

II. ΠΡΩΤΟΤΥΠΑ ΑΡΘΡΑ

1. Εκτίμηση των Ειδικών Αντισωμάτων Έναντι *Mycoplasma pneumoniae* και *Chlamydomphila pneumoniae* σε Ασθενείς με Αναπνευστική Λοίμωξη

Κ. Γιαννούλη, Α. Λαζαρίδου, Χ. Πουλοπούλου, Α. Γεωργάκη, Δ. Γαννέλη,

Κ. Θέμελη – Διγαλάκη

Τμήμα Κλινικής Μικροβιολογίας «Τζάνειο» ΓΝΠ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της μελέτης είναι η αναζήτηση των IgM αντισωμάτων έναντι *M. pneumoniae* σε παιδιά και ενήλικες με αναπνευστική λοίμωξη και των IgA-IgG αντισωμάτων έναντι *Chlamydomphila pneumoniae* σε ενήλικες, κατά την διετία 2008-2009. Το υλικό αποτέλεσαν 912 οροί ασθενών με υποψία αναπνευστικής λοίμωξης από *M. pneumoniae*. Εξ' αυτών 420 οροί αφορούσαν ενήλικες που νοσηλεύτηκαν σε παθολογικές κλινικές και ΜΕΘ και 492 οροί ήταν από νοσηλευόμενα παιδιά. Επίσης εξετάστηκαν 215 οροί ενηλίκων ασθενών με υποψία αναπνευστικής λοίμωξης από *Chlamydomphila pneumoniae*. Πρόσφατη λοίμωξη από *M. pneumoniae* διαγνώστηκε σε 91 παιδιά (18,5%) και σε 48 ενήλικες (11,8%). Εποχιακή κατανομή των λοιμώξεων από *M. pneumoniae* παρατηρήθηκε σε ποσοστό 45% των παιδιών και 35% των ενηλίκων κατά την άνοιξη. Πρόσφατη λοίμωξη από *C. pneumoniae* βρέθηκε σε 9 ασθενείς, με την ανίχνευση IgA αντισωμάτων. IgG αντισώματα έναντι των *C. pneumoniae* προσδιορίστηκαν σε 66 ασθενείς (30,7%). Δεν παρατηρήθηκε εποχιακή κατανομή των λοιμώξεων από *C. pneumoniae*. Το *M. pneumoniae* ήταν συχνότερος αιτιολογικός παράγοντας αναπνευστικής λοίμωξης κυρίως στα παιδιά, με εποχιακή έξαρση την άνοιξη. Τα *C. pneumoniae* ευθύνονται για λοίμωξη του αναπνευστικού σε πολύ μικρό αριθμό ασθενών. Τα υψηλά ποσοστά IgG οροθετικότητας υποδηλώνουν την ικανοποιητική ανοσοποίηση του ενήλικα πληθυσμού..

Λέξεις Ευρετηρίου

Mycoplasma pneumoniae, *Chlamydomphila pneumoniae*. Αναπνευστική λοίμωξη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα *C. pneumoniae* και *M. pneumoniae* αποτελούν συνήθη αίτια λοιμώξεων ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού. Ως επί το πλείστον οι λοιμώξεις αυτές είναι ασυμπτωματικές ή ήπιες.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η «περιπατητική πνευμονία». Εν τούτοις έχουν αναφερθεί και σοβαρές λοιμώξεις, ακόμη και με θανατηφόρο εξέλιξη. Τα άτυπα αυτά παθογόνα, εμφανίζουν συχνά εξωπνευμονικές εκδηλώσεις. Και τα δύο μικρόβια έχουν εμπλακεί στην παθογένεια του βρογχικού άσθματος καθώς και στις παροξύνσεις της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Ειδικότερα τα *C. pneumoniae* έχει ενοχοποιηθεί και για την εμπλοκή του στην αθηροσκλήρωση και στην σκλήρυνση κατά πλάκας.[1-3]

Και τα δύο μικρόβια αποτελούν συχνά αίτια πνευμονίας της κοινότητας. Η διάγνωση των λοιμώξεων από τα παθογόνα αυτά αίτια

διερευνώνται σε μικρό ποσοστό ασθενών, σε περιπτώσεις μη ανταπόκρισης στη θεραπεία με αντιβιοτικά ή σε πνευμονίες που απαιτούν νοσηλεία.[4]

