

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Matej Kovač

PRIMERJAVA DVEH SEROLOŠKIH METOD ZA  
DOKAZOVANJE OKUŽB Z BAKTERIJO *Mycoplasma*  
*pneumoniae*

COMPARISON OF TWO SEROLOGICAL METHODS FOR  
DIAGNOSTIC OF INFECTIONS WITH BACTERIA *Mycoplasma*  
*pneumoniae*

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010



Diplomsko delo sem opravljal na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v laboratoriju za dokazovanje virusnih okužb.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med., ki me je sprejel na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo ter mi omogočil izvajanje diplomskega dela s področja, ki me zanima in mi nudil strokovno pomoč ter vodenje pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi osebju laboratorija za diagnostiko virusnih infekcij za pomoč pri izvajanju praktičnega dela naloge ter vsem domačim za vzpodbude v času študija.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca, dr. med.

Podpis:

Ljubljana, september 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft

Mentor: doc. dr. Miroslav Petrovec

Somentor(ica): -----

Članica diplomske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički



## Kazalo

1	Uvod .....	1
1.1	Mikoplazme kot povzročiteljice bolezni.....	1
1.1.1	Splošno o mikoplazmah .....	1
1.1.2	Taksonomska razvrstitev mikoplazem .....	1
1.1.3	Biološke lastnosti mikoplazem.....	1
1.1.4	Virulenčni faktorji mikoplazem.....	3
1.1.5	Genom mikoplazem.....	4
1.2	Patogeneza .....	4
1.2.1	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	4
1.2.2	Ostale mikoplazme .....	5
1.3	Klinične slike infekcij z <i>Mikoplazmo pneumoniae</i> .....	6
1.3.1	Pljučnica .....	6
1.3.2	Vnetje žrela.....	6
1.3.3	Traheobronhitis.....	7
1.4	Epidemiologija.....	7
1.5	Zdravljenje in preprečevanje.....	8
1.6	Laboratorijska diagnostika okužb z <i>M. pneumoniae</i> .....	9
1.6.1	Osamitev bakterij na gojiščih .....	9
1.6.2	Direktni imunofluorescenčni test .....	10
1.6.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	10
1.6.4	Encimsko imunski test (ELISA).....	11
1.7	Vrednotenje posameznih diagnostičnih metod .....	12
2	Namen naloge.....	14
3	Materiali in metode.....	15
3.1	Princip encimsko imunskega testa (ELISA).....	15
3.2	Test ELISA proizvajalca Savyon Diagnostics Ltd, Ashdod, Izrael.....	16
3.2.1	Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgG.....	16
3.2.2	Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgA.....	16
3.2.3	Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgM.....	17
3.2.4	Shranjevanje in stabilnost reagentov .....	18
3.2.5	Oprema za izvedbo testa.....	18
3.2.6	Postopek testiranja.....	18
3.2.7	Vrednotenje rezultatov .....	20

3.3	Test ELISA proizvajalca Medac GmbH, Hamburg, Nemčija .....	22
3.3.1	Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgG.....	22
3.3.2	Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgA.....	23
3.3.3	Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgM.....	23
3.3.4	Shranjevanje in stabilnost reagentov .....	24
3.3.5	Oprema za izvedbo testa.....	24
3.3.6	Postopek testiranja.....	25
3.3.7	Vrednotenje rezultatov .....	26
3.4	Test ELISA proizvajalca Serion, Immunodiagnostica GmbH, Würzburg, Nemčija.....	29
3.4.1	Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgG.....	29
3.4.2	Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgM.....	29
3.4.3	Shranjevanje in stabilnost reagentov .....	30
3.4.4	Oprema za izvedbo testa.....	30
3.4.5	Postopek testiranja.....	30
3.4.6	Vrednotenje rezultatov .....	31
4	Rezultati.....	34
4.1	Rezultati testiranja s testom Serion.....	34
4.2	Rezultati testiranja s testom Medac .....	35
4.3	Rezultati testiranja s testom Savyon .....	35
4.4	Primerjava rezultatov treh seroloških testov za dokazovanje okužb z <i>M. pneumoniae</i> .....	36
4.5	Diagnostično vrednotenje rezultatov treh seroloških testov za dokazovanje okužb z <i>M. pneumoniae</i> .....	38
4.6	Diagnostična specifičnost in občutljivost metod .....	41
5	Diskusija.....	43
6	Sklepi.....	48
7	Literatura .....	49

## POVZETEK

Bakterija *Mycoplasma pneumoniae* je zelo prilagojena na gostitelja (človeka) in se prenaša le znotraj te gostiteljske vrste. S človeškimi sluznicami pride najpogosteje v stik s kužnimi kapjlicami. Inkubacijski dobi (10-20 dni) sledijo nespecifični simptomi (glavobol, povišana telesna temperatura, suh, neproduktiven kašelj). Povzroča različne okužbe dihal, ki se lahko pokažejo kot pljučnica, faringitis ali traheobronhitis. Ocenjujejo, da so v Združenih državah Amerike okužbe z *M. pneumoniae* vzrok 10 do 20 % vseh pljučnic, ki so obravnavane ambulantno. Pri otrocih, ki so mlajši od 5 let, lahko okužba poteka blago ali celo brez simptomov. Pri mlajših bolnikih so pogostejše tudi sekundarne okužbe z *M. pneumoniae*, ki sledijo predhodni virusni ali bakterijski (pnevmokokni) pljučnici. Po okužbi z *M. pneumoniae* ne pride do razvoja zaščitne imunosti, zato so ponovne okužbe pogoste in okrevanje po njih dolgotrajno.

Za diagnostiko okužb z *M. pneumoniae* je potrebno uporabiti specifične laboratorijske teste, saj na osnovi kliničnih znakov pljučnice, ki jo povzroča, te ni mogoče ločiti od pljučnic, ki jih povzročajo virusi. Diagnostika poteka z neposrednimi (osamitev bakterije na gojišču, dokaz genoma z metodo PCR) in posrednimi metodami (serološke preiskave). V zelo zgodnjem obdobju okužbe so za diagnostiko bolj primerne neposredne metode.

Namen naloge je bil dokazati specifična protitelesa IgG, IgM in IgA z dvema novejšima diagnostičnima kompletoma proizvajalcev Medac in Savyon, ki temeljita na metodi ELISA, in primerjati rezultate z metodo ELISA proizvajalca Serion, ki se rutinsko uporablja za določanje specifičnih protiteles IgG in IgM. Rezultate smo poskušali ovrednotiti tudi diagnostično oziroma dokazati akutno okužbo.

Protitelesa smo dokazovali v skupini 49 bolnikov, pri katerih sta bila v laboratorij na rutinsko serološko diagnostiko okužbe z *M. pneumoniae* poslana vsaj dva (parna) arhivska vzorca, odvzeta v različnih časovnih obdobjih (leta 2006 in/ali 2007). Sum na akutno okužbo smo s testom Serion potrdili pri 13 (26,5 %), s testom Medac pri 20 (40,8 %) in s testom Savyon pri 23 (46,9 %) od testiranih bolnikov. Dokazali smo, da se bolniki s potrjeno akutno okužbo s posamičnim testom razlikujejo po povprečni starosti. Najnižjo so imeli tisti, ki so bili dokazani s testom Serion (11,4 leta), najvišjo pa tisti s testom Savyon (24,6 let). Pri starejši populaciji si uspešnejše dokazovanje okužb z *M. pneumoniae* razlagamo z dokazovanjem protiteles razreda IgA.

## SEZNAM OKRAJŠAV

- AU – arbitrarna enota (angl. arbitrary unit)
- BSA – goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
- BU – arbitrarna vezna enota (angl. arbitrary binding unit)
- C – citozin
- COI – "cut off" indeks, indeks za dokazovanje protiteles
- DNK – deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
- ELISA – encimsko imunska metoda (angl. Enzyme linked immunosorbent assay)
- FCS – serum telečjega zarodka (fetal calf serum)
- G – gvanin
- HRP – peroksidaza (angl. horseradish peroxidase)
- IgA – imunoglobulini (protitelesa) razreda A
- IgG – imunoglobulini (protitelesa) razreda G
- IgG/Rf – absorbant imunoglobulinov razreda G in revmatoidnega faktorja
- IgM – imunoglobulini (protitelesa) razreda M
- IU – internacionalna enota (angl. international unit)
- kDa – kilodalton, enota za molekulsko maso
- LN – lažno negativni
- LP – lažno pozitivni
- NK – negativna kontrola (angl. negative control)
- O.D. – absorbanca (angl. optical density)
- P1 – beljakovina adhezina *M. pneumoniae*
- PCR – polimerazna verižna reakcija (angl. polymerase chain reaction)
- pH – merilo kislosti oz. bazičnosti
- PK – pozitivna kontrola (angl. positive control)
- RN – resnično negativni
- RP – resnično pozitivni
- Se – diagnostična senzibilnost (angl. diagnostic sensitivity)
- Sp – diagnostična specifičnost (angl. diagnostic specificity)
- U – enota (unit)
- UV – ultravijolični žarki





# 1 Uvod

## 1.1 Mikoplazme kot povzročiteljice bolezni

### 1.1.1 Splošno o mikoplazmah

Mikoplazme so najmanjši prostoživeči mikroorganizmi. Za razliko od drugih bakterij nimajo celične stene. Od virusov se razlikujejo po tem, da lahko živijo in se razmnožujejo zunaj gostiteljevih celic (1). So zelo prilagojene na gostitelja – prenašajo se le znotraj ene gostiteljske vrste (2). Povzročajo različna bolezenska stanja pri ljudeh, živalih in rastlinah (1, 2, 3). Ta so kronična, ponavadi blaga in le redko povzročijo smrt (4).

Pri ljudeh lahko identificiramo najmanj 15 vrst, od katerih so za človeške bolezni pomembne predvsem 4 vrste, in sicer: *Mycoplasma pneumoniae* (povzroča pljučnico in okužbe sklepov), *Mycoplasma hominis* (genitalne okužbe), *Ureaplasma urealyticum* (uretritis pri moških, pri novorojencih pa vnetje dihal) in *Mycoplasma genitalium* (genitalne in druge okužbe) (2).

### 1.1.2 Taksonomska razvrstitev mikoplazem

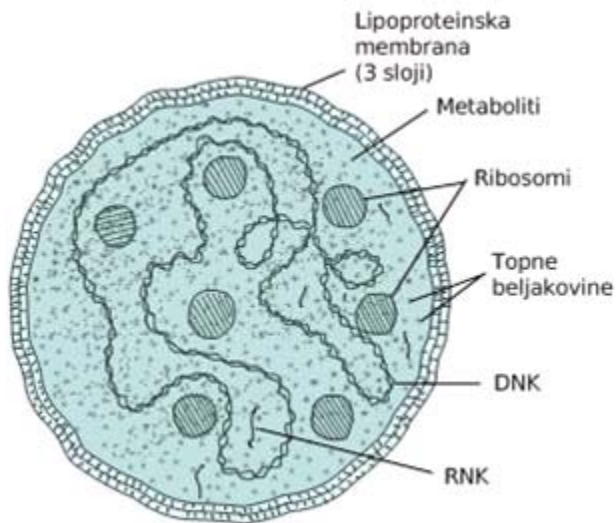
Preden je analiza mikoplazemskih rRNA razkrila, da so podobne Gram pozitivnim mikroorganizmom, so bile uvrščene v ločeno deblo Gram negativnih bakterij – deblo *Mollicutes*. Danes jih sodobni taksonomi in druga izdaja Bergey's Manual of Systematic Bacteriology uvrščajo v *Mollicutes* kot razred Gram pozitivnih bakterij z nizko vsebnostjo gvanina in citozina (G+C) v deblo *Firmicutes* (5).

Ime *Mollicutes* pomeni " mehka koža" in nakazuje na odsotnost rigidne celične stene (6). Ta razred je razdeljen v štiri redove: *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* in *Anaeroplasmatales*. Red *Mycoplasmatales* vsebuje samostojno družino *Mycoplasmataceae*, v katero sodita rodova *Mycoplasma* in *Ureaplasma*. Za ta je značilno, da potrebujeta za kultivacijo in vitro sterole (npr. holesterol). Rod *Mycoplasma* vsebuje čez sto vrst, rod *Ureaplasma* pa šest (6).

### 1.1.3 Biološke lastnosti mikoplazem

Celice mikoplazem so zelo majhne – merijo le 0,2-0,3 µm, so brez celične stene, zato niso sposobne vzdrževati svoje stalne oblike – torej so pleomorfne. Obdaja jih trojni sloj lipidne membrane (2).

Glikolipidi, fosfolipidi in nevtralni lipidi so, tako kot pri večini bioloških membran, tudi pri mikoplazemskih glavni gradniki le-teh. Dve tretjini mase membrane sestavljajo proteini, eno tretjino pa lipidi.

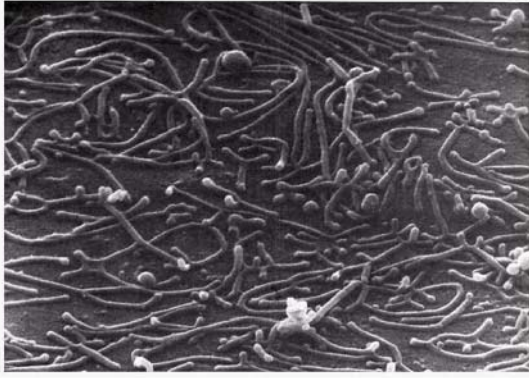


**Slika 1:** Celična zgradba mikoplazem (skica)

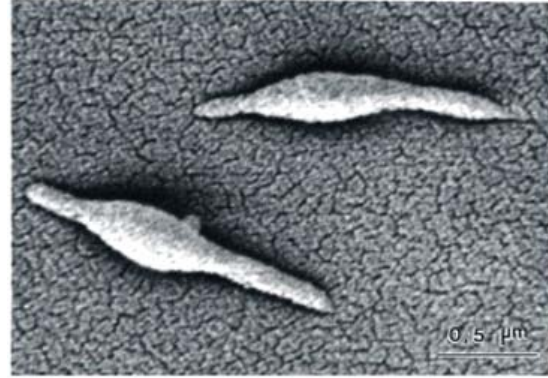
Za razliko od ostalih prokariontov imajo mikoplazme precejšen delež lipoproteinov, ki predstavljajo njihove glavne antigene. Za svojo rast nujno potrebujejo holesterol, ki ga niso sposobne sintetizirati same, zato tega pridobivajo iz membran gostiteljevih celic, na katere so pritrjene (2, 7). Pomemben je za uravnavanje fluidnosti membrane. Mikoplazme ne morejo ali pa so le delno sposobne sinteze maščobnih kislin (7).

Čeprav je večina mikoplazem negibljivih in brez bičkov, pa imajo nekatere hruškaste oblike (*M.pneumoniae*, *M. genitalium* ...) sposobnost polzenja po mokrih površinah. Kako do tega pride, še vedno ni popolnoma raziskano (8, 9). Pomembno vlogo ima po vsej verjetnosti pritrditveni organel. Ta se med premikanjem nahaja na tisti strani bakterije, ki je obrnjena v smer gibanja (10).

Ker so mikoplazme pleomorfne in imajo lastnost, da se slabo obarvajo, se ne proučujejo z običajnimi bakteriološkimi metodami. Rastejo na tekočih in trdnih gojiščih. Na tekočih se pojavljajo v različnih oblikah (obročastih, vlaknastih, spiralnih, bacilarnih). Na trdnih tvorijo raznolike kolonije, ki zrastejo v nekaj dneh.



