

Katarzyna W.Pancer¹, Alicja Pawińska³, Daniel Rabczenko², Justyna Milczewska⁴,
Joanna Friedman-Gruszczyńska⁴, Janusz B. Książyk⁴, Danuta Dzierżanowska³,
Hanna Stypułkowska-Misiurewicz¹

ODPOWIEDŹ ODPORNOŚCIOWA W KLASIE IGM NA ZAKAŻENIE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* U DZIECI

¹Zakład Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik Zakładu: Marek Jagielski

²Zakład Statystyki Medycznej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik Zakładu: Paweł Goryński

³Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej,
Instytut "Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka"
Kierownik Zakładu: Danuta Dzierżanowska

⁴Klinika Pediatrii, Instytut "Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka"
Ordynator Kliniki: Janusz B. Książyk

*Przedstawiono wyniki oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgM specyficznych dla *L. pneumophila* sg 1 w próbkach surowicy pobranych od 144 dzieci z objawami zakażeń dróg oddechowych. Wynik dodatni stwierdzono w badaniach 34 dzieci w wieku powyżej 2 r.ż., w tym 21 dziewczynek oraz 13 chłopców. Najwyższy odsetek próbek dodatnich stwierdzono w grupie wieku 4-10 lat (31,8%) oraz 10-14 lat (31,7%). Wykazano statystycznie znamienne różnice w oznaczanych poziomach immunoglobulin klasy M w zależności od wieku badanych dzieci.*

Słowa kluczowe: legionelozę, zakażenia dróg oddechowych u dzieci, serologia
Key words: legionellosis, respiratory tract infection in children, serology

WSTĘP

Legionelozę, jest chorobą wywoływaną przez pałeczki z rodziny *Legionellaceae*, rodzaju *Legionella* oraz *Tatlockia* (dawniej zaliczane do rodzaju *Legionella*). Może wywoływać całą gamę objawów ze strony układu oddechowego, pokarmowego, moczowego i nerwowego. W cięższych przypadkach można obserwować atypowe zapalenie płuc z towarzyszącą wysoką ciepłotą ciała (pow. 39°C), kaszlem, niewydolnością oddechową, utratą przytomności lub splątaniem umysłowym. Często obserwuje się objawy ze strony układu pokarmowego:

biegunkę, nudności, wymioty. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się podwyższony poziom enzymów wątrobowych, upośledzenie funkcjonowania nerek. Śmiertelność w przypadkach legionellozowego zapalenia płuc (choroby legionistów) wynosi ok. 13 - 20%, ale w przypadkach zakażenia pałeczkami *Legionella*, nabytego w szpitalu - wzrasta, nawet do 30 - 50%. Szacuje się, że wśród ciężkich zapaleń płuc choroba legionistów stanowi ok. 5-20% (1,2,3). Wysoki odsetek niepowodzeń terapeutycznych może być spowodowany obniżoną wrażliwością pałeczek *Legionella* na beta-laktamy oraz niewielką skutecznością wobec tych bakterii antybiotyków najczęściej stosowanych w terapii empirycznej zapaleń płuc. Skuteczne leczenie polega na stosowaniu makrolidów lub nowych fluorochinolonów. Czynnikiem etiologicznym legionelozu są najczęściej pałeczki należące do gatunku *L. pneumophila* serogrupy 1 (50-75%), w 15-20% są to bakterie *L. pneumophila* zaliczane do innych grup serologicznych, jak serogrupy 2-15, a w 5-10% inne gatunki *Legionella* m.in. *L. micdadei*, *L. longbeache* (1,2,3,4,5,6,7). Procentowy udział w zakażeniach poszczególnych gatunków lub odmian serologicznych jest różny w zależności od regionu geograficznego. W krajach skandynawskich częściej niż w krajach śródziemnomorskich, czynnikiem wywołującym legionelozę są pałeczki *L. pneumophila* serogrupy 2-15, natomiast w Australii i Oceanii odsetek zachorowań wywołanych przez *L. longbeachae* jest wyższy niż w Europie (8).

Zgodnie z danymi w piśmiennictwie przypadki legionelozu obserwowane są głównie wśród osób dojrzałych i starszych. Zachorowania na legionelozę u dzieci zgłaszane są bardzo rzadko.

