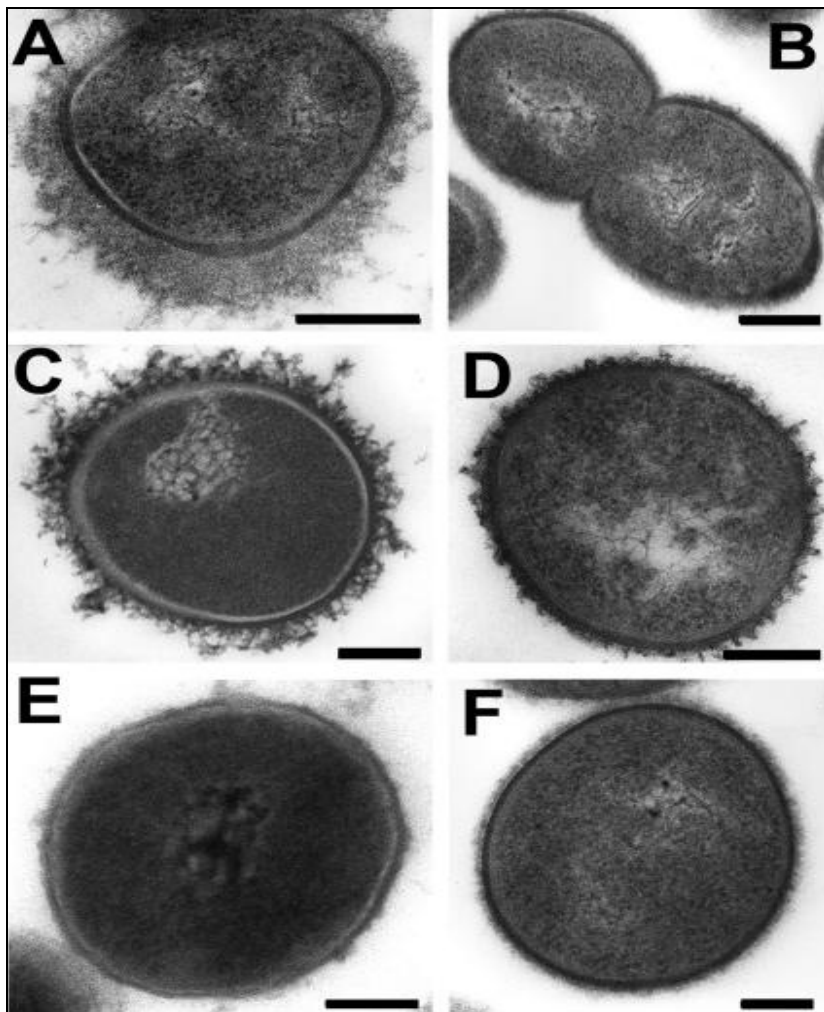
(PsaA) (Sampson ir kt., 1994) ir pneumokokinis paviršiaus baltymas A (PspA) (McDaniel ir kt., 1994), gali būti naudojami, kaip potencialūs vakcinų kandidatai.

Ląstelės sienelės komponentai peptidoglikanai ir teichoninė rūgštis yra uždegiminiai mediatoriai, pagal poveikį panašūs į kai kurių gram-neigiamų bakterijų lipopolisacharidus (LPS). Pneumokokinės ligos simptomų pasireiškimas ir didelis mirtingumas nuo šių infekcijų labai priklauso nuo gynybinių šeimininko organizmo reakcijų (Musher, 1992).

Pirmasis identifikuotas baltymas buvo ląstelės sienelės hidrolazė- autolizinas (LytA) (Garcia ir kt., 1986), skaldantis peptidoglikaną, tokiu būdu netiesiogiai įtakojantis uždegimą ir aktyvinantis kitus virulentiškumo faktorius, tokius kaip pneumolizinas. Antras identifikuotas baltymas-choliną surišantis pneumokokinis paviršinis baltymas A (PspA) (Mitchell ir kt., 1997), yra antigeniškai variabilus paviršinis baltymas (Crain ir kt., 1990). PsaA reikšmė dar nėra galutinai nustatyta, bet egzistuoja hipotezė, priskirianti jį permeazėms (Crook ir kt., 1998).

Antikūnų tyrimai parodė, kad PspA yra lokalizuotas pneumokoko ląstelės sienelėje ir yra randamas kiekvienoje *S. pneumoniae* atmainoje (Crain ir kt., 1990). PspA yra paviršinis baltymas, kurio molekulinė masė gali būti 67-99 kDa (Waltman ir kt., 1993). Sekos analizė parodė, kad baltymas turi 4 skirtingus domenus: N-galinį, turintį krūvį, α spiralės regioną (288 amino rūgštys Rx1 atmainoje), prolinu praturtintą domeną (83 amino rūgštys), fragmentą iš 10 labai konservatyvių 20 amino rūgščių pasikartojimų ir 17 silpnai hidrofobinių liekanų C gale. N-galas tęsiasi nuo ląstelės sienelės ir tikriausiai kyšo išsikišęs iš kapsulės. Tiriant antrinę struktūrą nustatyta, kad N galas yra susisukusios spiralės formos. PspA funkcija yra apsaugoti mikroorganizmą nuo šeimininko komplemento sistemos (Yother, Briles, 1992). Struktūriniai tyrimai parodė, kad PspA turi didelį poliarinį elektrostatinį krūvį, kuris stabilizuoja kapsulės krūvį per elektroteigiamus molekulės galus ir apsaugo nuo dominuojančios PspA elektroneigiamos dalies komplementarios aktyvacijos (Cundell ir kt., 1995). Biologiniai antikomplementarių PspA savybių tyrimai parodė, kad PspA didina *S. pneumoniae* atsparumą fagocitozei (Briles ir kt., 1997). Visi apsauginiai monokloniniai antikūnai, reaguojantys į PspA ant pneumokoko ląstelės paviršiaus, prisijungia prie N galo (McDaniel ir kt., 1994). Dėl mutacijų susikaupimo šis α spiralinis domenas taip pat pasižymi didesniu variabilumu.

Pneumolizinas yra viduląstelinis baltymas, atpalaiduojamas autolizės metu. Jis aktyvuoja klasikinį komplemento kelią, kai nėra susidariusių specifinių antikūnų (Paton ir kt., 1984). Pneumolizinas sumažina neutrofilų aktyvumą bei migraciją ir slopina limfocitų proliferaciją, bei antikūnų produkciją *in vitro* (Ferrante ir kt., 1984). Jis slopina žmogaus epitelinių ląstelių plaukelių (angl. cilia) veiklą ir ardo kvėpavimo kelių bei plaučių alveolių epitelines ląsteles (Rubins ir kt., 1993).



1 pav. *Streptococcus pneumoniae* apvalkalo nuotraukos: Skirtingų serotipų kapsulės struktūra: serotipas 1 (laukinio tipo atmaina P53) (A) ir serotipas 19F (laukinis tipas atmaina P91) (C), serotipo 1 kapsulė be įvairių komponentų (B), serotipo 19F kapsulė be įvairių komponentų (D), atmainos be apvalkalo R6x (E) ir R800 (F) (Infect Immun. 2005 August; 73(8): 4653–4667.doi: 10.1128/IAI.73.8.4653-4667.2005.)

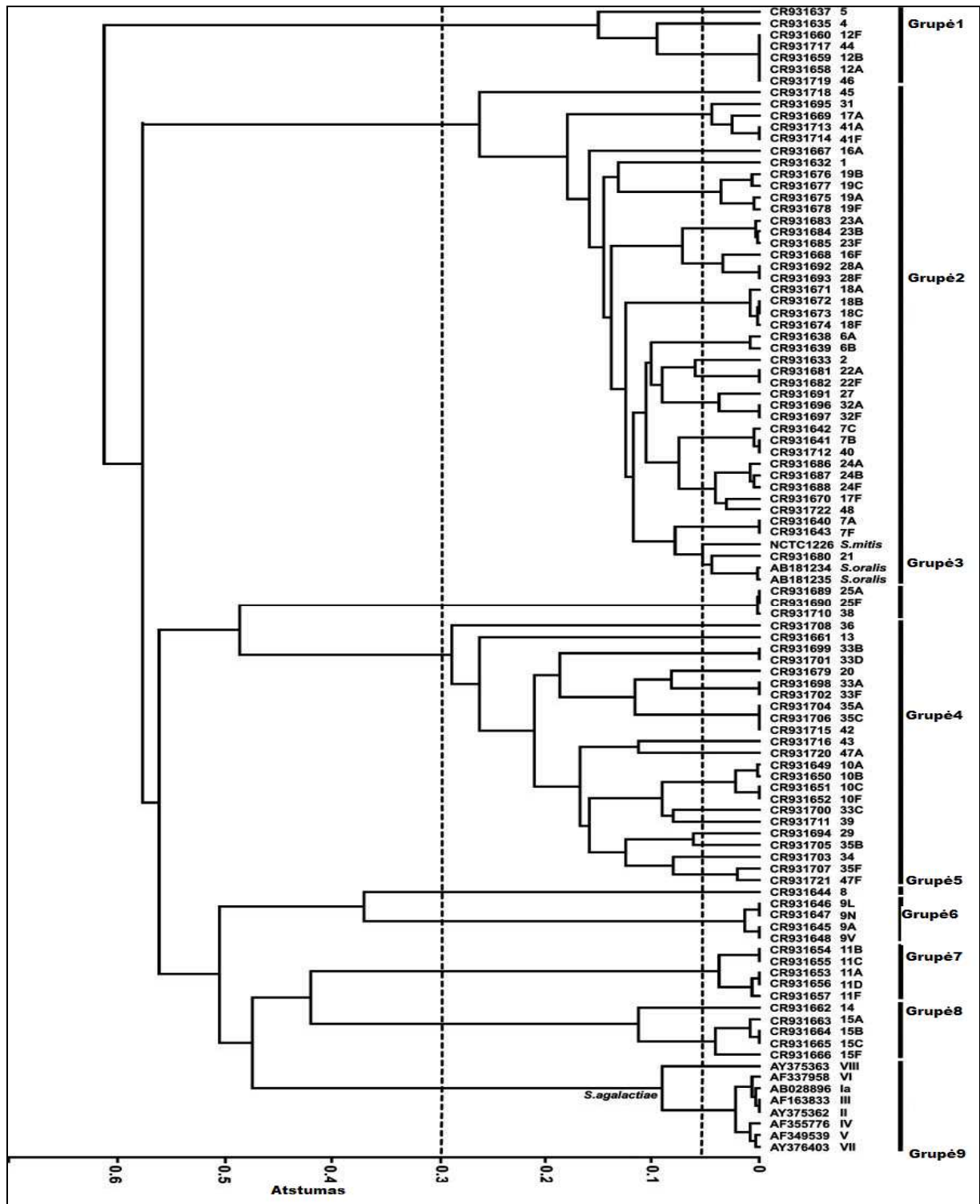
2. *Streptococcus pneumoniae* serotipų genetinė charakteristika:

Yra nustatytos 54 serotipų kapsulių biocheminės struktūros (Kamerling, 2000). 88 serotipų CPS yra sintetinės blokavimo tipo keliu (angl. block-type pathway=WZY-priklausomas kelias) ir visų šių serotipų *cps* lokusai, koduojantys šį kelią, yra randami toje pačioje chromosomos vietoje tarp *dexB* ir *aliA* genų (Bentley ir kt. 2006), kitų dviejų serotipų kapsulės yra sintetinės sintazės keliu (angl. synthase pathway). Wzy-priklausomas sintezės kelias yra ir kitose *Streptococcus* rūšyse (Yoshida ir kt., 2006) -*Streptococcus agalactiae* ir *Streptococcus suis* CPS biosintezėje, *Streptococcus viridans* grupėje: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* receptoriaus kapsulės polisacharido sintezėje (RPS) (Aanensen ir kt., 2007).

88 pneumokokų serotipų keturių *cps* genų produktų (*wzg*, *wzh*, *wzd* ir *wze*) sekos yra konservatyvios, tuo tarpu flipazių, polisacharidų polimerazių, pirminių transferazių (angl. initial transferase-ITs) ir kitų *cps* genų produktų grupės, įskaitant ir didelį skaičių skirtingų glikoziltransferazių (GTs) yra labai nehomologiškos.

Streptokokų 88 serotipai buvo sugrupuoti į 8 grupes, tarp kurių nustatytas kirpimo (angl. cutt of) atstumas 0,3 (2 pav.). Pneumokokų serotipų *cps* vietos toje pačioje serogrupėje yra nekintančios. Į 9 grupės sudėtį įėjo visos *S. agalactiae* *cps* vietos; *Streptococcus mitis* ir *Streptococcus oralis* receptoriaus polisacharido sintezės (RPS) vietos buvo rastos antroje pneumokokų grupėje. (2 pav.)

Pogrupiai buvo suskirstyti 0,05 atstumo kirpimo kriterijumi (2 pav.), nustatant labai arti esančias *cps* vietas. Visi tos pačios serogrupės pneumokokų serotipai įėjo į tą patį pogrupį, išskyrus 7, 16, 17, 33, 35, 47 serotipus, kurie skilo į du ar tris pogrupius, trimis atvejais *cps* vietos buvo sinteninės (angl. syntenic, sinteninės-tokie patys genai buvo rasti išsidėstę tokia pačia tvarka). Serotipų 44, 46 *cps* sinteninės vietos atitiko 12 serogrupės vietas. Septyniems iš devynių pogrupių, buvo rastas faktorius, kryžmiškai reaguojantis su skirtingais serotipais pogrupio viduje. Skirtingų serotipų panašumai tarp *cps* vietų yra kartais net didesni nei tarp serotipų toje pačioje serogrupėje. Pvz. :serotipo 40 *cps* vietos geno sekomis buvo panašesnės į 7B, nei 7B į 7C (panašumai 97,5% ir 90,3% atitinkamai).



2 pav. Kapsulės polisacharidų sintazės vietų grupių analizė. jb.asm.org by on May 28, 2008

Pirma grupė: Serogrupių 12, 44, 46 *cps* vietos sudaro šios grupės pogrupį ir yra sinteninės, todėl yra manoma, kad jos yra kilusios iš vieno *cps* vietos protėvio. 12F ir 12A serotipų struktūros yra žinomos ir skiriasi pirmuoju angliavandeniu ir šonine grandine, tokie skirtumai atsirado dėl amino rūgščių pokyčių IT WciI ir GT (WcxB) srityse (Aanensen. ir kt., 2007). 12B, 44 ir 46 serotipų struktūra yra nežinoma, bet sintenija ir imunologinės kryžminės reakcijos tarp serotipų šeimų pogrupyje rodo, kad yra struktūriniai panašumai su 12F ir 12A serotipų CPS.

Serotipų 4 ir 5 *cps* vietos priklauso 1-ai grupei, bet jie yra mažiau panašūs į kitus grupės narius. Palyginus serogrupės 12, 44 ir 46 *cps* vietas su 4 serotipo *cps* vietomis, pasirodė, kad jų genai wciI, wciJ, mnaA ir fnIA-C persidengia, taip pat ir 5 serotipo wciI, wciJ ir fnIA-C genai. Dėl šios priežasties minėti serotipai įeina į vieną grupę. 45 serotipo *cps* vietos irgi turi wciI, wciJ, wcxB ir fnIA-C genus, bet jų sekos yra mažiau panašios į 1 grupės sekas, todėl jie priklauso 2 grupei.

Antroji grupė. 40 pneumokokų serotipų *cps* vietos, taip pat *S. oralis* ir *S. mitis* polisacharido biosintezės vietos priklauso šiai didelei grupei, visos *cps* vietos turi ramnozės biosintezės genus (*rml*). Visos įmanomos šių serotipų CPS struktūros turi ramnozę (išskyrus 1 ir 24B tipus dėl *rmlC* ir *rmlD* genų rėmelio poslinkio mutacijos praradusios šį polisacharidą), pastebėta tobula koreliacija tarp pasikartojančiuose vienetuose L-Rhap-(β1-4)-β-D-Glcp esančios junties (Yoshida ir kt., 2005), kuriose yra spėjama ramnozitransferazės geno *wchF* lokalizacija. 1 serotipo pasikartojantis vienetas turi AAT-Galp-pneumokokų teichoinės rūgšties komponentą, randamą *Bacteroides fragilis* kapsulės polisacharido A, *Shigella sonnei* I antigeno ir *Plesiomonas shigelloides* serotipo O17 antigeno sudėtyse (Yoshida ir kt., 2005). Serotipai 6, 18, 19, 22, 23, 24, 28, 32, 41 sudaro tą patį pogrupį, kadangi yra kilę iš tos pačios pirminės *cps* vietos. Tuo tarpu 7, 16, 17 serogrupių *cps* vietos skyla į skirtingus pogrupius.

Serogrupių 6, 22, 28, 32, 41 *cps* vietos yra sinteninės ir skirtumai struktūroje turėtų būti dėl amino rūgščių pokyčių vienoje ar keliose *cps* genų produktų vietuose.

3 grupė. Serotipai 25A, 25F, 38 priklauso 3 grupei ir įeina į tą patį pogrupį. Jų *cps* vietos yra labai panašios sudėtimi, taip pat jų pirmi 4 *cps* reguliavimo genai yra perskirti transpozazės geno. 25A, 25F tipų *cps* lokusai yra sinteniniai.

4 grupė. Į šios grupės sudėtį įeina 23 pneumokokų serotipų *cps* vietos (2 pav.). GT genų (tokių kaip *wciB*, *wcrC*, *wciF*, *wcrD* ir *wcrE*) buvimas ir *cps* vietų 3' galo panašumai apvienija šią grupę. Kryžminės reakcijos atspindi tam tikrus struktūrinius panašumus. Serotipų 13 ir 36 *cps* vietos nėra labai panašios į kitas vietas šiame pogrupyje.

5 grupė Serotipas 8 yra vienintelis šios grupės narys. *WciS* yra α -1,4 galaktosyltransferazė, o *WciQ* ir *WciR* yra *Sphingomonas* glukuronozil β -1,4 transferazės *SpsK* (Mavroidi ir kt. 2007) atitinkamų C-galo ir N-galo homologai, kuri manoma katalizuoja D-GlcpA-(β 1-4)- β -D-Glcp jungimąsi, *WciT* skatina D-Glcp-(α 1-4)- α -D-Galp jungimąsi.

6 grupė. 4 serotipų *cps* vietos serogrupėje 9 suskyla į pogrupius ir formuoja 2 sintenines poras (9A-9V ir 9L-9N).

7 grupė. 11 serogrupėje rasti 5 serotipai, pasižymintys labai panašiomis *cps* vietų struktūromis ir sudarantys vieną pogrupį. Serogrupėje 11 yra 2 sinteninės *cps* vietų sankaupos 11F-11A-11D ir 11B-11C, kurios skiriasi tik acetiltransferazės genais, todėl manoma, kad jos kilo iš vieno bendro protėvio. Visi 5 serotipai turi acetiltransferazės geną *wcwT*: serotipai 11F, 11A ir 11D turi 2 papildomus acetiltransferazės genus (*wcjE* ir *wcwC*), tuo tarpu 11C ir 11B turi tik po vieną acetiltransferazės geną (*wcwR*). *WcwU* yra glicerolfosfattransferazė, 11A ir 11C serotipuose Gro-1P buvimas koreliuoja su sveiko *gct* geno buvimu, serotipuose 11F ir 11B *gct* yra rėmelio poslinkio pasėkmė ir Rib-ol yra randamas vietoj Gro CPS vietuose. Serogrupėje 11 *cps* vietuose nustatyti genai *wchJ* ir *wchK*, yra randami ir 14 serotipo *cps* vietuose, kuriose *WchK* yra β -1,4-galactoziltransferazė, katalizuojanti D-Galp-(β 1-4)- β -DGlcp, tuo tarpu *WchJ* manoma veikia, kaip *WchK* aktyvumo skatintojas (Mavroidi ir kt, 2007). Homologiški geno produktai serogrupėje 11 yra atsakingi už D-Galp-(β 1-4)- β -D-Glcp jungimąsi prie CPS. *WcrL* turi tą patį domeną Pfam (PF04488) kaip ir 8 serotipo *WciT*, kuris skatina D-Glcp-(β 1-4)- β -D-Galp jungimąsi. Serotipao 11A paskutinis angliavandenis pasikartojančiame vienete yra D-Glcp, o serotipuose 11B, 11C, ir 11F-D-GlcpNAc (serotipo 11D struktūra yra nežinoma) visais atvejais per α -1,4 jungtį sujungti prie α -D-Galp. Todėl yra manoma, kad šis 11 serogrupės angliavandenis pasikartojančiame vienete yra kilęs iš *WcrL* ir skiriasi amino rūgščių sudėtimi,

taip paveikdamas donoro angliavandens specifiškumą. WcyK šalinimo proceso būdu reguliuoja D-Galp-(α 1-3)- β -D-Galp serogrupės 11CPS jungimąsi.

Grupė 8. Į jos sudėtį įeina serogrupė 15 ir serotipas 14. CPS ir genų sekų skirtumai išskiria serotipą 14 ir serogrupę 15 į skirtingus pogrupius.