Η απομόνωση και των δύο μικροβίων παρουσιάζει δυσκολίες. Τα Χλαμυδοφιλα της πνευμονίας είναι υποχρεωτικώς ενδοκυττάριο μικρόβιο και πρέπει να καλλιεργηθεί μέσα σε ευκαρυωτικά κύτταρα-ξενιστές. Οι πιο ευαίσθητες κυτταρικές σειρές για την καλλιέργειά του είναι η HL (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα) και η Hep-2 (καρκινικά κύτταρα λάρυγγα). Αυτές οι καλλιέργειες παραμένουν δύσκολες, χρονοβόρες και χαμηλής ευαισθησίας. Σε ό,τι αφορά την καλλιέργεια του Μυκοπλάσματος της πνευμονίας χρειάζονται εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά όπως το PPLO (pleuro-pneumonia-like organisms medium) και το MBGD (Methylene-Blue-Glucose Diphasic medium). Η απομόνωση του είναι επίπονη, ακριβή και χρονοβόρα αφού μπορεί να απαιτηθούν δύο

έως και πέντε εβδομάδες για τη δημιουργία ορατών αποικιών.[5-6]

Λόγω των προαναφερθέντων δυσκολιών στην απομόνωση των δύο μικροβίων, οι ορολογικές μέθοδοι εξακολουθούν να παραμένουν σημαντικές για τη διάγνωση των λοιμώξεων από *C. pneumoniae* και *M. pneumoniae*, αλλά και για επιδημιολογικούς σκοπούς. Τα πλεονεκτήματά τους σχετίζονται με την ευκολία λήψης, αποθήκευσης, αποστολής και εξέτασης του δείγματος και στην ύπαρξη έτοιμων αντιδραστηρίων στο εμπόριο.[5,7]

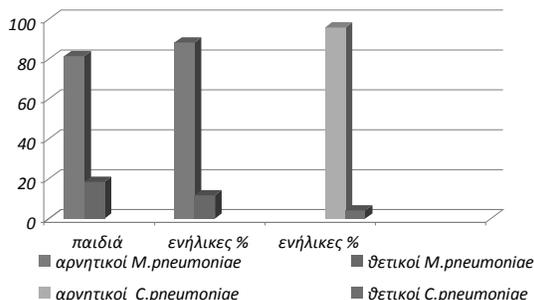
Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αναζήτηση των IgM αντισωμάτων έναντι *M. pneumoniae* σε παιδιά και ενήλικες με αναπνευστική λοίμωξη και των IgA και IgG αντισωμάτων έναντι *Chlamydomphila pneumoniae* σε ενήλικες, κατά την διετία 2008-2009.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελετήθηκαν 1127 οροί ασθενών με υποψία αναπνευστικής λοίμωξης. Σε 912 ορούς ασθενών ελέγχθηκε η παρουσία αντισωμάτων έναντι του *M. pneumoniae*. Εξ' αυτών 420 οροί αφορούσαν ενήλικες που νοσηλεύτηκαν σε παθολογικές κλινικές και ΜΕΘ και 492 οροί αφορούσαν νοσηλεύόμενα παιδιά. Επίσης εξετάστηκαν 215 οροί ενήλικων ασθενών με υποψία αναπνευστικής λοίμωξης από *Chlamydomphila pneumoniae*. Για την μέτρηση των IgM Abs έναντι του *M. pneumoniae* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοχρωματογραφίας (ImmunoCard /Meridian. USA). Πρόκειται για ανοσοενζυμική δοκιμή σε μεμβράνη, για την εκτέλεση της οποίας δεν απαιτείται προηγουμένως διαχωρισμός των IgM ή απομάκρυνση των IgG αντισωμάτων, και αποτελεί μέθοδο ποιοτικού προσδιορισμού των ειδικών IgM αντισωμάτων έναντι του μυκοπλάσματος της πνευμονίας. Για την μέτρηση των ειδικών IgA και IgG Abs έναντι των *Chlamydomphila pneumoniae* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του μικροανοσοφθορισμού MIF (Focus Diagnostics/ Cypress USA). Ως αντιγόνο χρησιμοποιήθηκαν κεκαθαμένα από λιποπολυσακχαρίτη στοιχειώδη σωμάτια του *C. pneumoniae* και στη μέθοδο συμπεριελήφθησαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Ο μικροανοσοφθορισμός παραμένει μέχρι και σήμερα η μόνη προτεινόμενη ορολογική μέθοδος για την ανίχνευση λοίμωξης από *C. pneumoniae*. [8-9]