Celem naszej pracy było próba wykazania, przy zastosowaniu badań przesiewowych, czy istotnie zachorowania na legionelozę wśród dzieci są tak rzadkim zjawiskiem.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto pacjentów, hospitalizowanych w Klinice Pediatrii IP Centrum Zdrowia Dzieci w Międzyzlesiu w okresie od czerwca 2005 do października 2006. U dzieci tych stwierdzono objawy ze strony układu oddechowego, które mogły sugerować możliwość zakażenia pałeczkami *Legionella*. Zastosowano komercyjny immunoenzymatyczny test (Euroimmun) do poszukiwania przeciwciał klasy IgM swoistych dla *L. pneumophila* sg 1. Test ten wykorzystywany jest do diagnostyki zakażeń pałeczkami *Legionella* (głównie u dorosłych) w Państwowym Zakładzie Higieny od 2001 roku. Wynik przedstawiono, jako współczynnik wartości OD próby badanej do wartości OD kalibratora. Wartość współczynnika poniżej 0,8 – oznacza wynik ujemny, w zakresie 0,8-1,099 – jest wartością graniczną, powyżej i równa 1,1 – wynik dodatni (znamienny poziom przeciwciał).

Porównanie zależności pomiędzy płcią a poziomem IgM przeprowadzono przy użyciu testu Manna-Whitneya. Istotność zależności pomiędzy grupą wieku a poziomem IgM oceniano przy pomocy testu Kruskala-Wallisa. Obliczenia przeprowadzono przy użyciu programu statystycznego SPSS for Windows 12.0.

WYNIKI

Ogółem przebadano 176 próbek surowic pobranych od 144 dzieci (69 dziewczynek oraz 75 chłopców) w wieku od 5 miesięcy do 18 lat. W tabeli I przedstawiono rozkład wieku i płci

Tabela I. Dzieci, u których wykonano oznaczenia poziomu IgM dla *L. pneumophila* sg 1 według grupy wieku i płciTable I. Children examined for IgM serum level to *L. pneumophila* sg 1 – by age group and gender

Grupa wieku (lata)	Dziewczęta	Chłopcy	Razem liczba badanych dzieci	Liczba zbadanych próbek surowicy
< 2 r.ż.	7	17	24	34
2 - < 4	24	16	40	46
4 - <10	23	26	49	60
10- <14	9	11	20	22
>14	6	2	8	11
Nieznany wiek	0	3	3	3
Razem	69	75	144	176

badanych dzieci. Najliczniejszą grupę badanych pacjentów stanowiły dzieci w wieku od 4 do 10 lat (34% badanych) oraz w wieku od 2 do 4 roku życia (28% dzieci).

W tabeli II zebrano wyniki oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgM dla *L. pneumophila* sg 1 w 176 próbkach surowicy pobranych od 144 dzieci – dane z podziałem na płeć.

Tabela II. Wyniki oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgM dla *L. pneumophila* sg 1 w 176 próbkach surowicy pobranych od 144 dzieci z podziałem na płeć.Table II. The level of IgM antibodies to *L. pneumophila* sg 1 in 176 serum samples collected from 144 children – by gender

Płeć	Badane dzieci				Badane próbki surowicy			
	Oznaczony współczynnik			Ogółem dzieci	Oznaczony współczynnik			Ogółem próbek
	0,000-0,799	0,800-1,099	> 1,100		0,000-0,799	0,800-1,099	> 1,100	
Dziewczęta Liczba (%)	40 (58%)	8 (11,5%)	21 (30,5%)	69 (100%)	52 (59,0%)	12 (13,6%)	24 (27,3%)	88 (100%)
Chłopcy Liczba (%)	51 (68%)	11 (14,5%)	13 (17,5%)	75 (100%)	59 (67,0%)	12 (13,6%)	17 (19,3%)	88 (100%)
Ogółem Liczba (%)	91 (63%)	19 (13%)	34 (24%)	144 (100%)	111 (63,0%)	24 (13,6%)	41 (23,3%)	176 (100%)