Grupė 9. Šioje grupėje yra 8 *cps* vietos iš *S.agalactiae* serotipų (2 pav.), kurios nėra panašios į pneumokokų *cps* vietas, bet kai kurie abiejų rūšių *cps* vietų genų produktai įeina į bendrą homologinės grupės sudėtį, įskaitant *wzg*, *wzh*, *wzd*, *wze*, IT geną *wchA*, ir GT geną *wchJ*. Dėl CPS struktūrų bendrumo ir sekų panašumo centriniame *cps* regione buvo manoma, kad *Streptococcus agalactiae* tipas VIII ir *S. pneumoniae* serotipas 23F galėjo apsikeisti DNR segmentais (Cieslewicz ir kt., 2005). Genų *wchF*, *wchV* ir *wzy-19* (HG168) produktai, randami 23F serotipo *cps* vietuose turi tas pačias homologines grupes (HG), kaip ir *Streptococcus agalactiae* VIII tipo geno produktai.

3. Pneumokokai viršutiniuose kvėpavimo takuose

3.1. Pneumokokinių ligų patogenezė

S. pneumoniae yra žmogaus patogenas, perduodamas kontakto būdu. Infekcija prasideda nuo bakterijos kolonizavimosi nosiaryklėje, iš kur ji gali patekti į plaučius ar eustachijaus vamzdžius. Jei bakterija patenka į eustachijaus vamzdžius ir pradeda augti ten, yra sukiamas uždegiminis atsakas, pasireiškiantis skausmu, karščiavimu ir galvos skausmu. Bakterija taip pat gali tiesiogiai patekti į kraujotaką, tačiau patekimo mechanizmai ir sąlygos, įgalinančios bakterijos translokaciją, yra nežinomos. Bakterijos išsiskiriami toksinai ir produktai (ląstelės sienelės komponentai, pneumolizinas) manoma, vaidina svarbų vaidmenį (Johnston, 1991). Tiesioginis epitelinių ląstelių pažeidimas vandenilio peroksidaze ir plaukelių suardymas pneumolizinu, taip pat palengvina pneumokoko patekimą į kraujotakos sistemą (Boulnois, 1992). Kai kurie tyrimai patvirtino, kad invazinės ligos pradžioje sužadinami lokalūs uždegiminiai faktoriai, kurie pakeičia receptorių, galinčių aktyvuoti žmogaus ląsteles, skaičių ir tipą (Tuomanen ir kt., 1997).

3. 2. Mukozinis kelias

Pneumokokų besimptominio tipo infekcija plačiai varijuoja amžiaus ir populiacijų grupėse. JAV, Virginijos valstijoje, nešiojimo dažnis 1970 m. buvo pas 38 proc. ikimokyklinio amžiaus vaikų, su amžiumi sumažėjo iki 19 proc. suaugusiųjų populiacijose (Hendley ir kt., 1975). Aukštesnis pneumokokų nešiotųjų dažnis yra užfiksuotas pas vaikus su AOM (ūmus vidurinės ausies uždegimas) ar kitomis kvėpavimo takų infekcijomis nei tokio pačio amžiaus sveikų vaikų grupėse. Pnc (*pneumococcus*) kaupimasis naujagimių nosiaryklėje labai priklauso nuo gyvenimo sąlygų. Dviejų metų amžiaus grupėje net 96 proc. vaikų buvo Pnc (*pneumococcus*) nešiotojai mažiausiai vieną kartą. Palyginimui, Švedijoje nešiotųjų dažnis yra 12 proc. 3 mėn amžiaus grupėje ir 67 proc. 18 mėnesių amžiaus grupėje (Aniansson, 1992).

3. 3. Ūmus vidurinės ausies uždegimas

Vidurinės ausies ertmė yra sausa ir neužkrėsta bakterijų, susisiekianti su nosiarykle, eustachijaus vamzdžiu, kuris sulygina oro spaudimą tarp vidurinės ausies ir nosiaryklės. Vis dėlto, jų funkcija yra silpnesnė vaikuose nei suaugusiuose (Bylander, Tjernstöm, 1983). Ūmaus vidurinės ausies uždegimo metu (AOM) bakterija patenka į vidurinę ausį per eustachijaus vamzdį. AOM patogenezė yra susijusi su blogesne vidurinės ausies ventiliacija, susidarancia dėl eustachijaus vamzdžio disfunkcijos, patogeninių bakterijų nosiaryklėje buvimu, biocheminiu ir imuniniu šeimininko atsaku (Hendersson, Giebink, 1986). Pacientų, sergančių ūmiu ausies uždegimu, vidurinėje ausyje buvo dažnai randami paragripo ir gripo virusai: 74 proc. vaikų su RSV (kvėpavimo gleivinės virusas) infekcija, 52 proc.- su paragripu ir 42 proc. - su gripu (Heikkinen ir kt., 1999).

Mėginiuose yra randami kiti virusai ir bakterijos: *Haemophilus influenzae* yra antras pagal paplitimą (10-20 proc.), *Branhamella catarrhalis*-trečias. *Streptococcus pyogenes* ir *Staphylococcus aureus* yra rečiau randami (Karma ir kt., 1987). Sujungus antigenų detekciją su vidurinės ausies uždegimo (AOM) diagnostikos metodais, Pnc (*pneumococcus*) yra randamas apie 60 proc. visų ūmaus vidurinės ausies uždegimo (AOM) atvejų (Luotonen ir kt., 1981).

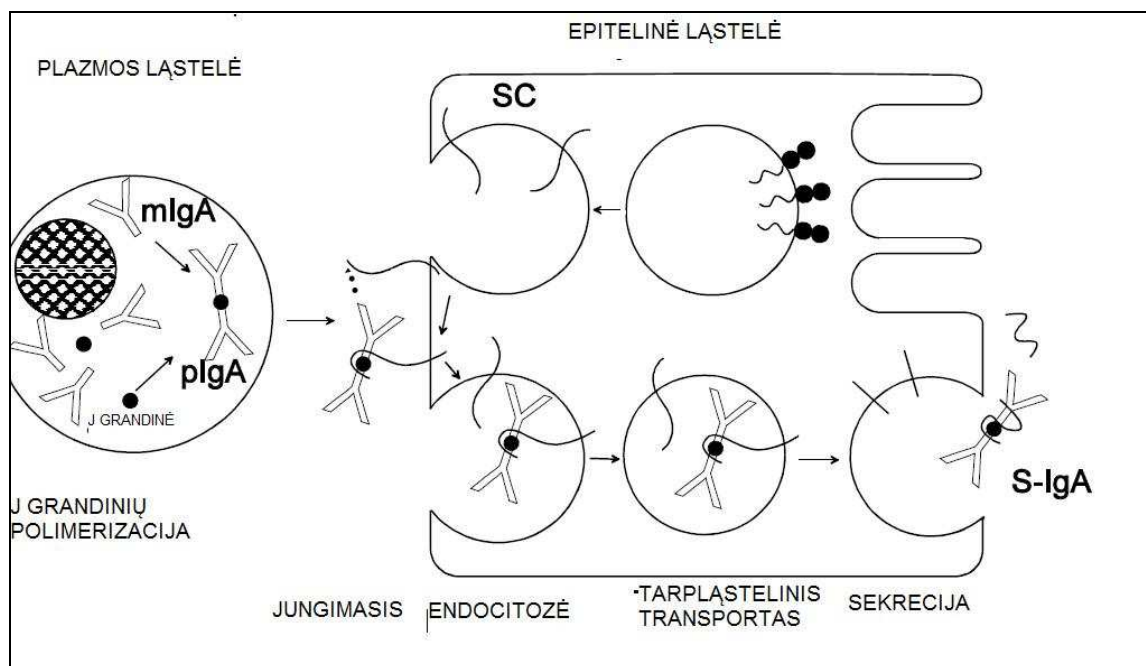
Serotipai, sukeliantys ūmų vidurinės ausies otitą (AOM), gali varijuoti priklausomai nuo invazinių ligų masto (Gray ir Dillon, 1986). Pnc (*pneumococcus*) serogrupės dažniausiai sukeliančios AOM yra 19, 23, 6, 14 (Kilpi ir kt., 1999). Serotipai gali skirtis ne tik atskirose pacientų grupėse, bet ir skirtingose šalyse. Pirmo epizodo dažnis 12 mėnesių amžiaus grupėje svyruoja nuo 28 proc. (Pukander ir kt., 1982) iki 45 proc. (Sipilä ir kt., 1987) Suomijos tyrimuose, bet pasiekia 62 proc. JAV tyrimuose (Teele ir kt., 1989). 24 mėnesių amžiaus grupėje dažnis buvo 71 proc. Suomijoje (Alho ir kt., 1990), 36 proc. Švedijoje (Lundgren ir Ingvarsson, 1983) ir 61 proc. USA (Howie ir kt., 1975). Remiantis šiais tyrimais, didžiausias infekcijų dažnis yra tarp vaikų nuo 6 iki 12 mėnesių. Kuo anksčiau vaikystėje prasideda ūmaus vidurinės ausies uždegimo (AOM) epizodai, tuo didesnė rizika pasikartoti šiems epizodams (Teele ir kt., 1989).

4. Šeimininko gynyba prieš pneumokokinę infekciją

4.1. Gleivinės

Kvėpavimo takų gleivinė yra pirmas apsauginis organizmo barjeras prieš patogenus, patenkančius į organizmą per kvėpavimo takus. Sveikas gleivinės epitelis bei kvėpavimo kelių virpamasis epitelis, kartu su antibakteriniais baltymais ir peptidais mukoziniuose paviršiuose apsaugo nuo infekcijos plitimo nosiarykle į supančius audinius ir plaučius. Įgimto imuniteto apsauga pradeda veikti gleivinių paviršiuje, kur IgA yra dominuojantis imunoglobulino izotipas. Sekretuose randamas polimerinės formos IgA; dimerinė forma yra dominuojanti. IgA monomerai tarpusavyje sujungti J grandinėmis. J grandinė sujungia polimerinį IgA kompleksą su sekretiniu komponentu (SC), ir tokiu būdu suformuojamas sekretinis IgA (S-IgA). Sekretinis komponentas SC, atliekantis poliimunoglobulino receptoriaus vaidmenį, yra epitelinių ląstelių bazolateralinėje pusėje. Jis funkcionuoja kaip specifinis receptorių polimerinei J grandinei. IgA jungtis su SC sukuria specifinį transportą į sekretijos vietą (3 pav.) stabilizuoja polimerinį imunoglobuliną ir apsaugo jį nuo proteolitinių fermentų (Russel ir kt., 1992).

Labai svarbi IgA funkcija-bakterijų ir virusų adhezijos prie epitelinių ląstelių trukdymas. Kartu su įgimtais apsauginiais faktoriais S-IgA slopina epitelinę kolonizaciją ir mažina antigenų skverbimąsi per gleivinės ląstelių membranas. S-IgA taip pat neutralizuoja virusus, bakterinius



3 pav. Polimerinio IgA, turinčio J grandines selektyvus transportas per epitelines ląsteles.

toksinus ir fermentus (1 lentelė). IgA turi 2 izotipus IgA1 ir IgA2, kurių paplitimas įvairaus tipo gleivinėse skirtingas (Delacroix ir kt., 1982). Viršutiniuose kvėpavimo takuose ir viršutiniame virškinamajame trakte IgA1 izotipas yra dominuojantis, IgA2 daugiausia apatinėje virškinamojo trakto dalyje (Kett ir kt., 1986).

B ląstelės, atsakingos už lokalią IgA polimero produkciją, yra kilusios iš limfinio su gleivinėmis susijusio audinio (MALT). MALT komponentai viršutiniuose kvėpavimo takuose formuoja struktūrą, pavadintą Waldeyer žiedu, į kurio sudėtį įeina gomurys ir ryklės tonzilės (adenoidai). Apatiniuose kvėpavimo takuose limfinis audinys yra priskiriamas bronchų limfiniam audiniui (BALT). Pirminės B ląstelės ir T ląstelės iš indukcinės limfoepitelinės struktūros MALT migruoja per periferinį kraują į audinius per visą organizmą (Gowans ir kt., 1964). Integruota gleivinių imuninė sistema tokiu būdu užtikrina, kad visos gleivinės ląstelių membranos būtų aprūpintos sekretiniais antikūnais (Brandtzaeg ir kt., 1999).

1 lentelė. Biologinės S-IgA funkcijos.

Biologinės S-IgA funkcijos	
Tiesioginės	Netiesioginės
Biologiškai aktyvių antigenų neutralizavimas (virusų, toksinų, fermentų).	Gleivinės makrofagų opsinizacija (fagocitozės skatinimas).
Trukdymas mikrobo prisitvirtinimui	Nuo antikūnų-priklausomų ląstelių citotoksiškumas.
Antigeno skverbimosi lėtinimas	Sekrecinių antibakterinių humoralinių faktorių skatinimas (laktoferinas ir peroksidazės sistema).
	Monocitų ir nuo limfocitų-priklausomų ląstelių baktericidinio aktyvumo skatinimas.

Limfocitai ir kitos imunokomponentinės ląstelės, antigenams specifinės IgA produkuojančios ląstelės gali būti aktyvinamos, esant vidurinės ausies uždegimui. IgA pirmதாகai kolonizavęsi vidurinėje ausyje gali skatinti IgA gamybą adenoiduose ir tonzilėse (Bernstein ir kt., 1988), GALT ir BALT tampa pirmtakų šaltiniu (Watanabe ir kt., 1988). Daugelyje egzokrininių skysčių išskyrose kartu su polimeriniu IgA yra gausiai randamas IgM pentameras, o IgG dažniausiai patenka į sekretus pasyviai, nors jis taip pat gali būti gaminamas lokaliai (Bouvet, Fischetti, 1999). IgG nutekėjimas į egzokrininius skysčius yra palengvinamas gleivinės sudirginimo. Nors IgG nėra sekrecinis imunoglobulinas, jis gali dalyvauti imuniniame atsake (Brandtzaeg ir kt., 1999) ir slopinti pneumokokų kolonizaciją gleivinėse (Kauppi ir kt., 1993). Tai galima pastebėti kvėpavimo takuose ir žarnyno trakte, kur IgG proteolitinė degradacija vyksta ne taip intensyviai. Kitą vertus, suaktyvintus komplementą, IgG pagreitina antigenų skverbimąsi į gleivines ir tokiu būdu skatinamas pastovių imunopatologinių procesų vystymąsis gleivinėse.

4. 2. Sisteminės vietos

Bakterijai prasiskverbus į gilesnius organus, koordinuotai pradeda veikti antikūnai, komplemento komponentai ir fagocitinės ląstelės (Watson ir kt., 1995). Kadangi polisacharidinė kapsulė gali trukdyti fagocitozei, apsaugodama pneumokokus nuo tiesioginio kontakto su fagocitais, ji yra svarbi fagocitozei (Johnston ir kt., 1991). Jei šiose funkcijose atsiranda sutrikimai, tokie kaip komplemento ar imunoglobulinų nepakankamumas, šeimininkas pasidaro imlus sunkioms pneumokokinėms infekcijoms. Blužnis vaidina svarbų vaidmenį, inicijuojant antikūnų prieš pneumokokus gamybą ir išvalant kraują nuo opsinizuotų bakterijų (Wara, 1981). Blužnies, kaip filtracijos organo funkcija, yra akivaizdi, stebint pacientus su pašalintomis blužnimis ar blužnies disfunkcija. Tokie pacientai yra ypatingai neatsparūs pneumokokinių ligų progresavimui, ypatingai septinei bakteriemijai, atsirandančiai po pneumonijos. Dėl klasikinio komplemento kelio aktyvinamo, esant anti-PS (anti-polisacharidas) antikūnams, pneumokokai yra efektyviai pašalinami iš kraujotakos kepenų ir blužnies pagalba (Holzer ir kt., 1984). Nepaisant to, ar yra sukeliama antikūno opsinizacija ar ne, nepažeista komplemento sistema yra svarbiausia bakterijos naikinime (Brown ir kt., 1983). Juo labiau, kad CPS (kapsulės-polisacharidas) ir kapsulinis pneumokoko PS (polisacharidas) gali aktyvinti alternatyvius komplemento kelius, sukeliančius opsonizuojančių komplemento komponentų gamybą.

5. Antikūnų formuojamas imunitetas, nukreiptas prieš polisacharidų antigenus

5. 1. Polisacharidai kaip antigenai

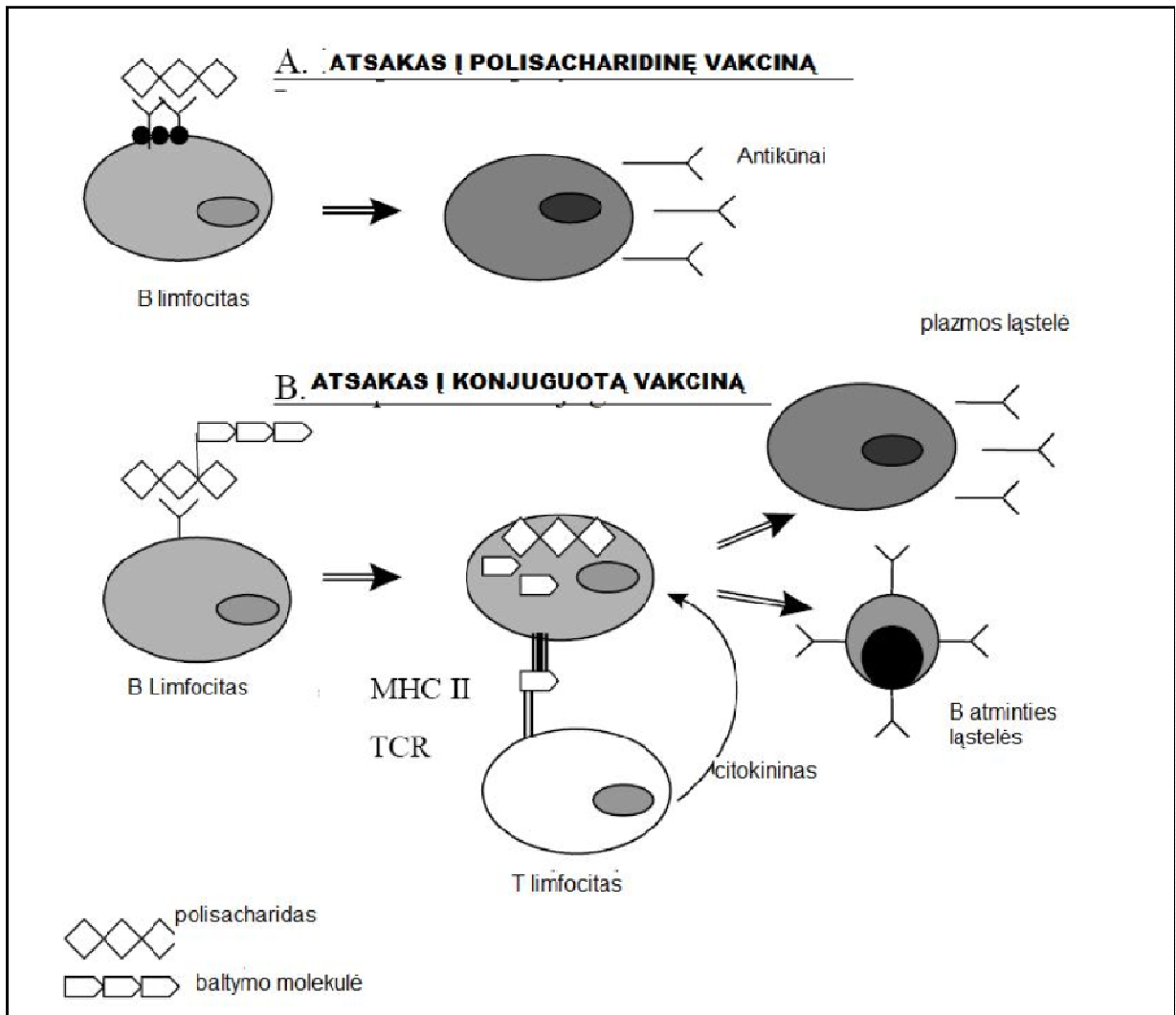
Polisacharidų antigenai skiriasi nuo baltymų antigenų pristatymo ir sąveikos su antikūnais būdais (Mond ir kt., 1995). Imuninės sistemos jautrumas polisacharidų antigenams išsivysto ankstyvoje ontogenezės stadijoje (Käyhty ir kt., 1984). Baltyminės prigimties antigenai yra dažniausiai nuo T-ląstelių priklausomų ląstelių (angl. TD-T dependent) antigenai. PS (polisacharidų) antigenai yra T-nepriklausomi antigenai (angl. TI-T independent). Egzistuoja 2 tipai TI antigenų. Pirmo tipo TI antigenai (TI-1) yra bakteriniai produktai, tokie kaip LPS, kurie funkcionuoja kaip mitogeniniai ar polikloniniai B ląstelių aktyvatoriai. TI-1 atsakas yra visiškai

priklausomas nuo T-ląstelių reguliacinio aktyvumo ir gali būti sužadintas ankstyvoje vaikystėje. Antro tipo TI antigenai (TI-2) dažniausiai yra didelės molekulinės masės polimerai su pasikartojančiomis struktūromis, tokiomis kaip bakterinės kapsulės polisacharidai ir viruso paviršiaus kapsidės (Fehr ir kt., 1998). Antikūnų atsakas TI antigenams gali būti stimuliuojamas be antigenui specifinių T-ląstelių, prisijungiant imunoglobulinams prie B-ląstelių paviršiaus. Nors TI-2 atsakas gali būti sužadintas be T-ląstelių pagalbos, reguliacinės T-ląstelės turi įtakos imuninio atsako intensyvumui. Limfokinai ir T bei B ląstelės reikalauja optimalaus antikūnų atsako į pneumokokų PS (polisacharidą) (Griffioen ir kt., 1993). TI-2 atsakas sukiamas vėliau nei TD atsakas gyvenimo eigoje ir nepasižymi ilgalaikę „atmintimi“, giminingumo branda ar izotipų perjungimu (Baker ir kt., 1981). Imuninis TI-2 atsakas prasideda pirmais gyvenimo mėnesiais ir pasiekia suaugusiųjų lygį iki 5 metų amžiaus (Pabst, Kreth, 1980).

