

ANALIZA STANU UODPORNIECIA POPULACJI MIESZKAŃCÓW POLSKI PRZECIWKO BŁONNICY

Jarosław Walory

Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek, Warszawa

1 WPROWADZENIE

Błonica jest ostrą chorobą zakaźną wywołowaną przez maczugowca *Corynebacterium diphtheriae*. Chorobotwórczość tych drobnoustrojów związana jest z wytwarzaną toksyną, która poprzez błony śluzowe układu oddechowego przedostaje się do łożyska naczyniowego i wywołuje trwałe uszkodzenie wielu narządów (1,2). W Polsce przed wprowadzeniem szczepień, błonica była jedną z najczęściej występujących i najcięższych chorób zakaźnych wieku dziecięcego. Charakteryzowała się wysoką śmiertelnością, a około 40 % przypadków błonicy stanowiły dzieci poniżej 5 roku życia, a 70% poniżej 15 lat. W okresie, kiedy drobnoustrój występował powszechnie w środowisku większość noworodków posiadała odporność uzyskaną od matek. Po jej wygaśnięciu błonica była często pierwszą chorobą zakaźną na którą chorowały niemowlęta i małe dzieci. Odporność naturalna utrzymywała się długo, ponieważ przedłużana była poprzez stymulację krążącym w środowisku antygenem. W latach 50-tych występowało średnio około 40 000 zachorowań rocznie. Obowiązkowe szczepienia ochronne przeciwko błonicy wprowadzono w latach 1954-55, co spowodowało obniżenie częstości występowania choroby (do 1 przypadku błonicy rocznie w latach 1987/88). Spowodowało to powszechne przekonanie, że błonica jest jedną z tych chorób zakaźnych, które ze względu na wieloletnie stosowanie szczepień ochronnych są skutecznie kontrolowane. Jednak, kiedy w latach 90 doszło do wybuchu groźnej epidemii błonicy w krajach byłego Związku Radzieckiego, zaobserwowano również zwiększenie liczby zacho-

rowań w wielu krajach europejskich, Azji a nawet USA (3,4). Pierwsze zachorowanie w Polsce powiązane z epidemią w Rosji i na Ukrainie nastąpiło w 1992 roku, a w 1993 z terenu całego kraju zgłoszono 10 przypadków błonicy, co wzbudziło wówczas duże zaniepokojenie. Wszystkie przypadki błonicy obserwowano we wschodniej części kraju. Zmodyfikowano wówczas kalendarz szczepień ochronnych wprowadzając dawkę przypominającą szczepionki błonicy w postaci „Td” (tężec + błonica) dla osób w 19 roku życia oraz zalecając szczepienie „Td” lub „d” dla wszystkich osób zamieszkujących tereny graniczące z krajami objętymi epidemią. W latach następnych do dnia dzisiejszego zanotowano jednak tylko kilkadziesiąt przypadków hospitalizowanych. Mimo, iż pokrycie szczepionkowe dla błonicy, tężca i krztuśca w Polsce wynosi dla dzieci i młodzieży powyżej 95% (5), a szczepienia są realizowane od ponad 40 lat, to jednak mogą istnieć pewne luki regionalne i wiekowe. Konieczna jest zatem, jak przy realizacji każdego programu ochrony zdrowia publicznego, okresowa kontrola realizacji szczepień i monitorowanie stanu uodpornienia ludności, a ponadto stałe doskonalenie stosowanych metod diagnostycznych. Mimo, że epidemia w krajach byłego Związku Radzieckiego dobiegła już końca, to jednak stale istnieje realne zagrożenie w krajach sąsiadujących. Szacuje się, że każdego dnia nocuje tylko w samej Warszawie około 30.000 - 40.000 osób przybywających z terenów objętych epidemią. Jak wynika z raportów epidemiologicznych szczególnie narażone są tereny wzdłuż wschodniej granicy Polski, gdzie ruch tej ludności jest największy,

choć w znacznie mniejszym stopniu narażone są większe miasta, ponieważ są często celem podróży wielu obywateli byłego Związku Radzieckiego (5,6).