Ogółem wartość wyliczonego współczynnika zawarta była w granicach od 0,020 do 8,840 (wśród dziewczynek 0,020-8,840, wśród chłopców 0,050-3,790). Znamiennej poziom przeciwciał klasy IgM swoistych dla *L. pneumophila* sg 1 stwierdzono w aż w 41 próbkach (23,3% badanych próbek), poziom graniczny wykazano w 24 próbkach (13,6%), natomiast nieznamiennej poziom IgM oznaczono w 111 próbkach (63%). Serokonwersję, czyli znamiennej spadek lub wzrost miana przeciwciał, stwierdzono w kolejnych próbkach pobranych od 2 dziewczynek. W próbkach pobranych od 3 dzieci obserwowano wzrost miana przeciwciał klasy IgM, ale najwyższy uzyskany wynik mieścił się w zakresie wartości granicznej.

Znamiennej poziom immunoglobulin klasy M dla *L. pneumophila* sg 1 wykazano w próbkach pobranych od 34 dzieci (24% badanych dzieci) – 21 dziewczynek (15%) i 13 chłopców

(9% ogółem badanych dzieci). Natomiast udział dziewcząt, u których stwierdzano znamienne poziomy przeciwciał wśród badanych dziewczynek wynosił 30,5%, udział chłopców - 17,5%. Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic w oznaczonym poziomie specyficznych dla *L. pneumophila* sg 1 przeciwciał klasy IgM w zależności od płci ($p=0,24$)

W tabeli III zebrano wyniki oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgM dla *L.pneumophila* sg 1 w 173 próbkach surowicy pobranych od dzieci wg. wieku.

Tabela III. Wyniki oznaczania poziomu przeciwciał klasy IgM dla *L.pneumophila* sg 1 w 173 próbkach surowicy pobranych od dzieci z podziałem na wiek.

Table III. The level of IgM antibodies to *L.pneumophila* sg 1 in 173 serum samples collected from children– by age group

Grupa wieku (lata)		Oznaczony współczynnik			Ogółem
		0,000-0,799	0,800-1,099	> 1,100	
<2 r.ż.	Liczba	28	6	0	34
	%	82,3	17,6	0,0	100
2 - < 4	Liczba	29	5	12	46
	%	63	10,9	26,1	100
4 - <10	Liczba	32	9	19	60
	%	53,4	15,0	31,7	100
10 - <14	Liczba	12	3	7	22
	%	54,6	13,6	31,8	100
> 14	Liczba	7	1	3	11
	%	63,7	9,1	27,3	100
Ogółem	Liczba	108	24	41	173*
	%	62,4	13,9	23,7	100

* z analizy wyłączone wyniki oznaczeń wykonanych w 3 próbkach surowicy pobranych od 3 chłopców dla których nie udało się ustalić wieku (były to wyniki ujemne).

* - 3 serum samples (negative results) were excluded from analysis because of unknown age of patients

W próbkach pobranych od dzieci najmłodszych (poniżej 2 r.ż.) nie stwierdzono wartości dodatnich, ale w 6 próbkach (17,6%) poziom przeciwciał był graniczny. Najwyższy odsetek dodatnich surowic spośród badanych próbek pobranych od dzieci w danej grupie wieku stwierdzono w grupie wieku 4 – 10 lat (31,8% badanych) oraz 10-14 lat (31,7%). Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w poziomie przeciwciał klasy IgM swoistych dla *L. pneumophila* sg 1 w zależności od wieku badanych dzieci ($p=0,001$).

DYSKUSJA

Występowanie legionelozy u dzieci jest zjawiskiem mało poznanym ze względu na niewielką liczbę udokumentowanych zachorowań, wywołanych przez pałeczki *Legionella* w tej grupie wiekowej. Opisane przypadki dotyczą głównie dzieci w immunosupresji lub poddanych długotrwałej terapii np. kortykosteroidami (9,10). Według przeglądu światowego piśmiennictwa (dokonanego przez zespół *Greenberga* i wsp., 2006) opisanych zostało zaledwie 76 zachorowań na legionelozę u dzieci, z tego 46% stanowiły zachorowania nabyte w domowym środowisku (*community-acquired pneumonia*, CAP). Opisane przypadki

dotyczyły w 51,5% dzieci poniżej 2 roku życia. Ponadto u 78% małych pacjentów stwierdzono obecność innych, poważnych schorzeń (np. chorobę nowotworową) (11). Analiza piśmiennictwa wskazała także na znaczne obniżenie śmiertelności w przypadku zastosowania właściwego leczenia, podjętego odpowiednio wcześniej w porównaniu do sytuacji, kiedy zastosowano niewłaściwe leczenie (odpowiednio 23% i 70%).

