

Katarzyna Pancer

WIEK PACJENTÓW A DYNAMIKA SWOISTYCH IgM U OSÓB ZAKAŻONYCH *L. PNEUMOPHILA* sg1

Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny
w Warszawie

STRESZCZENIE

MATERIAŁ I METODY. Przeanalizowano wyniki oznaczeń IgM dla *L. pneumophila* sg1 wykonywanych w NIZP-PZH w latach 2004-2007 u 304 osób dorosłych i 270 dzieci w celu sprawdzenia wpływu wieku pacjentów oraz odstępu czasu między kolejnymi próbkami surowicy na wyniki i ich interpretację.

WYNIKI. Stwierdzono znamienne różnice w poziomie IgM w zależności od wieku chorych ($P_0=0.0084$). Wyniki dodatnie (ogółem u 20,4% pacjentów) najczęściej obserwowano w grupie chorych w wieku 19-29 lat (42,5%), a najrzadziej w grupach pacjentów +60 r.ż. oraz <2 r.ż. (7%). Mediana wartości IgM w tych 2 grupach (+60 lat i <2 r.ż.) były zbliżone oraz zdecydowanie różniły się od wyników w pozostałych grupach. Od 44 dorosłych i 33 dzieci pobrano ≥ 2 próbki. Wykazano istotną różnicę w odstępie czasu między pobraniem pierwszej i drugiej próbki surowicy u dorosłych (gł. 3-5 tyg.) i dzieci (gł. 2-4 tyg.). Przyrost poziomu IgM obserwowano u dzieci, jeśli odstęp między 1 oraz 2 próbka nie przekraczał 4 tygodni, natomiast u dorosłych zmiana ta obserwowana była także w odstępie >5 tygodni (25% chorych). Nie stwierdzono istotnych różnic w analizie wskaźnika dynamiki IgM u dzieci (1,25-14) i u dorosłych (1,5-26), ale zaobserwowano tendencję do dłuższego utrzymywania się IgM u dorosłych niż u dzieci.

WNIOSKI. Wykazanie tendencji szybszego spadku poziomu IgM u dzieci niż u dorosłych powoduje, że w przypadkach podejrzeń legionelozy u dzieci, próbki surowicy powinny być pobierane maksymalnie do 4-5 tygodni od wystąpienia objawów oraz w odstępach co 1-2 tygodni.

SŁOWA KLUCZOWE: *Legionella pneumophila*, legioneloza, badania serologiczne, dynamika IgM, serokonwersja

WSTĘP

W diagnostyce bakteryjnych i wirusowych zakażeń często wykonuje się badania poziomu przeciwciał klasy M. Potwierdzeniem zakażenia jest wykazanie serokonwersji lub znamiennego spadku lub wzrostu poziomu przeciwciał klasy M lub G w badaniu kolejnej próbki surowicy pobranej w odpowiednim odstępie czasu. Dynamika powstawania oraz zanikania swoistych przeciwciał zależy od klasy przeciwciał, właściwości patogenu oraz od indywidualnych właściwości gospodarza. Na wynik ma wpływ również rodzaj zastosowanego testu serologicznego, metoda (ELISA, IFA lub in.), technika odczytu (automatyczna lub wizualna; z zastosowaniem znakowanych monoprzeciwciał lub buforów z barwnikiem i in.) oraz rodzaj zastosowanego antygeny. Ponadto przy interpretacji wyniku badania

serologicznego należy uwzględnić wiek pacjenta, który także może stanowić czynnik wpływający na uzyskane wartości (1,2,3).

Pałeczki *Legionella* sp., w tym najczęściej *L. pneumophila* sg1, wywołują zachorowania na legionelozę. Jedną z metod stosowanych w laboratoryjnej diagnostyce tych zakażeń są badania serologiczne. W Polsce badania te stanowią podstawę rozpoznania większości zakażeń wywołanych przez *Legionella* sp. (4,5,6).

Celem tej pracy była analiza wpływu wieku pacjentów na wartości i dynamikę IgM dla *L. pneumophila* sg1.

MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano wyniki badań diagnostycznych (oznaczenia IgM oraz IgG) zakażeń *Legionella pneu-*

mophila sg1 (grupy serologicznej 1), wykonywanych w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego - Państwowym Zakładzie Higieny (NIZP-PZH) w latach 2004-2007. Ogółem przebadano 658 próbek surowicy pobranych od 574 pacjentów, w tym 304 dorosłych (powyżej 18 r.ż.) i 270 dzieci. Badania te wykonywane były komercyjnymi zestawami ELISA firmy Euroimmun Polska do oznaczania przeciwciał IgM oraz IgG przeciw *L. pneumophila* sg1. Oznaczenia i interpretację wyniku przeprowadzono zgodnie ze wskazaniem producenta.

