



Zkušenosti se sérologickou diagnostikou *Mycoplasma pneumoniae*

Raszka J., Januška J., Rulíšková H., Tomisová D., Zelená H.

Úvod

Mycoplasma pneumoniae je etiologický agens všech druhů zánětů dýchacích cest od inaparentních infekcí až po těžké pneumonie. Infekce se často vyskytují v lokalizovaných epidemiích a mohou být provázeny komplikacemi, např. exantém, pleuritis, astma, otitis, meningoencefalitis, trombocytopenie a anémie. Ze vzácnějších komplikací se mohou dále objevit např. perikarditis, myokarditis, glomerulonefritida, artritida. Pro kvalitní laboratorní stanovení diagnózy pomocí ELISA nebo komplementfixační reakce (KFR) je ideální sledovat dynamiku tvorby protilátek, kde předpokladem je vyšetření dvou vzorků sér jednoho pacienta, tzv. párových sér – první vzorek je odebrán v akutní fázi onemocnění, druhý v době, kdy se předpokládá vytvoření detekovatelné hladiny protilátek, tj. cca za 10-20 dnů od odběru prvního vzorku. Pozitivita protilátek anti - *M. pneumoniae* třídy IgG, IgA, IgM svědčí o tom, že organismus pacienta se setkal se zmíněným infekčním agens. Rozlišení, zda se jedná o recentní nákazu, je obdobné jako u jiných infekcí, tj. je založeno na průkazu specifických protilátek třídy IgM nebo IgA. Při vyšetření dvou vzorků stejného pacienta recentní nákazu indikuje sérokonverze protilátek třídy IgG, IgM, IgA nebo přítomnost protilátek třídy IgM nebo IgA. Pozitivita ELISA protilátek je v tomto sdělení vyjádřena pomocí indexu pozitivity, který představuje podíl absorbancí vzorku a hraničně pozitivní kontroly. V KFR testu se titr protilátek 1:64 pokládá za suspektní, za pozitivní výsledek lze považovat titer 1:128 nebo vyšší a nejméně čtyřnásobný vzestup titru nebo sérokonverze u vzorků odebraných s odstupem 2 až 3 týdnů.

Materiál a metody

V rámci rutinní laboratorní diagnostiky byly v období od října 2005 do května 2006 testovány v KFR a ELISA technikou specifické protilátky anti - *M. pneumoniae*. Celkem bylo vyšetřeno 4197 vzorků převážně s onemocněním respiračního traktu. Specifické protilátky tříd IgG, IgM a IgA byly stanoveny pomocí vlastní modifikace ELISA s využitím komerčního antigenu. Použitý antigen je extrakt lyzátu *M. pneumoniae* obohacený membránovým adhezivním proteinem P1. Pro KFR byl použit antigen firmy IMUNA. Výsledky testů byly interpretovány dle kritérií uvedených v úvodu.

Výsledky

Infekce *M. pneumoniae* byla sérologicky prokázána u 264 pacientů v 355 vzorcích sér. U 138 pacientů (52%) s průkazem infekce byla uvedena diagnóza onemocnění dolních cest dýchacích. Výsledky laboratorních testů byly hodnoceny zejména z hlediska detekce specifických protilátek jednotlivých imunoglobulinových tříd a KF protilátek v závislosti na věku pacientů. Sérologický průkaz infekce *M. pneumoniae* dle věkových skupin je zobrazen v tabulce č. 1. Významné je zjištění četnosti výskytu infekce *M. pneumoniae* u věkové skupiny 0 – 15 let, která je dvojnásobná ve srovnání s věkovou skupinou dospělých nad 25 let.

Tabulka č. 2 prezentuje průkaz protilátek anti-*M. pneumoniae* u pacientů s opakovaným odběrem vzorků. Druhé, případně další vzorky, byly odebrány u 85 pacientů s průkazem infekce. Výsledky jednoznačně ukazují na nutnost odběru druhého vzorku – u 18 pacientů (21%) nebyly detekovány v prvním vzorku žádné protilátky, u 44 pacientů (52%) byl prokázán signifikantní vzestup titru protilátek.