**Slika 2:** Pleomorfne oblike mikoplazem, lahko so kokoidnih ali filamentarnih oblik, saj so brez celične stene



**Slika 3:** *M. pneumoniae* na trdni površini pod elektronskim mikroskopom

Njihov premer znaša od 50 do 300  $\mu\text{m}$ . Opazujemo jih z mikroskopom. Zaradi odsotnosti celične stene so odporne proti antibiotikom, ki delujejo nanjo (2).

#### 1.1.4 Virulenčni faktorji mikoplazem

Potencialni virulenčni faktorji človeku patogenih mikoplazem še niso podrobno proučeni, vendar so v zadnjih nekaj letih nekatere od njih opisali (6).

Tako je najpomembnejši virulentni dejavnik *M. pneumoniae* beljakovina adhezina P1, ki se nahaja na membrani in ima velikost 169- kDa. Za njega je znano, da omogoča adherenco mikroba na celice gostitelja. Ker je adherenca pomemben prvi korak za okužbo, ta protein predstavlja pravi virulenčni faktor tega organizma, dodatno pa se posamezniki odzovejo z močnim protitelesnim odgovorom na ta adhezina. Iz tega lahko sklepamo, da bi ta protein lahko bil koristen pri seroloških testih za diagnozo infekcij z *M. pneumoniae*. Prav tako so dokazali dodatne površinske proteine, ki pomagajo P1 pri adherenci na tarčna tkiva (6).

P50 in P100 sta dva površinsko lokalizirana polipeptida *M. hominis*, ki omogočata adherenco te vrste na eukariotske celice. *M. hominis* prav tako veže sulfonirane glikolipide v časovni, temperaturni in koncentracijski odvisnosti. Ti glikolipidi in drugi glikokonjugati se v velikih količinah nahajajo v ženskem in moškem urogenitalnem traktu (6).

*M. genitalium* ima vrstno-specifičen 140- kDa velik protein, imenovan P140, ki je funkcionalno in strukturno podoben P1 od *M. pneumoniae*. Sevi *M. genitalium*, ki niso sposobni adherence, so spremenili ali pa izgubili ta adhezina.

Izolati *U. urealyticum* izdelujejo fosfolipazne encime, ki hidrolizirajo fosfolipide, pri čemer se sprostí arahidonska kislina. Domnevamo, da pri okužbah ženskega genitalnega trakta produkcija fosfolipaze privede do zaporedja patoloških dogodkov (6).

### **1.1.5 Genom mikoplazem**

Kot pri drugih bakterijah mikoplazemski genom predstavlja krožna dvojna vijačnica DNK (11). V večini primerov mikoplazme ne vsebujejo plazmidov (12). Velikost genoma je manjša kot pri večini drugih prokariontov, in sicer najpogosteje znaša med 500 in 1100 kilobaznih parov DNK. To lahko primerjamo s tisto od klamidije in rikecije in predstavlja eno petino do eno četrtno velikosti genoma od *E. coli*.

Genom *M. genitalium* vsebuje 580 kilobaznih parov in je to najverjetneje najmanjša količina DNK, ki jo celica potrebuje za izvajanje življenjskih procesov (6, 11, 13).

## **1.2 Patogeneza**

Mikoplazme se prenašajo le znotraj ene gostiteljske vrste, saj so zelo prilagojene na gostitelja. Pri živalih živijo mikoplazme predvsem znotraj celično v mezotelijskih tkivih (plevra, peritonej, sinovijska ovojnica sklepov) in povzročajo različne bolezni (pljučnice pri govedu, atrofijo mlečnih žlez pri drobnici, respiratorna in sklepna obolenja pri piščancih, prašičih, psih in drugih živalih).

Pri ljudeh mikoplazme izoliramo iz sluznice dihal, spolovil in sečil (2). Pri okužbah dihal je *M. pneumoniae* odgovorna za 10-20 % primerov zunaj bolnišnično pridobljenih pljučnic, kar predstavlja približno tretjino vseh okužb z mikoplazmo (14).

Nekatere (*M. salivarium*, *M. orale*, *M. buccale*) od tistih, ki se nahajajo v ustih, so del normalne flore. Druge (*M. hominis*, *U. urealyticum* in *M. genitalium*) se nahajajo v sluznici spolovil in sečil zlasti pri ženskah. Pri obeh spolih je verjetnost za poseljenost sorazmerna s številom spolnih partnerjev (2).

### **1.2.1 *Mycoplasma pneumoniae***

*M. pneumoniae* pride s kužnimi kapljicami ali mnogo redkeje z aerosoli v stik z epitelijskimi celicami nosne in žrelne sluznice, najverjetneje pa tudi s sluznico spodnjih dihal in z mononuklearnimi celicami (1). Okužba se začne z receptorsko vezavo površinskih proteinov P1 na epitelijske celice dihal. Tu se začne razmnoževati. Le nekaj

bakterij prodre v sluznico, večina pa jih ostane med epiteljskimi celicami na površini sluznic (1).

Okužbi sledi porast koncentracije specifičnih protiteles v krvi in večja odpornost proti ponovni okužbi. *M. pneumoniae* povzroča poliklonske stimulacije, tako B kot T limfocitov in tvorbo citokinov. Pri bolnikih, ki so okuženi s to bakterijo, najdemo tudi do 100 % zvišanje vrednosti celotnih protiteles IgM. Prav tako se pri takih bolnikih v serumu pojavijo protitelesa proti hladnim aglutininom, ki, sicer zelo redko, lahko povzročijo hemolitično anemijo in diseminirano intravaskularno koagulacijo. Ta se lahko konča s smrtjo. Prehodno se pojavijo tudi protitelesa proti tkivnim antigenom, ki povzročijo avtoimune reakcije, ki se pogosto končajo brez posledic (1). Lahek potek bolezni pri otrocih, hujši pri starejših ljudeh nakazuje možnost imunskih dogajanj. Reakcija med antigenom in protitelesom ob ponovni okužbi z *M. pneumoniae* naj bi privedla do bolezenske slike (1).

Po okužbi sledi eno do tritedenska inkubacijska doba, nato običajno blago obolenje dihal z vročino, glavobolom, bolečim žrelom in kašljem (najprej je suh, kasneje pa lahko nastane krvavkast izmeček). Zgodaj v poteku bolezni se na rentgenskem posnetku vidi izrazito zasenčenje pljuč, vendar je bolnik kljub temu malo prizadet. Njegova prizadetost se za tem lahko stopnjuje in bolezen izzveni počasi (2).

### **1.2.2 Ostale mikoplazme**

Iz zgornjih sečil pri pielonefritisu in iz sluznice jajcevodov pri salpingitisu je mogoče izolirati *M. hominis*. Prav tako imajo ženske s salpingitisom pogosteje prisotna protitelesa proti *M. hominis*, kot ženske, ki niso obolele. Iz tega sklepamo na povezavo med okužbo sečil s tem mikrobom in nekaterimi boleznimi, (splav, poporodna mrzlica, artritis), vendar neposrednih dokazov za to ni. *M. genitalium* verjetno povzroča manjši del akutnih in kroničnih uretritisov pri moških, a jo je mogoče razmeroma redko dokazati v sečnici obolelih. Prav tako pri moških uretritis lahko povzroča *U. urealyticum*, ki za rast na gojiščih potrebuje urejo. Pogosto je prisotna tudi v ženskih spolovilih, ni pa znano, koliko njena navzočnost vpliva na nastanek bolezenskih procesov (2).

## **1.3 Klinične slike infekcij z *Mikoplazmo pneumoniae***

### **1.3.1 Pljučnica**

Začetek bolezni je počasen; inkubacija ponavadi traja 14-21 dni. Bolezen spremljajo utrujenost, mrazenje, nahod in bolečine v žrelu. Zelo pogosto je prisoten tudi glavobol. Telesna temperatura navadno ni povišana ali pa le zmerno; takrat ima obliko kontinue. Čez nekaj dni se pojavi kašelj, ki je na začetku suh, pozneje pa se pojavi sputum, ki je sluzav ali gnojen, redko krvav. Navadno ima bolnik izcedek iz nosu ter pordel obraz. Pojavijo se tudi bolečine za prsnico, včasih plevralna bolečina in bolečine v mišicah in sklepih, bruhanje ali slabost. Pri 15 % bolnikov se pojavi izpuščaj različnih oblik, pri 20 % opazimo miringitis (15).

Fizikalni izvid nad pljuči je v večini primerov normalen, pri vdihu pa včasih slišimo lokalizirane piske. Če se vnetje iz intersticija razširi v alveole, so značilni naslednji znaki: poki, bronhialno dihanje, pojačana bronhofonija, skrajšan poklep. Na rentgenogramu vidimo intersticijska zasenčenja v spodnjem režnju, lahko tudi obojestransko. Pleoralni izliv se pojavi pri 5-20 % bolnikov. Pri okužbi z *M. pneumoniae* je nesorazmerje med fizikalnim izvidom in rentgenogramom bolj izraženo kot pri drugih atipičnih pljučnicah (15).

Na splošno lahek potek okužbe z *M. pneumoniae* dokazujejo dejstva, da je potrebno hospitalizirati samo 10 % odraslih in 25 % otrok. Kadar bolnika ne zdravimo, povišana temperatura navadno traja 8-10 dni, nato začne postopoma padati. Utrujenost, kašelj in pljučni infiltrat pa so lahko navzoči tudi do 6 tednov. Bolezen se zelo redko konča s smrtjo (15).

### **1.3.2 Vnetje žrela**

Znaki okužbe se pojavijo postopno, po 2-3 tednih inkubacije. Izrazit je predvsem kašelj, ki je vedno hujši in predstavlja najbolj moteč simptom. Prisotni so še povišana telesna temperatura, bolečine v žrelu, glavobol in utrujenost.

Pri vnetju žrela je sluznica otekla in pordela. Vratne bezgavke so na pritisk zmerno boleče, malo ali nič povečane.

Pri fizikalnem pregledu pljuč slišimo piske, vendar je izvid normalen (15).

### 1.3.3 Traheobronhitis

5-10 % bolnikov zbolijo za traheobronhitisom, saj se okužba iz žrela razširi v spodnja dihala.

Kašelj postane vse močnejši, pojavi se hripavost, povišana telesna temperatura, ki jo spremlja mrazenje. Sputum, ki ga obarvamo po Gramu, ne pokaže bakterij, ampak samo levkocite. V mišicah prsnega koša se pojavijo bolečine, ker bolnik pogosto kašlja. Nastane tudi bolečina za prsnico, le redko pa plevralna bolečina.

Pri starejših otrocih se pogosto pojavi tudi spastična komponenta (15).

#### Preglednica I: Druge okužbe, ki jih povzroča *Mycoplasma pneumoniae*

Sluznice in koža	makulopapularni, vezikulozni izpuščaj, urtikarija, purpura, eritema nodosum, eritema multiforme, Stevens-Johnson sindrom
Osrednje živčevje	meningitis, meningoencefalitis, cerebelitis, akutna psihoza, transverzalni mielitis, polinevritis, pareze, oglušelost
Parenhimski organi	pankreatitis, reaktivni hepatitis, diabetes
Drugo	hemoragični bulozni miringitis, hemolitična anemija, perikarditis, miokarditis, srčna aritmija, Raynaudov fenomen, artritis

## 1.4 Epidemiologija

*M. pneumoniae* je prisotna samo pri človeku, pri katerem povzroča okužbe dihal. Te so lahko prisotne v kolektivih ali pa se razvijejo v epidemijo (16).

Med leti 1962-1975 je bila v ZDA narejena najobsežnejša epidemiološka študija. Zajela je veliko število preiskovanih oseb različnih starosti. Rezultati te študije se niso bistveno razlikovali od tiste v Veliki Britaniji in so bili sledeči: največ obolelih je bilo med otroki, mlajšimi od 5 let. Dojenčki do 6. meseca starosti so zboleli redko, po vsej verjetnosti zaradi zaščitnih protiteles, ki so jih dobili od mater. Med družinskimi člani se je okužba širila počasi - v povprečju 23 dni. *M. pneumoniae* je povzročila 15-20 % vseh pljučnic, od katerih sta bila hospitalizirana le 2 %. Asimptomatska okužba je bila prisotna pri 15 % preiskovanih oseb (16, 17). Podobna študija, narejena v Sloveniji (113 preiskovancev), je pokazala, da je *M. pneumoniae* pri nas povzročitelj 24,8 % zunaj bolnišnično pridobljenih pljučnic (18).



V nasprotju z respiratornimi virusi, ki povzročajo epidemije pozimi, se epidemije, ki jih povzroča *M. pneumoniae*, pojavijo jeseni ali poleti vsakih 4 do 7 let. Pojavljajo se počasi in trajajo tudi do dve leti. Pri približno tretjini obolelih se razvije pljučnica, pri ostalih pa okužba zgornjih dihal. Pri 30-40 % bolnikov s pljučnico, ki so stari od 15 do 19 let, je povzročitelj *M. pneumoniae*. Mlajši okužbo prenašajo lažje kot starejši; če se epidemija pojavi v domu za ostarele, terja tudi smrtne žrtve (1).

*M. pneumoniae* se prenaša s kužnimi kapljicami in aerosoli. Širjenje bolezni je počasno, ker je inkubacijska doba dolga in ker je za okužbo potreben tesen stik z bolnikom (1).

### 1.5 Zdravljenje in preprečevanje

Pri okužbah spodnjih dihal starejših bolnikov je potrebno zdravljenje z antibiotiki, medtem ko pri okužbah zgornjih dihal to ni potrebno, saj bolezen postopoma izzveni sama po sebi. Pri mlajših bolnikih zdravljenja ne izvajamo ne glede na vrsto okužbe, saj te ponavadi potekajo brez hujših simptomov in je ozdravitev spontana. Če pa želimo skrajšati trajanje bolezni in verjetno tudi oslabiti kužnost bolnika, pa uporabimo antibiotično zdravljenje. Ko pa gre za zunajpljučno obliko okužbe, antibiotična terapija nima učinka (1).

Mikoplazme so brez celične stene, zato so odporne na betalaktamske antibiotike (penicilini, cefalosporini) (2). Učinkoviti so tetraciklini, kinoloni in makrolidi (1).

Hitre in specifične diagnostične metode, ki bi bila na voljo zdravnikom, še žal ni, zato so priporočila za zdravljenje, v domačem okolju pridobljene pljučnice, različna (zdravljenje z enim antibiotikom ali s kombinacijo teh). Zdravimo 14 dni, če pa to izvajamo z azitromicinom pa tri dni. Čeprav je zdravljenje ponavadi uspešno, se bolezen v 10 % ponovi. Če pride do tega, moramo zdravljenje ponoviti.

Pri preprečevanju okužb z *M. pneumoniae* se je tako živo oslabiljeno kot mrtvo inaktivirano cepivo izkazalo za neuspešno. Za preprečevanje razvoja bolezni pri epidemijah v domu ostarelih priporočamo varovancem, ki so bili v stiku z bolnimi, ustrezen antibiotik za profilakso (1).

#### **Preglednica II:** Antibiotično zdravljenje okužb z *Mycoplasma pneumoniae*

Antibiotik	Odmerek/dan
tetraciklin	ODRASLI 250-500 mg 4-krat dnevno

doksiciklin	100 mg 2-krat dnevno
eritromicin	250-500 mg 4-krat dnevno
klaritromicin	250 mg 2-krat dnevno
azitromicin	500 mg 1-krat dnevno
ciprofloksacin	250-500 mg 2-krat dnevno
moksiflokacin	400 mg 1-krat dnevno
	OTROCI
eritromicin	30-50 mg/kg/dan, razdeljeno v 4 odmerke
klaritromicin	7,5-15 mg/kg/dan, razdeljeno v 4 odmerke
azitromicin	10 mg/kg 1-krat dnevno

## 1.6 Laboratorijska diagnostika okužb z *M. pneumoniae*

Pri diagnostiki infekcijskih bolezni uporabljamo metode neposrednega in posrednega dokazovanja. Direktno dokazujemo mikroorganizme v kužninah z mikroskopskim preparatom, kultivacijo, z dokazovanjem specifičnih antigenov in dokazovanjem nukleinskih kislin. Indirektno jih dokazujemo z ugotavljanjem specifičnih protiteles v bolnikovem serumu (19).