Dane dotyczące wieku pacjentów uzyskano dla 251 dzieci oraz 235 dorosłych. Od 51 dorosłych oraz 33 dzieci otrzymano do badania więcej niż jedną próbkę surowicy.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu Statgraphics for Windows, Centurion, v.XV. StatPointTech.Inc.USA. Za znamienne uznawano wynik $P_0 < 0,05$. Analiza wartości median wykonana została testem Mooda, natomiast, ze względu na rozkład wartości w grupie odbiegający od rozkładu normalnego, analizę średnich wartości median IgM i IgG w zależności od wieku chorych przeprowadzono testem Kruskal-Wallis.

WYNIKI

Ogółem wyniki dodatnie oznaczania IgM stwierdzono u 117 pacjentów (20,4%), a u 48 osób (8,4%) wyniki graniczne. Natomiast dodatni poziom IgG stwierdzono u 34 spośród badanych 397 pacjentów (8,6%), a graniczny u 19 chorych (4,8%).

Stwierdzono statystycznie znamienne różnice w poziomie IgM w zależności od wieku chorych ($P_0=0,0084$). Najwyższy odsetek wyników dodatnich IgM stwierdzono w grupie młodych dorosłych (32,5%), a szczególnie osób w wieku od 18 do 29 lat – 42,5%. Wysoki (>30%) odsetek wyników dodatnich IgM stwierdzono także u dzieci w wieku >4 lat. Najniższy odsetek wyników dodatnich IgM stwierdzono u najmłodszych chorych (7,1%) (tab. I). Analiza wartości mediany oraz średnich median IgM w wyróżnionych grupach wiekowych wykazała występowanie istotnych różnic. Najwyższe zróżnicowanie uzyskanych wyników IgM obserwowano u dzieci w wieku 5-9 lat oraz 10-17 lat. Natomiast najwyższe wartości IgM obserwowano wśród dorosłych (40-59 lat; i 18-39 lat) oraz dzieci w grupie wiekowej 5-9 lat. Średni poziom IgM u najmłodszych był podobny do oznaczonego u osób starszych oraz zdecydowanie różnił się od wyników w grupie dzieci 5-9 lat, młodych dorosłych oraz starszych dzieci (tab. I, ryc.1).

Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic między wartościami IgG w zależności od wieku: ani w poszczególnych, wyróżnionych grupach ($P_0=0,18$), ani w analizie wartości średnich mediany lub mediany.

Jednak zaznaczają się różnice w wynikach uzyskanych u dzieci i u dorosłych. Wśród dzieci wartości dodatnie IgG są nieliczne, natomiast wśród osób dorosłych znacznie wzrasta średni i najczęściej mierzony poziom IgG oraz zauważalne jest znaczne zróżnicowanie tego poziomu. Najwyższe wartości IgG stwierdzano przede wszystkim u dorosłych (tab. I, ryc.1).

W kolejnym etapie pracy analizie poddano wyniki oznaczania IgM uzyskane w badaniu próbek surowicy wielokrotnie pobranych od tego samego pacjenta, przy założeniu, że odstęp między pierwszym a drugim pobraniem nie przekroczył 12 tygodni. Z analiz wyłączono próbki od 7 osób dorosłych, ponieważ zostały one pobrane w odstępie 43 – 76 tygodni, co mogło wskazywać na kolejne zachorowanie.

Ogółem analizowano wyniki badania 44 osób dorosłych, od których drugą próbkę surowicy pobrano do badań w odstępie od 0,5 do 9 tygodni (średnio odstęp wynosił 4,38 tyg., mediana = 4,0) oraz 33 dzieci, od których pobrano kolejną próbkę w odstępie od 0,5 do 10 tygodni (średnia = 2,782; mediana: 2,0). Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w odstępie czasu, jaki upłynął między pobraniem pierwszej i drugiej próbki surowicy u dorosłych i dzieci (mediana - $P_0=0,0004$; średnia - $P_0=0,0016$). Kolejne próbki surowicy u dzieci były pobierane na ogół w przedziale od 1,5 do 4 tygodnia, natomiast u osób dorosłych od 3 do 5 tygodnia (ryc.2).