Manoma, kad mažo imuninės sistemos jautrumo PS priežastis yra vėlyvas B-ląstelių, sugebančių suformuoti atsaką TI antigenams, brendimas (Barrett ir kt., 1992). Be to pneumokokinis PS gali suaktyvinti alternatyvius komplemento kelius ir jungtis prie atskirų komplemento sistemos komponentų. Komplemento receptorių 2 (CR2) yra B-ląstelių receptorių, sąveikaujantis su PS ir C3 kompleksu. Ši CR2 sąveika su PS-C3 kompleksu vaidina pagrindinį vaidmenį B-limfocitų aktyvacijoje, proliferacijoje ir antikūnų produkcijoje (Griffioen, 1993). Neonatalinės B ląstelės blužnies marginalinėje zonoje (tai turėtų būti imuninio atsako į PS antigenus iniciacijos vieta) sekretuoja sumažėjusius CR2 kiekius, lyginant su tokiomis ląstelėmis suaugusio žmogaus blužnyje (Timens ir kt., 1989). Neonatalinio nejautrumo į PS antigenus paaiškinimas gali būti mažesnė CR2 ekspresija pas kūdikius nei suaugusius (Griffioen ir kt., 1993). Atsižvelgiant į kapsulinių polisacharidų savybę aktyvuoti komplementą kuri nėra pastovi (Hostetter, 1986), aiškėja imunogeniškumo variabilumo tarp skirtingų serotipų priežastis.

Kita PS kaip antigeno būdinga savybė - jų plitimas per kūno skysčius (Darville ir kt., 1992). PS antigenų imunogeniškumas gali būti padidintas prijungus juos prie baltymų-nešėjų, kurių dėka jie pavirsta TD antigenais (Schneerson ir kt., 1983). Hipotetinis PS jungimasis prie baltymo-nešėjo, sustiprinančio atsaką, pateiktas 4 paveiksle. PS-baltymo kompleksas yra įterpiamas į B ląsteles per jų polisacharidui specifinį paviršinių-imunoglobulinų receptorių. B-ląstelėje baltymas suardomas, o susidarę peptidai pristatomi MHC komplekso Th ląstelėms (Lanzavecchia, 1986). Pakartotinas imunizavimas padidina baltymui-nešėjui specifinių Th

ląstelių skaičių, kas padeda PS-specifinėms B-ląstelėms, diferencijuotis į atminties ar plazmos ląsteles.



4 pav. T-priklausomų ir T- nepriklausomų antikūnų atsakai į PS ar PS- baltymas konjuguotus antigenus (Modified from Åhman 1999, Dissertation, University of Helsinki).

5. 2. Sisteminiai antikūnai prieš polisacharidinius antigenus

Suaugusiuose parenteralinis (ne pro virškinimo organus) PS (polisacharidų) antigenų patekimas gali skatinti sisteminių antikūnų produkciją. IgG ir IgM klasės antikūnai buvo surasti pas 25 proc. pneumokokais infekuotų vaikų (Sloyer ir kt., 1974). Suomijoje atlikti tyrimai parodė, kad serotipui–specifiniai IgG ir IgM serume atsiranda ligos pradžioje; 36 proc. vaikų turi padidėjusią antikūnų koncentraciją sveikimo stadijoje (Koskela ir kt., 1982). Tyrime, atliktame Virolainen ir kt., 1996) 29 proc. vaikų su pneumokokine AOM serumuose buvo rastas imuninis atsakas į pneumokokų PS. Be AOM, pneumokokiniai PS-specifiniai antikūnai buvo randami beveik pas pusę vaikų su pneumonija penktą ligos dieną (Nohynek ir kt., 1995). Besimptomis inkapsuluotų bakterijų nešiojimas sukelia sisteminių PS-specifinį atsaką (ir kt., 1981). Besimptomis nešiotųjų serumo antikūnų atsakas, manoma, yra limfocitų antigenų lokalsios stimuliacijos nosiaryklėje rezultatas - imunizavimas per gleivinę, lydymas kloninės ekspansijos ir antigenus sekretuojančių ląstelių išplitimo visame kūne.

5. 3. Gleivinėje besiformuojantys antikūnai prieš polisacharidų antigenus

Mestecky pasiūlė, kad sisteminis antigenų padidėjimas sukelia S-IgA antigenų atsaką tik tuo atveju, kai imunizuoti asmenys per gleivines buvo anksčiau susidūrę su tuo pačiu antigenu arba kryžmiškai reaguojančiais antigenais (Mestecky, 1987). Kitą vertus, PS antigenai yra plačiai išplitę kūno skysčiuose (Darville ir kt., 1992), kurie leidžia parenteraliai patekusiems PS (polisacharidai) pasiekti limfinius audinius, esančius gleivinėse, ir indukuoja lokalią S-IgA produkciją, net gi be ankstesnio kontakto su tais pačiais antigenais. Nors PS antigenai negali indukuoti serumo antikūnų pas kūdikius ir mažus vaikus, sekretinių antikūnų gamyba gali prasidėti net gi ankstyvame amžiuje. Sekretiniai antikūnai po sisteminės infekcijos buvo aptikti pas jaunesnius nei 1 metų amžiaus vaikus, Gleivinių imuninio atsako detekcija, priklausanti nuo sisteminio atsako, atsirandusio dėl funkcinio gleivinių imuninės sistemos subrendimo ankstyvoje ontogenezeje (Pichichero ir kt., 1981).

Po imunizavimo sekretuose aptinkami PS–specifiniai antikūnai yra daugiausia IgA klasės (Kauppi ir kt., 1995). Priešingai baltyminės kilmės antigenams, kurie indukuoja IgA1 atsakus,

polisacharidų antigenai suaugusiuose žmonėse indukuoja IgA2 (Mestecky, Russel, 1986). Vaikuose vis dėlto S-IgA atsakas į konjuguotus PS yra daugiausia IgA1 klasės (Korkeila ir kt., 1999).

Tyrimų duomenimis antigenų patekimas per gleivines sukelia intensyvesnius sekretinių antikūnų atsakus nei pavyzdžiui injekcijų keliu. Vis dėlto reikalingi gleivinėms taikytini adjuvantai tam, kad PS (polisacharidų) antigenai per gleivinių barjerą pasiektų limfinius audinius ir padidintų imuninių mediatorių atpalaidavimą, reikalingų antikūnų produkcijai (Mestecky ir kt., 1997). Vis dar yra mažai žinoma apie PS-antigenų ar PS-baltymų konjugatų žmonėse imunogeniškumą, kai valdymas vyksta per gleivines. Ankstyvoje AOM fazėje, serumo IgG ir IgM klasių antikūnai atsiranda vidurinėje ausyje, o lokalus S-IgA atsakas į pneumokokinį PS vystosi lėtai (Karjalainen ir kt., 1990). Sekretiniai antikūnai gali būti indukuojami pas vaikus po besimptomio Pnc nešiojimo. Tiriant naujagimių seiles antikūnai yra nustatomi pas 65 proc. vaikų nešiojančių Pnc (*pneumococcus*) ir pas 53 proc. vaikų su pneumokokine AOM (Kauppi ir kt., 1998).

5. 4. Antikūnus sekretuojančios ląstelės

Antikūnų atsako indukcija gali būti tiriama, matuojant antikūnus sekretuojančių ląstelių skaičių (ASC) įvairuose limfiniuose audiniuose ar periferiniame kraujyje. B-ląstelės pastoviai cirkuliuoja limfinėje sistemoje, per kraują į periferinius audinius (Gowans ir kt., 1964). Lastelės, susijusios su gleivine, yra taip pat randamos periferiniame kraujyje, bet ribotą laiko tarpą, nes jos greitai transportuojamos į skirtingus ekzokrininius audinius. Antikūnų, specifinių ASC, atsiradimas gali būti matuojamas periferiniame kraujyje po imunizavimo antigenu. Pas suaugusius ASC atsakas į PS antigenus susidaro daugiausia iš IgA klasės antikūnus sekretuojančių ląstelių (Tarkowski ir kt., 1989), o tuo tarpu atsakas į baltyminės kilmės antigenus yra aiškiai dominuojantis IgG ASC klasės (Lue ir kt., 1994).

Anksčiau paminėti Mestecky ir Russel (1986) pasiūlė, kad IgA dominuojantis atsakas atsiradęs po sisteminio PS antigenų veikimo yra dėl ankstesnio gleivinės kontakto su tais pačiais (ar kryžmiškai reaguojančiais) antigenais. Tokiu būdu, B ląstelės gali būti stimuliuojamos

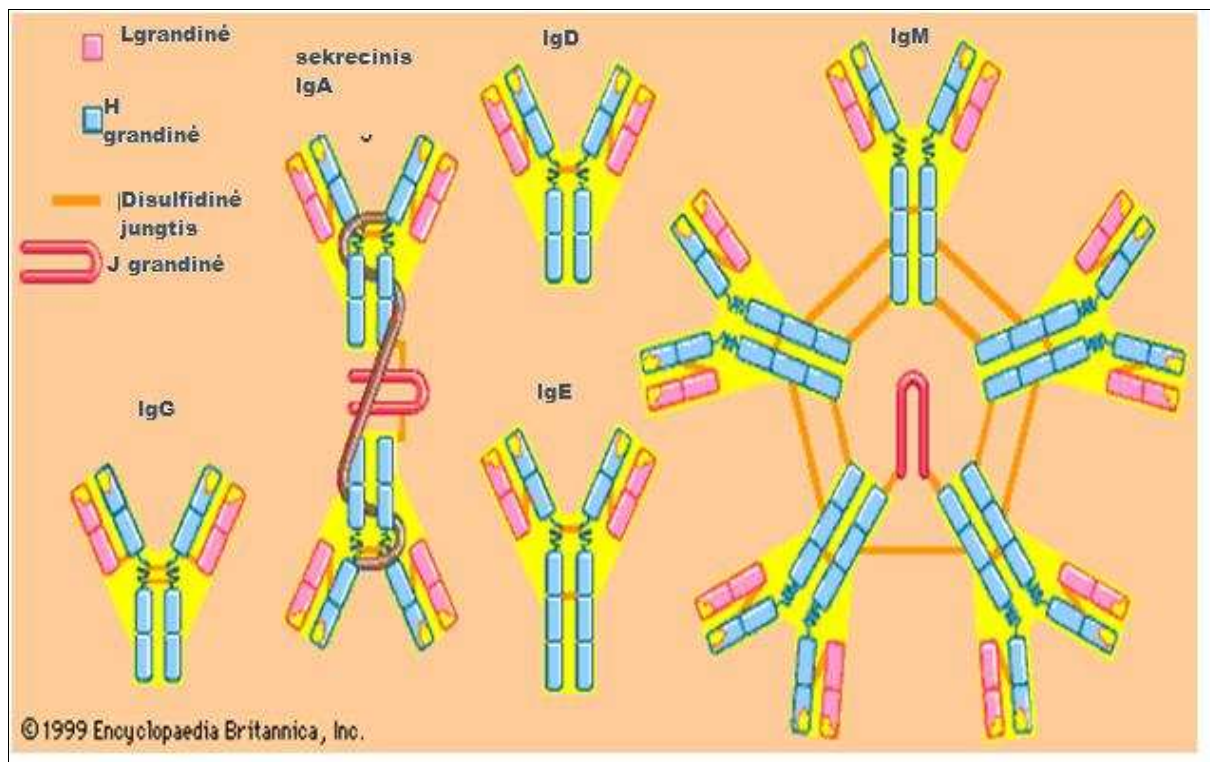
limfiniuose mazguose netoli injekcijos vietos, o ląstelės gaminančios IgA migruotų per cirkuliacinę sistemą į gleivinės vietas, sekretuoti IgA. Kitas paaiškinimas, kodėl PS antigenai gali pasiekti gleivines ir limfinius audinius, yra tai, kad mikroaplinka palankiai veikia IgA susijungimą su B-ląstelėmis (Weinstein, Cebra, 1991).

PS konjuguota su baltymu-nešėju sukelia didesnį anti-PS antikūnus sekretuojančių ląstelių skaičių periferiniame kraujyje nei gryni PS. IgG/IgA dažnis ASC atsako metu yra padidėjęs palyginus su atsaku į PS (Lue ir kt., 1994). Po PS antigenų veikimo fiksuojamas IgA-ASC atsakas suaugusiuose yra daugiausia IgA2 izotipo, priešingai IgA1 izotipui, kuris yra aptinkamas atsakuose į baltymų antigenus.

Bet IgA-ASC atsakas po PS konjugacijos su baltymu nešėju vis dar yra dominuojantis IgA2 izotipe (Tarkowski ir kt., 1990). Po imunizavimo su PS konjuguota vakcina kūdikiuose IgA atsakas susideda daugiausia iš IgA1 sekretuojančių ląstelių (Barington ir kt., 1994).

6. Imunoglobulinai, jų funkcijos.

IgA - tai grupė baltymų (imunoglobulinų), kuriems būdinga panaši molekulinė organizacija. Jie sugeba sąveikauti su antigenais. Visi imunoglobulinai yra glikoproteinai. Karbohidratų kiekis svyruoja nuo 2-3 proc. (IgG) iki 12-14 proc. (IgM, IgD, IgE). Imunoglobulinus sudaro keturios polipeptidinės grandinės, sujungtos tarpusavyje kovalentiniais disulfidiniais ir nekovalentiniais ryšiais (5 pav.).



5 pav. Žmogaus imunoglobulinų struktūra.

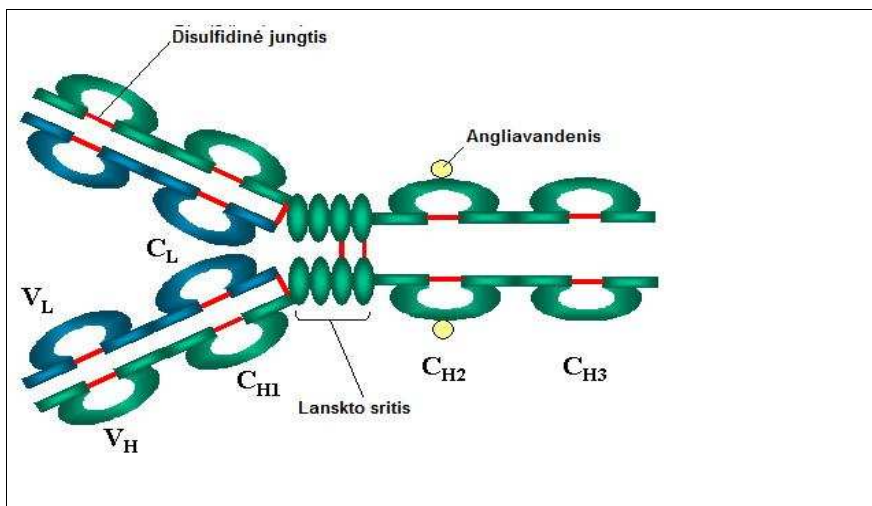
Mažesnes (25kDa) lengvasias L-grandines (angl. light) turi visi imunoglobulinai; jie būna dviejų tipų: λ ir κ . Tuo tarpu sunkiosios (50-77 kDa) H-grandinės (angl. heavy) yra specifinės kiekvienai imunoglobulinų klasei: γ grandinės turi IgG, μ , α , δ , ϵ – atitinkamai IgM, IgA, IgD, IgE klasės. Žmogaus IgA ir IgG klasės dar skirstomos į poklasius. Vieną Ig molekulę sudaro 2 identiškos L (κ arba λ) ir 2 identiškos H grandinės (Frangione ir kt., 1976).

Abi grandinės turi keletą pasikartojančių homologiškų atkarpų. Kiekvieną jų sudaro 110 a.r., kurios formuoja globulę, vadinamą domenu. Domenas sudarytas iš dviejų sluoksnių. Vieną sluoksnį formuoja keturios priešpriešinės β klostės, kitą-trys. α spiralių Ig molekulinėje yra labai mažai arba iš viso nėra. Globulė turi hidrofobinį vidinį branduolį. Maždaug per vidurį sluoksniai surišti disulfidiniu tilteliu. Disulfidinės jungtys tarp grandinių yra paslėptos negiliai ir lengvai redukuojamos. Tačiau pašalinus reduktorių, Ig molekulė grįžta į natyvią formą (Torano ir kt., 1977).

Abiejų grandinių N-galiniai domenai skiriasi daugelyje Ig, todėl jie vadinami kintamaisiais (angl. variable) V-domenais. Kintamuose domenuose yra ypatingai besiskiriančios sekos, kurios vadinamos hipervariabiliomis (angl. complementarity determining regions CDRs). Jų yra po tris kiekvienoje grandinėje. Čia yra susikaupusios tos amino rūgštys, kurios dalyvauja antigeno surišime. Hipervariabilias sritis skiria karkasinės sritys (angl. framework regions-FR), kurios yra mažiau variabilios. Tokių sričių yra keturios ir sudaro 80-85 proc. viso V-domeno. Karkasinės dalys palaiko Ig tokioje tretinėje struktūroje, kad ji geriau kontaktuotų su antigenu. Ig molekulėje 3L ir 3H hipervariabilios sritys sudaro aktyvų, antigenus surišantį centrą (Edelman, 1970).

Vieno tipo H- ir L-grandinių C-galiniai domenai yra beveik tokie patys ir vadinami pastoviais (angl. constant) C-domenais. Nuo pastovių grandinės domenu priklauso Ig efektorinės funkcijos.

L-grandines sudaro vienas V- ir vienas C-domenas. Sunkiasias grandines sudaro vienas V ir keturi (μ , ϵ) ar trys (γ , α , δ) C domenai. γ , α ir δ H grandinėse tarp C_{H1} ir C_{H2} domenu yra neglobularinis regionas-lanksto sritis iš 10 (α_1 , α_2 , γ_1 , γ_2 , γ_4) ar 60 (γ_3 , δ) amino rūgščių sekos (6 pav.). Visos sunkiosios grandinės, priklausomai nuo to, ar Ig yra sekretuojamoje, ar membraninėje formoje, gali turėti skirtingas C-galines aminorūgštis. Sekretuojamos formos imunoglobulinų C-gale yra hidrofiliinės aminorūgštys, o membraninės-hidrofobinės, kurios formuoja α spiralę ir kerta hidrofobinį membranos lipidų sluoksnį.



6 pav. Bendra imunoglobulino schema.

Imunoglobulinai yra gana heterogeniški baltymai. Antiserumų pagalba galima išskirti izotopines, alotipines ir idiotipines Ig determinantes (Nisonoff ir kt., 1975). Izotipai-tai pastovių domenų determinantės, kurių pagalba galima atskirti kiekvienos H ir L grandinių genų produktus. Alotipai-determinantės, koduojamos vieno lokuso aleliniais genais ir paveldimos pagal Mendelio dėsnius. Žinomi žmogaus κ , α , γ grandinių alotipiniai variantai skiriasi tik 1-4 amino rūgštimis. Kai kurie alotipai yra konformaciniai ir susiformuoja, tik esant H- ir L-grandinių kompleksui. Kai kurioms alotipinėms Gm determinantėms būdingos atitinkamo poklasio H-grandinės, aptinkamos kituose poklasiuose, tačiau ten jos nėra aleliniai žymenys. Tokie žymenys vadinami izoalotipais arba non-markeriais. Idiotipai tai determinantės, lokalizuotos Ig variabilioje dalyje ir būdingos tik individualiai Ig molekulei.

Pagal sunkiosios grandinės izotipą, Ig skirstomi į klases: IgM, IgA, IgG, IgE, IgD.