Badania przesiewowe nt. różnych czynników zapalenia płuc u dzieci i dorosłych prowadzone były także w innych krajach (np. Gruzja, Tajlandia, Bangladesz, Chiny, Jordania, Szwecja), jednak stwierdzany odsetek zakażeń wywołanych przez pałeczki *Legionella* na ogół był niewielki (12 – 17).

Badania naszego zespołu zostały ukierunkowane na wykrywanie obecności przeciwciał w klasie IgM, w odpowiedzi na zakażenie pałeczkami *Legionella*. W diagnostyce legionelozy jednorazowe stwierdzenie znamiennego poziomu przeciwciał interpretowane jest jako „prawdopodobne zakażenie”. W celu potwierdzenia zakażenia zalecane jest wykonanie drugiego oznaczenia poziomu przeciwciał, po upływie co najmniej 2 tygodni od pierwszego badania, albo dodatkowe wykonanie innego testu (np. poszukiwanie antygenu *L. pneumophila* w próbce moczu, wykrywanie metodą PCR specyficznego fragmentu DNA w próbce materiału klinicznego, posiew wydzielin dróg oddechowych). Stwierdzony w naszych badaniach znaczny odsetek (23,3%) spośród nadesłanych próbek surowicy, w których oznaczony poziom przeciwciał klasy M był znamienny sugeruje, że legionelozowe zapalenie płuc oraz łżejsze postaci legionelozy mogą być znacznie częstsze wśród dzieci, także uprzednio zdrowych, niż przypuszczano. W 2006 r. opublikowane zostało doniesienie *dr Mrozińskiej* o zachorowaniach na legionelozę 3 uprzednio zdrowych dzieci (badania laboratoryjne w kierunku legionelozy wykonywane były w PZH) (18). Lekarze pediatrzy powinni brać pod uwagę pałeczki *Legionella* jako możliwy czynnik etiologiczny zapalenia płuc u dzieci - podobnie jak *Mycoplasma pneumoniae* czy *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*.

Jednym z czynników wpływających na odpowiedź odpornościową jest wiek i rozwój układu odpornościowego. Znamienny poziom przeciwciał klasy M stwierdzano u dzieci od 2 roku życia. Wśród najmłodszych pacjentów (poniżej 2 r.ż.) stwierdzano poziom graniczny, co może wskazywać na konieczność wykonania badań kontrolnych dla skorygowania punktów odcięcia w badaniach u dzieci w wieku poniżej 2 lat.

Zwraca także uwagę znacznie wyższy niż w piśmiennictwie odsetek wyników dodatnich wśród próbek pobranych od dziewczynek (aż 62% oznaczonych wyników dodatnich). Nie potwierdziły się także dane światowe wskazujące na częstsze zakażenia u mężczyzn niż u kobiet (u dorosłych stosunek K/M wynosi 1:3). Możliwe, że specyfika badanej grupy (dzieci) wpłynęła na uzyskane wyniki. Ponadto z analizy nie wyłączano zachorowań o łżejszym przebiegu, bez stwierdzonego zapalenia płuc.

Należy podkreślić, że prezentowane wyniki badań przesiewowych, przeprowadzone przez nasz zespół wskazują na potrzebę kontynuowania badań również dla ustalenia punktów odcięcia dla dzieci w różnym wieku.

KW Pancer, A Pawińska, D Rabczenko, J Milczewska, J Friedman-Gruszczynska, JB Książyk, D Dzierżanowska, H Stypułkowska-Misiurewicz

IMMUNOLOGICAL RESPONSE (IgM) TO *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* INFECTION IN CHILDREN

SUMMARY

Most of the publications report cases of *Legionella* infection among adults. In our studies the level of IgM to *Legionella pneumophila* sg 1 was determined by ELISA method in serum samples of 144 children with symptoms of respiratory tract infections. Children were from 5 months to 18 years old. The significant level of IgM was found in 41 sera collected from 34 children aged 2 years and above. There were samples collected from 21 girls and 13 boys. The highest percentage of significant level of IgM was found in the age group 4-10 years (31,8%) and 10-14 years (31,7%). Among the youngest children (below 2 years) the equivocal results were found in 6 samples. The significant difference in IgM level was found between the children age groups. There was not found the significant differences in IgM level depending on gender. Obtained results indicated the importance of such kind of studies and necessity of adjusting cut-off values to age groups of children.