### 1.6.1 Osamitev bakterij na gojiščih

*M. pneumoniae* iščemo v vzorcih iz dihal (bris žrela, izmeček, aspirat traheje, plevralni punktati ...), pri zunajpljučnih zapletih pa tudi v drugih kužninah. Ker so mikoplazme občutljive na izsušitev, brise žrela v laboratorij prenašamo v transportnih gojiščih, izmeček pa pošiljamo kot običajno. Preden vzorce zasejemo na gojišča, jih lahko hranimo največ 48 ur pri 4 °C (20).

Za rast na umetnih gojiščih so zelo zahtevne bakterije. Rastejo v kompleksno sestavljenih tekočih ali trdnih gojiščih z dodatkom konjskega seruma in kvasnega ekstrakta ter antibiotikov, ki preprečujejo razmnoževanje drugih bakterij. Kulture pregledujemo peti, deseti, štirinajsti in enaindvajseti dan, saj mikoplazme rastejo počasi (podvojitveni čas je šest ur). Po sedmih do enaindvajsetih dneh s stereomikroskopom (40 do 60-kratna povečava) opazimo okrogle kolonije, velike do 300 µm. Te se vraščajo v gojišče in imajo značilno obliko, podobno na oko pečenemu jajcu (20, 21).

Včasih smo jih identificirali z biokemičnimi testi, v zadnjem času pa uporabljamo označena specifična protitelesa ali pa inhibicijo rasti (22).

Osamitev *M. pneumoniae* je vedno klinično pomembna, saj ta nikoli ni del normalne flore. Njena identifikacija v gojišču je potrebna, da je ne zamenjamo z drugimi vrstami mikoplazem, ki so lahko prisotne. V kolikšni meri so te občutljive za antibiotike, ugotovimo z uporabo dilucijske metode v agarju ali v bujonu. Opisujejo, da je *M. pneumoniae* še občutljiva na tetracikline in makrolide. Nekateri sevi genitalnih mikoplazem niso več občutljivi na te antibiotike (20). *M. pneumoniae* je občutljiva tudi na novejša kinolone (23).

### **1.6.2 Direktni imunofluorescenčni test**

Imunofluorescenca se je v zadnjem času največ uporabljala za identifikacijo kolonij mikoplazem, ki so bile osamljene pri ljudeh in različnih živalih. Ima prednost, da omogoča identifikacijo posamezne kolonije določene vrste mikoplazem, ki se nahaja v kulturi, v kateri prevladujejo kolonije drugih vrst mikoplazem (24).

Test temelji na dokazovanju antigenov *M. pneumoniae* s poliklonskimi protitelesi, ki so označena s fluorescentnim barvilom (24). Metoda vključuje direkten nanos protiteles na material, ki ga proučujemo. Da lahko reakcija vezave protitelesa na antigen poteče, sledi petnajst do trideset minutna inkubacijska doba v vlažnem okolju pri 35-37 °C. Po koraku spiranja, ki je potreben, da se odstranijo nevezana protitelesa, se preparat posuši na zraku. Nato ga za opazovanje namestimo pod mikroskop, opremljen z ustrezno UV svetilko in vzbujevalnimi ter zapornimi filtri (6). Test ni dovolj občutljiv in specifičen (24).

### **1.6.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)**

V sodobnem času dokazujemo mikoplazme z različnimi molekularnimi metodami, ki so občutljivejše, hitrejše in omogočajo identifikacijo vrste (2). Odkritje toplotno obstojnih polimeraz in zasnova PCR sta pomenila velik napredek v večini bioloških znanosti, saj sta močno spremenila pristop k analizi genomske DNK. Princip cikličnega in vitro pomnoževanja kratkih odsekov genomske DNK nam omogoča uporabo majhnih količin genomske DNA, lahko tudi slabše kvalitete. To je omogočilo uporabo metode direktno na kliničnem materialu. Področje, ki ga želimo pomnožiti, določimo z izbiro sintetičnih oligonukleotidov. Ti nam služijo kot začetniki pri pomnoževanju DNK s pomočjo polimeraze (25).

Pri dokazovanju *M. pneumoniae* najpogosteje uporabljamo PCR z začetnim oligonukleotidnim parom MP-P 11/MP-P 12, ki je del gena za adhezin P1. Tako dobimo 466 baznih parov velike produkta DNK (26). Opisali so tudi par MP 5-1/MP 5-2, ki je bil izbran na drugem delu kromosoma (27). Pomnoževanje poteka v 40 ciklih. Produkta lahko razgradimo z restrikcijskimi encimi in jih dokažemo z elektroforezo na agaroznem gelu (26, 27).

Metoda je zelo občutljiva (95 %) in specifična (85 %) (1). Primerna je za hitro diagnostiko pri bolnikih s hudo klinično sliko in pri imunsko oslabljenih osebah, ki ne tvorijo specifičnih protiteles (28).

#### **1.6.4 Encimsko imunski test (ELISA)**

Zaradi nizke občutljivosti in dolgotrajnega postopka osamitve bakterije za dokaz okužbe z *M. pneumoniae* pogosto uporabljamo serološke metode. V zadnjih 10 letih je to predvsem test ELISA (29). Na tržišču so kompleti reagentov, ki temeljijo na indirektni encimski imunski metodi in omogočajo dokaz specifičnih protiteles (IgG, IgM) v bolnikovem serumu (2).

Vzorec, ki vsebuje primarna protitelesa, damo v mikrotitrsko vdolbinico, ki je prekrita z antigeni in počakamo, da reakcija poteče. Nevezana protitelesa speremo, vezana pa določimo s sekundarnimi z encimom konjugiranimi antiizotipskimi protitelesi, ki se vežejo s primarnimi. Prosta sekundarna protitelesa speremo in dodamo ustrezen substrat. Encim reagira z brezbarvnim substratom. Pri tem nastane obarvan produkt. Absorbanco tega merimo v posebnem spektrofotometru za merjenje v mikrotitrskih ploščicah (30).

Okužba z *M. pneumoniae* izzove močan protitelesni odziv (2). Določamo lahko specifična protitelesa IgM in IgG. Od začetka simptomov do konca prvega tedna protitelesa IgM v serumu običajno narastejo nad mejno vrednost (60 IU/ml). Najvišje vrednosti dosežejo po 10 do 30 dneh (31). Le redko nastajajo pri odraslih bolnikih, so pa uporaben marker za dokaz okužbe pri otrocih (32, 33). IgG narastejo nad mejno vrednost (85 IU/ml) v drugem tednu. Opazni so odkloni pri posameznikih. V serumu lahko vztrajajo več let zato je potrebno testiranje parnih serumov v časovnem razmaku 2-3 tednov, da z gotovostjo dokažemo okužbo z mikoplazmo (34).

## 1.7 Vrednotenje posameznih diagnostičnih metod

Dva najpomembnejša parametra, ki opisujeta klinično učinkovitost vsake metode, sta diagnostična občutljivost in diagnostična specifičnost. Določita se vsakemu testu posebej.

### Diagnostična občutljivost

Diagnostična občutljivost ali senzibilnost testa je definirana kot pokazatelj deleža preiskovancev z določeno boleznijo in pozitivnim rezultatom testa. Rezultati se interpretirajo, kot da so pozitivni in je s tem bolezen prisotna (35). Izračuna se po naslednji formuli:

$$Se = \frac{RP}{RP + LN} \times 100$$

Se = diagnostična občutljivost (angleško sensitivity)

RP = resnično pozitivni

LN = lažno negativni

Gre torej za odnos resnično pozitivnih (RP) z vsemi, ki so dejansko oboleli (RP+LN).

Če ni pri testiranju nobenega lažno negativnega vzorca (LN), je senzibilnost 1 oz. 100 % in je test 100 % sposoben zaznati bolezen pri obolelih.

Pri okuženih je negativni rezultat testa lažno negativen (36).

Občutljivost naših testov smo ugotavljali na skupini bolnikov s sumom na okužbo z *Mycoplasma pneumoniae*.

### Diagnostična specifičnost

Diagnostična specifičnost posamezne metode je po definiciji delež preiskovancev, ki nimajo določene bolezni in pri katerih je rezultat testa negativen. Rezultati se interpretirajo, kot da so negativni, kar pomeni da osebe niso obolele (35).

Izračuna se po sledeči formuli:

$$Sp = \frac{RN}{RN + LP} \times 100$$

Sp = specifičnost (angleško specificity)

RN = resnično negativni

LP = lažno pozitivni

Gre torej za odnos resnično negativnih (RN) z vsemi, ki so dejansko brez bolezni (RN+LP). Če ni pri testiranju nobenega lažno pozitivnega vzorca, je specifičnost 1 oz. 100 %, kar pomeni, da nobena oseba, ki je brez bolezni, ne bo kazala pozitivnega rezultata testa. Pozitiven rezultat testa pri osebah, ki nimajo bolezni, se vrednoti kot lažno pozitiven. Iz tega lahko sklepamo, da je senzibilnost kazalec, ki vrednoti sposobnost merila za ustrezno razvrščanje oseb z boleznijo, in specifičnost tisti kazalec, ki vrednoti sposobnost merila za ustrezno razvrščanje oseb brez bolezni. Oba parametra se podajata v odstotkih (36).

## 2 Namen naloge

Namen praktičnega dela diplomske naloge je:

- dokazati specifična IgG, IgM in IgA protitelesa pri bolnikih s sumom na okužbo, povzročeno z *M. pneumoniae*,
- protitelesa določiti z dvema novejšima diagnostičnima kompletoma proizvajalcev Medac in Savyon, ki temeljita na metodi ELISA in rezultate primerjati z metodo ELISA proizvajalca Serion, ki se uporablja rutinsko,
- ovrednotiti dva novejša testa in preveriti, kateri od njiju bi bil najbolj uporaben v rutinski diagnostiki.

### 3 Materiali in metode

V diplomski nalogi smo dokazovali specifična protitelesa, usmerjena proti *M. pneumoniae* razreda IgG, IgM in IgA z dvema serološkima testoma. Uporabili smo dva novejša diagnostična kompleta proizvajalcev Medac GmbH, Hamburg, Nemčija in Savyon Diagnostics Ltd, Ashdod, Izrael. Oba temeljita na encimsko imunski tehniki. Serološke preiskave smo izvajali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb.

V raziskavo smo zajeli 49 parnih serumskih vzorcev pacientov s sumom na okužbo z *M. pneumoniae* iz obdobja preteklih let.

Preiskavo smo izvajali na arhivskih serumih bolnikov, ki so bili predhodno poslani na serološko diagnostiko okužbe z *M. pneumoniae* v letih 2006 in 2007. Serumi so pripadali pacientom v starosti od 2 do 76 let, povprečna starost 27,8 let, mediana 16 let. Serumi so bili predhodno testirani z encimsko imunsko metodo proizvajalca Serion Immunodiagnostica GmbH, Würzburg, Nemčija, s katero poteka rutinsko diagnostično dokazovanje specifičnih protiteles IgG in IgM. Rezultate našega testiranja smo primerjali z rezultati, ki so jih ugotovili z rutinskim testiranjem.

#### 3.1 Princip encimsko imunskega testa (ELISA)

Vsak serumski vzorec smo najprej razredčili s pufersko raztopino. Razredčino smo nanесли v vdolbinice na mikrotitrski ploščici, ki so bile prekrite z antigeni *M. pneumoniae*. Kot antigen se navadno uporabljajo beljakovine, med katerimi je najpomembnejša beljakovina P1. Te bakterija izraža na svoji površini in ji služijo za pritrjevanje na površino. Ko smo nanесли redčen serum, je sledila faza inkubacije v vlažni komori, potem pa spiranje s pufrom, da smo odstranili nevezana nespecifična protitelesa. Nato smo dodali sekundarna protičloveškimi imunoglobulinom usmerjena protitelesa, na katera je vezan encim. Ponovno je sledila inkubacija v vlažni komori.

V tem delu testa je prišlo do vezave sekundarnih z encimom konjugiranih protiteles z, v prejšnji fazi nastalim, imunskim kompleksom. Preostanek nevezanega konjugata smo sprali s pufrom. V naslednji stopnji smo nanесли substrat, ki ga encim reducira, kar privede do spremembe barve. Ko smo dodali raztopino za prekinitev reakcije, je produkt zopet spremenil barvo.



Merili smo absorbanco obarvanega produkta pri predpisanih valovnih dolžinah. Ta je sorazmerna količini specifičnih protiteles, ki so se vezala na antigene.

### **3.2 Test ELISA proizvajalca Savyon Diagnostics Ltd, Ashdod, Izrael**

Za izvedbo encimsko imunskega testa smo uporabili komplet reagentov proizvajalca Savyon Diagnostics Ltd, Ashdod, Izrael.

#### **3.2.1 Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgG**

- mikrotitrna ploščica po 8 × 12 vrstic z vdolbinicami, prekritimi z antigeni *M. pneumoniae*
- pufer za spiranje 100 ml, 20 × koncentrat
- pufer za redčenje vzorcev 60 ml, 85 × koncentrat
- substratni pufer 14 ml (puferna raztopina vsebuje benzidin kot kromogen in peroksid kot substrat)
- raztopina za ustavitev reakcije "stop solution" 15 ml
- negativna kontrola 0,75 ml, humani serum brez specifičnih IgG protiteles (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- pozitivna kontrola 0,75 ml, humani serum, ki vsebuje iskana IgG protitelesa (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- P10 IgG kalibrator 0,75 ml, nizko pozitiven humani serum, vsebuje 10 BU/ml (arbitrary binding units) protiteles IgG (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- P50 IgG kalibrator 0,75 ml, srednje pozitiven humani serum, vsebuje 50 BU/ml protiteles IgG (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- P100 IgG kalibrator 0,75 ml, visoko pozitiven humani serum, vsebuje 100 BU/ml protiteles IgG (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- IgG konjugat 0,2 ml, 300 × koncentrirana anti-humana protitelesa IgG, konjugirana s peroksidazo.