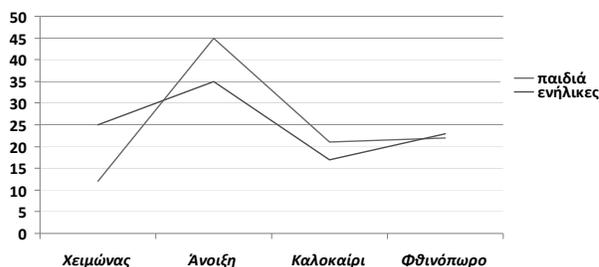
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πρόσφατη λοίμωξη από *M. pneumoniae* διαγνώστηκε σε 91 παιδιά (18,5%) και σε 48 ενήλικες (11,8%) (Εικόνα 1).



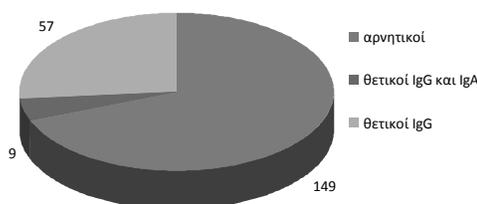
Εικόνα 1. Ποσοστά (%) ασθενών με αναπνευστική λοίμωξη από *C. pneumoniae* και *M.pneumoniae*

Εποχιακή κατανομή των λοιμώξεων από *M. pneumoniae*, παρατηρήθηκε σε ποσοστό 45% των παιδιών και 35% των ενηλίκων κατά την άνοιξη (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Εποχιακή επίπτωση του Μυκοπλάσματος της πνευμονίας

Πρόσφατη λοίμωξη από *C. pneumoniae* βρέθηκε σε 9 ασθενείς, με την ανίχνευση IgA αντισωμάτων. IgG αντισώματα έναντι της *C. pneumoniae* προσδιορίστηκαν σε 66 ασθενείς (30,7%) (Εικόνα 3). Δεν παρατηρήθηκε εποχιακή κατανομή των λοιμώξεων από *C. pneumoniae*.



Εικόνα 3. Αποτελέσματα ανίχνευσης αντισωμάτων για *Chlamydomphila pneumoniae*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τις λοιμώξεις που προκαλεί το *M. pneumoniae*, το 20% είναι ασυμπτωματικές, το 75% εκδηλώνονται με ήπια συμπτωματολογία του αναπνευστικού (φαρυγγίτιδα, τραχειοβρογχίτιδα) και μόνο ένα ποσοστό 3-10% αποτελεί αίτιο πνευμονίας.¹⁰ Ωστόσο, παγκοσμίως, το *M. pneumoniae*, ευθύνεται για 10-25% των πνευμονιών της κοινότητας και 40% των άτυπων πνευμονιών.^{3,11} Η μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται σε παιδιά άνω των 5 ετών και τους εφήβους, όπου ανέρχεται περίπου στο 25% και ελαττώνεται στο 10% στους νεαρούς ενήλικες. Από εκεί και μετά η συχνότητα ελαττώνεται κι άλλο, ενώ τείνει να αυξάνει η βαρύτητα της λοίμωξης.^{5,9} Και στη δική μας μελέτη, το *M. pneumoniae* ήταν συχνός αιτιολογικός παράγοντας αναπνευστικής λοίμωξης με υψηλότερη οροθετικότητα στα παιδιά. Αντιφατικά είναι τα στοιχεία από διάφορες μελέτες σε ό,τι αφορά την εποχική κατανομή των λοιμώξεων από *M. pneumoniae*. Υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν μεγαλύτερα ποσοστά λοιμώξεων το χειμώνα¹¹, άλλες την άνοιξη¹² και μελέτες που δεν βρήκαν κάποια ιδιαίτερη εποχική κατανομή κατά τη διάρκεια του έτους⁵. Στη δική μας μελέτη παρατηρήθηκε εποχική έξαρση την άνοιξη τόσο στα παιδιά όσο και στους ενήλικες. Οροεπιδημιολογικές μελέτες αποδίδουν κύριο ρόλο στο *C. pneumoniae* στην αιτιολογία της πνευμονίας. Αναφέρουν ότι το 6-20% περιπτώσεων πνευμονίας της κοινότητας (community-acquired pneumonia, CAP) και 5% λοιμώξεων της άνω αναπνευστικής οδού οφείλονται σε *C. pneumoniae*. Τα ποσοστά οροθετικότητας αυξάνουν γρήγορα στην προσχολική ηλικία και φτάνουν στο 35-45% μετά την εφηβεία. Σε μεγαλύτερες ηλικίες, ο επιπολασμός του *C. pneumoniae* αυξάνει ακόμα περισσότερο. Μετά την ηλικία των 65 ετών, η οροθετικότητα ξεπερνά το 70%. Μεγάλη πλειοψηφία του πληθυσμού θα νοσήσει από Χλαμυδοφιλα, τουλάχιστον μία φορά κατά τη διάρκεια της ζωής του. ^{5, 9} Τα ποσοστά οροθετικότητας IgA είναι ελάχιστα χαμηλότερα (περίπου 60-70%) από ότι τα IgG.⁴ Έχει προταθεί ότι τα IgA αντισώματα μπορεί να αποτελούν δείκτες εμμένουσας και χρόνιας λοίμωξης, χωρίς όμως ακόμη να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.^{3, 13-14}