IgG-tai dažniausiai sutinkamas izotipas. Apie 75 proc. bendro imunoglobulinų kiekio žinduolių serume sudaro IgG. Kiekviena molekulė yra sudaryta iš 2 γ ir 2 L-grandinių (κ ar λ) (150 kD). Žmogaus IgG yra skirstomi į keturis poklasius: IgG1, IgG2, IgG3 ir IgG4. Serume jie sudaro atitinkamai: 66 proc., 23 proc., 7 proc., 4 proc.. Struktūriškai visi poklasiai yra panašūs. Homologija tarp domenų yra 95 proc., o tuo tarpu homologija lanksto srityje yra tik 60-70 proc. (Michaelson ir kt., 1977). Visi IgG C_{H2} domene turi prijungtas angliavandenių grandines, kurios turi įtakos erdvinei IgG struktūrai. Šis komponentas neleidžia glaudžiai sąveikauti abiemis, γ -grandinėms C_{H2} . Poklasiai skiriasi H-grandine, o tuo pačiu ir savo fizikocheminėmis ir biologinėmis savybėmis (Spiegelberg, 1974). Didžiausi skirtumai tarp poklasių yra lanksto srityje; jie lemia tokias funkcijas, kaip gebėjimą surišti komplementą, jautrumą proteolitiniams fermentams. Šioje srityje tarp γ -grandinių yra nuo 2 (γ_1 ir γ_4), 4 (γ_2) iki 11(γ_3) disulfidinių jungčių (Michaelson, 1977). Manoma, kad IgG3 lanksto sritis susidarė 4 kartus dubliuojantis γ_1 atitinkamai sričiai. Palyginti ilga IgG3 lanksto sritis nulemia didelį jautrumą proteolizei, greitą katabolizmą,- savybes, kurių neturi iki IgG.

IgA sudaro 10-15 proc. visų serumo imunoglobulinų. Seruminis IgA daugiausia yra monomeras (160 kDa), tik 1-11 proc. yra dimerai (330 kDa) ir labai maža dalis (apie 11,5 μ g/ml) IgA serume yra polimerai (400 kDa) (Newkirk ir kt., 1975). Ig A mielominis baltymas dažnai

būna polimerinis ir gali būti komplekse su kitais baltymais (Kerr, 1990). Polimeriniame IgA monomerai sujungti tarpusavyje disulfidinėmis jungtimis ir cisteinu turtinga AJ grandinė.

IgA-dominuojantis imunoglobulinas sekretiniuose skysčiuose seilėse, ašaros, prakaitė, piene, virškinimo trakto gleivinėse, tulžyje, nosies ir bronchų sekretuose. Didelė dalis IgA molekulių (65-96 proc.), esančių įvairių gleivinių sekretuose, yra polimerai (385 kDa) ir vadinami sekretoriniu IgA (S-IgA) (Kerr, 1990). Monomerinio IgA sekretuose yra nedaug: priešpienyje yra 14 proc. (Meilet ir kt., 1986), tulžyje-30 proc. (Delacroix ir kt., 1982), bronchų gleivinėje-56 proc. (Laine ir kt., 1977), plaučių alveolių skystyje-9,4 proc. (Reynolds, Newball, 1974). Polimerinis IgA sekretuose dar turi glikozilintą polipeptidą-sekrecinį komponentą-SK (70kDa). Amnioniniame skystyje, serume, tulžyje nedidelėmis koncentracijos aptiktos nuo 170 iki 200 kDa S-IgA formos. Tai viena ar dvi α -grandinės, asocijuotos su SK ir J-grandine, ar tik su sekreciniu komponentu SK ar J-grandine. Tokių formų nerastą piene, šlapime (Cleveland ir kt., 1991).

Nepriklausomai nuo to, kiek monomerų įeina į polimerinę IgA formą, randama tik viena J-grandinė, J-grandinė-tai ypatingas polipeptidas, reikalingas IgA polimerizacijos iniciacijai. J-grandines turintis IgA 10 kartų stipriau sąveikauja su SK, negu neturėdamas J grandinės (Bastian ir kt., 1992). J-grandinės molekulinė masė yra apie 15kDa; ji sudaryta iš 129 a.r. ir vieno oligosacharido. J-grandinė yra nehomologiška IgA, o ją koduojantys genai yra chromosomoje, kuri neturi Ig genų. J-grandinę, kaip ir pačią imunoglobulino molekulę, sintetina plazminės ląstelės. IgA dimerizacija vyksta ląstelės viduje (Mestecky, McGhee, 1987). J-grandinė jungia 2 IgA monomerus, sudarydama disulfidines jungtis su α -grandinės paskutiniu cisteinu ir J-grandinės antru ir trečiu cisteinu (Bastian ir kt., 1992). Kartais IgA gali dimerizuotis ir po sekrecijos. Susidarę dimerai su skirtingu specifiškumu yra mažiau aktyvūs.

Kita S-IgA sudedamoji dalis-sekrecinis komponentas, kuris apsaugo IgA dimerą nuo proteolizės ir padeda transportuoti IgA per endotelį į gleivinės paviršių. SK (sekrecinis komponentas) yra 70kDa masės baltymas. Savo struktūra SK (sekrecinis komponentas) panašus į Ig domenų. Sekrecinis komponentas pririštas prie IgA tik viena disulfidine jungtimi tarp SK 5 domeno Cys 16 tik prie vienos α -grandinės egzokrininių liaukų endotelio ląstelės, o jo pirmtakas yra endotelio ląstelių (IgA)₂-J kompleksui specifiškas receptorių. Ląstelės paviršiuje susidarę

SK-IgA kompleksai endocitozės būdu patenka į ląstelės vidų, toliau keliauja per citoplazmą ir dėl transmembraninio SK proteolitinio suskaldymo atsipalaiduoja kitoje ląstelės pusėje. SK pirmtako fragmentas pasilieka ant membranos (Mestecky, McGhee, 1987) (1 pav.)

Žinomi du IgA izotipai-IgA1 ir IgA2, kurie skiriasi antigeninėmis biocheminėmis ir biologinėmis savybėmis. Serume dominuoja IgA1 (89 proc.), o sekretuose -IgA2 (65 proc.). Tačiau monokloninis IgA2 serume randamas kur kas dažniau, nei IgA1.

Didžiausi struktūriniai skirtumai tarp α_1 ir α_2 grandinių yra lanksto srityje. α_1 grandinės lanksto sritis sudaryta iš neįprastų, pasikartojančių seku, turtingų prolinu, serinu ir treoninu (Londe ir kt., 1988), o taip pat šioje srityje yra 5 serinai, O-glikozidinėmis jungtimis prijungtas gliukozamininis oligosacharidas yra biologiškai svarbus: α_2 grandinė dėl to yra atspari proteazėms, kurias sintetina kai kurios patogeninės bakterijos (Plaut, 1983). Be to oligosacharidai reikalingi glikozilintų baltymų transportavimui ir sekrecijai. Nuslopinus α grandinės glikozilinimą, sustoja ir IgA sekrecija. Kita vertus, oligosacharidai gali palaikyti domenų konformaciją, kuri būtina jų funkciniam aktyvui taip pat, užstodami proteolizei jautrias vietas ne tik lanksto srityje, bet ir visoje molekulėje, saugo molekulę nuo degradacijos (Torano ir kt., 1977).

6.1. Imunoglobulinų funkcijos

Imunoglobulinai specifiskai sąveikauja su antigenu, inaktyvuoja jį ir (arba) pašalina iš organizmo. Biologinės Ig funkcijos priklauso nuo ketvirtinės struktūros ir net nedideli struktūros pakeitimai, pavyzdžiui, pakaitinus, gali pažeisti šias funkcijas. Antigeno atpažinimas priklauso nuo Ig kintamos dalies, o efektorinės funkcijos-nuo H ir Fc dalies. Ig šeimos baltymai, kurie turi atitinkamą domenų struktūrą, gali prisijungti įvairius baltyminius ligandus prie konstantinių domenų. Gerai žinomi pavyzdžiai yra komplemento C1q komponento (Schifferli ir kt., 1982) ir stafilokokinių baltymų A ir G prisijungimas. Ankstesni tyrimai parodė, kad C1q komponentas rišasi tarp C2 Glu 318, Lys 320 ir Lys 322. SpA (*Staphylococcus aureus* baltymas A) rišasi prie 252-254 a.r., 308-312 a.r.- C γ 2 domene ir 433 a.r. C γ 3 domene (Burton, Woof, 1992). IgG3, prie kurio SpA nesiriša, toje vietoje turi argininką. Baltymas G rišasi prie panašios imunoglobulinų vietos kaip ir baltymas A, bet su didesniu afiniškumu (Reis ir kt., 1984). Nezlín R. (1993) aprašė

naujus IgG surišančius baltymus. Tai komplemento C3a ir C4a komponentai ir Ig grandinių peptidai V_HI ir C_γ3.

6.2. Atskirų imunoglobulinų klasių funkcijos

IgM. Imuninio atsako metu pirmiausia gaminami IgM klasės antikūnai. Naujagimių organizme pirmiausia taip pat sintetunami šios klasės antikūnai. IgM yra svarbus kai kurių autoimuninių ligų atvejais, yra imuninio atsako prieš bakterijas dalis: lengvai sukelia agliutinaciją ir ląstelės lizę, aktyvuoja komplementą klasikiniu keliu. IgM monomerai yra pagrindinis B-ląstelių paviršiaus receptorių (Pernis ir kt., 1974).

IgG. Antrinio imuninio atsako metu daugiausia sintetunami IgG klasės antikūnai. Atsižvelgiant į tai, kad IgG receptoriai yra ant placentos sincitiotrofoblastų, IgG praeina per placentą ir apsaugo organizmą pirmąsias gyvenimo savaites. IgG, lyginant su kitais Ig, lengvai pasiskirsto audinių skysčiuose, kas labai svarbu, neutralizuojant bakterijų toksinus. Surišus mikroorganizmus, aktyvuojamas komplementas, sukiamas leukocitų chemotaksis. IgG-antikūnų kompleksai sąveikauja su daugelio ląstelių-neutrofilų, makrofagų, monocitų IgG receptoriais ir sukelia fagocitozę, o sąveikaujant su natūralių kilių IgG receptoriais-nuo antikūnų priklausantį citoksiškumą (Burton, Woof, 1992). Skirtingos sunkiosios γ grandinės turi nevienodas efektorines funkcijas. IgG1 ir IgG3 receptoriai randami ant fagocitinių ląstelių, be to jie aktyvuoja komplementą klasikiniu keliu. IgG4 surišamas putliųjų ląstelių (Heiner, 1984). Atsakas į įvairius antigenus būna skirtingų IgG poklasių. Polisacharidiniai antigenai indukuoja daugiausia IgG2 antikūnus, kurie blogai aktyvuoja komplementą klasikiniu keliu, nesuriša Fc γ receptorių ant fagocitinių ląstelių. Įvairių H-grandinių genai pasirinktinai jungiasi su skirtingomis V genų grupėmis. IgG2 C regiono genai turi pirmenybę pasirinkti V_HI grupės genus, kurių produktai pasižymi aukštu afiniškumu polisacharidams. Prieš virusus ir RNR dažniausiai susidaro IgG1, prieš ds DNR-IgG1, IgG3, IgM; prieš baltymus - IgG1 IgG3 poklasių antikūnai (Yount ir kt., 1988).

IgA yra kraujo serume ir gleivinės sekretuose: seilėse, ašarose, prakaitu, piene, taip pat kvėpavimo, šlapimo ir lytinių takų bei virškinimo trakto išskyrose, tai yra tokiose vietose, kurios kontaktuoja su aplinka (Mestecky, McGhee, 1987). Nors serume IgA klasės imunoglobulinai

sudaro 10-15 proc., jų funkcijos iki galo nežinomos, Sveikų žmonių kraujo serume rasti IgA1 antikūnai prieš kai kuriuos maisto produktus, bakterinius, virusinius antigenus ir IgA2 klasės antikūnai prieš dekstraną, kazeiną, stafilokokinę ribitolteichoinę rūgštį (Russel ir kt., 1986). IgA antikūnai gali konkuruoti su IgG ir IgM antikūnais ir tuo būdu slopinti komplemento aktyvaciją klasikiniu būdu (Russel ir kt., 1989), fagocitozę, chemotaksį ir nuo antikūnų pirklausanti fitotoksiškumą. IgA slopina monocitų TNF_{α} ir IL-6 produkciją, o tuo pačiu stabdo uždegiminius procesus (Wolf ir kt., 1994).

Daugiau žinoma apie S-IgA reikšmę. Gleivinėse S-IgA sudaro imuninį barjerą. Antigenams, prieš patenkant į endotelio ląsteles, visų pirmiausia reikia prisijungti prie jų paviršiaus. Tokiai adhezijai trukdo IgA, esantis organizmo sekretuose. IgA suriša priešiškas organizmui medžiagas ir neleidžia joms prilipti prie endotelio ląstelių. Pats IgA taip pat nepasižymi didele adhezija. Be to, IgA inhibuoja kitų klasių imunoglobulinus, kurie yra surišę antigeną, skatina adheziją prie gleivinės ląstelių. Tokiu būdu S-IgA apsaugo gleivinės ląsteles nuo antigenų įsiskverbimo (Mazanec ir kt., 1993).

Prisirišdamas prie biologiškai aktyvių antigenų (virusų, fermentų, toksinų), S-IgA neutralizuoja jų biologinį aktyvumą. Jungiamojo audinio plokštelėse IgA suriša antigeną be komplemento aktyvinimo, dėl ko nekyla uždegiminių reakcijų. Imuniniai kompleksai per endotelio ląsteles transportuojami į gleivinės paviršių ir į kraują nepatenka (Mazanec ir kt., 1993).

S-IgA apsaugo nuo patogeninių organizmų: pašalina bakterijas, virusus ar gali skaldyti IgA dimerą. IgA tampa neveiklus ir įvairūs patogenai gali patekti į organizmą. Tačiau S-IgA efektyviai veikia ne tik gleivinės paviršiuje, bet ir endotelio ląstelių viduje bei jungiamojo audinio plokštelėje. Endotelinėse ląstelėse viruso baltymai, bakterijos, bakterijų toksinai bei kitos svetimos medžiagos būna egzocitozinėse vezikulėse. IgA dimerai, susijungę su SK (sekrecinis kompleksas), transportuojami per endotelio ląsteles į gleivinės paviršių endocitozinėse vezikulėse. Egzogeninėms ir endogeninėms vezikulėms susijungus ir susiliejus, IgA suriša antigeną ir jis inaktyvuojamas (Mazanec ir kt., 1993). IgG ir IgM antikūnų antiinfekcinės savybės priklauso nuo komplemento sistemos. IgA negali aktyvinti komplemento klasikiniu keliu. Agreguoti IgA, susijungę su neutrofilais, gali aktyvinti komplementą alternatyviu keliu,

kuris sąlygoja sinergizmo atsiradimą tarp IgA komplemento ir lizocimo, sunaikinant konkretų mikroorganizmą. Tyrimai parodė, kad fagocitinės baltosios kraujo ląstelės turi $Fc_{\alpha}R$. S-IgA, sąveikaudamas su šiais receptoriais, sukelia metabolinę aktyvaciją, degranuliaciją, superoksidų išsiskyrimą iš granulocitų ir monocitų (Mestecky, McGhee, 1992).

Su motinos pienu gaunamas S-IgA, apsaugo kūdikį pirmaisiais gyvenimo metais. Kūdikio žarnyno ląstelės IgA neišsiurbia, ir jis pasilieka virškinamajame trakte, apsaugodamas nuo infekcijos. Įdomu tai, kad šie IgA yra nukreipti prieš bakterijas ir virusus, kurie dažnai patenka į virškinamąjį traktą. Yra manoma, kad ląstelės, kurios produkuoja antikūnus prieš virškinamojo trakto antigenus, migruoja į pieno liauką, iš kur jų sekretuojami antikūnai patenka į pieną (Mestecky, McGhee, 1992).

6.3. Patologijos, susijusios su imunoglobulinų kiekio pakitimu

Imunoglobulinų kiekio padidėjimas ar sumažėjimas yra susijęs su B ląstelių proliferacijos pakitimais. Skiriamos trys (Potter, 1986) B ląstelių proliferacijos formos:

1. piktybinės imunoglobulinus sekretuojančios plazminės ląstelės (daugybė mieloma, plazminių ląstelių leukemija, plazmicitoma).
2. piktybiniai B limfocitai (Waldenstrom makroglobulinemija, lėtinė limfocitinė leukemija).
3. nepiktybinė plazminių ląstelių proliferacija:
 - a. nuo antigeno nepriklausoma proliferacija (nepiktybinė monokloninė gamapatija)
 - b. nuo antigeno priklausoma proliferacija (proliferacija po infekcijos, hiperimunizacijos).

Pirmais dviem atvejais, o taip pat esant monokloninei gamapatijai, paprastai, būna ypač didelis vieno izotipo monokloninių imunoglobulinų kiekio padidėjimas, o tuo pačiu kitų imunoglobulinų izotipų kiekio supresija. Polikloninės proliferacijos metu taip pat būna koreliacija tarp skirtingų imunoglobulinų izotipų kiekio padidėjimo ir sumažėjimo. V. Oxelius (1981), W Jount (1970) ligonių su padidėjusia infekcija kraujo serume aptiko žemą bendrą IgG kiekį, o tuo pačiu neproporcingą kai kurių IgG poklasių kiekio padidėjimą (Yount, 1970).

Ligoniai, esant plaučių infekcijai (Young, 1970), turėjo normalų bendrą IgG, IgA, IgM kiekį, bet visai neturėjo IgG2, IgG4. Oxelius (1981) pastebėjo koreliaciją tarp IgG poklasių kiekio padidėjimo. Dauguma ligonių, esant IgG2 kiekio trūkumui, turi ir IgG4 nepakankamumą. A. Haraldsson (1991) duomenimis, IgD padidėjimo sindromas yra susijęs ne tik su seruminio IgD padidėjimu, bet dažnai ir su IgA padidėjimu, bet su IgG3 bei IgM sumažėjimu. P. Olsson (1992) teigia, kad IgA deficitas gali būti asocijuotas su IgG2 ir (ar) IgG4 bei IgE deficitu, o taip pat infekcijų dažnumo padidėjimu (Olsson ir kt., 1992).

Atskirų Ig izotipų kiekio padidėjimas ar sumažėjimas yra susijęs su tam tikromis ligomis. Polikloninis nuo antigeno priklausantis Ig padidėjimas yra susijęs su infekcinėmis ligomis (Rostoker ir kt.,1992) Polikloninis IgM kiekio padidėjimas būna, esant ūmioms infekcijoms, kepenų, jungiamojo audinio ligoms, įgimtai raudoniukei, sifiliui, taksoplazmozei, mukoviscidozei, heroininei narkomanijai. Polikloninis IgG kiekio padidėjimas yra susijęs su lėtinėmis infekcijomis, lėtinėmis kepenų ligomis, infekcine mononukleoze, Šegreno, Stuardro-Braso sindromais. Taip pat didesnė IgG koncentracija yra spindulinės ligos atsistatymo fazėje. Polikloninės kilmės IgA kiekio padidėjimas nustatomas, sergant kepenų lėtinėmis infekcijomis (mikronoduline ciroze, infekciniu hepatitu), ūmiomis ir lėtinėmis infekcijomis (tuberkulioze, grybeliniais susirgimais), autoimuninėmis ligomis (raudonąja vilklige, reumatoidiniu artritu), infekcine mononukleoze, mukoviscidoze, krūties vėžiu, inkstų ligomis (IgA nefropatija, pirminiu glomerulonefritu). IgA padidėja, esant ankilozinei spondiliozei, Bergero ligai (Newkirk ir kt., 1983). Kai kurių vėžinių susirgimų atvejais yra padidėjęs bendras IgA ir kompleksų kiekis. Palyginus aukštos IgA koncentracijos aptinkamos alkoholikų serume. Tai dažnai koreliuoja su kepenų ciroze, uždegiminiais procesais. B. Sopena (1993) nustatė koreliaciją tarp IgA kiekio padidėjimo ir kepenų funkcijų sutrikimo (Sopena,1993). S-IgA koncentracija yra padidėjusi kraujo serume pas pacientus, sergančius tulžies ir kepenų ligomis, o taip pat nėštumo metu (Yagi ir kt., 1991). Seilėse IgA1 ir IgA2 padidėja, esant įvairiom inkstų ligoms (Rostoker ir kt., 1992). IgD polikloninis padidėjimas būna sergant lėtinėmis infekcinėmis ligomis, jungiamojo audinio ir kepenų susirgimams, o IgE padidėjimas būdingas, esant alerginiams susirgimams (bronchinė astma, egzema), parazitinėms ligoms, Wiskott-Aldrich sindromui (Johansson, Bennich, 1967).

Imunoglobulinų kiekio sumažėjimas būna įgimtas ir laikinas. Visų Ig klasių sumažėjimas yra esant imunodeficitams, gastroenteropatijai su baltymo netekimu, po didelių terminų

nudegimų, imunodepresinės terapijos metu, taip pat vėlyvo nėštumo laikotarpiu. IgM kiekio sumažėjimas dar susijęs su Wiskott-Aldrich sindromu, Brutono agamaglobulinemija. IgG kiekio sumažėjimas yra susijęs su nekrotiniu sindromu, distrofine miotonija, pantoteninės rūgšties trūkumu. Vieno ar daugiau IgG poklasių deficitas aptinkamas, sergant infekcinėmis kvėpavimo takų ligomis (Schur ir kt., 1970), taip pat kai kuriems kitiems imunodeficitams (IgA deficitui), Wiskott-Aldrich sindromui ir HLA II klasės deficitui (Bremard-Oury ir kt., 1986). Individai su IgA trūkumu dažnai serga kvėpavimo takų infekcinėmis ligomis, gleivinės uždegimais, skundžiasi virškinamojo trakto sutrikimais, taip pat labiau kenčia nuo dantų ėduonies. AIDS ligoniams, esant infekcijoms, F.Mueller (1991) aptiko S-IgA kiekio sumažėjimą (Muller ir kt., 1991). IgE sumažėjimas nustatomas esant navikų progresavimui, kai kurioms agamaglobulinemijos formoms.