Distribuce protilátek anti - *M. pneumoniae* jednotlivých imunoglobulinových tříd v závislosti na věku je uvedena v tabulce č. 3. Významným zjištěním je zejména kombinace výskytu protilátek třídy IgA bez přítomnosti protilátek třídy IgM u 27% dospělých pacientů v kontrastu k 0% u dětí do 15 let věku a pouze u 2% jedinců ve věku 15 – 25 let. S největší pravděpodobností se u části dospělých pacientů jedná o reinfekci. Zajímavý v této souvislosti je i pokles počtu pacientů s průkazem IgM protilátek bez přítomnosti protilátek IgA z 60% u dětí do 15 let věku na 39% u dospělých nad 25 let.

V tabulce č. 4 jsou prezentovány výsledky stanovení protilátek anti - *M. pneumoniae* v KFR. Výsledky ukazují, že ve srovnání s technikou ELISA je sérologická diagnostika pomocí KFR, dle předpokladu, méně citlivá. Suspektní nebo průkazný KF titer protilátek byl nalezen u 107 (30%) z 355 vzorků pozitivních v ELISA.

V tabulce č.5 jsou uvedeny příklady výsledků s průkazem dynamiky tvorby protilátek anti - *M. pneumoniae* u pacientů s opakovaným odběrem.

Obrázky č.1 a č.2 ilustrují frekvenci KF títů protilátek anti - *M. pneumoniae* v prvním (obr. č.1) a dalším (obr.č.2) vzorku u 85 pacientů s opakovaným odběrem, pozitivních v ELISA. U 55 pacientů (65%) byl prokázán signifikantní vzestup titru protilátek nebo titer protilátek ≥ 64 . Titer protilátek ≤ 32 bez signifikantního vzestupu titru byl zaznamenán u 30 pacientů (35%).

Literatura

- M. Karpellin, K. Hakkarainen, M. Kleemola, and A. Miettinen: Comparison of three serological methods for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clin Pathol., 46(12): 1120–1123, December 1993.
- M. Granstrom, T. Holme, A. M. Sjogren, A. Ortqvist and M. Kalin: The role of IgA determination by ELISA in the early serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection, in relation to IgG and mu-capture IgM methods. The Journal of Medical Microbiology, Vol 40, Issue 4 288-292, 1994.
- Toršová V., Medková Z.: *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia pneumoniae*: Původci respiračních infekcí a jejich vztah k některým chronickým onemocněním. Interní medicína, 1, Ročník 3, str. 13 -18., 2001.
- Ken B. Waites and Deborah F. Talkington: *Mycoplasma pneumoniae* and Its Role as Human Pathogen. Clinical Microbiology Reviews, p. 697-728, Vol. 17, No. 4, October 2004.

Tabulka č.1: Sérologický průkaz infekce *M. pneumoniae* dle věkových skupin.

Věk	Počet pacientů s průkazem infekce	Počet pozitivních vzorků	Pacienti %
0 – 15 let	122	177	46,2
16 – 25 let	80	104	30,3
>25let	62	74	23,5
Celkem	264	355	100

Tabulka č.2: Průkaz protilátek anti - *M. pneumoniae* u pacientů s opakovaným odběrem vzorků.

Věk	Počet pozitivních pacientů se 2 a více vzorky	Počet pacientů se signifikantním vzestupem hladiny protilátek	Počet pacientů s průkazem pouze IgM protilátek v 1. vzorku	Počet pacientů bez průkazu protilátek v 1. vzorku
0 – 15 let	45	22	13	5
16-25 let	24	14	5	8
>25let	16	8	1	5
Celkem	85	44	19	18

Tabulka č.3: Distribuce protilátek anti - *M. pneumoniae* jednotlivých imunoglobulinových tříd v závislosti na věku.