Στη μελέτη μας, τα *Chlamydothila pneumoniae* ευθύνονται για πρόσφατη αναπνευστική λοίμωξη μικρού αριθμού ασθενών που μελετήθηκαν, ενώ τα υψηλά ποσοστά οροθετικότητας (30,7%)

συμβαδίζουν με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα, που αποδίδονται σε πολλαπλή έκθεση στα χλαμυδόφιλα της πνευμονίας κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Επίσης πιθανόν να υπάρχουν διασταυρούμενες αντιδράσεις αντισωμάτων κατά μικροοργανισμών που φέρουν ομοιότητες με τα *C. pneumoniae*, όπως π.χ. *Simkania negevensis* and *Parachlamydia acanthamoebae* που να οδηγούν σε ψευδώς θετική ορολογική αντίδραση.⁴ Υπογραμμίζεται έτσι η αναγκαιότητα λήψης δύο δειγμάτων από τον ασθενή, σε διάστημα τουλάχιστον δύο εβδομάδων για να διαγνωστεί η οξεία λοίμωξη κατά την οποία πραγματοποιείται τετραπλασιασμός του τίτλου αντισωμάτων στη φάση της ανάρρωσης.

Επιδημιολογικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των λοιμώξεων αναπνευστικού από *M. pneumoniae* και *C. pneumoniae*. Το *M. pneumoniae* αποτελεί συχνότερο αιτιολογικό παράγοντα αναπνευστικής λοίμωξης στα παιδιά σε σχέση με το *C. pneumoniae*. Ωστόσο, μετά την ηλικία των 20 περίπου ετών, η οροθετικότητά του αυξάνεται με χαμηλότερους ρυθμούς σε σχέση με το *C. pneumoniae*, του οποίου ο επιπολασμός παραμένει μεγαλύτερος σε όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής.¹⁵ Σύμφωνα με τη μελέτη μας, εποχική έξαρση των λοιμώξεων από *M. pneumoniae* παρατηρείται την άνοιξη σε αντίθεση με το *C. pneumoniae* του οποίου οι λοιμώξεις δεν εμφανίζουν εποχική κατανομή.

Η καθυστερημένη αύξηση των IgG αντισωμάτων, η παρουσία IgG αντισωμάτων για πολύ καιρό μετά τη λοίμωξη και η απουσία εμφάνισης IgM αντισωμάτων στους ενήλικες σε κάποιες περιπτώσεις πρωτογενούς ή δευτερογενούς λοίμωξης θέτουν περιορισμούς στη χρήση των ορολογικών μεθόδων ως μοναδικό μέσο διάγνωσης λοιμώξεων από *M. pneumoniae* και *C. pneumoniae*.

Συμπερασματικά αναφέρουμε ότι, η συμβολή των ορολογικών εξετάσεων στην διάγνωση των αναπνευστικών λοιμώξεων από Μυκόπλασμα της πνευμονίας και Χλαμυδόφιλα της πνευμονίας είναι σημαντική διότι σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα και τον ακτινολογικό έλεγχο βοηθούν στην αιτιολογική θεραπεία και επιδημιολογική διερεύνηση.