Odporność przeciw zachorowaniu na błonicę zależy głównie od obecności przeciwciał skierowanych przeciwko toksynie *C. diphtheriae*. Przeciwciała te należą głównie do klasy IgG, przenikają przez łożysko dając bierną odporność u niemowląt podczas pierwszych 2-4 miesięcy życia. Wytwarzanie przeciwciał przeciwbłoniczych przez organizm może być indukowane przez toksynę błoniczą produkowaną przez *C. diphtheriae* podczas choroby lub stanów nosicielstwa, jak również w wyniku przeprowadzanych szczepień toksoidem błoniczym (toksyną pozbawioną działań cytotoksycznych). Wytworzone przeciwciała w obu przypadkach są identyczne i nie można ich odróżnić dostępnymi technikami laboratoryjnymi. Poziom krążących przeciwciał błoniczych wynoszący 0,01 IU/ml (7), oznaczony testem neutralizacji na zwierzętach czy komórkach uznaje się za zabezpieczający przed zachorowaniem na błonicę. Poziom ten koreluje z testem Schicka (referencyjny test diagnostyczny na ludziach). Mimo, iż istnieje korelacja pomiędzy klinicznym działaniem ochronnym, a obecnością przeciwciał w surowicy, poziom przeciwciał zapewniający ochronę przed zachorowaniem nie jest jednoznacznie określony (8), co może być związane z dawką toksyny przekraczającą zdolność neutralizacyjną przeciwciał. Opisano przypadki, w których poziom przeciwciał powyżej 0,16 IU/ml nie zabezpieczył przed zachorowaniem (9). Ochrona przed zakażeniem, oprócz poziomu krążących swoistych immunoglobulin, zależy także od innych czynników takich jak: liczba i zjadliwość komórek bakteryjnych, stan układu odpornościowego, w tym w szczególności sprawność odporności komórkowej i obecność komórek pamięci immunologicznej (10). Wielu badaczy za poziom ochronny przyjmuje 0,1IU/ml (11,12), brak uodpornienia określa się jako poziom poniżej 0,01IU/ml, poziom ochrony niecałkowitej jako 0,01-0,1IU/ml, zabezpieczenie powyżej jednego roku 0,1-1,0IU/ml i zabezpieczenie na więcej niż pięć lat, powyżej 1,0IU/ml (13).

Do oznaczania aktywności przeciwciał błoniczych wykorzystywane są dwie ważne właściwości toksyny błoniczej. Pierwszą z nich jest zdolność do indukowania reakcji zapalnej,

a następnie martwicy skóry po podaniu śródskórnym u człowieka lub zwierzęcia. Właściwość ta wykorzystywana jest u ludzi w teście Schicka (14-16) i do oznaczania zneutralizowanych toksyną przeciwciał w testach *in vivo* na zwierzętach (17,18). Drugą właściwością jest zdolność toksyny błoniczej do blokowania syntezy białek w komórkach ssaków i ich śmierci. Właściwość ta jest wykorzystywana do oznaczania poziomu przeciwciał błoniczych w teście neutralizacji *in vitro* wykonywanym na komórkach wrażliwych na toksynę błoniczą (19-25). Ponadto innymi testami stosowanymi *in vitro* do oznaczania poziomu stężenia przeciwciał błoniczych są: test biernej hemaglutynacji (OHB) (26-34) i test immunoenzymatyczny (ELISA) (35-37). Ze względów praktycznych, etycznych i ekonomicznych najczęściej stosowane są techniki *in vitro* (38).

Diagnostyka serologiczna może być stosowana dla ustalenia obecności i poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych przede wszystkim dla potwierdzenia zakażenia w wątpliwych przypadkach oraz w badaniach przeglądowych odporności populacji. Pozwala to na wyodrębnienie grup zwiększonego ryzyka na zachorowanie, kontrolę skuteczności przeprowadzanych programów szczepień, może być także wykorzystywana w sytuacjach wyjątkowych przy stosowaniu u chorego antybiotyków lub przy trudnościach w wyizolowaniu szczepu bakteryjnego. Najbardziej wiarygodnym testem służącym do oznaczania antytoksyny błoniczej jest test *in vivo* na zwierzętach. Wyniki uzyskane w tym teście najbardziej odpowiadają stanowi uodpornienia u poszczególnych osób, jednak z wielu względów w laboratoriach testy *in vivo* zastępowane są przez testy *in vitro*. Coraz częściej stosuje się test na komórkach z równie dobrymi rezultatami, natomiast odczyn hemaglutynacji biernej stracił znaczenie na rzecz testów immunoenzymatycznych, wśród których najbardziej korelującym z testem *in vivo* jest ToBI – ELISA oraz Toksoid ELISA (39-42).