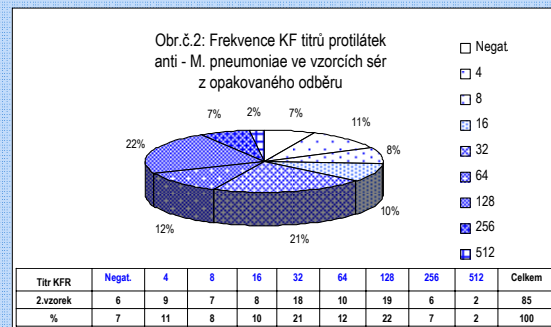
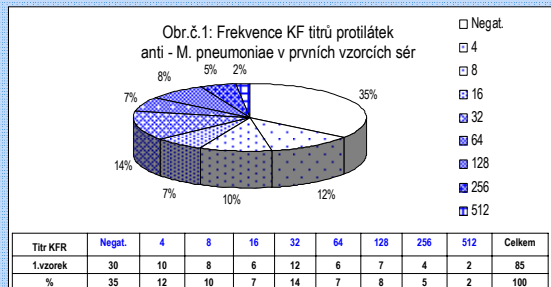
Věk	IgM pozit. IgA pozit.	IgM pozit. IgA negat.	IgM negat. IgA pozit.	Celkem
0-15 let	71 40%	106 60%	0 0	177
16-25 let	54 52%	48 46%	2 2%	104
>25let	25 34%	29 39%	20 27%	74
Celkem	150 42%	183 52%	22 6%	355

Tabulka č.4: KF protilátky anti - *M. pneumoniae* ve vzorcích sér pacientů se sérologickým průkazem infekce v ELISA v závislosti na věku.

Věk	KFR ≤ 32			KFR > 64			Celkem vzorků
	IgM pozit. IgA pozit.	IgM negat. IgA negat.	IgM pozit. IgA negat.	IgM pozit. IgA pozit.	IgM negat. IgA pozit.	IgM negat. IgA negat.	
0-15 let	32	91	0	39	15	0	177
16-25 let	23	45	2	31	3	0	104
>25let	10	27	18	15	2	2	74
Celkem	65	163	20	85	20	2	355

Tabulka č.5: Příklady výsledků s průkazem dynamiky tvorby protilátek anti - *M. pneumoniae* u pacientů s opakovaným odběrem (sérokonverze protilátek nebo signifikantní vzestup titru je označen vykháčkem).

Pacient č.	Ročník	Odběr Vzorku	Dg.	KFR	ELISA IgG	ELISA IgM	ELISA IgA
1.	1999	31.10.05	J18.0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
		16.11.05	J18.0	16!	1,57!	4,44!	Negat.
2.	1992	15.12.05	J15.8	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
		19.12.05	J15.8	Negat.	Negat.	1,57!	1,55!
		5.1.06	J18.0	256!	2,16!	3,15	1,93
3.	1992	14.2.06	J18.9	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
		1.3.06	J20.9	128!	3,42!	4,33!	3,39!
4.	1991	16.11.05	J18.8	Negat.	Negat.	1,36	Negat.
		9.12.05	J18.8	32!	2,31!	3,51	Negat.
5.	1988	26.12.05	J18.0	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
		5.1.06	J18.0	32!	1,98!	2,65!	5,55!
6.	1973	15.11.05	B34.9	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
		22.11.05	B34.9	32!	6,65!	Negat.	1,34!



Závěr

Zpracováním výsledků laboratorní diagnostiky *M. pneumoniae* byly získány poznatky, které jsou využitelné zejména z hlediska interpretace sérologických vyšetření. Byla potvrzena výhoda odběru a vyšetření druhého vzorku krve, ověřená byla citlivost KF a ELISA testů. I když KFR je méně citlivá metoda stanovení protilátek ve srovnání s ELISA, ukázala se jako velmi užitečná pro sledování dynamiky tvorby protilátek a verifikaci výsledků v ELISA. Významným zjištěním je rozdílná tvorba specifických protilátek anti - *M. pneumoniae* třídy IgA a IgM u dětí a dospělých, kdy u části dospělých pacientů s reinfekcí jsou detekovány pouze protilátky třídy IgA bez nálezů protilátek třídy IgM. Z předchozího vyplývá nezbytnost vyšetření specifických protilátek třídy IgA.