SUMMARY

Evaluation of *M.pneumoniae* and *C. pneumoniae*-specific antibodies in patients with respiratory tract infection. *M.pneumoniae* IgM antibody levels were studied in adults and children with respiratory tract infection and *C. pneumoniae* IgA-IgG antibody levels were studied in adults during the two-year period 2008-2009. 912 serum specimens were collected from patients with suspicion of *M.pneumoniae* respiratory tract infection: 420 serum samples belonged to adults hospitalized in internal medicine clinics and ICU, whereas 492 serum samples were pediatric clinical specimens. 215 serum specimens were collected from patients with suspicion of *C. pneumoniae* respiratory tract infection too. Recent *M.pneumoniae* infection was detected in 91 children (18.5%) and 48 adults (11.8%). *M.pneumoniae* infection frequency was higher in spring in both children (45%) and adults (35%). Recent *C. pneumoniae* infection was found in 9 patients who tested positive for IgA antibodies. *C. pneumoniae* IgG antibodies were detected in 66 patients (30.7%). No seasonal variation was observed in *C. pneumoniae* infections. *M. pneumoniae* was a common cause of respiratory tract infections especially in children with higher infection rates in spring. Recent *C. pneumoniae* infection was detected in few patients. High background of IgG antibody prevalence is indicative of repeated past exposure to the organism. Key words : *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* , respiratory tract infection.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cunha BA. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin Microbiol Infect.* 2006 May; 12 Suppl 3:12-24.
2. Youn et al. Difference of clinical features in childhood *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *BMC Pediatrics* 2010, 10:48.
3. Falck G, Gnarp J et al. Comparison of individuals with and without specific IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae*-Respiratory Morbidity and the Metabolic Syndrome. *Chest* 2002 Nov; 122(5): 1587-1593.
4. Tuuminen T, Varjo S, Ingman H, Weber T, Oksi J, Viljanen M. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* immunoglobulin G and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays; *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 September; 7(5): 734-738.
5. Μανίκα Κ, Γαβριηλάκη Ε, Χατζηδημητρίου Δ και συν. Ο ρόλος των «άτυπων» παθογόνων μικροοργανισμών στην πνευμονία της κοινότητας. *Δελ Ελ Μικ Ετ* 2010; 55:15-36.
6. Ginevra C, Barranger C, Ros A, et al. Development and evaluation of Chlamylege, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of *Legionella*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in clinical respiratory specimens by multiplex PCR; *J Clin Microbiol.* 2005 July; 43(7): 3247-3254.
7. Hammerschlag MR. Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae* in children: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr Pulmonol.* 2003 Nov; 36(5): 384-90.
8. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis.* 2001; 33(4): 492-503.
9. Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. *Chlamydomphila pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Jan; 15(1):29-35.
10. Σαμαντάς Κ, Γιαννάκη Μ, Κοντογιάννη Β, et al. Εκτίμηση ταχείας τεχνικής προσδιορισμού IgM ειδικών αντισωμάτων έναντι του μυκοπλάσματος της πνευμονίας. *Εφαρμ Κλιν Μικροβ και Εργ Διαγν* 2007; Περίοδος Β', 12(4): 224-228.
11. Sidal M, Kilic A et al. Frequency of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *J Trop Pediatr.* 2007 Aug; 53(4):225-31. Epub 2007 May 21.
12. Lieberman D, Porath A. Seasonal variation in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J.* 1997 Oct; 10(10):2432-3.
13. de Barbeyrac B, Obeniche F, Ratsima E, et al. Serologic diagnosis of chlamydial and *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Ann Biol Clin (Paris).* 2006 Sep-Oct; 64(5):409-19.
14. Paldanius M et al. Measurement of *Chlamydia pneumoniae*-Specific immunoglobulin A (IgA) antibodies by the microimmunofluorescence (MIF) method: comparison of seven fluorescein-labeled anti-human IgA conjugates in an in-house MIF test using one commercial MIF and one enzyme immunoassay kit. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jan; 10(1):8-12.
15. Κανσουζίδου Α, Καραμπαξόγλου Δ, Χαϊδούλη Ε, et al. Συχνότητα ανεύρεσης των IgG αντισωμάτων έναντι του *Chlamydia pneumoniae* σε υγιή άτομα. *Εφαρμ Κλιν Μικροβ και Εργ Διαγν* 2007; Περίοδος Β', 11(3): 176-183.