7. Imunodeficitai

Imunodeficito ligą sukelia imuninės sistemos vieno ar kelių elementų normalios funkcijos nebuvimas ar sutrikimas:

- specifinę imunodeficito ligą sukelia T ir B ląstelių (įgytos imuninės sistemos ląstelės) išsigimimai,
- ne-specifinę imunodeficito ligą-tokių imuninės sistemos elementų, kaip komplementas ar fagocitai (kurie funkcionuoja iminiame atsake nespecifiškai) sutrikimai.

Pirminės imunodeficito ligos atsiranda dėl imuninės sistemos ląstelių vidinių defektų ir yra dažniausiai genetiškai nulemtos, sukeliančios padidėjusį sergamumą infekcinėmis ligomis. Ligoniai, sergantys imunodeficito ligomis skirstomi į grupes:

- pacientai, kuriems būdingi imunoglobulinų, komplemento baltymų ar fagocitų defektai yra labai imlūs inkapsuluotų bakterijų infekcijoms tokioms, kaip *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ir *Staphylococcus aureus*-taip vadinamomis piogeninėmis (angl. pyogenic) infekcijomis, sukeliančiomis pūlinių ar pūlingų išskyrų formavimąsi.

- pacientai, turintys imunitetą formuojančių T ląstelių defektus, yra imlūs oportunistinėms (angl. opportunistic) infekcijoms, kurioms sveiki žmonės greitai įgauna atsparumą, o sukėlėjai yra randami aplinkoje-mielės, virusai (vėjaraupiu).

7.1 B ląstelių nepakankamumai

Pacientai su B ląstelių funkcijų defektais dažnai serga atsinaujinančiomis infekcijomis tokiomis, kaip: plaučių uždegimas, vidinės ausies uždegimas ir sinusitas. Negydomiems pacientams gali išsivystyti obstrukcinė plaučių liga, kuri pažeidžia oro takų elastingumą.

7.1.1. IgA ir IgG poklasių nepakankamumai

IgA nepakankamumas yra vienas iš dažniausių imunodeficitų atvejų, nustatytas sergamumas siekia 1 iš 700 kaukaziečių, turinčių šį defektą, bet kitose etninėse grupėse nėra randamas arba randamas labai retais atvejais. Apie 20 proc. IgA deficitu sergančių individų, taip turi IgG₂ ir IgG₄ trūkumą, be to yra neatsparūs piogeninėms infekcijoms. Žmogaus dauguma antikūnų prieš piogeninių bakterijų kapsulės polisacharidus yra IgG₂ poklasio, kurio nepakankamumas sukelia neatsparumą įvairioms infekcijoms. Šios klasės ir poklasio nepakankamumai yra B ląstelių galinės diferenciacijos sutrikimo rezultatas(Buckley, 2000).

7.1.2. Imunodeficitas su padidintu IgM kiekiu

Ypatingas imunodeficito atvejis-imunodeficitas su padidėjusiu IgM (angl. hiper-IgM, HIgM) kiekiu, kurio metu pacientuose sukeliama IgG ir IgA nepakankamumai, tačiau polikloninis IgM yra sintetinamas padidintais kiekiais (daugiau nei 200mg/dl). Sergantys HIgM yra neatsparūs piogeninėms infekcijoms ir turėtų būti gydomi intraveninio gamaglobulino kursu. Pacientuose vyksta IgM autoantikūnų prieš neutrofilus, kraujo plokšteles (trombocitus) ir kitus kraujo elementus, taip pat ir audinių antigenus gamyba, todėl greita imunodeficito ligos vystosi sudėtingi autoimuniniai susirgimai(Buckley, 2000).

70 proc. HIgM atvejų yra su X chromosoma sukibusios recesyvinės paveldimos būklės, sukeltos CD40 ligando mutacijos, kurio genai užima tą pačią vietą X chromosomos ilgajame

petyje kaip ir HIgM. HIgM atvejais B ląstelės imunoglobulinų sintezės metu negali atlikti perjungimo iš IgM į IgG, IgA ir IgE, kas vyksta normaliaame B ląstelių brendime (Conley, 1992).

HIgM gali būti paveldimas ir kaip autosominis recesyvinis požymis, paliečiantis tiek moteris, tiek vyrus, atsirandantis dėl genetinio B ląstelių fermento defekto-aktyvaciją-skatinančio citidino deaminazės (angl. activation-induced cytidine deaminase-AID). Šis aktyvus fermentas B ląstelių vienagrandėje DNR citidina paverčia į uridina. Uridinas vėliau yra suskaldomas iki uracilo, sukeldamas DNR grandinės trūkį.

7.1.3. Kintanti imunodeficito būklė

Individai bendra kintančia imunodeficito būkle (angl. common variable immunodeficiency-CVID) susergera antrą arba trečią gyvenimo dešimtmetį, vėliau pradeda vystytis agamaglobulinemija. Tiek moterys, tiek vyrai yra vienodai paveikiami ligos ir priežastis paprastai lieka neaiški, tačiau manoma, kad gali būti infekcijos ar virusų tokių, kaip Epstein-Barr virusas (EBV) pasekmė. Pacientai su CVID yra labai imlūs piogeniniams mikroorganizmams, žarnyno pirmuonims (protozoan), *Gardia lamblia.*, kurie sukelia sunkų viduriavimą (Rosen, 1995).

Daugumai pacientų (80 proc.) su CVID yra būdingos normalios B ląstelės, funkcionuojančios tinkamai arba būna nesubrendusios, tačiau nesugebančios priimti signalų iš T ląstelių. CVID atvejais T ląstelių defektai nėra ištirti. Pacientai su CVID būklėmis turėtų būti gydomi intraveninėmis gamaglobulino injekcijomis, kadangi jis apsaugo nuo pasikartojančių piogeninių infekcijų. Dauguma pacientų susergera dar ir autoimuninėmis ligomis, agresyvia anemija, bet vėlgi šių procesų priežastys nėra žinomos. CVID nėra paveldimas, tačiau yra susijęs su MHC haplotipais HLA-8 IR HLA-DR3.

7.1.4. Pavėluota IgG produkcija kūdikių praeinančios hypogamaglobulinemijos atvejais

Po gimimo kūdikiai nuo infekcijų yra apsaugoti dėka motinos IgG. IgG gyvenimo puspreriodis yra 30 dienų, 3 mėnesių kūdikiai pradeda sintetinti nuosavus IgG, todėl antikūnų prieš bakterijų kapsulės polisacharidus formavimasis neprasideda iki 2 metų amžiaus. Kai kuriuose kūdikiuose IgG sintezės pradžia gali būti atidėta iki 36 mėnesių, ir ši periodą kūdikiai

yra labai imlūs piogeninėms infekcijoms. Tokių kūdikių B ląstelės yra normalios, bet jos stokoja T ląstelių CD4+ pagalbos sintetinant antikūnus.

7.2.T ląstelių nepakankamumai

Žmonėms su T ląstelių imunodeficitais būdinga, kad T ląstelės iš viso neatlieka savo funkcijų, todėl jie yra labai imlūs oportunistinėms infekcijoms. Kadangi B ląstelių funkcijos labai priklauso nuo T ląstelių, todėl T ląstelių nepakankamumas sukelia humoralinį imunodeficitą, kuriam būdingas kombinuotas humoralinio ir ląstelių valdomo imunitetų nepakankamumas.

7.2.1.Limfocitų nepakankamumas ir skydinės liaukos neišsivystymas SCID atvejais

Sunkiausias paveldėtas ląstelių moduluojamas imuniteto sutrikimas yra kūdikių sunkus sudėtinis imunodeficitas (anl. Severe combined immunodeficiency SCID), kurio pasekmė yra pasikartojančios infekcijos ankstyvame amžiuje, kuriam yra būdinga:

- užsitęsęs viduriavimas dėl rotaviruso arba kitokios virškinamojo trakto bakterinės infekcijos,
- išsivysto plaučių uždegimas, paprastai dėl pirmuonio, *Pneumocystis carinii*.

Įprastas mielių organizmas *Candida albicans* vešliai auga burnos ertmėje ir ant pacientų su SCID būklėmis odos. Jei pacientai su SCID būkle yra vakcinuojami su gyvų organizmų vakcinomis, tokiomis kaip poliovirusas ar bacilė Calmette-Guerin(BCG)-naudojamomis skiepams nuo tuberkuliozės, jie miršta nuo šių nepiktybinių organizmų progresuojančios infekcijos. SCID yra nesuderinamas su gyvybe, kūdikiai sergantys SCID paprastai miršta iki 2 metų amžiaus, nebent yra išgebėjami kaulų čiulpų transplantacijos procedūros dėka. Tokiais atvejais jie yra limfocitų chimeros-gali išgyventi ir gyventi normalų gyvenimą (Curnutte, 1994).

Kūdikiai su SCID turi vos keletą limfocitų kraujyje-mažiau nei 3000/ml, jų limfoidinis audinys irgi neturi arba turi vos keletą limfocitų. Užkrūčio liauka pasižymi embrionine išvaizda, turinti endodermines stromos ląsteles kilusias iš embrioninio iš 3-4 trachėjinio maišelio.

Limfoidinės kamieninės ląstelės, kurios pradeda vystytis žmogaus 6 nėštumo savaitę, neatsiranda ir užkrūčio liauka netampa limfoidiniu organu.

CSID yra dažniau sutinkamas vyriškos nei moteriškos lyties kūdikiuose (3/1), todėl kad 50 proc. atvejų yra sukelti X chromosomoje esančio geno defekto. Defektyvus genas koduoja interleukino-2 γ grandinės receptorių. γ grandinė taip pat formuoja IL-4, IL7, IL-11, IL-15 receptorių dalį.

Recesyviųjų genų sukeltiems SCID atvejams yra būdingas adenozino deaminazės (ADA) ar purino nukleozido fosforilazės (PNP) nepakankamumas. Šių purinų skaldymo fermentų nepakankamumas sukelia limfoidinėms kamieninėms ląstelėms toksinių medžiagų kaupimąsi tokių, kaip dATP ir dGTP. Šie metabolitai inhibuoja ribonukleotido reduktazės fermentą, reikalingą DNR sintezei ir taip pat ląstelių dauginimuisi.

Autosominė recesyvinė SCID forma yra sukeliama koduojančių RAG-1 arba RAG-2 genų mutacijų, kurie yra reikalingi dvigubos DNR grandinės sukarpymui prieš DNR rekombinaciją, formuojant imunoglobulinų genus ir genus koduojančius T ląstelės receptorių (jei šie persitvarkymai neįvyksta, B ir T ląstelės nesivysto). Optimalus SCID atvejais gydymo metodas yra kaulų čiulpų transplantacija iš visiškai histologiškai suderinamo donoro, apie 70 proc. pacientams yra persodinami kaulų čiulpai iš vieno iš tėvų, kuris turi vieną identišką haplotipą, operacijos paprastai būna sėkmingos.

Paskutiniaisiais metais tiriamas naujas gydymo metodas, kuomet retroviruso vektoriumi, į kurį yra įkeltas ADA genas, yra infekuojami ADA nepakankamumu sergančių vaikų limfocitai. Tai pirmas sėkmingas genų inžinerijos pavyzdys.

7.2.2.T pagalbinių ląstelių nepakankamumas

II MHC klasės molekulių ant antigeną ekspresuojančių ląstelių (makrofagų ir B ląstelių) nepakankamumas yra paveldimas kaip autosominis recesyvinis požymis, kurio genas yra 6 chromosomos trumpajame petyje. Kūdikiai su tokiomis būklėmis serga atsinaujinančiomis infekcijomis, ypač virškinamojo trakto ligomis. Kadangi $CD4^+$ pagalbininkų T(Th) ląstelių vystymasis priklauso nuo taisyklingos MHC klasės molekulių pasirinkimo užkrūčio liaukoje,

MCH nepakankamumu sergantysys kūdikiai turi ir CD4⁺ T ląstelių nepakankamumą. Toks Th ląstelių trūkumas sukelia ir antikūnų nepakankamumą. II MHC klasės yra sukeliama promotoriaus baltymo, kuris jungiasi prie II klasės genų 5' netransliuojamo regiono, defektų.

7.2.3. Digeorge anomalijas sukelia antkrūčio defektai embriogenezėje

Užkrūčio liaukos epitelio formavimosi įgimti defektai sukelia Digeorge anomaliją. T ląstelių defektai yra labai įvairūs ir priklauso nuo užkrūčio liaukos pažeidimo laipsnio. Sergantiems kūdikiams būdinga tam tikra veido išraiška-akys toli viena nuo kitos, ausys išsidėsčiusios žemiau linijos, viršutinės lūpos linija yra sutrumpėjusi. Taip pat kūdikiams būdingi įgimti širdies ir aortos lanko apsigiminai, pprieskydinių liaukų aplazija arba hipoplazija. Tokie kūdikiai turi dalinę monosomiją-22q11-10p.

7.2.4. X chromosomos proliferuojantis sindromas

Nuo X chromosomos priklausantis proliferuojantis sindromas (angl.X linked proliferative syndrome -XPL) yra sukeliama sutrikus normaliai citotoksinių T ląstelių proliferacijos kontrolei, kartu su sekančia Epstein-Barr viruso (EBV) infekcija, kuri sukelia infekcinę (mononucleosis) mononukleozę. Sergantys vyrai būna normalūs iki tol kol nesuserga EBV, tuomet pacientams išsivysto:

- embrioninė infekcinė mononukleozė
- visiška B ląstelių destrukcija, tuomet išsivysto gamaglobulinemia
- embrioninio limfoidinio audinio supiktybėjimas
- aplastinė anemija.

X chromosomeje defektyvūs genai koduoja T ir B ląstelių baltymą SAP arba SLAM-priklausantį baltymą (kuris ekspresuojamas ant B ir T ląstelių paviršiaus). SLAM tarpląstelinė uodega sąveikauja su baltymu SAP. Pagal dar neišaiškintą mechanizmą, SAP valdo citotoksinių T ląstelių proliferacijos greitį. SAP genetinis defektas sukelia nekontroliuojamų citotoksinių T ląstelių sukeltą limfoidinio ar kito hemotopoetinio audinio sunaikinimą (Conely, 1992).

7.2.5.Chromosominiai trūkiai TCR ir imunoglobulino gene AT atvejais

Ataxia telangiectacia (AT) yra paveldima autosominiu recesyviniu būdu. Sergantiems kūdikiams būdinga svirduliuojanti eiseną, kuri pradeda vystytis 18 mėnesių amžiaus laikotarpiu. AT yra lydima įvairių T ląstelių sutrikimų, apie 70 proc. pacientų turi IgA, IgG2, IgG4 nepakankamumus. Cirkuliuojančių kraujyje T ląstelių kiekis yra labai sumažėjęs, pacientai serga sunkiais sinusitais ir plaučių uždegimais. Pacientų ląstelės išvengia chromosominių trūkų T ląstelių receptorių (TCR) genų ir imunoglobulinų sunkiąsias grandines koduojančių genų vietuose 7, 14 chromosomose. Pacientų ląstelės ir AT ląstelės in vitro yra labai jautrios jonizuojančiai spinduliuotei, todėl, kad defektyvus genas AT koduoja baltymą, atsakingą už dvigubos DNR grandinės trūkų taisymą.

7.2.6.T ląstelių defektai WISKOTT-ALDRICH sindromo atveju

Wiskott-Aldrich sindromas (WAS) yra su X chromosoma susijusi imunodeficito liga. Sergantiems vyrams būdinga:

- labai mažos ir ypatingai nenormalios kraujo plokštelės, kurių skaičius sumažėjęs-trombocitopenija,
- sunki egzema, oportunistinių ir piogeninių infekcijų vystymasis,
- padidėję IgA ir IgE kiekiai plazmoje, normalus IgG kiekis ir sumažėjęs IgM kiekis
- T ląstelėms būdingos pakitusios funkcijos.

Ląstelių valdomas imunitetas labai nusilpsta. Antikūno formavimosi metu T ląstelės citoskeletas persiorganizuoja arba įgauna poliarizaciją link B ląstelių. WAS atveju tokie pokyčiai neįvyksta, tarp imuninių ląstelių vyksta klaidingas persiorganizavimas (Snapper, Rosen, 1999).

7.3. Komplemento baltymų genetiniai nepakankamumai

Klasikinio komplemento kelio, C1q, C1r, C1s, C4 ar C2 sutrikimai sukelia imunines sudėtinės ligas tokias, kaip sisteminė raudonoji vilkligė. C3, faktoriaus H ir faktoriaus I nepakankamumai sukelia padidėjusį imlumą piogeninėms infekcijoms, tai koreliuoja su C3 svarbiu vaidmeniu piogeniniu bakterijų opsinizacijoje. C5, C6, C7, C8 galinių komponentų,

alternatyvaus kelio komponentų faktoriaus D ir properdino sutrikimai sukelia ypatingai padidėjusį sergamumą *Neisseria* rūšies patogenais-*N. Gonorrhoeae* ir *N. Meningitis*. Tai įrodo šių bakterijų rūšių alternatyvaus kelio ir makromolekulių puolimo komplekso svarbą bakteriolyzės metu.

Visi šie genetiniai komplemento komponentų nepakankamumai yra paveldimi autosominiu recesyvinių būdu, išskyrus:

- properdino nepakankamumas paveldimas, kaip sukibęs su X chromosoma recesyvinis bruožas,
- C1 inhibitoriaus nepakankamumas paveldimas autosominiu dominantiniu būdu.

7.3.1. HAE yra sukiamas C1 inhibitoriaus nepakankamumo

Kliniškai svarbiausias komplemento sistemos sutrikimas-C1 inhibitoriaus nepakankamumas. Ši molekulė yra atsakinga už aktyvaus C1 disociaciją, prisijungiant C1r₂ ir C1s₂. Šis nepakankamumas sukelia autosominiu dominantiniu būdu paveldimą ligą-paveldimą angioneurotinę edemą (angl. hereditary angioneurotic edema HAE). Pacientams būdingi pasikartojantys įvairių kūno dalių patinimai:

- jei edema vystosi žarnyne, pacientai kenčia stiprius spazminius pilvo skausmus, traukulius ir vėmimą,
- viršutiniuose kvėpavimo takuose, pacientai gali uždusti nuo kvėpavimo takų obstrukcijos.

C1 inhibitorius ne tik slopina klasikinį komplemento kelią, bet ir kinino, plazmino ir krešėjimo sistemų komponentus. Edemą sukelia 2 peptidai: peptidas kilęs dėl C2 aktyvacijos- C2 kininas ir bradikininas, susidaręs dėl susisiekiimo (angl.contact system) sistemos. Šie peptidai veikia postkapiliarines venules, priversdami endotelines ląsteles susitraukti, suformuojant plyšius, leidžiančius nutekėti plazmai. Yra dvi HAE genetiškai determinuotos formos:

- Tipas I, C1 inhibitoriaus genas yra defektyvus , todėl nesusidaro transkriptai.
- Tipas II, yra taškinė C1 inhibitoriaus geno mutacija, todėl yra sintetinės nenormalios ląstelės.

Šie ligų tipų skirtumai yra labai reikšmingi diagnostikoje: nustatant II tipo HAE neužtenka vien tik C1 inhibitoriaus kiekybinio tyrimo kraujo plazmoje, taip pat turi būti atliekamas ir C4 tyrimas, kurio kiekis kraujo serume bus sumažėjęs dėl neužslopintos C1 veiklos (Lekstrom-Himes, Gallin,2000).

C1 inhibitoriaus nepakankamumas gali išsivystyti ir gyvenimo eigoje: kai kuriais atvejais išsivysto autoantikūnai, kitais atvejais dėl monokloninės B ląstelių proliferacijos (chroninės limfocitinės leukemijos, daugybinės mielomos, B ląstelių limfomos atvejais). Tokių pacientų kraujyje vystosi anti-idiotipai prieš nuosavus imunoglobulinus, idiotipinė-anti-idiotipinė reakcija dėl nežinomų priežasčių sukelia C1, C4 ir C2, ir C1 inhibitorių sunaudojimą bei C3 konvertazės formavimosi (kuri sukelia C3 kaupimą ir pašalinimą nuo komplemento komplekso).

8. Medžiagos ir tyrimo metodai

8.1. Pacientai

Vaikų nosiaryklės mikrofloros tyrimas buvo atliekamas, gavus Lietuvos bioetikos komiteto leidimą (Nr.: 58). Ištirtas 601 vaikų kolektyvą lankantis vaikas. Visi vaikai lankė Vilniaus miesto lopšelių-darželius. Trylika ikimokyklinio ugdymo įstaigų geografiškai parinktos taip, kad atspindėtų viso miesto teritoriją. Vaikų amžius–nuo 2 iki 7 metų imtinai.