Celem pracy w pierwszym etapie było opracowanie, standaryzacja, ocena trafności diagnostycznej i przydatności wybranych testów oraz wytypowanie właściwej metody pozwalającej na szybkie, swoiste i czułe określanie poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych w surowicy. Po dokonaniu wyboru właściwej metody celem drugiego etapu była ocena stanu uodpornienia przeciwko błonicy w różnych grupach wieko-

wych w wybranych województwach i regionach Polski, wytypowanie populacji zwiększonego ryzyka zakażenia błonicą i ustalenie zaleceń dotyczących zapobiegania zachorowaniom w zależności od wieku oraz regionu zamieszkania.

2 MATERIAŁY I METODY

W celu wytypowania metody, która najlepiej nadawałaby się do przeglądowego określania poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych wystandardyzowano i sprawdzono przydatność następujących testów: testu lateksowego, immunoenzymatycznego testu Toksoid ELISA, immunoenzymatycznego testu neutralizacji toksyny błoniczej ToBI ELISA, odczynu biernej hemaglutynacji. Wobec wszystkich tych testów przeprowadzono standaryzację wewnętrzną (standard WHO) oraz zewnętrzną, porównując badane testy do testu neutralizacji toksyny błoniczej na komórkach Vero, zalecanego przez WHO (obok testu neutralizacji prowadzonego na zwierzętach) jako test referencyjny. Zdecydowano się na stosowanie jako układu odniesienia testu *in vitro* na komórkach Vero ze względów ekonomicznych i etycznych. Porównania z metodą referencyjną oraz wyboru optymalnego testu do przesiewowej diagnostyki uodpornienia populacji dokonano w oparciu o parametry statystyczne - współczynnik korelacji Pearsona (r) i międzymetodyczny współczynnik zmienności (CV) oraz cechy testów takie jak czułość i swoistość przy arbitralnie dobranych wartościach granicznych, pracochłonność, stopień komplikacji i koszty.

Badaniem objęto łącznie 4829 osób w wieku od 1 dnia do 98 roku życia. Pacjenci z chorobą nowotworową, chorobami autoimmunologicznymi, pierwotnym i wtórnym niedoborem odporności, ostrymi infekcjami oraz leczeni immunosupresyjnie byli wyłączeni z analizy. Surowice gromadzone były między sierpniem 1996 a lipcem 1998 roku.

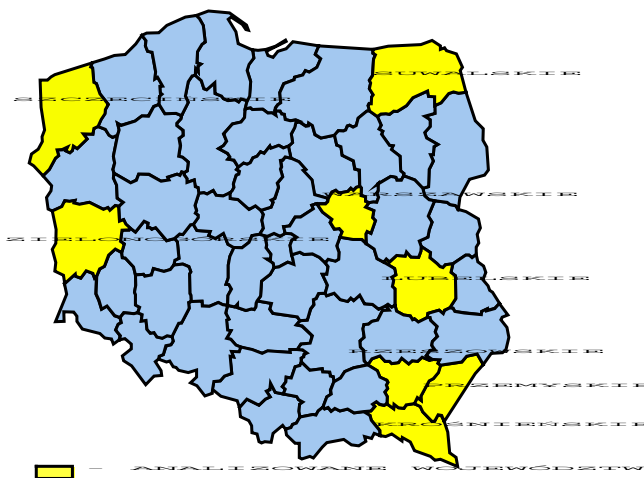
Badaniem objęto osoby z regionu północno-wschodniej Polski (województwo suwalskie), Polski centralnej (warszawskie), południowo-wschodniej (lubelskie, rzeszowskie, przemyskie, krośnieńskie), oraz zachodniej (szczecińskie, zielonogórskie) (Rysunek 1). Wybór regionów podyktowany był potrzebą określenia sytuacji

epidemiologicznej w całym kraju, nie tylko w regionach przygranicznych.

Analizę poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych klasy IgG w surowicy przeprowadzono w grupach wiekowych ustanowionych arbitralnie, uwzględniających okresy szczepień przeciwko błonicy wskazane w obowiązkowym Kalendarzu Szczepień Ochronnych. Przyjęto następujące przedziały wiekowe: od 1 do 30 dnia życia - 0 miesięcy (0 m), od 31 do 60 dnia życia - 1 miesiąc (1 m), od skończonych 2 miesięcy do 7 miesiąca życia - (2-6 m), i analogicznie 7-11 m, 1-5 lat, 6-13 lat, 14-18 lat, 19-24 lat, 25-29 lat, 30-34 lat, 35-39 lat, 40-44 lat, 45-49 lat, 50-54 lat, 55-59 lat, 60-64 lat, >65 lat.