#### **3.2.2 Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgA**

- mikrotitrna ploščica po 8 × 12 vrstic z vdolbinicami, prekritimi z antigeni *M. pneumoniae*

- pufer za spiranje 100 ml, 20 × koncentrat
- pufer za redčenje vzorcev 60 ml, 85 × koncentrat
- substratni pufer 14 ml (puferna raztopina vsebuje benzidin kot kromogen in peroksid kot substrat)
- raztopina za ustavitev reakcije "stop solution" 15 ml
- negativna kontrola 0,75 ml, humani serum brez specifičnih IgA protiteles (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- pozitivna kontrola 0,75 ml, humani serum, ki vsebuje iskana IgA protitelesa (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- P10 IgA kalibrator 0,75 ml, nizko pozitiven humani serum, vsebuje 10 BU/ml protiteles IgA (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- P50 IgA kalibrator 0,75 ml, srednje pozitiven humani serum, vsebuje 50 BU/ml protiteles IgA (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- P100 IgA kalibrator 0,75 ml, visoko pozitiven humani serum, vsebuje 100 BU/ml protiteles IgA (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- IgA konjugat 0,2 ml, 300 × koncentrirana anti-humana protitelesa IgA, konjugirana s peroksidazo

### 3.2.3 Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgM

- mikrotitrna ploščica po 8 × 12 vrstic z vdolbinicami, prekritimi z antigeni *M. pneumoniae*
- pufer za spiranje 100 ml, 20 × koncentrat
- pufer za redčenje vzorcev 60 ml, 85 × koncentrat
- IgM serum diluent - IgM pufer za redčenje vzorcev 12 ml - raztopina, ki vsebuje anti-humana IgG protitelesa (kot konzervans je dodan proclin)
- substratni pufer 14 ml (puferna raztopina vsebuje benzidin kot kromogen in peroksid kot substrat)
- raztopina za ustavitev reakcije "stop solution" 15 ml
- negativna kontrola 0,75 ml, humani serum brez specifičnih IgM protiteles (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)
- pozitivna kontrola 0,75 ml, humani serum, ki vsebuje iskana IgM protitelesa (kot konzervansa sta dodana proclin in natrijev azid)

- mejna kontrola 0,75 ml, humani serum, ki vsebuje IgM protitelesa za določanje mejne vrednosti
- IgM konjugat 0,2 ml, 300 × koncentrirana anti-humana protitelesa IgM, konjugirana s peroksidazo

### 3.2.4 Shranjevanje in stabilnost reagentov

Reagentov ne smemo zamrzniti. Pred in po uporabi smo jih hranili v hladilniku pri temperaturi med +2°C in +8°C. Hranjeni pod temi pogoji so uporabni do 90 dni po odprtju.

### 3.2.5 Oprema za izvedbo testa

- ✓ destilirana ali dvojno deionizirana voda
- ✓ čista testna ploščica za redčenje vzorcev
- ✓ epruveta 10 ml
- ✓ kalibrirane pipete 5-1000 µl in 1-5 ml
- ✓ multikanalna pipeta 100 µl
- ✓ zamenljivi nastavki za pipete
- ✓ merilna bučka 1 l
- ✓ merilni valj 50 ml
- ✓ prosojna puhalka (z 70 % etanolom)
- ✓ staničevina
- ✓ štoparica
- ✓ vortex mixer
- ✓ inkubator
- ✓ spektrofotometer z valovnimi dolžinami 450 nm in 620 nm
- ✓ tiskalnik za beleženje odčitanih valovnih dolžin

### 3.2.6 Postopek testiranja

#### Dokaz protiteles IgG

Pred začetkom izvajanja smo reagente in mikrotitrsko ploščico ogreli na sobno temperaturo 20-25°C. Najprej smo pripravili protokolni list, na katerega smo vpisali položaje raztopin in vzorcev ter številke vzorcev, ki smo jih kasneje nanašali. Nato smo pripravili pufer za spiranje, tako da smo 50 ml koncentriranega redčili z 950 ml destilirane

vode. Sledilo je dvostopenjsko redčenje preiskovanih serumov, ki smo jih pred tem pretresli na vorteksu. Redčenje teh je bilo narejeno na posebnih čistih testnih ploščicah po naslednjem zaporedju:

v vsako čisto mikrotitrsko jamico v prvi vrstici smo odpipetirali 200 µl pufra za redčenje vzorcev in dodali po 10 µl seruma. Tako smo dobili razredčino A, ki smo jo (25 µl) v drugi stopnji prenesli v 100 µl pufra za redčenje vzorcev; tega smo predhodno odpipetirali v drugo vrstico. Na tak način pripravljeno končno redčenje preiskovanih serumov smo uporabili za izvedbo testa.

V nadaljevanju smo na mikrotitrsko ploščico za dokaz IgG pipetirali po 50 µl:

negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, kalibratorje (P10, P50, P100) in ustrezno redčene serume. V izogib izhlapevanju smo mikrotitrsko ploščico pokrili s plastičnim pokrovom ter jo inkubirali 1 uro pri 37°C in ustrezni vlagi v inkubatorju.

Med tem smo pripravili razredčino anti-humanega IgG konjugata po opisanem postopku - v epruveto smo pipetirali 10 µl konjugata + 3 ml raztopine za redčenje vzorcev ter pomešali na vorteksu. S tem smo omogočili, da se je koncentrat enakomerno porazdelil po raztopini.

Po končani inkubaciji smo z mikrotitrskve ploščice odstranili tekočino in trikrat izprali s pripravljenim pufrom. Potem smo jo še osušili z nežnimi udarci po čisti staničevini.

V vsako vdolbinico smo pipetirali 50 µl pripravljenega konjugata, ploščico zaščitili s plastičnim pokrovom in inkubirali 1 uro pri 37°C in ustrezni vlagi v inkubatorju. Ponovno smo odstranili tekočino in ponovili postopek izpiranja in sušenja. V naslednjem koraku smo dodali po 100 µl substratnega pufra, ploščico pokrili in inkubirali 15 min pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo dodali v vse vdolbinice raztopino za ustavitev reakcije (100 µl), da smo jo zaustavili. Po preteku največ 30 min smo mikrotitrsko ploščico vstavili v spektrofotometer z valovno dolžino 450 in 620 nm ter izmerili absorbance analiziranih vzorcev, kontrol in kalibratorjev. Te smo vpisali na protokolni list.

### **Dokaz protiteles IgA**

Postopek dokazovanja protiteles IgA je bil enak postopku dokazovanja protiteles IgG, le da smo za njegovo izvedbo uporabili reagente za dokaz protiteles IgA. Pri dokazovanju protiteles IgA smo uporabili protitelesa proti človeškim IgA, konjugirana s HRP (petroksidazo).

### **Dokaz protiteles IgM**

Postopek dokazovanja protiteles IgM je podoben postopku dokazovanja protiteles IgG in IgA. Razlikuje se samo v naslednjih korakih:

V drugi stopnji redčenja vzorcev smo preiskovane serume redčili tako, da smo raztopino A prenesli v IgM pufer za redčenje vzorcev (IgM serum diluent). Ta vsebuje anti-humana protitelesa IgG in nam je služila za odstranitev protiteles IgG in revmatoidnega faktorja iz preiskovanih serumov. S tako predhodno obdelavo vzorcev smo se izognili lažno pozitivnim rezultatom.

Na mikrotitrsko ploščico smo namesto treh kalibratorjev pipetirali dvakrat mejni kontroli po 50  $\mu$ l.

Uporabili smo konjugat, ki vsebuje konjugirana anti-humana IgM protitelesa.

### **3.2.7 Vrednotenje rezultatov**

Za veljavnost testa smo morali preveriti določene kriterije proizvajalca. Če ti ne bi bili v predpisanih mejnih vrednostih, bi domnevali, da so rezultati testiranja napačni in bi le-tega morali ponoviti.

Navedeni kriteriji za IgG in IgA:

O.D. P100 > 1,2

razmerje O.D. P10/OD NK > 1,5

razmerje O.D. P50/OD NK > 4

razmerje O.D. P100/OD NK > 6

PK mora biti večje ali enako 40 BU/ml

Navedeni kriteriji za IgM:

O.D. PK > 1,0

razmerje O.D. PK/OD mejne kontrole > 2

O.D. NK < 0,3

### **Izračun in interpretacija rezultatov testa**

Izmerjene absorbance vzorcev smo natisnili, jih odčitali in vnesli na protokolni list. Nato smo preverili vrednosti posameznih kontrol in kalibratorjev za IgG, IgA in IgM. Ker so se ti ujemali s predpisanimi kriteriji, smo izračunali rezultate.

Za določitev koncentracije protiteles IgG in IgA smo na računalniku v koordinatnem sistemu narisali umeritveno premico treh kontrol (P10, P50, P100). Na os X smo vnesli podane koncentracije, na os Y pa izmerjene absorbance. V naslednjem koraku smo vnesli absorbance analiziranih vzorcev in odčitali njihove koncentracije (BU/ml). Te smo vpisali na protokolni list ter jih interpretirali po naslednjih omejitvah:

Koncentracija < 10 BU/ml → negativen rezultat (specifičnih protiteles nismo zaznali)

Koncentracija ≥ 10 BU/ml → pozitiven rezultat (zaznali smo pomembno količino specifičnih protiteles)

Pri dokazovanju protiteles IgM smo uporabili tako imenovani "cut off " indeks (COI). Tega smo za vsak vzorec izračunali po naslednji formuli:

$$COI = \frac{\text{O.D. preiskovanega serumskega vzorca}}{\text{O.D. povprečja dveh mejnih kontrol}}$$

Rezultate smo vpisali na protokolni list in jih interpretirali po naslednjih omejitvah:

COI < 10 → negativen rezultat (specifičnih protiteles IgM nismo zaznali)

COI = 10-11 → mejni rezultat

COI > 11 → pozitiven rezultat (zaznali smo pomembno količino specifičnih protiteles IgM)

### **Diagnostična interpretacija rezultatov**

Prisotnost IgG protiteles v koncentraciji, višji od mejne vrednosti, nakazuje na potekajočo ali prebolelo okužbo. Da bi lahko razlikovali med tema stanjema, je bil priporočen odvzem drugega vzorca po 2-4 tednih. Če se je koncentracija IgG v tem času signifikantno zvišala, je pomenilo, da okužba poteka, če je ostala enaka, je to bil znak za prebolelo okužbo.

Ob prisotnosti protiteles IgA v koncentraciji višji od mejne vrednosti je to pokazatelj za potekajočo oz. kronično okužbo z *M. pneumoniae*.

Če je COI, ki smo ga izračunali za protitelesa IgM, bil mejni, je to pomenilo, da nismo mogli z gotovostjo določiti količino IgM. Proizvajalec v teh primerih priporoča ponovni odvzem čez 14 dni po prvem odvzemu vzorca. V primeru, da je imel ta ponovno COI nižji od 11, smo rezultate interpretirali kot negativne; če so bili višji, je bil to znak za potekajočo okužbo.

Da smo dobili čim bolj realno sliko, smo rezultate testiranja na IgG, IgM, in IgA primerjali, kot je prikazano v preglednici III.

**Preglednica III:** Interpretacija rezultatov testiranja na protitelesa proti *M. pneumoniae* razredov IgG, IgM in IgA

IgG	IgM	IgA	Interpretacija
-	-	-	seronegativni status, v primeru kliničnega suma na okužbo z mikoplazmo je priporočan odvzem drugega vzorca 14 dni po odvzemu prvega
-/+	+	+	sum na akutno okužbo, pozitivni IgA-rezultati kombinirani z pozitivnimi IgM-rezultati v primeru mladih pacientov
-/+	-	+	sum na akutno okužbo, (v primeru starejših pacientov s ponovno okužbo obstaja možnost da IgM ne bodo zaznani)
+	-	-	stara okužba, v redkih primerih akutna okužba brez nastajanja specifičnih protitres IgM in IgA (potrebno je biti pozoren na zvišanje IgG titrov)

### 3.3 Test ELISA proizvajalca Medac GmbH, Hamburg, Nemčija

Za izvedbo encimsko imunskega testa smo uporabili komplete reagentov proizvajalca Medac, GmbH, Hamburg, Nemčija.

#### 3.3.1 Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgG

- mikrotitrna ploščica po 12 × 8 vrstic z vdolbinicami, prekritimi z rekombinantnimi antigeni *M. pneumoniae* in FCS
- pufer za spiranje 100 ml, 10 × koncentrat pH = 7,2-7,4
- pufer za redčenje vzorcev 110 ml, 100 × koncentrat (vsebuje proclin kot konzervans)
- substratni pufer 10 ml

- raztopina za ustavitev reakcije "stop solution"  $2 \times 11$  ml
- negativna kontrola 1,5 ml humani serum brez specifičnih IgG protiteles (dodani so NBCS, fenol, proclin in gentamicin sulfat)
- pozitivna kontrola 1,5 ml, humani serum, ki vsebuje iskana IgG protitelesa (dodani so BSA, fenol, proclin in gentamicin sulfat)
- IgG kalibrator 1,5 ml, humani serum (dodani so BSA, Fenol, proclin in gentamicin sulfat)
- IgG konjugat  $3 \times 4,5$  ml, kozja anti-humana protitelesa IgG, konjugirana s peroksidazo

### 3.3.2 Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgA

- mikrotitrna ploščica po  $12 \times 8$  vrstic z vdolbinicami, prekritimi z rekombinantnimi antigeni *M. pneumoniae* in FCS
- pufer za spiranje 100 ml,  $10 \times$  koncentrat pH = 7,2-7,4
- pufer za redčenje vzorcev 110 ml,  $100 \times$  koncentrat (vsebuje proclin kot konzervans)
- substratni pufer 10 ml
- raztopina za ustavitev reakcije "stop solution"  $2 \times 14$  ml
- negativna kontrola  $2 \times 0,75$  ml, humani serum brez specifičnih IgA protiteles (dodani so NBCS, fenol, proclin in gentamicin sulfat)
- pozitivna kontrola  $2 \times 0,75$  ml, humani serum, ki vsebuje iskana IgA protitelesa (dodani so BSA, fenol, proclin in gentamicin sulfat)
- IgA kalibrator  $2 \times 0,75$  ml, humani serum (dodani so BSA, fenol, proclin in gentamicin sulfat)
- IgA konjugat  $3 \times 5$  ml, kozja anti-humana protitelesa IgA, konjugirana s peroksidazo

### 3.3.3 Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgM

- mikrotitrna ploščica po  $12 \times 8$  vrstic z vdolbinicami, prekritimi z rekombinantnimi antigeni *M. pneumoniae* in FCS
- pufer za spiranje 100 ml,  $10 \times$  koncentrat pH = 7,2-7,4
- pufer za redčenje vzorcev 110 ml,  $100 \times$  koncentrat (vsebuje proclin kot konzervans)



- IgG/Rf absorbant, 1 × 4 ml, - kozji anti-humani IgG anti-serum (kot konzervans vsebuje natrijev azid)
- substratni pufer 10 ml
- raztopina za ustavitev reakcije - 2 × 11 ml
- negativna kontrola 1,5 ml humani serum brez specifičnih IgM protiteles (dodani so NBCS, fenol, proclin in gentamicin sulfat)
- pozitivna kontrola 1,5 ml, humani serum, ki vsebuje iskana IgM protitelesa (dodani so BSA, fenol, proclin in gentamicin sulfat)
- IgM konjugat 3 × 4,5 ml, kozja anti-humana protitelesa IgM, konjugirana s peroksidazo

### 3.3.4 Shranjevanje in stabilnost reagentov

Pred in po uporabi smo jih hranili v hladilniku pri temperaturi med +2°C in +8°C. Hranjeni pod temi pogoji so uporabni do 12 tednov po odprtju.

### 3.3.5 Oprema za izvedbo testa

- ✓ destilirana voda
- ✓ čista testna ploščica za redčenje vzorcev
- ✓ epruveta 10 ml
- ✓ kalibrirane pipete 5-1000 µl in 1-5 ml
- ✓ multikanalna pipeta 100 µl
- ✓ zamenljivi nastavki za pipete
- ✓ merilna bučka 1 l
- ✓ merilni valj 50 ml
- ✓ prosojna puhalka (z 70 % etanolom)
- ✓ staničevina
- ✓ štoparica
- ✓ vortex mixer
- ✓ inkubator
- ✓ spektrofotometer z valovnimi dolžinami 450 nm in 620-650 nm
- ✓ tiskalnik za beleženje odčitanih valovnih dolžin

### 3.3.6 Postopek testiranja

#### Dokaz protiteles IgG

Pred začetkom izvajanja smo reagente in mikrotitrsko ploščico ogreli na sobno temperaturo 20-25°C. Najprej smo pripravili protokolni list, na katerega smo vpisali položaje raztopin in vzorcev ter številke vzorcev, ki smo jih kasneje nanašali. Nato smo pripravili pufer za spiranje, tako da smo 50 ml koncentriranega pufra redčili s 450 ml destilirane vode. Sledilo je dvostopenjsko redčenje preiskovanih serumov, ki smo jih pred tem pretresli na vorteksu. Redčenje teh je bilo narejeno na posebnih čistih testnih ploščicah po naslednjem zaporedju:

v vsako čisto mikrotitrsko jamico v prvi vrstici smo odpipetirali 490 µl pufra za redčenje vzorcev in dodali po 10 µl seruma. Tako smo dobili razredčino A, ki smo jo (30 µl) v drugi stopnji prenesli v 30 µl razredčila za redčenje vzorcev; tega smo predhodno odpipetirali v drugo vrstico. Končno razredčino serumov smo uporabili za izvedbo testa.