PIŚMIENNICTWO

1. Fry NK, Harrison TG. Diagnosis and Epidemiology of Infections Caused by *Legionella* spp. w: Methods in Molecular Medicine, vol. 15: Molecular bacteriology: Protocols and Clinical Applications. Ed. Bvy: N. Woodford and A.P. Johnson, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
2. Pancer K, Stypułkowska-Misiurewicz H, Krogulska B, Matuszewska R, Meszaros J. Legioneloza w szpitalach. Blok Operacyjny 2001, 1, 15-18.
3. Yu VL: Nosocomial legionellosis. Current Opinion in Infectious Diseases 2000, 13, 385-88.
4. Pancer K, Stypułkowska-Misiurewicz H. Gorączka Pontiac – zapłucna postać legionelozy. Przegl Epidemiol 2003, 57: 607-12.
5. Raport of the Maryland Scientific Working Group to Study Legionella in Water Systems in Healthcare Institutions: <http://www.dhmh.state.md.us>
6. Stypułkowska-Misiurewicz H, Pancer K. Legioneloza w Polsce w latach 2001-2002 na tle sytuacji epidemiologicznej w Europie. Przegl Epidemiol 2003, 57, 599-606.
7. Stypułkowska-Misiurewicz H, Pancer K, Krogulska B, Matuszewska R. Development of Surveillance of *Legionella* Infections in Poland By Serological Investigation. w: *Legionella* ed. by R.Marre, ASM Press, 2002, 68, 338-341.
8. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, i in. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 710-716.
9. Johansson PJ, Andersson K, Wiebe T, Schalen C, Bernander S. Nosocomial transmission of *Legionella pneumophila* to a child from a hospital's cold-water supply. Scand J Infect Dis 2006; 38: 1023-7
10. Myers C, Corbelli R, Schrenzel J, Gervais A. Multiple pulmonary abscesses caused by *Legionella pneumophila* infection in an infant with croup. Pediatr Infect. Dis J 2006; 25: 753-4
11. Greenberg D, Chiou CC, Famidilleti R, Lee TC, Yu VL. Problem pathogens: paediatric legionellosis – implications for improved diagnosis. Lancet Infect Dis 2006; 6: 529-35
12. Al-Ali MK, Batchoun RG, Al-Nour TM. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Jordan. Saudi Med J 2006; 27: 813-6

13. Chkhaidze I, Manjavidze N, Nemsadze K. Serodiagnosis of acute respiratory infections in children in Georgia. *Indian J Pediatr* 2006; 73: 569-72.
14. Haung HH, Hang YY, Xiu QY, i in. Community-acquired pneumonia in Shanghai, China: microbial etiology and implications for empirical therapy in a prospective study of 389 patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25: 369-74.
15. Matsumoto T, Matsumura K, Anwar KS, i in. Prevalence of *Chlamydomphila pneumoniae* among Bangladesh children under 5 years with acute respiratory infections. *J Infect Chemother* 2006; 12: 139-44.
16. Prapphal N, Suwanjutha S, Durongkaverroj P, i in. Prevalence and clinical presentations of atypical pathogens infection in community acquired pneumonia in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2006; 89: 1412-9.
17. Schneeberger PM, Dorigo-Zetsma JW, van der Zee A, van Bon M, van Opstal JL. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 269-73.
18. Mrozińska M. Zapalenie płuc o etiologii *Legionella pneumophila* (LP) u trojga dzieci - opis przypadków. *Przegl Epidemiol* 2005; 59: 851-57.

Otrzymano: 12.03.2007 r.

Adres do korespondencji:

dr Katarzyna Pancer
Państwowy Zakład Higieny
Ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa
e-mail: kpancer@pzh.gov.pl