W niniejszej pracy przyjęto następujący podział zakresów wartości poziomu przeciwciał: poniżej 0,1 IU/ml - brak zabezpieczenia przed zachorowaniem, od 0,1 IU/ml do 1,0 IU/ml - podstawowe zabezpieczenie, dające uodpornienie na okres do około pięciu lat, wartości powyżej 1,0 IU/ml uodpornienie długoterminowe na okres powyżej pięciu lat.

Jako grupę ryzyka zakażenia *Corynebacterium diphtheriae* przyjęto osoby należące do tych przedziałów wiekowych, w których odsetek osób nieuodpornionych (a więc posiadających poziom przeciwciał przeciwbłoniczych nie przekraczający 0,1 IU/ml) wynosił ponad 30%.



Rys. 1. Terytorialne pochodzenie materiału badawczego według podziału administracyjnego obowiązującego do 1 stycznia 1999 roku.

Zwięzłego przedstawienia ogólnej charakterystyki istotnych właściwości badanych zbiorowości uzyskano poprzez określenie parametrów statystycznych (43,44,45). Parametry te tak cha-

rakteryzują zbiorowość, że porównanie różnych zbiorowości statystycznych można sprowadzić do ich porównań. Podstawowe zadania tych parametrów to: określenie przeciętnego rozmiaru i rozmieszczenia wartości zmiennych (obliczenie miar położenia), określenie granic obszaru zmienności wartości zmiennych (obliczenie miar zmienności), określenie skupienia i spłaszczenia (w stosunku do krzywej normalnej) oraz stopnia zmiany od idealnej symetrii (obliczenie miar asymetrii i koncentracji).

Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi zbiorowościami określano stosując test t – Studenta dla zmiennych niepowiązanych. Do badania zależności pomiędzy zmiennymi jakościowymi (porównanie liczby osób nieuodpornionych w poszczególnych regionach) stosowano test *chi* kwadrat.

Wszystkie obliczenia statystyczne przeprowadzono przy 95 % poziomie ufności ($p \leq 0,05$).

Siła i kierunek zależności między zbiorami zostały opisane poprzez współczynnik korelacji Pearsona. Jako miary zmienności przyjęto międzygrupowe współczynniki zmienności.

Przyjęto następującą skalę dla oceny współczynnika korelacji (*r*):

$r = 0$ zmiennie nie są skorelowane

$0 < r < 0,1$ korelacja nikła

$0,1 \leq r \leq 0,3$ korelacja słaba

$0,3 \leq r \leq 0,5$ korelacja przeciętna

$0,5 \leq r \leq 0,7$ korelacja wysoka

$0,7 \leq r \leq 0,9$ korelacja bardzo wysoka

$0,9 \leq r < 1$ korelacja prawie pełna

Mechanizm powiązań między zmiennymi przedstawiono w postaci obliczonych równań regresji. Funkcja regresji to analityczny wyraz przyporządkowania średnich wartości zmiennej zależnej konkretnym wartościom zmiennej niezależnej ($y = a x + b$; wyrażenie *a* określa o ile jednostek przeciętnie wzrośnie (lub zmaleje) wartość zmiennej zależnej, gdy wartość zmiennej niezależnej wzrośnie o 1 jednostkę).

Ocena trafności testu diagnostycznego została przedstawiona w następujący sposób (tabela 1):

–Swoistość (*specificity*) - zdolność wykrywania osobników rzeczywiście zdrowych (bez danej cechy). Test swoisty powinien dawać małą liczbę osób z wynikami fałszywie dodatnimi. W naszym przypadku swoistość testu określa nam procentową wykrywalność osób wystarczająco uodpornionych, a więc z mianem przeciwciał przeciwbłoniczych powyżej 0,1 IU/ml.

–Czułość (*sensitivity*) - prawidłowe rozpoznanie przypadków (wykrywalność). Zdolność wykrywania wszystkich osobników rzeczywiście chorych (posiadających daną cechę). Test czuły powinien dawać małą liczbę osób z wynikami fałszywie ujemnymi.

W naszym przypadku czułość testu określa nam procentową wykrywalność osobników niewystarczająco uodpornioną, tak więc osób posiadających miano przeciwciał przeciwbłoniczych poniżej poziomu 0,1 IU/ml.