V nadaljevanju smo na mikrotitrsko ploščico za dokaz IgG pipetirali po 50 µl:

slepo kontrolo (uporabi se pufer za redčenje vzorcev), negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, kalibrator (2×) in ustrezno redčene serume ter jo inkubirali 60 min pri 37°C v inkubatorju. Da smo se izognili izsušitvi vdolbinic, smo mikrotitrsko ploščico prekrili s folijo in tako zagotovili, da ni prišlo do prekomernega izhlapevanja. Po končani inkubaciji smo z mikrotitrskе ploščice odstranili tekočino in trikrat izprali s po 200 µl pripravljenim pufrom. Potem smo jo še osušili s pomočjo nežnega udarjanja po čisti staničevini. Nemudoma smo nadaljevali z dodajanjem 50 µl konjugata v vsako vdolbinico, ploščico zaščitili s folijo in inkubirali 1 uro pri 37°C ter ustrezni vlagi v inkubatorju. Ponovno smo odstranili tekočino in ponovili postopek izpiranja. V naslednjem koraku smo dodali po 50 µl substratnega pufra, ploščico pokrili in inkubirali 30 min pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo v vse vdolbinice dodali raztopino za ustavitev reakcije (100 µl) in tako zaustavili reakcijo. Po preteku največ 15 min smo mikrotitrsko ploščico vstavili v spektrofotometer in izmerili optično gostoto pri 450 nm in 620-650 nm, izmerili absorbance in jih vpisali na protokolni list.

#### Dokaz protiteles IgA

Postopek dokazovanja protiteles IgA je bil enak postopku dokazovanja protiteles IgG,

le da smo za njegovo izvedbo uporabili reagente za dokaz protiteles IgA. Pri njihovem dokazovanju smo uporabili anti-humana protitelesa IgA, konjugirana s HRP (petroksidazo).

### **Dokaz protiteles IgM**

Pri dokazovanju protiteles IgM obstaja možnost, da je v serumu prisoten revmatoidni faktor ali pa visoki titri IgG protiteles. Da smo se izognili tem interferencam, smo vzorce predhodno obdelali, tako da smo ga v drugem koraku redčenja redčili z IgG/Rf absorbentom. V nadaljevanju smo na mikrotitrsko ploščico za dokaz IgM dodali po 50  $\mu$ l: slepo (uporabi se pufer za redčenje vzorcev), negativno kontrolo (2 $\times$ ), pozitivno kontrolo, in ustrezno redčene serume.

Potek dokazovanja protiteles IgM je v nadaljevanju enak postopku dokazovanja protiteles IgG in IgA. Razlikuje se samo v tem, da smo pri dokazovanju uporabili kozja anti-humana IgM protitelesa, konjugirana s HRP.

### **3.3.7 Vrednotenje rezultatov**

Da je bil test veljaven, smo morali preveriti določene kriterije. Če ti ne bi bili v predpisanih mejnih vrednostih, bi domnevali, da so rezultati testiranja napačni in bi testiranje ponovili.

Navedeni kriteriji za IgG in IgA:

O.D. slepe kontrole < 0,100

O.D. PK = na priloženem listu

O.D. NK < 0,100

O.D. = na priloženem listu

Navedeni kriteriji za IgM:

O.D. slepe kontrole < 0,100

O.D. PK > 0,8

O.D. NK(2 $\times$ ) < 0,100

Cut-off = O. D. povprečja dveh NK + 0,380

Mejne vrednosti = Cut-off  $\pm$  10 %

### **Izračun in interpretacija rezultatov testa**

Izmerjene absorbance vzorcev smo natisnili, jih odčitali in vnesli na protokolni list. Nato smo preverili vrednosti posameznih kontrol in kalibratorjev za IgG, IgA in IgM. Pri dobljenih absorbancah za pozitivno kontrolo pri IgG in IgA smo naredili še računsko korekcijo po formuli, ki jo je podal proizvajalec testov in ki smo jo uporabili tudi za korekcijo absorbanc preiskovanih serumov. Formula je sledeča:

$$\text{O.D. korigirana} = \frac{\text{podana O.D. vrednost kalibratorja}}{\text{izmerjena O.D. vrednost kalibratorja}} \times (\text{izmerjena O.D. vzorca} - \text{O.D. slepa})$$

Če so se absorbance kontrol in kalibratorjev ujemale s proizvajalčevimi kriteriji, smo začeli z izračunavanjem rezultatov.

Pri določanju koncentracij protiteles IgG in IgA smo uporabili umeritveno premico proizvajalca. Na os Y smo vnesli korigirane absorbance serumov ter z osi X odčitali pripadajoče koncentracije (AU/ml). Te smo vpisali na protokolni list ter jih interpretirali po naslednjih omejitvah:

Koncentracija < 9 AU/ml → negativen rezultat (specifičnih protiteles nismo zaznali)

Koncentracija 9 -11 AU/ml → mejni rezultat

Koncentracija > 11 AU/ml → pozitiven rezultat (zaznali smo pomembno količino specifičnih protiteles)

Izmerjene absorbance analiziranih vzorcev za IgM lahko opredelimo kvalitativno ali semikvantitativno po navodilih proizvajalca.

Kvalitativno vrednotenje vzorcev

Najprej smo izračunali mejno vrednost tako, da smo povprečni vrednosti absorbanc dveh negativnih kontrol prišteli vrednost 0,380 ter prišteli vrednost slepe kontrole. Sedaj smo vsem absorbancam preiskovanih serumov odšteli vrednost slepe kontrole in jih ovrednotili sledeče: če se je O.D. vzorca nahajala pod mejo (O.D. cut off ± 10 %), smo ga ocenili kot negativnega, če nad, pa kot pozitivnega.

### **Semikvantitativno vrednotenje vzorcev**

Pri tej ocenitvi rezultatov pri dokazovanju protiteles IgM smo uporabili tako imenovani "cut off" indeks (COI). Tega smo za vsak vzorec izračunali po naslednji formuli:

$$COI = \frac{\text{O.D. preiskovanega serumskega vzorca} - \text{O.D. slepa}}{\text{O.D. cut off-a}}$$

Rezultate smo vpisali na protokolni list in jih interpretirali po naslednjih omejitvah:

COI < 0,9 → negativen rezultat (specifičnih protiteles IgM nismo zaznali)

COI = 0,9 - 1,1 → mejni rezultat

COI > 1,1 → pozitiven rezultat (zaznali smo pomembno količino specifičnih IgM protiteles)

### Diagnostična interpretacija rezultatov

Prisotnost IgG protiteles v koncentraciji, višji od mejne vrednosti, nakazuje na potekajočo ali prebolelo okužbo. Da lahko razlikujemo med tema stanjema, je priporočen odvzem drugega vzorca po 2-4 tednih. Če se je koncentracija IgG v tem času signifikantno zvišala, pomeni, da okužba poteka, če je ostala enaka, je to znak za prebolelo okužbo. Ob prisotnosti protiteles IgA v koncentraciji, višji od mejne vrednosti, je to pokazatelj za potekajočo oz. kronično okužbo z *M. pneumoniae*. Prav tako je pri določanju IgG, IgA ali IgM priporočeno testiranje drugega parnega vzorca, če se je koncentracija oz. za IgM cut off indeks nahajala/nahajal v območju mejnih vrednosti. Če je drugi vzorec spet v mejnih vrednostih, ga ovrednotimo kot negativnega.

Da smo dobili čim bolj realno sliko, smo rezultate testiranja IgG, IgM, in IgA primerjali, kot je prikazano v preglednici IV.

**Preglednica IV:** Interpretacija rezultatov testiranja na protitelesa proti *M. pneumoniae* razredov IgG, IgM in IgA.

IgG	IgM	IgA	Interpretacija
-	-	-	seronegativni status, v primeru kliničnega suma na okužbo z mikoplazmo je priporočan odvzem drugega vzorca 14 dni po odvzemu prvega
-/+	+	+	sum na akutno okužbo, pozitivni IgA-rezultati kombinirani z pozitivnimi IgM-rezultati v primeru mladih pacientov
-/+	-	+	sum na akutno okužbo, (v primeru starejših pacientov s ponovno okužbo obstaja možnost, da IgM ne bodo zaznani)
+	-	-	stara okužba, v redkih primerih akutna okužba brez nastajanja specifičnih protiteles IgM in IgA (potrebno je biti pozoren na zvišanje IgG titrov)

### **3.4 Test ELISA proizvajalca Serion, Immunodiagnostica GmbH, Würzburg, Nemčija**

Za izvedbo encimsko imunskega testa smo uporabili kompleta reagentov proizvajalca Serion, Immunodiagnostica GmbH, Würzburg, Nemčija

#### **3.4.1 Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgG**

- mikrotitrna ploščica po 12 × 8 vrstic z vdolbinicami, prekritimi z rekombinantnimi antigeni *M. pneumoniae*
- pufer za spiranje 33,3 ml, 20 × koncentrat
- pufer za redčenje vzorcev 2 x 50 ml, 20 × koncentrat
- substratni pufer 13 ml
- raztopina za ustavitev reakcije "stop solution" 13 ml
- negativna kontrola 2 ml humani serum brez specifičnih protiteles v fosfatnem pufru s proteini (kot konzervans je dodan natrijev azid)
- standardni serum, 2 × 2 ml, humani serum v fosfatni razredčini s proteini (kot konzervans je dodan natrijev azid)
- IgG konjugat 13 ml, kozja anti-humana protitelesa IgG, konjugirana z alkalno fosfatazo

#### **3.4.2 Komplet reagentov za dokaz specifičnih protiteles IgM**

- mikrotitrna ploščica po 12 × 8 vrstic z vdolbinicami, prekritimi z rekombinantnimi antigeni *M. pneumoniae*
- pufer za spiranje 33,3 ml, 20 × koncentrat
- pufer za redčenje vzorcev 2 x 50 ml, 20 × koncentrat
- substratni pufer 13 ml
- raztopina za ustavitev reakcije "stop solution" 13 ml
- negativna kontrola 2 ml humani serum brez specifičnih protiteles v fosfatnem pufru s proteini (kot konzervans je dodan natrijev azid )
- standardni serum, 2 × 2 ml, humani serum v fosfatni razredčini s proteini (kot konzervans je dodan natrijev azid )
- IgM konjugat 13 ml, kozja anti-humana protitelesa IgM, konjugirana z alkalno fosfatazo

### 3.4.3 Shranjevanje in stabilnost reagentov

Pred in po uporabi smo jih hranili v hladilniku pri temperaturi med +2°C in +8°C. Hranjeni pod temi pogoji so uporabni najmanj do 4 tedne po odprtju.

### 3.4.4 Oprema za izvedbo testa

- ✓ destilirana voda
- ✓ čista testna ploščica za redčenje vzorcev
- ✓ epruveta 10 ml
- ✓ kalibrirane pipete 5-1000 µl in 1-5 ml
- ✓ multikanalna pipeta 100 µl
- ✓ zamenljivi nastavki za pipete
- ✓ merilna bučka 1 l
- ✓ merilni valj 50 ml
- ✓ prosojna puhalka (z 70 % etanolom)
- ✓ staničevina
- ✓ štoparica
- ✓ vortex mixer
- ✓ inkubator
- ✓ spektrofotometer z valovno dolžino 405 nm
- ✓ tiskalnik za beleženje odčitanih valovnih dolžin

### 3.4.5 Postopek testiranja

#### Dokaz protiteles IgG

Pred začetkom izvajanja smo reagente in mikrotitrsko ploščico ogreli na sobno temperaturo 20-25°C. Najprej smo pripravili protokolni list, na katerega smo vpisali položaje raztopin in vzorcev ter tudi številke vzorcev, ki smo jih kasneje nanašali. Nato smo pripravili pufer za spiranje, tako da smo 33,3 ml koncentriranega redčili s 1000 ml destilirane vode. Sledilo je redčenje preiskovanih serumov, ki smo jih pred tem pretresli na vorteksu. Redčenje serumov smo izvedli na posebnih čistih testnih ploščicah, tako da smo v vsako čisto mikrotitrsko jamico v prvi vrstici odpipetirali 10 µl seruma in dodali po 1000 µl pufera za redčenje vzorcev. Tako smo dobili razredčino preiskovanih serumov, ki smo jo kasneje uporabili pri izvedbi testa.

V nadaljevanju smo na mikrotitrsko ploščico za dokaz IgG pipetirali po 50 µl: standardni serum (2×), negativno kontrolo (2×) (cutt off) in redčene serume ter jo inkubirali 60 min pri 37°C v inkubatorju. Da smo se izognili izsušitvi vdolbinic, smo mikrotitrsko ploščico prekrili s folijo in tako zagotovili, da ni prišlo do prekomernega izhlapevanja. Po končani inkubaciji smo z mikrotitrške ploščice odstranili tekočino in štirikrat izprali s po 300 µl pripravljenega pufra. Potem smo jo še osušili z nežnim udarjanjem po čisti staničevini. Nemudoma smo nadaljevali z dodajanjem po 100 µl konjugata v vsako vdolbinico, ploščico zaščitili s folijo in inkubirali 30 min. pri 37°C ter ustrezni vlagi v inkubatorju. Ponovno smo odstranili tekočino in ponovili postopek izpiranja. V naslednjem koraku smo dodali po 100 µl substratnega pufra, ploščico pokrili in inkubirali 30 min pri 37°C v inkubatorju. Po končani inkubaciji smo v vse vdolbinice dodali raztopino za utavitev reakcije (100 µl) in jo tako zaustavili. Po preteku največ 15 min smo mikrotitrsko ploščico vstavili v spektrofotometer in pri, z valovno dolžino 405 nm, izmerili absorbance in jih vpisali na protokolni list.

### **Dokaz protiteles IgM**

Pri dokazovanju protiteles IgM obstaja možnost, da je v serumu prisoten revmatoidni faktor, ki deluje kot moteč dejavnik. Da smo se izognili temu dejavniku, smo vzorce predhodno obdelali, tako da smo jih redčili s pufrom za redčenje vzorcev, ki je vsebovalo absorbent za revmatoidni faktor. To raztopino smo pred tem pripravili tako, da smo 200 µl Rf- absorbent redčili z 800 µl razredčila za redčenje vzorcev. Potek dokazovanja protiteles IgM je v nadaljevanju enak postopku dokazovanja protiteles IgG. Razlikuje se samo v tem, da smo pri dokazovanju uporabili kozja anti-humana IgM protitelesa, konjugirana z alkalno fosfatazo.

### **3.4.6 Vrednotenje rezultatov**

Za veljavnost testa, smo morali preveriti od proizvajalca določene kriterije. Če ti ne bi bili v predpisanih mejnih vrednostih, bi domnevali, da so rezultati testiranja napačni in bi testiranje ponovili.