Tirti reliatyviai sveiki vaikai (tyrimo dieną atvykę į darželį), kai kuriems stebėti lengvi kataro reiškiniai. Keletą dienų prieš tyrimą tėvai buvo paprašyti pasirašyti sutikimo dalyvauti tyrime formą, užpildyti specialiai parengtą anketą apie vaikų sveikatos būklę ir naudotus antibakterinius preparatus. Tirti tik į anketos klausimus atsakiusių ir sutikimo formą užpildžiusių tėvų vaikai.

8.2. Mikrobiologinių kultūrų auginimas

VU vaikų ligoninės mikrobiologinėje laboratorijoje streptokokai ir stafilokokai buvo identifikuojami naudojant įprastus laboratorinius metodus (Ruoff ir kt., 1995) ir nustatomas jų jautrumas antibakteriniams preparatams, naudojant standartinius laboratorinius metodus, patvirtintus CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, anksčiau žinomame kaip NCCLS). Laboratorijoje bandiniai buvo sėjami į selektyvias mitybines terpes. Pasėliai auginami kraujo agare 5-10 proc. CO₂ atmosferoje.

Iš kultūrų, išaugusių ant selektyvių mitybinių terpių, buvo ruošiama pneumokokų suspensija, kurioje būtų 12×10^8 ląstelių/ml; ląstelių skaičius nustatomas nefelometriniu metodu pagal McFarland standartą. Paruošta suspensija buvo naudojama imunofermentinėje analizėje plokštelių dengimui, nustatant specifinius antikūnus atskiriems išaugintiems pneumokokų serotipams.

S.pneumoniae serotipai nustatyti naudojant komercinį antiserumo rinkinį Pneumotest-Latex iš Statens Serum Institut.

8.3. Medžiagos, buferiniai tirpalai, terpės

Pneumokokų ląstelės sienelės polisacharidų mišinys (CWPS Multi) (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark); orto-fenilendiaminas (Merck, Vokietija), neorganinės druskos (Sigma, Vokietija); streptavidino ir peroksidazės konjugatas (Invitrogen, JAV), Sulfo-NHS-LC-biotinas, Kat. Nr. 21338 (Pierce, JAV).

S. pneumoniae serotipai nustatyti naudojant komercinį antiserumo rinkinį Pneumotest-Latex (Kat. Nr. 51823) iš Statens Serum Institut (Copenhagen, Denmark).

Standartiniai serumai: Tarptautinės Sveikatos Organizacijos standartas žmogaus IgA, IgM, IgG nustatymui – serumas 67/086 (NIBSC, Didžioji Britanija); standartinis serumas specifinių *Streptococcus pneumoniae* IgA, IgM, IgG klasių antikūnų nustatymui 89SF-5 (CBER, US Food and Drug Administration, JAV); sIgA (MP Biomedicals, JAV).

Buferinis tirpalas PBS (NaCl-8g/l, KCl-0,2g/l, Na₂HPO₄-1,14g/l, KH₂PO₄-0,2g/l, pH 7,2).

MAk konjugavimas su biotinu. PBS tirpalas, biotino tirpalas (Sulfo-NHS-LC-biotinas, Pierce, JAV, Kat. Nr. 21338).

8.4. Imunofermentinis metodas -ELISA

]

Mėginio paruošimas: Seilių mėginiai buvo šildomi 56°C temperatūroje 15min., po to centrifuguojami 13000 g 10min.

MAk konjugavimas su biotinu (<http://www.piercenet.com>). Monokloninių antikūnų preparatas dializuojamas 1 l PBS per naktį 4°C-8°C temperatūroje. Po dializės spektrofotometriškai nustatoma monokloninių antikūnų koncentracija. Žymėjimui biotinu naudojama 1 mg/ml monokloninių antikūnų koncentracija. 1 ml paruoštų antikūnų sumaišomas su 27 µl paruošto biotino tirpalo (Sulfo-NHS-LC-biotinas) ir paliekama 4 val. 18-22°C temperatūroje periodiškai maišant. Mažinant antikūnų kiekį, biotino kiekis mažinamas

proporcingai. Reakcijai pasibaigus, mišinys dializuojamas 1 l PBS per naktį 4°C-8°C temperatūroje. Darbinis konjugatų praskiedimas nustatomas tiesioginiu ELISA metodu.

8.4.1. Pagrindiniai ELISA metodo vykdymo etapai ir sąlygos:

1. Antigenų (antikūnų) sorbcija polistirolinėje plokštelėje.

Baltymų sorbcija kietoje fazėje. Baltymams sorbuoti naudota 96-ių šulinėlių polistirolinė plokštelė (*MaxiSorp, Nunc, Danija*). Baltymų tirpalai skiedžiami PBS iki koncentracijos 5-10 µg/ml ir pilami į šulinėlius po 50 µl. Plokštelės paliekamos 18 val. +4°C temperatūroje.

Polisacharidų sorbcija kietoje fazėje. Pneumokokų ląstelės sienelės polisacharidams (CWPS) sorbuoti naudota 96-ių šulinėlių polistirolinė plokštelė (*PolySorp, Nunc*). CWPS tirpalai skiedžiami PBS iki koncentracijos 20 µg/ml ir pilami į šulinėlius po 50 µl. Plokštelės paliekamos 37° C temperatūroje 18 val. išdžiūti.

Streptococcus pneumoniae sorbcija kietoje fazėje. Pneumokokams sorbuoti naudota 96-ių šulinėlių polistirolinė plokštelė (*PolySorp, Nunc*). Bakterijų suspensija skiedžiama iki $2,4 \times 10^8$ ląstelių/ml ir pilama į šulinėlius po 50 µl. Plokštelės paliekamos 37° C temperatūroje 18 val. išdžiūti.

2. Laisvo šulinėlių ploto blokavimas. Blokavimui naudojamas 0.2 proc. jaučio albumino (Sigma, JAV) tirpalas. Į kiekvieną šulinėlį įpilama po 100 µl tirpalo ir 1,5 val. inkubuojama 37° C temperatūroje.

3. Inkubacija su tiriamais pavyzdžiais. Pavyzdžiai ir standartiniai tirpalai skiedžiami PBS su 0.05 proc. Tween-20 (Merck, Vokietija). Darbinis tūris-50 µl/šulinėliui. Inkubuojama 37° C temperatūroje 1,5 val., nustatant visų klasių specifinius antikūnus prieš pneumokokus, naudotas seilių pavyzdžių praskiedimas-1/10. Nustatant bendrą atskirų klasių imunoglobulinų kiekį, seilių pavyzdžiai buvo skiedžiami: IgA ir IgG – 1/1000, sIgA – 1/400, IgM – 1/100.

4. Inkubacija su konjugatais. Konjugatai praskiedžiami iki darbinio praskiedimo PBS su Tween-20, pilama po 50 µl konjugato tirpalo ir inkubuojama 1 val. 37° C temperatūroje.

5. Inkubacija su peroksidaze žymėtu streptavidinu. Konjugatas praskiedžiamas iki darbinės koncentracijos (1/18000) PBS su Tween-20, pilama po 50 µl konjugato tirpalo ir inkubuojama 40 min. 37° C temperatūroje.

6. Praplovimas. Po kiekvienos inkubacijos plokštelė iškratoma ir tris kartus praplaunama PBS su 0.05 proc. Tween-20.

7. Peroksidazinio aktyvumo nustatymas. Substratu naudojamas orto-fenilendiamino/ H₂O₂ mišinys. Substratinis buferis ruošiamas prieš pat naudojimą. 5 mg substrato ištirpinami 10 ml 0.025 M natrio acetatinio buferio pH 5,5 ir pripilama 30 µl 19 proc. H₂O₂. Į šulinėlius pilama po 100 µl substratinio tirpalo. Vykstant fermentinei reakcijai, šulinėliuose esantis bespalvis tirpalas geltonai nusidažo per 10-15 min. Fermentinė reakcija sustabdoma į šulinėlius pilant po 50 µl 2 M H₂SO₄. Šulinėlių optinis tankis matuojamas daugiakanaliu spektrofotometru ELx800 (BioTek, JAV).

8.5. Statistinis rezultatų įvertinimas

Visi skaičiavimai atliekami, naudojant kompiuterines programas "Gen5", "Excel" ir "SPSS 17.0". Buvo apskaičiuoti statistinių duomenų vidurkiai, medianos ir standartiniai nuokrypiai. Įvertinant duomenis taikytas Kolmagorovo-Smirnovio testas, lyginant duomenų grupes, naudojami nparametrinis Mann-Whitney ir Kruskal-Wallis statistiniai testai. Statistinė koreliacija tarp atskirų duomenų grupių buvo vertinama pagal Spirmeno koeficientų dydį.

Rezultatai ir jų aptarimas

9.1. Serologiniai tyrimai

Ištirtas 601 vaikas nuo 2 iki 7 metų amžiaus (vidutinis vaikų amžius- 5,1 metai). Iš jų 297 mergaitės (49 proc.) ir 304 berniukai (51 proc.).

Streptococcus pneumoniae išaugo iš 280 vaikų tepinėlių pasėliuose (47 proc.). Viso rasti 22 skirtingi serotipai. Iš visų rastų *S. pneumoniae* serotipų dažniausiai nustatyti-23F tipo (14 proc. visų tirtų vaikų), 19F (14.4 proc.), 6B (7.8 proc.), 6A (7.4 proc.), 3 (6.2 proc.) ir 18C(5.4 proc.)(2 lentelė). Kiti *S. pneumoniae* serotipai sudarė mažiau, nei 2 proc. visų išaugintų pneumokokų. Vyravo invaziniai (galintys sukelti sunkias sisteminės ligas-pneumoniją su bakteremija, bakteremiją, meningitą) pneumokokų serotipai- 23, 19, 6, 18, 3.

2 lentelė.Tyrimo metu išaugę pagrindiniai serotipai ir grupės dydžio procentinė išraiška nuo visų serotipų kiekio.

Serotipai	Grupės dydis	Procentai	Serotipas	Grupės dydis	Procentai	Serotipas	Grupės dydis	Procentai
19F	37	14,4	15	7	2,7	18A	1	0,4
23F	36	14,0	11	7	2,7	9A	1	0,4
6B	20	7,8	16	6	2,3	9N	1	0,4
6A	19	7,4	19A	5	1,9	23B	1	0,4
3	16	6,2	23A	4	1,6	19	1	0,4
18C	14	5,4	18B	2	0,8	7	1	0,4
10	8	3,1	23	2	0,8	6	1	0,4
37	8	3,1	8	2	0,8	9N	1	0,4
14	8	3,1	17	2	0,8	4	1	0,4
9V	8	3,1	8	2	0,8	Bendras tirtas vaikų skaičius N=601, Pneumokokai rasti N=257		
9V	8	3,1	nežinomi	2	0,8			

Atskirai buvo nagrinėta dažnai paskutinių pusės metų laikotarpiu iki tyrimo pradžios sirgusių vaikų grupė. Šiuos vaikus atrinkome pagal užpildytų anketų duomenis, kuriose tėvai nurodė, kad vaikai sirgo kvėpavimo organų ligomis ir joms gydyti buvo skirti trys ir daugiau antibakterinių vaistų kursai. Tokius kriterijus atitinkančių vaikų viso buvo 113 (19 proc. visų tirtų vaikų). Iš jų *S. pneumoniae* išaugo 40 proc.(45 atv.) atvejų.

S. pneumoniae nešiojimas sveikų vaikų nosiaryklėje yra pagrindinis streptokokinės infekcijos šaltinis visuomenėje. Pneumokokai lengvai plinta oro-lašiniu keliu. Vilniuje *S. pneumoniae* paplitimas, mūsų tyrimo duomenimis, siekia 47 procentus. Šio tyrimo metu gauti duomenys panašūs į kaimyninių valstybių. Pvz. Estijoje *S. pneumoniae* randamas 44 proc. sveikų 1-7 metų amžiaus vaikų nosiaryklėje (Tamm ir kt., 2007), Rusijoje – Sankt Peterburge – 60 proc. (Katz ir kt. 2000).

9.2. Imunologiniai tyrimai

9.2.1 Monokloninių antikūnų savybės

Atskirų imunoglobulinų klasių koncentracijos padidėjimas ir sumažėjimas yra susijęs su įvairiais patologiniais procesais. Kai kuriais atvejais svarbu identifikuoti specifinius antikūnus prieš tam tikrą antigeną, autoantikūnus ar reumatoidinį faktorių. MAK prieš žmogaus imunoglobulinius gali būti panaudoti bendram imunoglobulinų kiekiui nustatyti bei specifiniams antikūnams aptikti imunofermentiniais metodais. Imunofermentinės sistemos ypač gali būti naudingos, nustatant imunoglobulinų kiekį seilėse, šlapime, ašarose,-t.y. tokiuose skysčiuose, kurių yra nedaug ir negalima nustatyti kitais metodais.

Imunoglobulinų koncentracijos nustatymas yra svarbus įvairių infekcijų, uždegimų bei autoimuninių, hematologinių, vėžinių ligų atvejais. IgM, IgA ir IgG koncentracija paprastai nustatoma radialinės imunodifuzijos metodu (Mancini ir kt., 1965). Greitas ir patogus imunoglobulinų koncentracijos nustatymas yra nefelometrijos būdas (Schreiber, Chiang, 1992), tačiau šiuo atveju dėl imuninių kompleksų įtakos kartais gaunami neteisingi žemi rezultatai. Nustatant imunoglobulinų kiekį elektroforezės metodu (Magnusson ir kt., 1984), gaunami reliatyvūs, bet ne absoliutūs kiekiai. Specifiniai antikūnai prieš įvairius antigenus (Engstrom ir

kt., 1988) ar imunoglobulinų kiekis seilėse (Hirvonen, Koskinen, Tolo, 1993) nustatinėjamas ELISA metodu.

Savo darbe naudojome monokloninių antikūnų (MAk) prieš žmogaus IgM, IgA, IgG, sIgA nustatymui dviepitopinį ELISA metodą. Tam panaudojome MAk, reaguojančius su skirtingomis imunoglobulino molekulės vietomis; vienas jų sorbuojamas plokštelėje, o kitas-konjuguojamas su žyme (biotinu ar fermentais). Kadangi imunoglobulinai yra gana heterogeniški baltymai, buvo parinkti MAk vienodu intensyvumu reaguojantys su visais atitinkamos klasės poklasių imunoglobulinais. Šio metodo privalumai-didesnis jautrumas (kas svarbu esant imunodeficitams), greitesnis rezultatų gavimas (6-7 valandos, lyginant su radialine imunodifuzija -1-2 dienos), be to optinis tankis registruojamas spektrofotometru, o tai padeda išvengti subjektyvumo. Naudojantis MAk prieš sIgA galima nustatyti sIgA kiekį serume, seilėse, ašarose.

9.2.2. Monokloninių antikūnų parinkimas žmogaus atskirų klasių ir specifinių imunoglobulinų nustatymui

Monokloninių antikūnų poros imunoglobulinų nustatymui pagal dr. I. Girkontaitės rekomendacijas ir parinktos atsižvelgiant į antikūnų reakcijos efektyvumą dviepitopiniame ELISA metode, o taip pat į gebėjimą rištis prie izotipui bendrų epitopų (Girkontaitė ir kt. 1996).

IgM kiekiui nustatyti buvo naudoti HI-2 MAk. Kadangi IgM molekulė yra pentameras, galima tuos pačius MAk naudoti tiek plokštelės dengimui, tiek ir konjugavimui. IgA kiekis nustatytas, naudojant CGH-7 (plokštelės dengimui) ir IA-4 (konjugavimui su biotinu) MAk prieš skirtingus IgA epitopus. IgG nustatymui buvo naudoti IG-8 MAk, kurie vienodai gerai reaguoja su visais monokloniniais ir polikloniniais IgG ir gali dalyvauti simetrinėje dviepitopinėje reakcijoje poroje su CGH-3. Sekretinis IgA buvo nustatytas seilėse dviepitopiniu ELISA metodu, naudojant CGH-7 (plokštelės dengimui) ir SA-1 (konjugavimui su biotinu) MAk prieš skirtingus IgA epitopus (SA-1 – prieš sekretinį sIgA komponentą); reakcija gaunama seilėse tik po 15 min inkubacijos 56°C temperatūroje. Visi duomenys, apie naudotas Mak poras imunoglobulinų nustatymui, pateikti 3 lentelėje.

Standartinis serumas tiksliam imunoglobulinų koncentracijos nustatymui buvo gautas iš Londono Nacionalinio biologinių standartų ir kontrolės instituto. Imunoglobulinų koncentracijos standartiniame serume: IgM – 0,847 mg/ml, IgA – 1,42 mg/ml, IgG – 8,04 mg/ml.

Atsižvelgiant į gautų MAK-ų savybes, buvo parinktos antikūnų poros tiek bendro imunoglobulinų IgA, sIgA, IgM, IgG kiekio nustatymui, tiek specifinių *Streptococcus pneumoniae* atskirų klasių imunoglobulinų nustatymui (3 lentelė). Antriniai antikūnai buvo konjuguoti su biotinu pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas, nustatyti darbiniai konjugatų praskiedimai

3 lentelė. MAK poros kiekybiniam imunoglobulinų klasių ir specifinių antipneumokokinių antikūnų nustatymui dviepitopinės ELISA metodu

Parinktos MAK poros	IgA	sIgA	IgM	IgG
Pirminiai MAK (dengimui)	CGH-7	CGH-7	HI-2	IG-8
Antriniai MAK (konjuguoti su biotinu)	IA-4-B	SA-1-B	HI-2-B	CGH-3-B

9.2.3. Bendro IgM, IgA, sIgA ir IgG klasių kiekio nustatymas seilėse

Parinktos MAK poros buvo panaudotos, kuriant testavimo sistemas bendram IgA, sIgA, IgM, IgG kiekio nustatymui vaikų seilėse, o taip pat specifinių *Streptococcus pneumoniae* šių klasių antikūnų kiekybiniam nustatymui. Testavimo sistemoje buvo panaudota biotino-streptavidino sistema, iki 4 kartų padidinanti sistemos jautrumą, lyginant su sistemomis, kai antriniai antikūnai buvo konjuguoti tiesiogiai su peroksidaze (Yolken, 1992) Imunoglobulinų kiekis buvo nustatomas pagal kalibracinių kreivių duomenis. Bendro IgA, IgM, IgG kiekio nustatymui buvo panaudot Londono Nacionalinio biologinių standartų ir kontrolės instituto standartas, sIgA-sIgA iš MP Biomedicals (JAV), o specifinių pneumokokams89SF-5 standartas iš CBER, US Food and Drug Administration (JAV). Kalibracinių kreivių intervalai pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Kiekybinio imunoglobulinų nustatymo kalibracinių kreivių intervalai.

Nustatomi antikūnai	Bendras imunoglobulinų kiekis		Specifinių antikūnų kiekis	
	Maksimali nustatoma koncentracija, $\mu\text{g/ml}$	Minimali nustatoma koncentracija, ng/ml	Maksimali nustatoma koncentracija, $\mu\text{g/ml}$	Minimali nustatoma koncentracija, $\mu\text{g/ml}$
IgM	0,1	0,1	300	0,14
IgG	0,1	0,1	300	0,14
IgA	0,1	0,1	300	0,14
sIgA	1	1	300	0,14

Iš gautų kalibracinių kreivių galima tiksliai nustatyti imunoglobulinų koncentraciją (jautrumo ribas). Viršutine jautrumo riba laikoma tokia imunoglobulino koncentracija, kuriai esant kalibracinė kreivė dar neužlinkusi, išlaiko savo tiesinę priklausomybę. Apatine jautrumo riba laikoma tokia imunoglobulino koncentracija, kuriai esant optinio tankio reikšmė yra du kartus didesnė už fono reikšmę.