Analizowano uzyskane wartości IgM w badaniu kolejnych próbek u ogółem 77 pacjentów. Wynik dodatni w obu próbkach stwierdzono u 14 (18,2%) pacjentów, natomiast wynik ujemny u 29 (37,7%) chorych. Następnie analizowano przyrost/spadek poziomu IgM w badaniu kolejnej próbki surowicy (z wyłączeniem ujemnych par surowic). Przyjmując założenie, że zmiana wyniku o wartość $\leq 20\%$ może być spowodowana innymi czynnikami zewnętrznymi i nie musi wynikać z rzeczywistej zmiany poziomu IgM, wykluczono z dalszych analiz pary surowic, gdzie zmiana poziomu wynosiła poniżej 20%. Były to przede wszystkim pary surowic, w których w obu oznaczeniach uzyskano wyniki graniczne oraz w obu – wyniki dodatnie. Zmianę powyżej 20% stwierdzono u 33 pacjentów, w tym 17 dzieci. Serokonwersję stwierdzono ogółem u 12 osób, zarówno dorosłych, jak i dzieci. Spadek lub wzrost IgM, gdy w obu próbkach uzyskano wynik dodatni, stwierdzono u 8 pacjentów, a u 7 pacjentów zmiana ta dotyczyła zakresu dodatniego i granicznego. U dzieci obserwowano także zmianę w zakresie wartości ujemnych i granicznych. Najwyższe różnice w uzyskanych wynikach IgM stwierdzano, gdy zmiana następowała z wyniku ujemnego na dodatni, zarówno u osób dorosłych (różnica VE w zakresie od -1,02 do 8,73), jak i u dzieci (różnica VE w zakresie od -1,13 do 8,21). Stwierdzano także znaczny przyrost/spadek IgM gdy

w obu próbach wykazano poziom dodatni (różnica VE od -1,12 do 4,63) lub dodatni i graniczny (od -3 do 2,39).

Następnie analizowano zmianę poziomu IgM w funkcji czasu. Stwierdzono, że u dzieci znaczny wzrost/spadek poziomu przeciwciał występował jeśli odstęp między 1 oraz 2 próbą nie przekraczał 4 tygodni, u pozostałych dzieci nie wykazano serokonwersji – obie próbki surowicy były ujemne. Natomiast u osób dorosłych zmianę poziomu IgM wykrywano w różnych odstępach czasu, także powyżej 5 tygodni, choć zaledwie u 25% chorych.

Na rycinie 3 przedstawiono uzyskane wyniki poziomu IgM (VE) w badaniach 4 kolejnych próbek surowicy pobranych od 9,5 letniej dziewczynki z legionellozowym zapaleniem płuc w odstępie ogółem 35 dni (5 tygodni) (ryc.3).

Analizowano także wskaźnik dynamiki IgM, który określał ile razy wzrosło/spadło stężenie IgM w badaniu drugiej próbki surowicy (z wyłączeniem par surowic gdy obie próbki były ujemne). Stwierdzono, że wskaźnik dynamiki IgM wśród dzieci mieści się w zakresie 1,25-14 (średnia:3,56; mediana:3,2), natomiast wśród osób dorosłych w zakresie 1,5-26 (średnia: 4,17; mediana:1,73) ($P_0 > 0,05$). Ogółem co najmniej 2-krotny przyrost IgM stwierdzono u 18 pacjentów: 12 dzieci oraz 6 dorosłych. W tej grupie pacjentów stwierdzono przede wszystkim zmianę w zakresie wyniku ujemnego/dodatniego (56%) oraz wątpliwego/dodatniego (28%). Natomiast spośród 15 pacjentów, u których dynamika IgM mieściła się w zakresie 1,25-1,9; u 7 (47%) stwierdzono zmianę w zakresie wartości dodatnich, u 2 (13%) osób - zmianę wyniku z ujemnego na dodatni oraz u 2 chorych – z dodatniego na wątpliwy. Ponadto zmianę z wyniku ujemnego na graniczny wykazano głównie u dzieci w wieku < 5 r.ż. (4/6) Nie stwierdzono jednak zależności między wiekiem a wskaźnikiem dynamiki IgM.