Navedeni kriteriji za IgG in IgM:

O.D. slepe < 0,25



O.D. NK mora biti negativna

### **Izračun in interpretacija rezultatov testa**

Izmerjene absorbance vzorcev smo natisnili, jih odčitali in vnesli v protokolni list. Nato smo preverili vrednosti posameznih kontrol za IgG in IgM. Izračunali smo še faktor F po sledeči formuli:

$$F = \frac{\text{O.D. referenčna vrednost standardnega seruma}}{\text{O.D. povprečna vrednost standardnih serumov}}$$

Če so se absorbance kontrol ujemale s predpisanimi kriteriji, smo začeli z izračunavanjem rezultatov.

Pri določanju koncentracij protiteles IgG in IgM smo uporabili umeritveno premico proizvajalca. Na os Y smo vnesli korigirane absorbance ( $F \times OD$  preiskovanega vzorca) serumov ter z osi X odčitali pripadajoče koncentracije (U/ml). Te smo vpisali na protokolni list ter jih interpretirali po naslednjih omejitvah:

Interpretacija IgG za odrasle:

Koncentracija < 20 U/ml → negativen rezultat (specifičnih protiteles nismo zaznali)

Koncentracija 20 - 30 U/ml → mejni rezultat

Koncentracija > 30 U/ml → pozitiven rezultat (zaznali smo pomembno količino specifičnih protiteles)

Interpretacija IgG za otroke:

Koncentracija < 10 U/ml → negativen rezultat (specifičnih protiteles nismo zaznali)

Koncentracija 10 - 15 U/ml → mejni rezultat

Koncentracija > 15 U/ml → pozitiven rezultat (zaznali smo pomembno količino specifičnih protiteles)

Interpretacija IgM:

Koncentracija < 13 U/ml → negativen rezultat (specifičnih protiteles nismo zaznali)

Koncentracija 13 - 17 U/ml → mejni rezultat

Koncentracija > 17 U/ml → pozitiven rezultat (zaznali smo pomembno količino specifičnih protiteles)

### Diagnostična interpretacija rezultatov

Prisotnost IgG protiteles v koncentraciji, višji od mejne vrednosti, nakazuje na potekajočo ali prebolelo okužbo. Da lahko razlikujemo med tema stanjema, je priporočen odvzem drugega vzorca po 2-4 tednih. Če se je koncentracija IgG v tem času signifikantno zvišala, pomeni, da okužba poteka, če je ostala enaka, je to znak za prebolelo okužbo. Ob prisotnosti protiteles IgM v koncentraciji, višji od mejne vrednosti, je to pokazatelj za potekajočo oz. kronično okužbo z *M. pneumoniae*. Prav tako je pri določanju IgM priporočeno testiranje drugega parnega vzorca, če se je koncentracija nahajala v območju mejnih vrednosti. Če je drugi vzorec spet v mejnih vrednostih, ga ovrednotimo kot negativnega.

Da smo dobili čim bolj realno sliko, smo rezultate testiranja IgG, IgM, in IgA primerjali, kot je prikazano v preglednici V.

**Preglednica V:** Interpretacija rezultatov testiranja na protitelesa proti *M. pneumoniae* razredov IgG, IgM in IgA. S testom Serion smo testirali samo protitelesa razredov IgG in IgM.

IgG	IgM	IgA	Interpretacija
-	-	-	sronegativni status, v primeru kliničnega suma na okužbo z mikoplazmo je priporočan odvzem drugega vzorca 14 dni po odvzemu prvega
-/+	+	+	sum na akutno okužbo, pozitivni IgA-rezultati kombinirani s pozitivnimi IgM-rezultati v primeru mladih pacientov
-/+	-	+	sum na akutno okužbo, (v primeru starejših pacientov s ponovno okužbo obstaja možnost, da IgM ne bodo zaznani)
+	-	-	stara okužba, v redkih primerih akutna okužba brez nastajanja specifičnih protiteles IgM in IgA (potrebno je biti pozoren na zvišanje IgG titrov)

## 4 Rezultati

V diplomski nalogi smo na okužbo z *M. pneumoniae* pregledali 49 parnih vzorcev, skupaj torej 98 vzorcev. Naš namen je bil primerjalno testirati arhivske serume 49 bolnikov, ki so bili v obdobju preteklih let (2006-2007) poslani na rutinsko serološko diagnostiko okužbe s tem mikrobom. Izbrali smo bolnike, pri katerih sta bila v laboratorij poslana vsaj dva (parna) serumska vzorca, odvzeta v različnih časovnih obdobjih. Povprečna starost bolnikov je bila 27,8 let. Najmlajši je bil star dve, najstarejši 76 let. Polovica jih je bila mlajših od 16 let (mediana). Vse vzorce smo testirali s tremi diagnostičnimi kompleti proizvajalcev Serion, Medac in Savyon, ki temeljijo na metodi ELISA. Pri testih proizvajalca Medac in Savyon smo ugotavljali specifična protitelesa razreda IgG, IgM in IgA, rezultate pa smo primerjali z metodo ELISA proizvajalca Serion, ki se za dokazovanje specifičnih protiteles IgG in IgM uporablja rutinsko. V nalogi smo želeli ovrednotiti dva novejša testa in medsebojno primerjatei rezultate testiranja.

### 4.1 Rezultati testiranja s testom Serion

S testom proizvajalca Serion so serumske vzorce testirali na prisotnost specifičnih IgG in IgM proti *M. pneumoniae* v okviru rednega diagnostičnega dela. Pozitivne rezultate za protitelesa razreda IgG so določili pri 76 vzorcih, negativne pri 17 vzorcih, 5 vzorcev pa je bilo mejno pozitivnih. Pri dokazovanju specifičnih protiteles razreda IgM je bilo pozitivnih 22 vzorcev in negativnih 73 vzorcev. Mejno pozitivni so bili trije vzorci.

**Preglednica VI:** Rezultati serološkega testa proizvajalca Serion za specifična protitelesa IgG in IgM. Specifičnih protiteles razreda IgA pri rutinskem testiranju niso izvajali.

test Serion			
	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>	
<b>Pozitivno</b>	76	22	
<b>Negativno</b>	17	73	
<b>Pozitivno/negativno</b>	5	3	

Pri vrednotenju parnih vzorcev po specifičnih protitelesih IgG in IgM smo ugotovili, da je bilo z metodo proizvajalca Serion pri 13 bolnikih dokazana akutna okužba, pri ostalih pa je bila ugotovljena pretekla okužba ali pa so bila specifična protitelesa proti *M. pneumoniae*

povsem odsotna. Povprečna starost s to metodo diagnosticiranih bolnikov je znašala 11,4 leta.

## 4.2 Rezultati testiranja s testom Medac

S testom proizvajalca Medac smo serumske vzorce testirali na prisotnost specifičnih IgG, IgM in IgA proti *M. pneumoniae*. Pozitivne rezultate za protitelesa razreda IgG smo določili pri 48 vzorcih, negativne pri 41 vzorcih, 9 vzorcev pa je bilo mejno pozitivnih. Za specifična protitelesa razreda IgM je bilo 23 vzorcev pozitivnih in 65 negativnih. Mejno pozitivnih je bilo 10 vzorcev. Za specifična protitelesa razreda IgA je bilo 24 vzorcev pozitivnih, 72 jih je bilo negativnih. Mejno pozitivna sta bila dva vzorca.

**Preglednica VII:** Rezultati serološkega testa proizvajalca Medac za specifična protitelesa vseh treh razredov

test Medac			
	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>	<b>IgA</b>
<b>Pozitivno</b>	48	23	24
<b>Negativno</b>	41	65	72
<b>Pozitivno/negativno</b>	9	10	2

Pri vrednotenju parnih vzorcev po specifičnih protitelesih IgG, IgM in IgA smo ugotovili, da je bilo z metodo proizvajalca Medac dokazana akutna okužba pri 20 bolnikih, pri ostalih pa je bila ugotovljena pretekla okužba ali pa so bila specifična protitelesa proti *M. pneumoniae* povsem odsotna. Mejno pozitivne vrednosti smo pri testu Medac dokazali pri 21 testiranih vzorcih. Povprečna starost s to metodo diagnosticiranih bolnikov je znašala 24,6 let.

## 4.3 Rezultati testiranja s testom Savyon

S testom Savyon smo serumske vzorce testirali na prisotnost specifičnih IgG, IgM in IgA proti *M. pneumoniae*. Pozitivne rezultate za protitelesa razreda IgG smo določili pri 32 vzorcih, negativne pri 66 vzorcih. Za specifična protitelesa razreda IgM je bilo pozitivnih 23 vzorcev in negativnih 65.. Mejno pozitivne vrednosti smo določili pri dveh vzorcih. Za specifična protitelesa razreda IgA je bilo 21 vzorcev pozitivnih in 77 negativnih.

**Preglednica VIII:** Rezultati serološkega testa proizvajalca Savyon za specifična protitelesa vseh treh razredov

test Savyon			
	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>	<b>IgA</b>
<b>Pozitivno</b>	32	23	21
<b>Negativno</b>	66	65	77
<b>Pozitivno/negativno</b>	0	2	0

Pri vrednotenju parnih vzorcev po specifičnih protitelesih IgG, IgM in IgA smo ugotovili, da je z metodo proizvajalca Serion bilo pri bolnikih dokazanih 24 akutnih okužb; ostalo so bile stare okužbe ali pa okužbe ni bilo prisotne. Povprečna starost s to metodo diagnosticiranih bolnikov je znašala 29,3 leta.

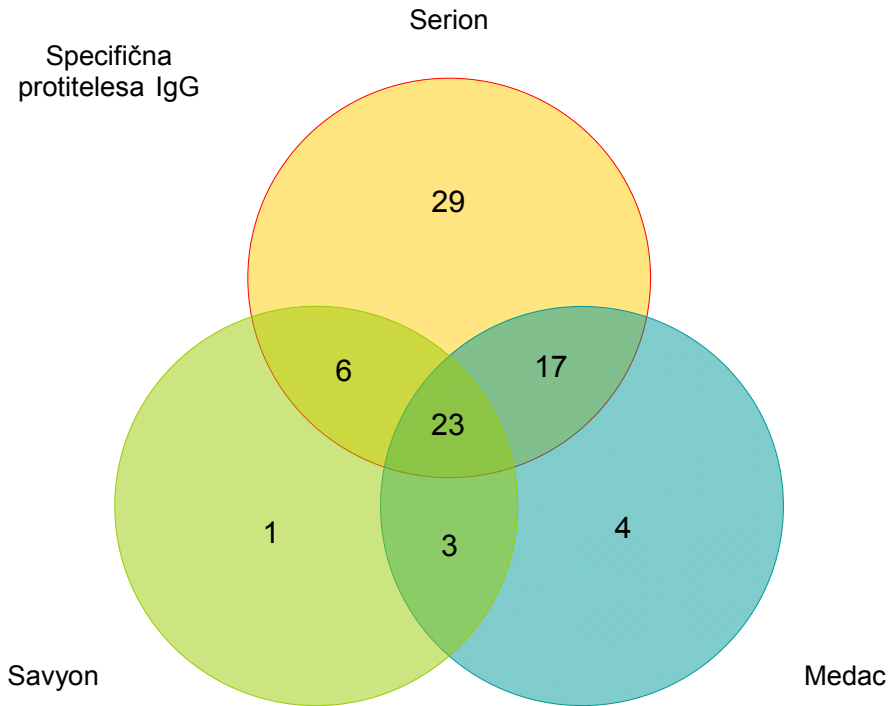
#### **4.4 Primerjava rezultatov treh seroloških testov za dokazovanje okužb z *M. pneumoniae***

Rezultati testiranja s testi Serion in Medac za dokaz specifičnih protiteles IgM sta se med seboj ujemala pri 75 vzorcih, kar je 76,5 % vseh testiranih. Testa Serion in Savyon za dokaz specifičnih protiteles IgM sta se ujemala v 87 vzorcih, kar je 88,8 % le-teh. Testa Medac in Savyon za dokaz specifičnih protiteles IgM sta dala enake rezultate pri 79 testiranih serumih oziroma 80,6% vzorcev.

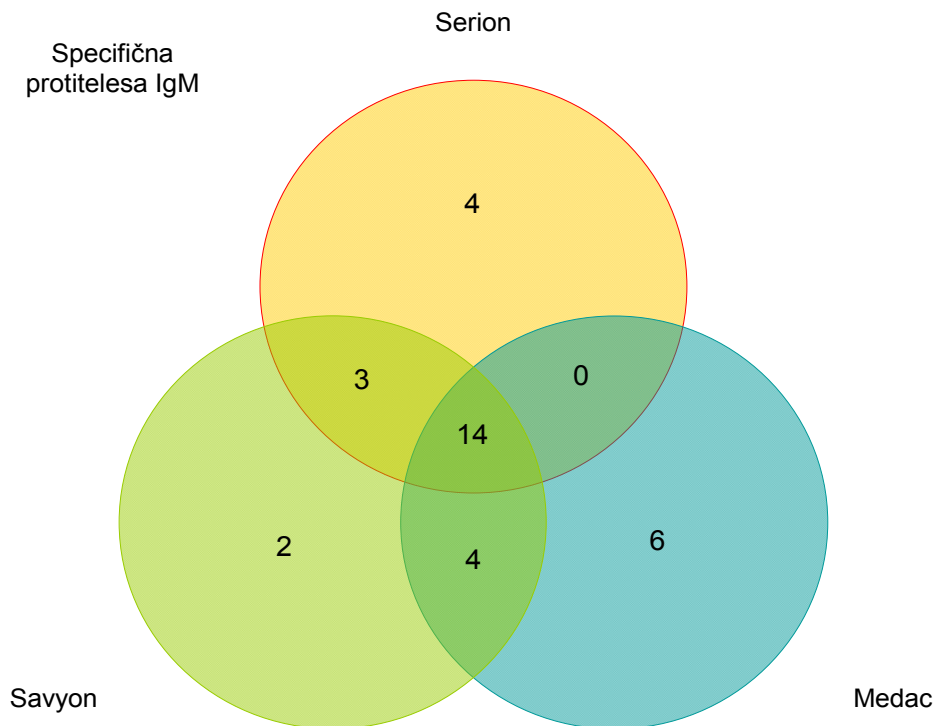
Pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM s testoma Serion in Savyon smo dokazali ujemanje dobljenih vrednosti pri osmih vzorcih oziroma za 8,2 % večjem deležu kot s testoma Medac in Savyon oziroma pri 12 vzorcih ali za 12,3 % večjem deležu kot s testoma Serion in Medac.

Pri dokazovanju specifičnih protiteles IgA smo lahko primerjali le rezultate testov Medac in Savyon, saj s testom Serion specifičnih protiteles IgA niso dokazovali. Testa sta dala enake rezultate v 76,5 % oziroma pri 75 od 98 serumskih vzorcev.

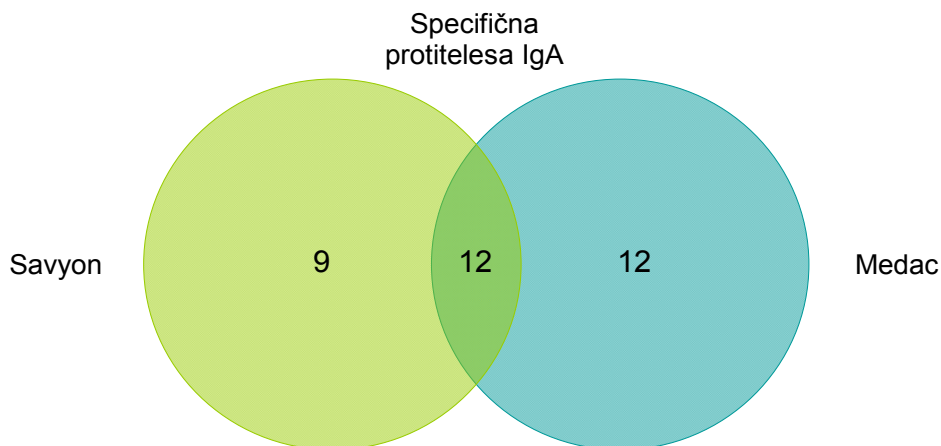
Rezultatov testiranj za specifična protitelesa IgG nismo vrednotili ločeno od rezultatov testiranja za specifična protitelesa IgM in IgA.