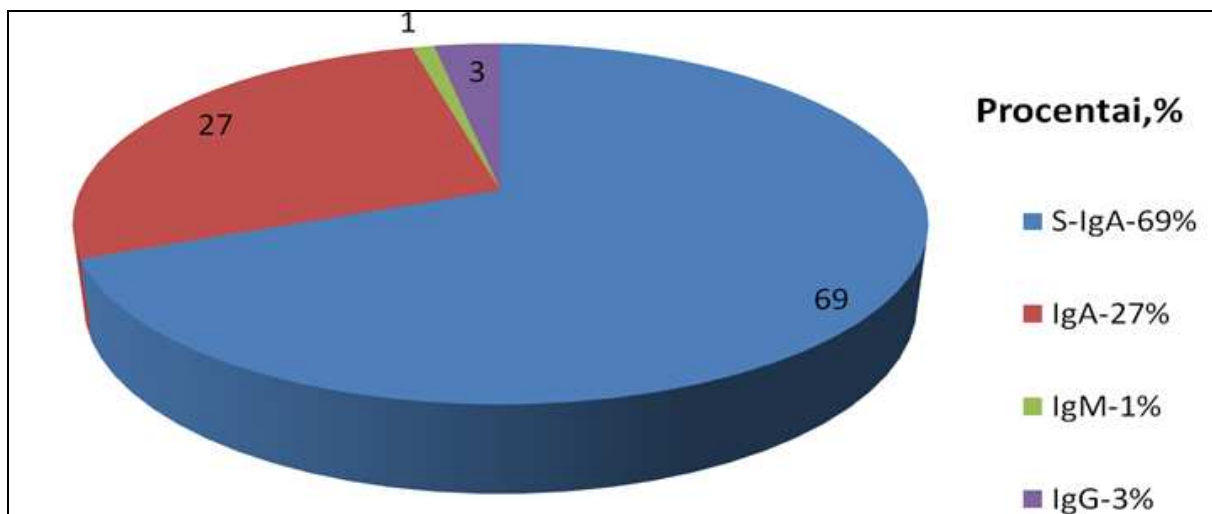
Iš surinktų 601 vaikų mėginių, ištirti 129 vaikų, neturinčių nosiaryklėje pneumokokų (noncarriers), ir 107 vaikų, pas kuriuos iš nosiaryklės tepinėlio išaugo pneumokokai (carriers), seilių bandiniais ir nustatyta:

- bendras IgA, S-IgA, IgM ir IgG imunoglobulinų kiekis mililitre seilių bandinio,
- specifinių ląstelės sienelės polisacharidams (CWPS) antikūnų kiekis (IgA CWPS, IgM CWPS ir IgG CWPS),
- specifiniai antikūnai, sąveikaujantys su 3, 6B, 14, 18C, 19F, 23F serotipų pneumokokais (IgA Pn, IgM Pn, IgG Pn).

5 lentelė. Vaikų, neturinčių pneumokokų, ir nešiotojų atskirų imunoglobulinų klasių pasiskirstymo statistiniai duomenys.

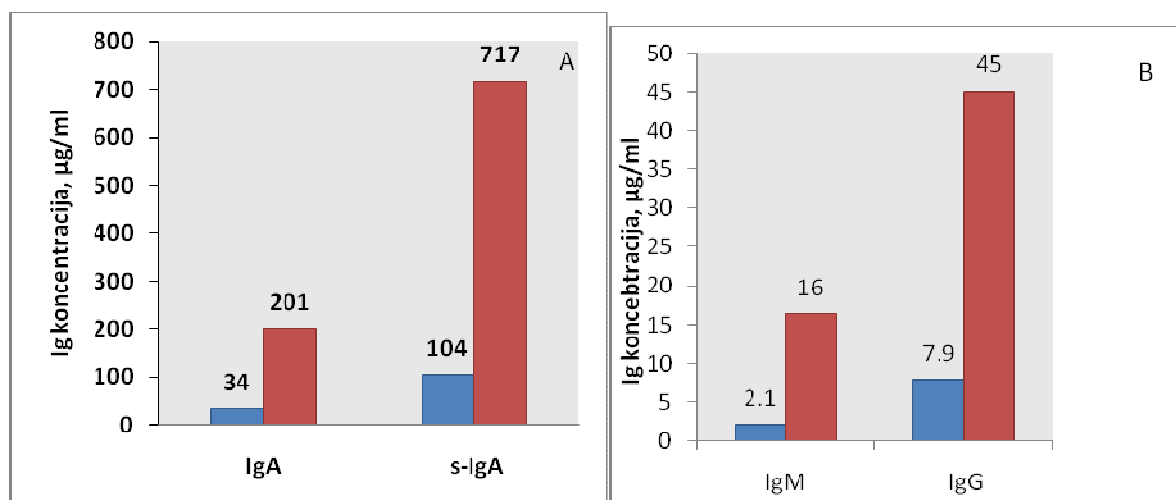
Ig klasė	Vidurkis	Mediana	Standartinis nuokrypis	Minimali reikšmė	Maksimali reikšmė	Procentilės		
	μg/ml	μg/ml		μg/ml	μg/ml	25	50	75
Nenešiotojai, vaikai neturintys pneumokokų (noncarriers) (N=129)								
IgA	36	24	37	3	307	15.5	24	43
S-IgA	102	72	95	7.6	662	43	72	123
IgM	1.9	1.5	1.8	0.1	12.1	0.8	1.5	2.3
IgG	7.5	4	10.1	0	71	2	4	9
Nešiotojai (carriers) (N=107)								
IgA	197	13	131	20	595	103	170	284
S-IgA	695	53	549	14	2426	277	592	977
IgM	14.7	1.4	14.2	0	90	3.6	12.6	21.6
IgG	42	5.5	57	0	318	0.0	32	57

Visų imunoglobulinų klasių duomenų pasiskirstymas – nenormalinis (pagal Kolmogorovo-Smirnov testą; didelis neatitikimas tarp vidurkio ir medianos), todėl lyginant atskirų grupių duomenis buvo taikyti neparametriniai testai (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Spearman's koreliacija).



7 pav. Procentinis atskirų imunoglobulinų klasių pasiskirstymas 2-7 metų vaikų seilėse.

Pagal neparametrinį Mann-Whitney Rank Sum testą visų imunoglobulinų klasių skirtumai tarp vaikų grupių, pas kurią nerasta pneumokokų ir pneumokokų nešiotų, yra statistiškai patikimi ($p < 0,001$, IgG atveju $p = 0,005$).



8 pav. Atskirų klasių imunoglobulinų kiekio pasiskirstymas pagal medianą 2-7 m. vaikų seilėse tarp pneumokokų nešiotų ir vaikų, pas kuriuos pneumokokų nerasta. A – IgA ir S-IgA klasės imunoglobulinai, B – IgM ir IgG klasės imunoglobulinai.

Buvo bandoma išsiaiškinti, ar yra imunoglobulinų kiekių pasiskirstymų skirtumai tarp amžiaus (tirtos 2-4 m. ir 5-7 m. grupės), skirtingų lyčių nešiotojų ir sąlyginai sveikų (pneumokokų nerasta) vaikų grupėse. Apibendrinti duomenys pateikti 6 lentelėje.

6 lentelė. Imunoglobulinų kiekio pasiskirstymo pagal lytį, amžių ir serotipus 3, 6B, 14, 18C, 19F, 23F (nešiotojai) statistinis patikimumas pagal Kruskal-Wallis testą.

Imunoglobulinų klasė	Lytis, (N=129)	Amžius (N=129)	Lytis, (N=107)	Amžius (N=107)	Serotipas (N=107)
IgA	-	+	-	+	+
S-IgA	-	+	-	+	+
IgM	-	-	-	-	+
IgG	-	-	-	-	+
IgA CWPS	-	-	-	-	+
IgM CWPS	-	-	-	-	-
IgG CWPS	-	-	-	-	-
PnIgA	N	N	-	-	+
PnIgM	N	N	-	-	+
PnIgG	N	N	-	-	+

- Statistiškai patikimų skirtumų nėra ($p > 0,05$), + $p < 0,01$, N - nenustatoma.

Pagal Kruskal-Wallis (6 lentelė) testą statistiškai patikimo skirtumo tarp mergaičių ir berniukų grupių pagal bendrą ar specifinių antikūnų kiekį nebuvo rasta ($p > 0,05$). Tačiau nustatytas statistiškai patikimas IgA ir S-IgA pasiskirstymo tarp dviejų amžiaus grupių skirtumas: 2-4 metų vaikai reikšmingai dažniau turi pneumokokus nei 5-7 metų vaikai (5 lentelė). Abiem atvejais vyresni vaikai turėjo reikšmingai didesnę A klasės imunoglobulinų kiekį: IgA ir S-IgA. Taip pat rastas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas pagal serotipus tarp pneumokokų nešiotojų bendro imunoglobulinų kiekio IgA, S-IgA, IgM ir IgG ir specifinių IgA Pn, IgM Pn,

IgG Pn (7 lentelė). Didžiausias procentas vaikų, pas kuriuos bendrų imunoglobulinų produkcija viršijo medianą, sietinas su 18C ir 19F serotipais, o visų imunoglobulinų klasių atveju mažiausias procentas – su 23F serotipu. Panašūs rezultatai gauti ir specifinių IgA Pn antikūnų atveju. Specifinių IgM Pn antikūnų atveju intensyviausia jų produkcija seilėse buvo pas 19F serotipo nešiotojus(6 lentelė).

7 lentelė. Bendrų ir specifinių imunoglobulinų pasiskirstymo pagal serotipus dažniai, išreikšti procentais vaikų, kurių imunoglobulinų kiekis viršija medianą.

Imunoglobulinų klasė	Mediana, $\mu\text{g/ml}$	Serotipas						p*
		3	6B	14	18C	19F	23F	
IgA	164	69	57	20	78	70	8	0.000
S-IgA	592	62	60	20	78	70	4	0.000
IgM	12.6	54	53	40	56	57	13	0.022
IgG	32	62	63	60	33	61	13	0.002
IgA Pn	20.4	46	50	20	67	74	29	0.031
IgM Pn	3.3	23	77	60	11	91	4	0.000
IgG Pn	2.1	54	77	40	56	48	17	0.001

* Kruskal-Wallis testas

Straipsniuose pateikiama daug duomenų apie atskirų klasių imunoglobulinų kiekius, aptinkamus suaugusių ar įvairaus amžiaus vaikų serumuose, bet labai mažai duomenų pateikiama apie seilėse nustatytą imunoglobulinų kiekį, lieka neaiškios normos ribos (Proctor, 2001). Iš pateiktų duomenų statistiškai patikimų normos ribų taip pat negalime rekomenduoti.

Tyrimo metu buvo nustatyti vaikai, kurių seilėse visiškai neaptikta A klasės imunoglobulinų (8 lentelė). IgA nepakankamumas serume ($< 0,05 \text{ mg/ml}$) – dažniausiai sutinkamas humoralinio imuniteto sutrikimas (nuo 1 iš 2000 iki 1 iš 500). Šis genetinis klasių perjungimo į IgA defektas paveikia gleivinių ir sistemines plazmines ląsteles (Brandtzaeg ir kt.,1999). Gleivinių imunitetas dar nėra pakankamai ištirtas, kad būtų pateiktas vienareikšmiškas paaiškinimas, bet manoma, kad IgM, būdamas vieninteliu, išskyrus IgA, imunoglobulinu, galinčiu prisijungti sekretinį komponentą, gali kompensuoti IgA trūkumą (Mayer,2003).

Iš 236 tiriamųjų nustatyti 3 vaikai (8 lentelė), kurių seilėse su turimu sistemos jautrumu A klasės imunoglobulinų nebuvo aptikta (IgA<0,1 ng/ml ir sIgA< 1 ng/ml). Tačiau visų trijų vaikų IgM kiekis padidintas, lyginant su mediana 3, 25, ir 18 kartų. Dviejų vaikų IgG kiekis padidintas, lyginant su mediana, 6,6 ir 13 kartų. 1 mergaitės mėginiuose iš viso nenustatytas pneumokokų augimas, kitų dviejų vaikų mėginiuose nustatyti 18C, 6A, 14, 3 serotipai. Pneumokokų serotipų augimas buvo nustatytas gausus-18C, 3 ir vidutiniškai gausus-6A, 14 serotipams. Šių vaikų tėvai nedeklaravo jokių sveikatos sutrikimų.

8 lentelė. Kiekybinio IgA, sIgA, IgM, IgG tyrimo vaikų seilėse metu nustatyti išskirtiniai atvejai

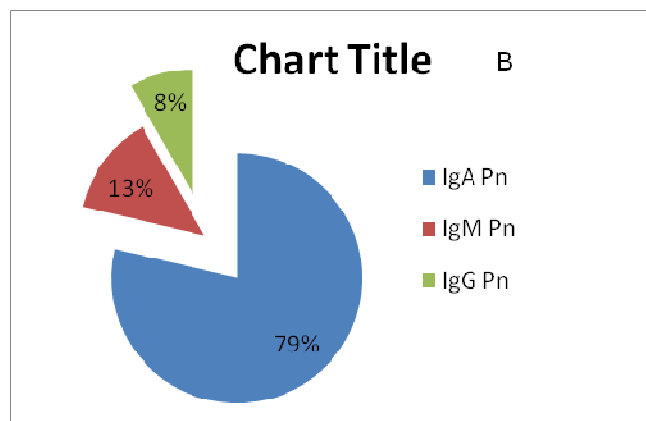
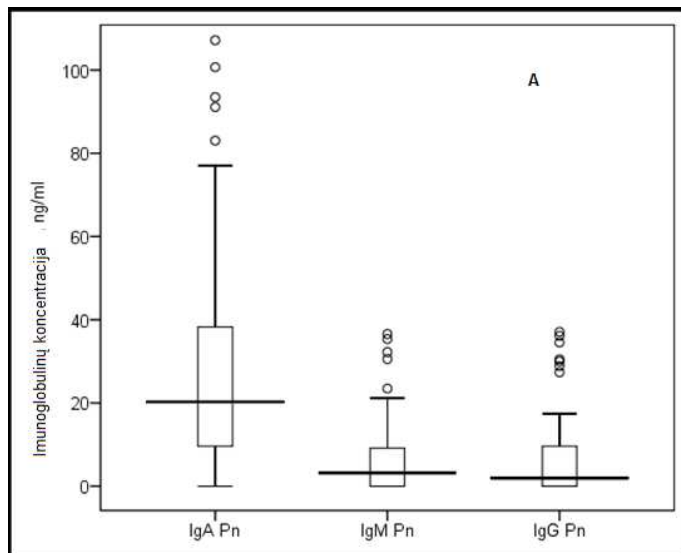
Vaiko Nr.	78	303	156
Amžius	4,8	5,9	3,9
Lytis	mergaitė	mergaitė	berniukas
IgA	0	0	0
sIgA	0	0	0
IgM	7,6	57,6	41,4
IgG	2	36,69	79,38
Pneumokokų serotipai	nerasta	18C, 3	6A, 14
Pneumokokų augimas	nerasta	gausus	negausus
Nusiskundimai	nėra	nėra	Nėra

Pagal literatūros duomenis šiuos tris išskirtinius atvejus galima būtų traktuoti, kaip imunodeficito su padidintu Ig M kiekiu atvejus, kurio metu stebimi IgG ir IgA nepakankamumai, tačiau polikloninis IgM yra sintetinas padidintais kiekiais (daugiau nei 200mg/dl) (Conley, Nortarangelo, Etzioni: 1999). Sergantys HIgM yra neatsparūs piogeninėms infekcijoms. Vertėtų toliau tirti šiuos ligonius, atlikti genetinius X chromosomos tyrimus, taip pat nustatyti autoantikūnų prieš DNR kiekius, stebėti, ar nesivysto autoimuniniai susirgimai.

9.2.4. Specifinių *Streptococcus pneumoniae* antikūnų IgA, S-IgA, IgM, IgG tyrimai

Išaugintų *S. pneumoniae* kultūrų serotipai (3, 6B, 14, 18C, 19F, 23F) naudoti kaip antigenai plokštelės dengimui. Antrinių monokloninių antikūnų sistemos naudotos tokios pat, kaip bendrų Ig nustatyme. Specifinių antikūnų kiekis buvo nustatomas pagal kalibracines kreives, gautas panaudojant standartinį serumą Pneumococcal serum, US Reference, Lot 89SF-5.

Specifinių antikūnų nenustatyta: IgA klasės – pas 1 vaiką, IgM klasės – pas 34 vaikus, IgG asės – pas 30 vaikų. Pneumokokų nešiotųjų grupė N=107.



9 pav. Specifinių *S. pneumoniae* antikūnų kiekis 2-4 m. vaikų seilių mėginiuose. A- mediana, kvartiliai, minimalios ir maksimalios reikšmės bei išskirtys, B-procentinis atskirų imunoglobulinų klasių pasiskirstymas seilėse (pagal medianą).

9 lentelė. Pneumokokų nešiotųjų atskirų imunoglobulinų klasių pasiskirstymo statistiniai duomenys (N=107).

Ig klasė	Vidurkis ng/ml	Mediana ng/ml	Standartinis nuokrypis	Mininami reikšmė ng/ml	Maksimali reikšmė ng/ml	Procentilės		
						25	50	75
IgA Pn	40	20	94	0	878	10	20	39
IgM Pn	10.6	3.3	20	0	139	0	3.3	10.1
IgG Pn	7.7	2.1	13	0	88	0	2.1	9.7

Pateikti duomenys rodo (9 lentelė), kad pagrindinę specifinių antikūnų masę sudaro IgA Pn, mažiausią – IgG Pn.

10 lentelė. Spearman's koreliacijos koeficientai, lyginant atskiras bendrų ir specifinių pneumokokams imunoglobulinų klases (N=107)

	IgA Pn	IgM Pn	IgG Pn
IgA	0.58**		
S-IgA	0,55**		
IgM		0.64**	
IgG			0.58**

** - $p < 0,01$

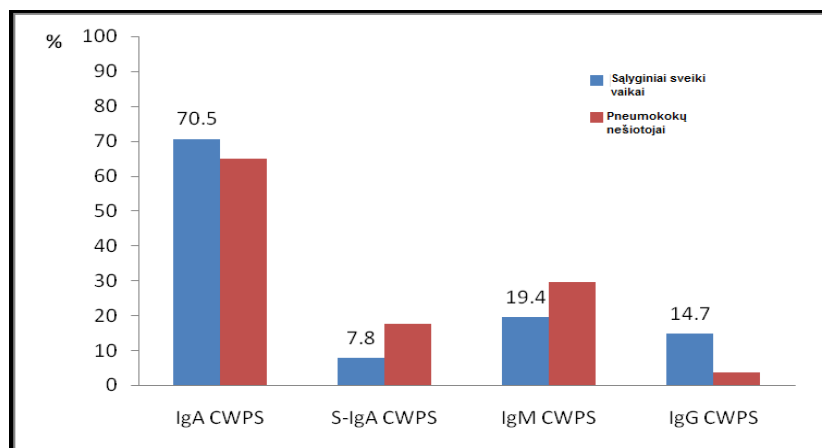
Iš 10 lentelės duomenų matome, kad koreliacija tarp bendrų ir specifinių visų klasių imunoglobulinų yra labia panaši - vidutinė teigiama (koreliacijos koeficientas apie 0,6). Silpniausias ryšys tarp A ir G klasės imunoglobulinų, stipresnis – tarp IgM klasės.

9.2.5. Specifinių *Streptococcus pneumoniae* ląstelės sienelės polisacharidui (CWPS)

antikūnų IgA, S-IgA, IgM, IgG tyrimai

Pneumokokų ląstelės sienelės polisacharidų mišinys (CWPS Multi, Statens Serum Institut, Denmark) naudotas kaip antigenas plokštelės dengimui. Antrinių monokloninių antikūnų sistemos naudotos tokios pat, kaip bendrų ir specifinių Ig nustatyme. Specifinių antikūnų kiekis nebuvo nustatomas, nes nėra standarto kiekybiniam šio tipo antikūnų įvertinimui. Specifinių CWPS antikūnų kiekiai buvo vertinami pagal absorbcijos duomenis. Įvedus atskaitos tašką (cut off), rezultatai, esantys žemiau arba lygus cut off, laikomi neigiamais (antikūnai CWPS nesudarė), o aukščiau cut off – teigiami (antikūnų prieš CWPS yra). Atskaitos taškas (pagal absorbcijos vienetų reikšmę) buvo nustatomas pagal vidutinę 10 tyrimų foninę reikšmę pridėjus dydį, lygų dviems standartiniams nuokrypiams.

Pagal literatūroje pateiktus duomenis ir tyrimų strategijas manoma, kad antikūnai prieš CWP visuomet susidaro pas pneumokokus turinčius individus, be to gausiai ir dažnai sutinkami pas sveikus žmones, nes jie anksčiau ar vėliau turi kontaktą su pneumokokais (Tuija ir kt.2008; Marchese ir kt., 2006; Rapola ir kt., 2001; Malley ir kt., 2007). Pagal gautus duomenis ne pas visus vaikus, ir net pas pačius pneumokokų nešiotojus, susidaro antikūnai prieš CWPS. Iš dalies tai galima būtų paaiškinti ribotu antikūnų cirkuliacijos ir gyvavimo laiku seilėse, o taip pat individualiomis atskiro organizmo imuninės sistemos savybėmis.



10 pav. Procentinis pasiskirstymas tarp pneumokokų nešiotojų ir vaikų, pas kuriuos nerasta pneumokokų, pagal atskirų klasių antikūnų prieš CWPS susiformavimą.

Apie 70 proc. vaikų, nepriklausomai nuo pneumokokų nešiojimo, turi specifinius IgA klasės antikūnus prieš ląstelės sienelės polisacharidus. S-IgA ir IgM klasės antikūnų kiekis didesnis pas pneumokokų nešiotojus. IgG klasės – daugiau pas vaikus, neturinčius pneumokokų. Gauti rezultatai rodo, kad specifinių pneumokokų ląstelės senelei antikūnai išlieka ilgesnį laiką, kai infekcinis mikroorganizmas jau nebeaptinkamas nosiaryklėje.