Przyrost poziomu IgM u dzieci i osób dorosłych opisywany był takim samym wzorem: $\ln Y = a + bX$ (gdzie X i Y = poziom IgM w kolejnych próbkach), natomiast występowały różnice w wartościach współczynników a i b w obu grupach. W grupie dzieci wartości współczynników wynosiły: a = 1,4+/-0,43 ($P_0 = 0,0054$), b = -1,12+/-0,34 ($P_0 = 0,0051$), a w grupie dorosłych a = 0,70+/-0,30 ($P_0 = 0,036$) oraz b = -0,74+/- 0,17 ($P_0 = 0,0008$). Różnice w wartościach współczynników a i b wskazują na odmienny przebieg krzywej dynamiki odpowiedzi IgM w obu grupach. Znamienne związku ($P_0 = 0,0243$) pomiędzy wartością przyrostu poziomu IgM a odstępem pomiędzy pobraniami próbek obserwowano u osób dorosłych, podczas gdy u dzieci zależność ta była nieznamienne ($P_0 = 0,5$).

DYSKUSJA

Wielu autorów podkreśla, że jedynie zastosowanie kompleksowej laboratoryjnej diagnostyki legionelozy, badanie różnych próbek materiału klinicznego i wykorzystanie różnorodnych technik, pozwala uzyskać wysoką, ponad 95% zdolność diagnostyczną (2,7). Prawidłowo wykonane badania serologiczne w kolejnych próbkach surowicy pozwalają wykazać odpowiedź immunologiczną na zakażenie *Legionella* sp., także w przypadkach zakażeń pozapłucnych. Ze względu na zależność poziomu swoistych przeciwciał od fazy choroby, czas pobrania próbki w znaczący sposób wpływa na możliwość interpretacji wyniku. Ujemny wynik badania pojedynczej próbki surowicy nie wyklucza legionelozy, ponieważ może być wynikiem zbyt wczesnego lub zbyt późnego pobrania próbki, tak jak w przedstawionym w tej pracy przykładzie 9,5 letniej chorej z legionellozowym zapaleniem płuc (gdyby analizować tylko próbki nr 1 i 4). Natomiast wynik dodatni lub graniczny w pojedynczym badaniu może wskazywać na prawdopodobne zakażenia *L. pneumophila* lub być efektem innych czynników (np. nieswoiste lub krzyżowe reakcje itp.). W takiej sytuacji należy dążyć do wykazania dynamiki przeciwciał klasy IgM lub IgG lub wykonać badanie inną metodą (np. PCR).

Definicja stosowana w celu wykazania znamienego wzrostu/spadku poziomu przeciwciał w badaniu kolejnej próbki surowicy zależy od użytej metody. Definicja EWGLI mówiąca, że jest to co najmniej 4-krotny przyrost/spadek miana przeciwciał, z założeniem, że przynajmniej w jednej próbce miano wynosi $\geq 1:128$, została opracowana w oparciu o test mikroaglutynacji (MAT), podczas którego badane są szeregi podwójnych rozcieńczeń surowicy chorego. Natomiast odczyt testu EIA jest automatyczny i polega na pomiarze OD zależnego od logarytmu stężenia przeciwciał. Czterokrotny przyrost wartości w teście ELISA oznaczać może faktycznie znacznie wyższe wartości. Prezentowana analiza wyników badań prowadzonych w NIZP-PZH potwierdza sugestię zespołu *Elverdal i wsp.* (8), którzy przyjmują za znamienne 2-krotny przyrost wartości IgM w teście ELISA. W poniższej pracy co najmniej 2-krotny przyrost stężenia IgM wykazano u 18 pacjentów (w tym 12 dzieci), z tego aż u 10 osób stwierdzono zmianę wyniku z ujemnego na dodatni (czyli serokonwersję). Niższą dynamikę IgM (<2) stwierdzono u 15 pacjentów, głównie dorosłych. Wśród tych chorych, u 2 osób, stwierdzono także serokonwersję, co pokazuje na istotność problemu i wątpliwości podczas interpretacji takich wyników.

Stwierdzono, że u 55% pacjentów, u których indeks IgM wynosił ≥ 2 , odstęp między pobraniem kolejnych próbek wynosił od 0,5 do 2 tygodni. Znamienne róż-

nice w odstępie pobrań między dziećmi i dorosłymi wskazują przede wszystkim na różny przebieg procesu diagnostyczno-leczniczego w tych grupach. Większość badanych dzieci była hospitalizowana z powodu zakażeń dróg oddechowych lub do zakażenia doszło podczas pobytu w szpitalu, więc próbki pobierane były w krótszych odstępach czasu. Natomiast dorośli pacjenci są często leczeni w domu, co może powodować problemy z pobraniem 2. próbki surowicy (opóźniona wizyta kontrolna lub jej brak).