**Slika 4:** Ujemanje pozitivnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG pri treh testih



**Slika 5:** Ujemanje pozitivnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM pri treh testih



**Slika 6:** Ujemanje pozitivnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgA pri dveh testih

#### **4.5 Diagnostično vrednotenje rezultatov treh seroloških testov za dokazovanje okužb z *M. pneumoniae***

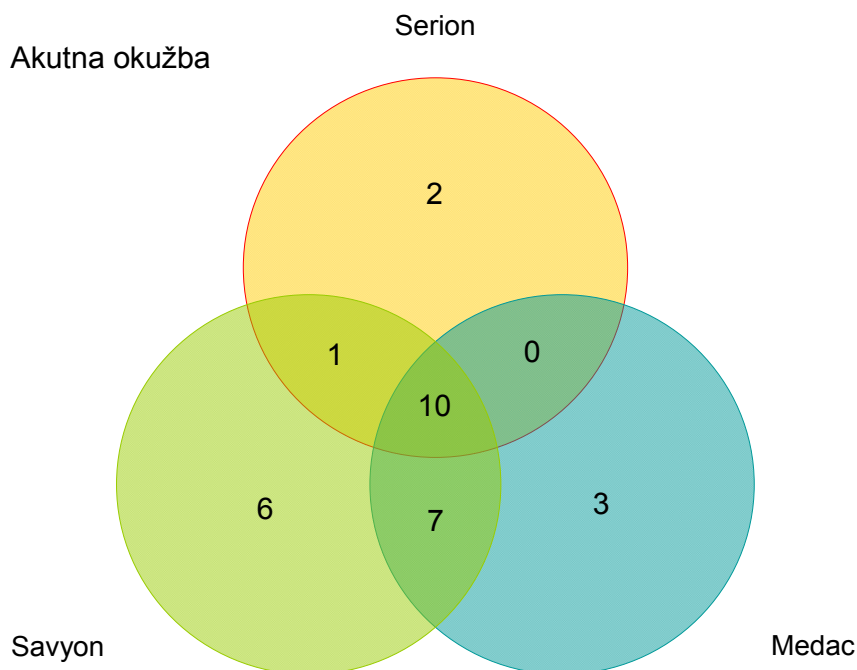
Rezultate seroloških testiranj na tri razrede specifičnih protiteles smo želeli po navodilih proizvajalcev tudi diagnostično ovrednotiti. Kot akutno okužbo smo opredelili vsak pozitiven rezultat na specifična protitelesa IgM in/ali IgA. Kot preteklo okužbo smo opredelili rezultate, kjer so bila v vsaj enem od parnih vzorcev prisotna protitelesa razreda IgG. Kot stanje brez okužbe pa smo opredelili rezultate, kjer nismo našli protiteles *proti M. pneumoniae*.

Sedaj smo diagnostično vrednotene rezultate, ki smo jih dobili s posameznimi testi in so prikazani v tabeli IX, primerjali med seboj, da smo ugotovili, pri katerih testih se ujemajo vsaj v dveh primerih. Odločili smo se, da bomo za konsenzus rezultata upoštevali rezultat, ki se je ujema vsaj pri dveh različnih testih. Takšnih je v primeru akutne okužbe z *M. pneumoniae* bilo 18, kar je prikazano na sliki 7. Od tega je bila pri 10 bolnikih zaznana okužba z *M. pneumoniae* z vsemi metodami, 7 z metodama Medac in Savion ter ena z metodama Serion in Savion. Povprečna starost vseh bolnikov diagnosticiranih z okužbo je znašala 22,6 let. Tisti, pri katerih so bili testi pozitivni s tremi metodami, so imeli povprečno starost 12,1 let, tisti ki so bili pozitivni z Medacom in Savyonom 38,7 let, en bolnik, star 14 let, je bil pozitiven z metodama Serion in Savyon.

**Preglednica IX:** Diagnostično vrednotenje rezultatov seroloških testov treh različnih proizvajalcev. Pri vrednotenju smo upoštevali navodila proizvajalcev. Pri testu Serion akutno okužbo opredeljuje prisotnost specifičnih IgM, pri testih Medac in Savyon pa prisotnost specifičnih IgM in/ali IgA protiteles.

Test	Akutna okužba	Okužba v preteklosti	Brez okužbe
<b>Serion</b>	13	33	3
<b>Medac</b>	20	13	16
<b>Savyon</b>	24	5	20

Ker smo s testoma proizvajalcev Medac in Savyon določali tudi specifična protitelesa IgA na *M. pneumoniae*, iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je to okužbo s tem mikroorganizmom pri starejši populaciji z večjo verjetnostjo možno potrditi, če se poleg specifičnih protiteles IgG in IgM naredi tudi test za specifična protitelesa razreda IgA. Tako navajajo v svojih navodilih tudi proizvajalci testov.



**Slika 7:** Ujemanje diagnostično vrednotenih rezultatov akutne okužbe z *M. pneumoniae* pri testih treh različnih proizvajalcev





**Slika 8:** Ujemanje diagnostično vrednotenih rezultatov okužbe v preteklosti z *M. pneumoniae* pri testih treh različnih proizvajalcev



**Slika 9:** Ujemanje diagnostično vrednotenih rezultatov za odsotnost okužbe z *M. pneumoniae* pri testih treh različnih proizvajalcev

#### **4.6 Diagnostična specifičnost in občutljivost metod**

Ker nismo imeli na voljo zanesljivega kontrolnega testa, smo diagnostično specifičnost in občutljivost računali glede na rezultate, ki smo jih dobili s konsenzusom. Zato so izračunane vrednosti bolj informativne narave in jih ne smemo jemati kot zanesljive.

Za specifična protitelesa razreda IgM in IgA smo kot pozitivne upoštevali parne vzorce bolnikov, ki imajo po konsenzusu akutno okužbo. Z merjenjem protiteles IgG ni mogoče ločiti med akutno in staro okužbo, zato smo za izračun specifičnosti in občutljivosti testov IgG kot pozitivne upoštevali tako akutne kot stare okužbe.

Pri računanju diagnostične specifičnosti in občutljivosti nismo upoštevali starosti pacientov.

##### **Serion IgG**

Specifičnost =  $2 / 14 \times 100 \% = 14,28 \%$

Občutljivost =  $34 / 35 \times 100 \% = 97,14 \%$

##### **Serion IgM**

Specifičnost =  $28 / 31 \times 100 \% = 90,32 \%$

Občutljivost =  $11 / 18 \times 100 \% = 61,1\%$

##### **Medac IgG**

Specifičnost =  $14 / 14 \times 100 \% = 100 \%$

Občutljivost =  $29 / 35 \times 100 \% = 82,86 \%$

##### **Medac IgM**

Specifičnost =  $29 / 31 \times 100 \% = 93,55 \%$

Občutljivost =  $12 / 18 \times 100 \% = 66,67 \%$

##### **Medac IgA**

Specifičnost =  $29 / 31 \times 100 \% = 93,55 \%$

Občutljivost =  $11 / 18 \times 100 \% = 61,11\%$

##### **Savyon IgG**

Specifičnost =  $14 / 14 \times 100 \% = 100 \%$

Občutljivost =  $20 / 35 \times 100 \% = 57,14 \%$

### **Savyon IgM**

Specifičnost =  $31 / 31 \times 100 \% = 100 \%$

Občutljivost =  $13 / 18 \times 100 \% = 72,22 \%$

### **Savyon IgA**

Specifičnost =  $25 / 31 \times 100 \% = 80,65 \%$

Občutljivost =  $9 / 18 \times 100 \% = 50,00 \%$

Glede na navedene rezultate vidimo, da se je med testi specifičnih protiteles IgM najbolj obnesel test Savyon IgM (specifičnost 100 %, občutljivost 72,22 %), med testi protiteles IgA pa test Medac IgA (specifičnost 93,55 %, občutljivost 61,11 %). Zato bi bilo morda koristno pri testiranju na različna protitelesa kombinirati teste različnih proizvajalcev. Po naših rezultatih najbolj pravilno dokaže prisotnost protiteles IgG test Medac IgG (specifičnost 100 %, občutljivost 82,86 %).

## 5 Diskusija

Okužbe z *M. pneumoniae* predstavljajo pomemben delež okužb dihal. Še posebej pogoste so kot povzročitelj t.i. atipične pljučnice, ki se pogosto pojavlja pri otrocih, adolescentih in mlajših odraslih. *M. pneumoniae* povzroča 10-20 % zunaj bolnišnično pridobljenih pljučnic, kar predstavlja približno tretjino okužb z mikoplazmo (14). Okužba z *M. pneumoniae* v večini primerov ni življenjsko ogrožujoča in poteka brez hujših simptomov. Mlajši okužbo prenašajo lažje kot starejši. Ozdravitev je ponavadi spontana, v nekaterih primerih pa je potrebna antibiotična terapija. Če se okužba pojavi med ostarelimi, lahko povzroči tudi smrt. Zdravljenje se izvaja z makrolidi, tetraciklini in kinoloni, saj mikoplazme nimajo celične stene in so zato odporne na betalaktamske antibiotike (1). Edini gostitelj bakterije *M. pneumoniae* je človek in dokaz njene prisotnosti pri njem je vedno klinično pomemben, saj *M. pneumoniae* ni nikoli del normalne flore (20).

Hitre in specifične diagnostične metode, ki bi bila na voljo zdravnikom žal še ni, zato so priporočila za zdravljenje v domačem okolju pridobljene pljučnice različna. Bolezen lahko mikrobiološko dokažemo z neposrednimi metodami, kot sta osamitev mikoplazem na posebnih gojiščih in v sodobnem času predvsem z metodo pomnoževanja in dokazovanja nukleinskih kislin (PCR). Posredno jih dokazujemo, kadar od začetka bolezni poteče več dni. Takrat lahko v diagnostične namene uporabimo serološke preiskave za dokazovanje specifičnih protiteles proti *M. pneumoniae* - v zadnjih letih prevladuje uporaba encimsko imunske metode (2, 24).

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, natančneje v laboratoriju za dokazovanje virusnih infekcij, se za rutinsko diagnostično dokazovanje specifičnih IgG in IgM protiteles uporablja encimsko imunski test proizvajalca Serion, Immunodiagnostica GmbH, Würzburg, Nemčija. V nalogi smo uporabili še dva novejša diagnostična kompleta proizvajalcev Medac GmbH, Hamburg, Nemčija in Savyon Diagnostics Ltd, Ashdod, Izrael, ki prav tako temeljita na metodi ELISA in s katerima smo poleg specifičnih protiteles IgG in IgM dokazovali tudi specifična protitelesa razreda IgA, usmerjena proti antigenom *M. pneumoniae*. Specifična protitelesa smo dokazovali v arhivskih parnih vzorcih 49 bolnikov, pri katerih je obstajal sum na okužbo z *M. pneumoniae* in ki so bili poslani na rutinsko serološko diagnostiko v

letih 2006 oziroma 2007. Drugi od parnih vzorcev so bili odvzeti v različnih časovnih obdobjih s pretekom najmanj štirinajstih dni od odvzema prvega od vzorcev.

Arhivske rezultate, pridobljene s testom proizvajalca Serion, smo dobili na razpolago od Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo in smo jih primerjali z rezultati testiranja dveh novejših diagnostičnih kompletov proizvajalcev Medac in Savyon. Testiranja smo izvajali v laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V diplomski nalogi smo želeli preveriti, ali bi diagnostiko lahko izboljšali z uporabo testov drugih proizvajalcev, ki omogočajo tudi detekcijo specifičnih protiteles razreda IgA, ki so še posebej primerna za diagnostično uporabo v primerih okužb, ki prizadenejo sluznice (tudi okužbe dihal). Pri okužbah z *M. pneumoniae* je bilo v novejšem obdobju dokazano, da je pri odraslih in starejših bolnikih dokazovanje specifičnih protiteles razreda IgA zaneslivejše od dokazovanja zgolj specifičnih protiteles razreda IgM. Slednja se pri nekaterih bolnikih, ki so se v preteklosti že srečali s to bakterijo, pri ponovni okužbi sploh ne pojavijo (37, 38)

Pri določanju specifičnih protiteles razreda IgG v skupini bolnikov s sumom na okužbo z *M. pneumoniae* so bili rezultati 98 testiranih vzorcev naslednji: s testom Serion 76, s testom Medac 48 in s testom Savyon 32 pozitivnih. Pri tem sta se testa Serion in Medac ujemala pri 40, Serion in Savyon v 29 ter Medac in Savyon pri 26 pozitivnih rezultatih.

Pri določanju specifičnih protiteles razreda IgM smo s testom Serion ugotovili 22, s testom Medac 23 in s testom Savyon 23 pozitivnih rezultatov. Pri tem sta se testa Serion in Medac ujemala pri 14, Serion in Savyon pri 17 ter Medac in Savyon pri 18 pozitivnih rezultatih.

Pri določanju specifičnih protiteles razreda IgA smo s testom Medac dobili 24 in s testom Savyon 21 pozitivnih rezultatov. Rezultati so se ujemali pri 12 primerih.

Po diagnostični interpretaciji smo s testom Serion ugotovili 13 akutnih okužb, s testom Medac 20 in s testom Savyon 24 akutnih okužb.

Pri testiranju serumskih vzorcev smo ugotovili, da se rezultati med posameznimi testi precej razlikujejo. Razlikujejo se tako glede na rezultate posamičnih parametrov, kakor tudi glede na interpretacijo statusa okužbe. Najboljše ujemanje pri primerjavi posameznih parametrov testiranja smo ugotovili pri določanju specifičnih protiteles razreda IgM med testoma Serion in Savyon (88 %). Pri testiranju na specifična protitelesa IgG smo najboljše ujemanje rezultatov ugotovili med testoma Serion in Medac.

Glede na povprečno starost bolnikov, diagnosticiranih z akutno okužbo, lahko sklepamo, da je to okužbo pri starejši populaciji z večjo verjetnostjo možno dokazati, če se ob testih

specifičnih protiteles IgG in IgM izvedejo še testi protiteles IgA (37, 38). To navajajo proizvajalci testov v navodilih, v diplomski nalogi pa smo to potrdili, saj smo s testoma, s katerima smo dodatno določali tudi IgA, dobili večjo povprečno starost diagnostično pozitivno testiranih bolnikov (11,4 leta pri testu Serion brez IgA, 24,6 oziroma 29,3 leta pri testih Medac in Savyon z dodatnimi IgA).

V nalogi smo ugotovili, da je bilo število mejnih (pozitivno/negativnih) rezultatov največje pri testiranju s testom proizvajalca Serion, ki se uporablja v rutinskem testiranju, najmanj pa pri proizvajalcu Savyon. Večina mejnih rezultatov se je pojavila pri testiranju specifičnih protiteles razreda IgG in IgM in tako ni povezana z dodatnim testiranjem na razred protiteles razreda IgA, kjer smo ugotovili majhno število mejnih rezultatov. Mejni rezultati v diagnostiki infekcijskih bolezni pomenijo veliko težavo, saj jih ne moremo opredeliti ne kot negativne in ne kot pozitivne. Običajno poskušajo takšne zaplete rešiti s ponovnim odvzemom serumskega vzorca in dodatnim testiranjem. Vse to za zdravnika in bolnika pomeni negotovost v etiološki potrditvi okužbe, psihološko breme in dodatne nepotrebne stroške diagnostike. Zato je v diagnostičnem laboratoriju zelo zaželjena uporaba testov, ki čim manj vzorcev opredelijo kot nejasne oz. mejne.