11 lentelė. Spearman's koreliacijos koeficientai, lyginant atskiras bendrų ir specifinių ląstelės sienelės polisacharidams imunoglobulinų klases (N=107).

	IgA CWPS	IgM CWPS	IgG CWPS
IgA Pn	0.43**		
IgM Pn		0.48**	
IgG Pn			0.19
IgA	0.50**		
S-IgA	0,56**		
IgM		0.53**	
IgG			0.27*

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$

Koreliacija tarp bendrų IgG ir specifinių IgG CWPS - pati silpniausia ir statistiškai nepatikima. Stipriausia koreliacija tarp bendrų ir specifinių A klasės imunoglobulinų (S-IgA - IgA CWPS). Taip pat vidutinio stiprumo ryšys tarp IgM ir specifinių IgM CWPS.

Taigi, pneumokokų diagnostikai seilėse tinkamiausias būtų A klasės specifinių imunoglobulinų tyrimas, nes, nežiūrint į aukštesnius M klasės koreliacijos koeficientus, jų kiekis bendroje imunoglobulinų masėje yra mažiausias.

Išvados

- Serologinių tyrimų rezultatai parodė, kad *Streptococcus pneumoniae* paplitimas Vilniaus ikimokyklinio amžiaus vaikų nosiaryklėje sudaro apie 50 proc.; paplitimas Lietuvoje panašus, kaip ir kaimyninėse valstybėse.
- Viso rasti 22 skirtingi serotipai. Vyravo invaziniai pneumokokų serotipai (23F, 19, 6, 18).
- Imunologiniai seilių mėginių tyrimai įrodo aktyvų gleivinių humoralinio imuniteto dalyvavimą vaikų organizmo gynybinėje sistemoje: tik pas 2,6 proc. pneumokokų nešiotojus nesusidarė specifiniai antikūnai. Aktyviausias vaidmuo atitenka seilėse gausiausiai sutinkamiems imunoglobulinams IgA ir sIgA.
- Nustatyta vidutinė koreliacija ($r=0,4\div 0,6$) tarp bendro imunoglobulino kiekio ir specifinių antikūnų kiekio.
- Specifinių antikūnų kiekio vertinimas imunofermentiniu metodu yra greitesnis ir patogesnis, lyginant su kitais metodais, o jų nustatymas seilių mėginiuose padeda išvengti sudėtingos kraujo ėmimo procedūros iš venos, kas labai aktualu dirbant su mažais vaikais.

Darbo vadovė dr. Raimonda Kvietkauskaitė

Darbą atliko Daiva Levinaitė-Zaher

Padėkos

Dėkojame prof.V.Usoniui ir doktorantei S.Petraitienei, kurių dėka buvo inicijuotas šis darbas; VU Vaikų ligoninės mikrobiologinės laboratorijos vedėjai G.Bernatonienei už darbo organizavimą serotipuojant ir auginant mikrobiologines kultūras.

Literatūros saraksts:

1. Aanensen, D. M., A. Mavroidi, S. D. Bentley, P. R. Reeves, and B. G. Spratt. 2007. Predicted functions and linkage specificities of the products of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J. Bacteriol.* 189:7856–7876
2. Angeliki Mavroidi, David M. Aanensen, Daniel Godoy, Ian C. Skovsted, Margit S. Kalsoft, Peter R. Reeves, Stephen D. Bentley⁴ and Brian G. Spratt, Genetic Relatedness of the *Streptococcus pneumoniae* Capsular Biosynthetic Loci, 2007
3. Aniansson G, Alm B, Andersson B, Larsson P, Nylén O, Peterson H, Rigner P, Svanborg M, Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill C B, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronan. *Cell.* 1992; 61:1303–1313. [[PubMed](#)]
4. Baker, C J.; Edwards, M S. Group B streptococcal infections. In: Remington J, Klein J O. , editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 4th ed. Philadelphia, Pa: The W. B. Saunders Co.; 1995. pp. 980–1054.
5. Barrett DJ, Sleasman JW, Schatz DA, Steinitz M. Human anti-pneumococcal polysaccharide antibodies are secreted by the CD5-B cell lineage. *Cell Immunol* 1992; 143:66-70.
6. Bentley, S. D., D. M. Aanensen, A. Mavroidi, D. Saunders, E. Rabinowitsch, M. Collins, K. Donohoe, D. Harris, L. Murphy, M. A. Quail, G. Samuel, I. C. Skovsted, M. S. Kalsoft, B. Barrell, P. R. Reeves, J. Parkhill, and B. G. Spratt. 2006. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* 2:e31.
7. Bernstein JM, Scheeren R, Schoenfeld E, Albin B. The distribution of immunocompetent cells in the compartments of the palatine tonsils in bacterial and viral infections of the upper respiratory tract. *Acta Otolaryngol* 1988; 454:S153-62.
8. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 1992; 138:249-59.
9. Bouvet JP, Fischetti VA. Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect Immun* 1999; 67:2687-91.
10. Brandtzaeg P, Bækkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johansen FE, Nielsen EM, Yamanaka T. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today* 1999; 20:141-51.
11. Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen FE, Morton HC, Norderhaug IN, Yamanaka T. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev* 1999; 171:45–87.
12. Briles D E, Hollingshead S K, Swiatlo E, Brooks-Walter A, Szalai A, Virolainen A, McDaniel L S, Benton K A, White P, Prellner K, Hermansson A, Aerts P C, Van Dijk H, Crain M J. PspA and

- PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist.* 1997; 3:401–408. [[PubMed](#)]
13. Brown EJ, Hosea SW, Frank MM. The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. *Rev Infect Dis* 1983;5:S797-805
 14. Buckley RH. Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes. *N Engl J Med* 2000; 343:313
 15. Cieslewicz, M. J., D. Chaffin, G. Glusman, D. Kasper, A. Madan, S. Rodrigues, J. Fahey, M. R. Wessels, and C. E. Rubens. 2005. Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infect. Immun.* 73:3096– 3103.
 16. Clustering of serotypes in a longitudinal study of *Streptococcus pneumoniae* carriage in three day care centres Tuija Leino*, Fabian Hoti, Ritva Syrjänen, Antti Tanskanen, Karri Auranen. *BMC Infectious Diseases* 2008, **8**:173.
 17. Cobney JT, Orkin SH, Dinanur Mc. Genetic disorders of phagocyte function. 1994, 443.
 18. Conley ME, Nortarangelo LD, Etzioni A: Diagnostic Criteria for Primary immunodeficiencies: *Clin Immunol* 1999; 93:190-197.
 19. Conley ME, Nortarangelo LD, Etzioni A: Diagnostic Criteria for Primary immunodeficiencies: *Clin Immunol* 1999; 93:190-197.
 20. Conley ME. Molecular approaches to analysis of X-linked immunodeficiencies. *Ann Rev Immunol* 1992; 10:215
 21. Crain M J, Waltman W D II, Turner J S, Yother J, Talkington D F, McDaniel L S, Gray B M, Briles D. E. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1990; 58:3293– 3299. [[PubMed](#)]
 22. Crook J. Tharpe JA. Johnson SE. Williams DB. Stinson AR. Facklam RR. Ades EW. Carlone GM. Sampson JS. Immunoreactivity of five monoclonal antibodies against the 37-kilodalton common cell wall protein (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5:205-10.
 23. Cundell D R, Pearce B J, Sandros J, Naughton A M, Masure H R. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. *Infect Immun.* 1995; 63:2493–2498. [[PubMed](#)]
 24. Darville T. Jacobs RF. Lucas RA. Caldwell B. Detection of *Haemophilus influenzae* type b antigen in cerebrospinal fluid after immunisation. *Ped Inf Dis J* 1992;11:243-4.
 25. Engstrom PE et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the IgA subclass distribution of antigen-specific antibodies. *J.Immunol.Method.* 1988, V.115, p.45-53.

26. Fagarasan S, and Honjo T. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces *Curr Opin in Immunology* 2004, 16:277–283.
27. Fehr T. Naim HY. Bachmann MF. Ochsenbein AF. Spielhofer P. Bucher E. Hengartner H. Billeter MA. Zinkernagel RM. T-cell independent IgM and enduring protective IgG antibodies induced by chimeric measles viruses. *Nat Med* 1998; 4:945-8.
28. Feldman C, Munro N C, Jeffery P K, et al. Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992; 5:416–423.
29. Ferrante A, Rowan-Kelly B, Paton JC. Inhibition of *in vitro* human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun* 1984; 46:585-9.
30. Girkontaitė I, Leckienė M, Tročiuk I, Giedraitis V, Mauricas M. A rapid ELISA test for detection of human paraproteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996; 34(4):349-53.
31. Gowans JL, Knight EJ. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc Roy Soc (Ser B)* 1964; 159:257-82.
32. Gray BM, Converse GM, Huhta N, Johnston RB Jr, Pichichero ME, Schiffman G, Dillon HC Jr. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody response to nasopharyngeal carriage of types 3, 19 and 23. *J Infect Dis* 1982; 144:312-8.
33. Griffioen AW, Franklin SW, Zegers BJM, Rijkers GT. Expression and functional characteristics of the complement receptor type 2 on adult and neonatal B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;69:1
34. Haraldsson A., Jaminon M., Bakkeren J.A.J.M., Stoelinga G.B.A., Weemaes C.M.R. Immunoglobulin G, A and M light chain ratios in some humoral immunological disorders //*Scand.J.Immunol.* 1992, V.36, p.57-61.
35. Heikkinen T. Thint M. Chonmaitree T. Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media. *N Engl J Med* 1999; 340:260-4.
36. Henderson FW, Giebink GS. Otitis media among children in day care: epidemiology and pathogenesis. *Rev Infect Dis* 1986; 8:533-8.
37. Hendley JO, Sande MA, Stewart PM, Qwaltney JM Jr. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families I. Carriage rates and distribution of types. *J Infect Dis* 1975; 132:55-61.
38. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2759-62.
39. Hirvonen M, Koskinen S., Tolo T. A sensitive enzyme immunoassay for the measurement of low concentration of IgA //*J.Immunol Methods*, 1993, V.163, p.59-65

40. Holzer TH, Edwards KM, Gewurz H, Mold K. Binding of C-reactive protein to the pneumococcal capsule or cell wall results in differential localization of C3 and stimulation of phagocytosis. *J Immunol* 1984; 133:1424-30.
41. Hostetter MK. Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: Implications for phagocytosis and antibody production. *J Infect Dis* 1986; 153:682-93. 57
42. <http://www.piercenet.com>
43. Jernigan D B, Cetron M S, Breiman R F. Minimizing the impact of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* (DRSP): a strategy from the DRSP working group. *JAMA*. 1996; 275:206–209. [\[PubMed\]](#)
44. Johnston R B Jr. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev Infect Dis*. 1991; 13:S509–S517. [\[PubMed\]](#)
45. Kamerling, J. P. 2000. Pneumococcal polysaccharides: a chemical view, p.81–114. *In* A. Tomasz (ed.), *Streptococcus pneumoniae: molecular biology and mechanisms of disease*. Mary Ann Liebert Inc., Larchmont, NY.
46. Katz A, Leibovitz E, Timchenko VN, Greenberg D, Porat N, Peled N, Dagan R, Ossipov IB. Antibiotic susceptibility, serotype distribution and vaccine coverage of nasopharyngeal and oropharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in a day-care centre in St. Petersburg, Russia. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(4):293-8
47. Kauppi M, Eskola J, Käyhty H. Anti-capsular polysaccharide antibody concentrations in saliva after immunisation with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:286-94.
48. Kauppi M, Saarinen L and Käyhty H. Anti-capsular antibodies reduce nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* type b in infant rat. *J Infect Dis* 1993; 167:365-71.
49. Käyhty H, Karanko V, Peltola H, Mäkelä PH. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunisation: no evidence of immunologic tolerance or memory. *Pediatrics* 1984; 74:857-65.
50. Kett K, Brandzaeg P, Radl J, Haaijman JJ. Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues. *J Immunol* 1986; 136:3631-5.
51. Kilpi T, Syrjänen R, Herva E, Karjalainen T, Eskola J, Takala A. Pneumococcal serotypes in acute otitis media; a prospective cohort study of 329 children. *In: 7th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media*. Fort Lauderdale, Florida. June 1999.

52. Kolkman, M. A., B. A. van der Zeijst, and P. J. Nuijten. 1997. Functional analysis of glycosyltransferases encoded by the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *J. Biol. Chem.* 272:19502–19508.
53. Kolkman, M. A., B. A. van der Zeijst, and P. J. Nuijten. 1997. Functional analysis of glycosyltransferases encoded by the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *J. Biol. Chem.* 272:19502–19508.
54. Korkeila M, Lehtonen H, Åhman H, Odile L, Eskola J, Käyhty H. Salivary anti-capsular antibodies in children immunised with *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide conjugate vaccine. *Vaccine* 1999; in press.
55. Koskela M, Leinonen M, Luotonen J. Serum antibody response to pneumococcal otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1982; 1:245-52.
56. Lanzavecchia A. Antigen presentation by B lymphocytes: a critical step in T-B collaboration. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986; 130:65-78.
57. Layton G.T, Stanworth D.R. The quantitation of IgG4 antibodies to three common food allergens by ELISA with monoclonal anti-IgG4//*J.Immunol.Methods*, 1984, V.73, p.347-56
58. Lee CJ, Banks SD, Li JP. Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Critical Rev Microbiol* 1991; 18:89-114.
59. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 2000,333:43
60. Llull, D., R. Lo´pez, and E. Garc´ıa. 2001. Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Curr. Mol. Med.* 1:475–491.
61. Lock R A, Paton J C, Hansman D. Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog.* 1988; 5:461–467. [[PubMed](#)]
62. Luotonen J, Herva E, Karma P, Timonen M, Leinonen M, Mäkelä PH. The bacteriology of acute otitis media in children with special reference to *Streptococcus pneumoniae* as studied by bacteriological and antigen detection methods. *Scand J Infect Dis* 1981; 13:177-83.
63. Magnusson C.G.M, Delacroix D.L, Vaerman J.P, Masson P.L. Typing of subclasses and light chains of human monoclonal immunoglobulins by particle counting immunoassay (PACIA) //*J.Immunol.Methods*, 1984, V.69, 229-34
64. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion //*Immunochemistry*, 1965, V.2, p.35-254
65. Mayer L. Mucosal Immunity. *Pediatrics* 2003; 111:1 595–1600.

66. McDaniel L S, Ralph B A, McDaniel D O, Briles D E. Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. *Microb Pathog.* 1994; 17:323–337. [[PubMed](#)]
67. Mestecky J, Moldoveanu Z, Michalek SM, Morrow CD, Compans RW, Schafer DP, Russell MW. Current options for vaccine delivery systems by mucosal route. *J Control Rel* 1997; 48:243-257.
68. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 1987; 7:265-76.
69. Mitchell TJ, Alexander JE, Morgan PJ, Andrew PW. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1997; 26:62S-71S.
70. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Ann Rev Immunol* 1995; 13:655-92.
71. Mufson M A, Mandell G L, Douglas R G Jr, Bennett J E. Principles and practice of infectious diseases. New York, N.Y: Churchill Livingstone, Inc.; 1990. pp. 1539–1550.
72. Musher D M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis.* 1992; 14:801–807.
73. National center for health statistics. Office visits for otitis media: United States, 1975-90, Number 214. – 1992, p.1-18.
74. Nohynek H, Eskola J, Kleemola M, Jalonen E, Saikku P, Leinonen M. Bacterial antibody assays in the diagnosis of acute lower respiratory tract infection in children. *Pediatr Inf Dis J* 1995; 14:478-84
Pichichero ME, Hall CB, Insel RA. A mucosal antibody response following systemic *Haemophilus influenzae* type b infection in children. *J Clin Invest* 1981; 67:1482-9.
75. Paton JC, Ferrante A. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun* 1984; 41:1212-6.
76. Proctor GB, Carpenter GH. Chewing stimulates secretion of human salivary secretory immunoglobulin A. *J Dent Res* 2001; 80(3):909-913.
77. Pukander J, Luotonen J, Sipilä M, Timonen M, Karma P. Incidence of acute otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1982; 93:447-53.
78. Rapola S., Kilpi T., Lahdenkari M., Takala A.K., P. Makela H., Kayhty H.. Do Antibodies to Pneumococcal Surface Adhesin A Prevent Pneumococcal Involvement in Acute Otitis Media? *The Journal of Infectious Diseases* 2001;184:577–8
79. Rocio D. Marchese, Neil T. Jain, Joseph Antonello, Laura Mallette, Kristin L. Butterfield-Gerson, Jennifer Raab, Pamela Burke, Cheryl Schulman, Hilary Adgate, Daniel J. Sikkema, Narendra Chirmule. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measuring Antibodies to Pneumococcal Polysaccharides for the PNEUMOVAX 23 Vaccine: Assay Operating Characteristics and

- Correlation to the WHO International Assay. *Clinical and vaccine immunology*, Aug. 2006, p. 905–912 Vol. 13, No. 8
80. Rosenow C, Ryan P, Weiser J N, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A, Masure H R. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1997; 25:819–829. [[PubMed](#)]
 81. Rubins JB. Duane PG. Clawson D. Charboneau D. Young J. Niewoehner DE. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 1993; 61:1352-8.
 82. Ruoff KL. *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of clinical microbiology*, 6th edn. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1995: 300-7.
 83. Saksouk, N., L. Pelosi, P. Colin-Morel, M. Boumedienne, P. L. Abdian, and R. A. Geremia. 2005. The capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8: functional identification of the glycosyltransferase WciS (Cap8H). *Biochem. J.* 389:63–72
 84. Sampson J S, O'Connor S P, Stinson A R, Tharpe J A, Russel H. Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. *Infect Immun.* 1994; 62:319–324. [[PubMed](#)]
 85. Schneerson R. Robbins JE. Chu CY. Sutton A. Schiffman G. Vann WF. Semi-synthetic vaccines composed of capsular polysaccharides of pathogenic bacteria covalently bound to proteins for the prevention of invasive diseases. *Prog Allerg* 1983; 33:144-58.
 86. Schreiber W.E, Chiang M.D.E. Electrophoresis Underestimates the concentration of Polyclonal Immunoglobulins in serum // *Am.J.Clin Pathol.*, 1992, V.97, p.610-613
 87. Serum Antipneumococcal Antibodies and Pneumococcal Colonization in Adults with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Richard Malley,¹ Marc Lipsitch,² Debby Bogaert,^{1,2} Claudette M. Thompson,² Peter Hermans,⁴ A. Claire Watkins,¹ Sanjay Sethi,³ and Timothy F. Murphy³ *The Journal of Infectious Diseases* 2007; 196:928–35)
 88. Sipilä M, Pukander J, Karma P. Incidence of acute otitis media up to the age of 1 ½ years in urban infants. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1987; 104:138-45.
 89. Skov Sorensen UB. Blom J. Birch-Andersen A. Henrichsen J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect Immun* 1988; 56:1890-6.
 90. Snapper SB, Rosen FS. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol* 1999; 905-929

91. Tamm E, Naaber P, Maimets M, Oona M, Kõljalg S, Lutsar I. Antimicrobial susceptibility and serogroup/serotype distribution of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Estonian children in 1999-2003. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Aug; 13(8):824-6. Epub 2007 May 2
92. Tarkowski A. Lue C. Moldoveanu Z. Kiyono H. McGhee JR. Prchal JT. Halpern NB. Mestecky J. Systemic immunisation for the induction of IgA responses. *Curr Top in Microbiol Immunol* 1989; 146:161-8. 67
93. Teele DW. Klein JO. Rosner B. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Inf Dis* 1989; 160:83-94.
94. Timens W. Boes A. Rozeboom-Uiterwijk T. Poppema S. Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. *J Immunol* 1989; 143:3200-6.
95. Tuomanen EI. The biology of pneumococcal infection. *Ped Res* 1997; 42:253-8.
96. Waltman W D II, McDaniel L S, Gray B M, Briles D E. Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog.* 1990; 8:61–69. [PubMed]
97. Wara DW. Host defence against *Streptococcus pneumoniae*: The role of the spleen. *Rev Infect Dis* 1981; 3:299-309.
98. Watson DA. Musher DM. Verhoef J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:479-90.
99. Wood WB, Smith MR. The inhibition of surface phagocytosis by the capsular slime layer of pneumococcus type III. *J Exp Med* 1949; 90:85-99.
100. Yolken R. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: current limitations and future prospects. *Rev Inf Diseases*, 1992; 4: 35-68. 52 Yolken R. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: current limitations and future prospects. *Rev Inf Diseases*, 1992; 4: 35-68.
101. Yoshida, Y., S. Ganguly, C. A. Bush, and J. O. Cisar. 2005. Carbohydrate engineering of the recognition motifs in streptococcal co-aggregation receptor polysaccharides. *Mol. Microbiol.* 58:244–256.
102. Yoshida, Y., S. Ganguly, C. A. Bush, and J. O. Cisar. 2006. Molecular basis of L-rhamnose branch formation in streptococcal coaggregation receptor polysaccharides. *J. Bacteriol.* 188:4125–4130.
103. Yother J, Briles D E. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J Bacteriol.* 1992; 174:601–609. [PubMed]