U dzieci zmiana poziomu IgM obserwowana była, jeśli odstęp między pobraniem kolejnych próbek wynosił ≤ 4 tygodnie, sugerując szybsze obniżanie poziomu swoistych IgM w przebiegu odpowiedzi na zakażenie u dzieci niż u dorosłych. Ma to istotne znaczenie praktyczne, ponieważ pobranie kolejnej próbki w odstępie powyżej 4-5 tygodni lub pobranie pierwszej próbki ze znacznym opóźnieniem może spowodować, że nie zostanie wykazana serokonwersja/znamienny przyrost poziomu przeciwciał IgM. Jest to tym bardziej istotne, że dane w piśmiennictwie często wskazują, że serokonwersja w przypadkach legionelozy może być opóźniona u części pacjentów i wystąpić dopiero po 6 tygodniach (1,9). Wykazanie w niniejszej pracy występowania u osób dorosłych związku pomiędzy odstępem w pobraniu a przyrostem IgM potwierdza te informacje. Należy jednak podkreślić, że dane w piśmiennictwie nt. serokonwersji odnoszą się głównie do dorosłych, ponieważ przez wiele lat uważano za mało prawdopodobne występowanie zakażeń *Legionella* sp. u dzieci ze sprawnym układem odpornościowym (10). Obecnie, co również potwierdzają prezentowane wyniki, uważa się, że zachorowania wywołane przez pałeczki *Legionella* sp. występują także u dzieci (6,11).

Stopień narażenia na zakażenie pałeczkami *Legionella* sp., jak wykazały badania Wedege i wsp. (12), może znaleźć odbicie w poziomie przeciwciał w danej grupie osób. U osób najbardziej narażonych mediana IgG i IgM była znacznie wyższa niż u osób mniej narażonych. W badaniach tych, prowadzonych po wystąpieniu dużego ogniska LD (103 osoby), stwierdzono odpowiedź immunologiczną nie tylko na antygeny *L. pneumophila* sg 1, który wywołał zachorowania, ale także *L. pneumophila* sg 4. Wynik ten sugeruje, że odpowiedź immunologiczna może wskazać na szereg różnych, także uprzednich zakażeń. Część z tych zakażeń mogła przebiegać w postaci samoograniczających się lub grypopodobnych zachorowań, a także mieć prze-

bieg bezobjawowy. Wielokrotne narażenie na zakażenie *Legionella* sp. może być jedną z przyczyn wykazanych w niniejszej pracy wyższych median wartości IgG, IgM oraz średnich tych median u osób dorosłych niż u dzieci. Wskazuje to na konieczność zróżnicowania procedur pobierania próbek surowicy u dzieci i u dorosłych: u dzieci kolejne próbki powinny być pobierane w odstępie co 1-2 tygodnie, począwszy od pierwszych objawów zachorowania, natomiast u osób dorosłych przerwy te mogłyby być dłuższe (2-4 tygodnie). Niewątpliwie należy dążyć do jak najszybszego pobrania pierwszej próbki surowicy od chorego.

Prezentowane wyniki potwierdzają także dane uzyskane przez innych autorów dotyczące znamiennego spadku poziomu IgM powstających w odpowiedzi na zakażenie pałeczkami *Legionella* sp. w grupie osób starszych w stosunku do poziomu określanego u pozostałych dorosłych (12). W prezentowanej pracy wykazano także występowanie na podobnym poziomie odpowiedzi immunologicznej u osób najmłodszych i najstarszych.

WNIOSKI

1. Wykazanie tendencji szybszego spadku poziomu IgM u dzieci niż u osób dorosłych ma istotne znaczenie praktyczne, ponieważ w przypadkach podejrzeń legionelozy u dzieci, należy bardzo dokładnie ustalać terminy pobrań kolejnych próbek surowicy do badań, a różnica pomiędzy pobraniami nie powinna przekroczyć ogółem 3-4 tygodni.
2. Pobranie w odpowiedniej fazie choroby i w odpowiednich odstępach czasu próbek surowicy do badań, wraz z uwzględnieniem różnic wynikających z wieku badanych chorych, pozwoli na prawidłową ocenę sytuacji epidemicznej legionelozy w Polsce.

Otrzymano: 3.10.2013 r.

Zaakceptowano do druku: 25.10.2013 r.

Adres do korespondencji:

Dr Katarzyna Pancer

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny

Ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Tel. +48 22 54 21 308

e-mail: kpancer@pzh.gov.pl