Serološki testi se glede na proizvajalca med drugim razlikujejo tudi po tem, kakšni antigeni so uporabljeni pri izdelavi testov. Čeprav vsi proizvajalci ne navajajo natančno, kakšne in kako pripravljene antigene uporabljajo v testih, je bilo iz navodil mogoče razbrati, da razlike obstajajo. Proizvajalec Savyon uporablja za dokazovanje vseh treh razredov protiteles rekombinantne antigene, medtem ko proizvajalca Medac in Serion uporabljata bodisi mešanice naravnih (nativnih) antigenov ali zgolj nativne prečiščene antigene.

Diagnostično specifičnost in občutljivost testiranih metod smo izračunali glede na konsenzus rezultatov vsaj dveh diagnostičnih testov, zato te številke niso zanesljive. Za natančen izračun bi potrebovali zanesljivo in natančno kontrolno metodo. Najboljša bi bila verjetno neposredna metoda PCR (znani sta občutljivost 95 % in specifičnost 85 %), vendar bi za njeno izvedbo potrebovali tudi ustrezne klinične vzorce iz dihal, odvzete čimprej po začetku bolezni, ki niso bili na voljo (1).

Po naših izračunih diagnostične specifičnosti in občutljivosti, so se najbolje obnesli testi Savyon IgM (specifičnost 100 %, občutljivost 72,22 %), Medac IgA (specifičnost 93,55 %, občutljivost 61,11 %) in Medac IgG (specifičnost 100%, občutljivost 82,86 %).

Glede na rezultate domnevamo, da bi lahko zvišali uspešnost diagnosticiranja akutne okužbe s tem, da bi za vsak razred specifičnih protiteles uporabili test, ki se je izkazal za

najzanesljivejšega. Da pa bi zanesljivo določili najustreznejše teste, bi potrebovali natančno kontrolno metodo.

Razlike med rezultati in posledično v vrednotenju testov so lahko posledica številnih dejavnikov med katerimi izpostavljamo naslednje:

- Testa Savyon in Medac vsebujeta različne antigene kot test Serion, čeprav proizvajalci ne navajajo natančno, kakšni in kako pripravljene antigeni so nanešeni v testnih ploščicah. Posledica uporabe različnih antigenov v testu je lahko različno zaznavanje protiteles, usmerjenih proti tem antigenom v serološkem testu. Za test Savyon smo iz dokumentacije proizvajalca razbrali, da vsebuje rekombinantne antigene za testiranje vseh treh parametrov (IgG, IgM in IgA). Posledično se je test Savyon v našem testiranju obnesel nekoliko bolje kot druga dva.
- Testa Savyon in Medac omogočata dokazovanje specifičnih protiteles razreda IgA, kar omogoča dokazovanje akutnih okužb z mikoplazmo pri odraslih in starejših bolnikih, ki so se v mladosti zelo verjetno že srečali z mikoplazmami. Pri njih se imunski odgovor pri ponovni akutni okužbi z *M. pneumoniae* le redko odzove s tvorbo specifičnih protiteles razreda IgM. Menimo, da na tako razlago nakazuje tudi razlika v starosti med skupinama, ki imata potrjeno akutno okužbo z vsemi tremi uporabljenimi testi in tisto, kjer je okužba potrjena s testoma Savyon in Medac (glej sliko 7).
- Testiranje s testom Serion je bilo izvedeno na »svežih« vzorcih, medtem ko je bil pred drugim testiranjem vzorec najprej zamrznjen za obdobje od nekaj mesecev do enega leta in nato neposredno pred izvedbo odmrznjen. Čeprav v literaturi ni podatkov, da bi tak postopek lahko bistveno vplival na rezultate, ga moramo vseeno upoštevati kot eno izmed možnosti.
- Ena od pomankljivosti vseh preizkušenih testov je, da niso bili avtomatizirani. Ob tem vsak test vsebuje več korakov (vsaj 4), zaradi česar obstaja možnost napak pri izvajanju testa.

Tako primerjava testiranj posamičnih parametrov (IgG, IgM in IgA) kot primerjava diagnostičnega vrednotenja treh testov (akutna okužba, okužba v preteklosti, brez okužbe), je pokazala na velike razlike med rezultati posamičnih proizvajalecev testov. Tako ujemanje rezultatov ocenjujemo za slabo in menimo, da tako različni rezultati zahtevajo poglobljeno dodatno testiranje in razjasnitev razlik.

Sklepamo, da so potrebna nadaljnja ugotavljanja, kateri serološki testi bi bili najprimernejši za uporabo v diagnostiki.



## 6 Sklepi

- Akutno okužbo z *M. pneumoniae* smo v nalogi poskušali dokazati z imunskimi testi treh različnih proizvajalcev. Ugotovili smo, da smo z vsemi tremi testi dokazali akutne okužbe.
- Ujemanje rezultatov testiranja za IgM smo ugotovili pri 75 vzorcih (76,5 %) med testoma Serion in Medac, v 87 vzorcih (88,8 %) med testoma Serion in Savyon ter pri 79 vzorcih (80,6 %) med testoma Medac in Savyon.
- Ujemanje rezultatov testiranja za IgA med testoma Medac in Savyon smo ugotovili pri 75 (76,5 %) od 98 serumskih vzorcev.
- Ujemanja rezultatov testiranja za IgG nismo vrednotili ločeno od rezultatov testiranja za specifična protitelesa IgM in IgA.
- Sum na akutno okužbo smo s testom Serion potrdili pri 13 (26,5 %), s testom Medac pri 20 (40,8 %) in s testom Savyon pri 23 (46,9 %) od 49 testiranih bolnikov.
- Dokazali smo, da se bolniki s potrjeno akutno okužbo s posamičnim testom razlikujejo po povprečni starosti. Najnižjo povprečno starost so tako imeli bolniki z akutno okužbo, ki so bili dokazani s testom Serion (11,4 leta), najvišjo povprečno starost pa tisti z dokazano akutno okužbo s testom Savyon (24,6 let). Povprečna starost bolnikov z akutno okužbo, dokazano s testom Medac je bila 20,3 let.
- Uspešnejše dokazovanje okužb z *Mikoplazmo pneumoniae* pri starejši populaciji razlagamo z dokazovanjem protiteles razreda IgA, za katera tudi proizvajalci navajajo, da so primernejša od protiteles razreda IgM pri dokazovanju okužb pri odrasli ali starejši populaciji.
- Glede na rezultate diplomske naloge sklepamo, da je za optimalno serološko diagnostiko akutnih okužb z *M. pneumoniae* v populaciji, ki zajema paciente vseh starostnih skupin, potrebno dokazovanje specifičnih IgM in IgA protiteles.

## 7 Literatura

1. Marolt-Gomišček A, Radšel-Medvešček: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 235-8.
2. Ihan A, Avšič – Županc T: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2000: 329-32.
3. Tully JG: Current status of the Mollicute flora in humans. Clin Infect Dis 1993; 1: 2-9.
4. Razin S: Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. Bioscience reports, 1999; 5 : 367-72.
5. Bauman R: Microbiology With Diseases by Taxonomy. Second Edition, San Francisco 2007: 594-7.
6. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr: Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth ed. Lippincot, New york, 1997: 858-81.
7. Razin S, Yogev D, Naot Y: Mycrobiology and Molecular Biology. Reviews 1998; 4 : 1094-1156.
8. Miyata M, Seto S: Cell reproduction cycle in mycoplasma. Biochemie 1999; 8-9: 873-8.
9. Trachtenberg S. Mollicutess - walless bacteria with internal cytoskeletonous. Journal of Structural Biology,1998; 2-3 : 244-56.
10. Miyata M, Venoyama A: Movement on the cell surface of the gliding bacterium, *Mycoplasma mobile* is limited to its head-like structure. FEMS letters 2002; 2 : 285-9.
11. Cohn WE, Moldave K: Characteristic of Mycoplasmas and their Genomes. Academic Press 1987; 30.
12. Morowitz HJ, Wallace DC: Genome size and life cycle of the *Mycoplasma*. Ann N Y acad sei 1973; 225 : 62-73.
13. Madigan M, Martinko J: Brock Biology of Microorganismos. Eleventh Edition, Chapter 12: The Bacteria. Pearson Prentice Hall, Inc 2006; 410-11.
14. Loens K, Goossens H, even M: Molecular diagnosisof *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. J Clin Microbiol 2003; 41 : 4915-23.
15. Hammerschlag MR: *Mycoplasma pneumoniae* infections. Curr Opin Infect Dis 2001; 14 : 181-6.
16. Foy HM, Kenny GE, McMahan MN, Mansy AM, Grayston JT: *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in an urban area 1970; 214: 1666-72.

17. British horacic Society Research Committe. Community-acquired Pneumonia in Adults in British Hospitals in 1982-1983: A Survey of Aetiology, Mortality, Prognostic Factors and Outcome. *Quart J Med* 1987; 239 : 195-220.
18. B. Beović, B. Bonač, D. Keše, T. Avšič Županc, S. Kreft, G. Lesničar, J. Gorišek-Reberšek, L. Rezar, S. Letonja: Aetiology and clinical presentation of mild community acquired bacterial pneumoniae, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2003; 22: 584 - 591
19. Müller-Premru M: Mikrobiološka diagnostika, kultivacija, hitre metode, Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana 1998: 28-30.
20. Kenny GE: Mycoplasmas. In: Ballows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ eds. *Manual of clinical microbiology*. Fifth ed. Washington 1991; 478-87.
21. Marmion BP, Williamson J, Worswick DA, Kok TW, Harris RJ: Experience with new techniques for the laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Adelaide, clin Infect dis* 1993; 1 : 90-9.
22. Benčina D, Bradbury J: Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of mycoplasma species. *J Clin microbiol* 1992; 30 : 407-10.
23. Bebear C, Dupon M, Renaudin H, de Barbeyrac B: Potential improvements in therapeutic options for mycoplasmal respiratory infections. *Clin Infect Dis* 1993; 1 : 202-7.
24. Gardella RS, Delguidice RA, Tully JG: Immunofluorescence. In: Razin S, Tully JG eds. *Methods in Mycoplasmaology Vol 1*, London: Academic Press 1983; 431-40.
25. Razin S: DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. *Molecular and cellular Probes* 1994; 8 :490-511.
26. de Barbeyrac B, Bernet – Pogi C, Febrer f, Renaudin H, Dupon M, Bebear C: Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1993; 1: 83-9.
27. Bernet C, Garret M, de Barbeyrac B, Bebear C, Bonnet J: Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27 : 2492-5.
28. Aubert G, Pozzetto B, Gaudin OG, Hafid J, Mbida AD, Ros A: Evaluation of five commercial tests: complement fixation, microparticle, agglutination, indirect immunofluorescence, enzyme- linked immunosorbent assay and latex agglutination in comparison to immunoblotting for *Mycoplasma pneumoniae* serology. *Ann Biol Clin* 1992; 27 : 2492-5.
29. Beersma MF, Dirven K, van Dam AP, Templeton KE, Claas, Goossens H: Evulation of 12 commercial tests and the complement fixation tests for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as "gold standard". *J Clin Microbiol* 2005; 43 : 2277-85.

30. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000; 112.
31. Jacobs E: Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: A critical review of current procedures. Clin Infect Dis 1993; 1: 79-82.
32. Petitjean J, Vabret, Gouarin S, Freymuth F: Evaluation of four commercial immunoglobulin G (IgG)- and IgM-specific enzyme immunoassays for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. J Clin Microbiol 2002; 40 : 165-71.
33. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C: Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Clin Microbiol Infect 2003; 9 : 263-73.
34. Jacobs E, Bennewitz A, Bredt W: Reaction pattern of human-anti *Mycoplasma pneumoniae* antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. J Clin Microbiol 1986; 23 : 517-22.
35. Kenneth D McClatchey: Clinical laboratory medicine, Edition 2, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001: 97-120.
36. Premik M: Uvod v epidemiologijo, Medicinska fakulteta, Inštitut za socialno medicino, Ljubljana: 1998: 96-7.
37. Seggav J.S., Sedmark G.V., Krup V.: Isotypespecific antibody responses to acute *M. pneumoniae* infection, Ann Allergy Asthma Immuno 1996; 77 : 67-73
38. Samra Z., Gadba R.: Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by specific IgM antibodies using a new capture-enzyme-immunoassay, Eur. J. Epidemiol. 1993; 9 : 97-99

## Kazalo slik

**Slika 1:** Celična zgradba mikoplazem (skica)

(stran 2)

<http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/kingdoms-living-world/cyanobacteria.php>

**Slika 2:** Pleomorfne oblike mikoplazem, lahko so kokoidnih ali filamentarnih oblik, saj so brez celične stene (Bauman R: Microbiology With Diseases by Taxonomy. Second Edition, San Francisco 2007: 595)

(stran 3)

**Slika 3:** *M. pneumoniae* na površini pod elektronskim mikroskopom

(stran 3)

[http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/wojtowic\\_trav/](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/wojtowic_trav/)

**Slika 4:** Ujemanje pozitivnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG pri treh testih

(stran 37)

**Slika 5:** Ujemanje pozitivnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM pri treh testih

(stran 37)

**Slika 6:** Ujemanje pozitivnih rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles IgA pri dveh testih

(stran 38)

**Slika 7:** Ujemanje diagnostično vrednotenih rezultatov akutne okužbe z *M. pneumoniae* pri testi treh različnih proizvajalcev

(stran 39)

**Slika 8:** Ujemanje diagnostično vrednotenih rezultatov okužbe v preteklosti z *M. pneumoniae* pri testih treh različnih proizvajalcev

(stran 40)

**Slika 9:** Ujemanje diagnostično vrednotenih rezultatov za odsotnost okužbe z *M. pneumoniae* pri testih treh različnih proizvajalcev

(stran 40)

## Kazalo preglednic

**Preglednica I:** Druge okužbe, ki jih povzroča *Mycoplasma pneumoniae*  
(stran 7)

**Preglednica II:** Antibiotično zdravljenje okužb z *Mycoplasma pneumoniae*  
(stran 8)

**Preglednica III:** Interpretacija rezultatov testiranja na protitelesa proti *M. pneumoniae* razredov IgG, IgM in IgA  
(stran 22)

**Preglednica IV:** Interpretacija rezultatov testiranja na protitelesa proti *M. pneumoniae* razredov IgG, IgM in IgA  
(stran 28)

**Preglednica V:** Interpretacija rezultatov testiranja na protitelesa proti *M. pneumoniae* razredov IgG, IgM in IgA. S testom Serion smo testirali samo protitelesa razredov IgG in IgM.  
(stran 33)

**Preglednica VI:** Rezultati serološkega testa proizvajalca Serion za specifična protitelesa IgG in IgM. Specifičnih protiteles razreda IgA pri rutinskem testiranju niso izvajali.  
(stran 34)

**Preglednica VII:** Rezultati serološkega testa proizvajalca Medac za specifična protitelesa vseh treh razredov  
(stran 35)

**Preglednica VIII:** Rezultati serološkega testa proizvajalca Savyon za specifična protitelesa vseh treh razredov  
(stran 36)

**Preglednica IX:** Diagnostično vrednotenje rezultatov seroloških testov treh različnih proizvajalcev. Pri vrednotenju smo upoštevali navodila proizvajalcev. Pri testu Serion akutno okužbo opredeljuje prisotnost specifičnih IgM, pri testih Medac in Savyon pa prisotnost specifičnih IgM in/ali IgA protiteles.  
(stran 39)