W przypadku standaryzacji metod diagnostycznych ustalano czułość i swoistość testów dla różnych arbitralnie wybranych poziomów granicznych. Generalnie dla testu Toksoid ELISA w całej analizie przeglądowej przyjęto poziom 0,1 IU/ml.

Tabela. 1. Wzór określania trafności diagnostycznej analizowanych metod.

		Wyniki testu referencyjnego		Suma
		Wynik dodatni	Wynik ujemny	
Wyniki testu przesiewowego	Wyniki dodatnie	a	b	a + b
	Wyniki ujemne	c	d	c + d
Suma		a + c	b + d	N

a - wyniki prawdziwie dodatnie

b - wyniki fałszywie dodatnie

c -wyniki fałszywie ujemne

d - wyniki prawdziwie ujemne

Dwie miary oceny trafności testu wyliczono w/g wzorów:

$$\text{Czułość} = (a/a + c) \times 100\%$$

$$\text{Swoistość} = (d/b + d) \times 100\%$$

W pracy do wszystkich obliczeń statystycznych jak i grafiki wykorzystano programy komputerowe: *STATISTICA* for Windows 95 PL (StatSoft Polska, Kraków), Excel 7,0 (Microsoft).

3 WYNIKI

Przy porównaniu z metodą referencyjną współczynnik korelacji Pearsona o najwyższej wartości $r = 0,93$, $p < 0,0001$ (korelacja prawie pełna) uzyskano dla immunoenzymatycznego testu neutralizacji toksyny błoniczej (ToBI ELISA). Stwierdzono także wysoką czułość oraz swo-

istość tego testu wynoszącą odpowiednio 95,9% i 90,2%.

Test lateksowy uzyskał wysoką korelację z testem referencyjnym $r = 0,74$ ($p < 0,0001$). W teście tym uzyskano małą swoistość wynoszącą 76,4%. Z praktycznego punktu widzenia jest to metoda, która kwalifikuje do doszczepienia 23,5% nietrafnie zidentyfikowanych osób. Jednakże nie ma ryzyka niezdiagnozowania osoby nieuodpornionej (czułość 100%).

Wykazano, że odczyn hemaglutynacji biernej posiada słabą korelację $r = 0,34$ ($p < 0,0001$) z testem Toksoid ELISA (wykorzystanym ze względów technicznych zamiast testu referencyjnego) oraz czułość wynoszącą tylko 15% (swoistość 85,6%).

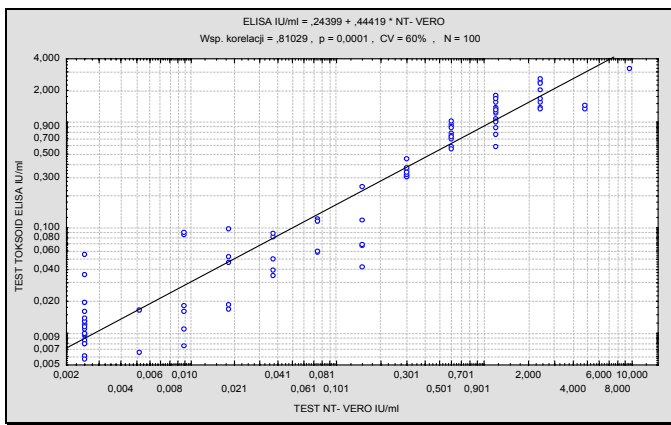
Wysoki współczynnik korelacji z testem referencyjnym uzyskano dla testu Toksoid ELISA

($r = 0,81$; $p < 0,0001$, korelacja bardzo wysoka). Ocena trafności diagnostycznej testu immunoenzymatycznego Toksoid ELISA względem testu referencyjnego przy punkcie krytycznym 0,1 IU/ml wyrażona przez czułość testu wynosiła 94%. Swoistość testu wynosiła również 94%.

Na podstawie porównania parametrów statystycznych takich jak współczynnik korelacji Pearsona, międzymetodyczny współczynnik zmienności, czułość i swoistość testów przy arbitralnie dobranej wartości granicznej 0,1 IU/ml oraz biorąc pod uwagę takie czynniki jak czas wykonania oznaczenia, koszty, złożoność i dostępność metody jako metodę najlepiej spełniającą wymagania badań przeglądowych wybrano test *Toksoid ELISA* (Tab. 2, Rys. 2).

Tabela 2. Zbiorcze zestawienie porównawcze parametrów statystycznych metod pomiaru poziomu przeciwciał błonnych: testu lateksowego, immunoenzymatycznego Toksoid ELISA, immunoenzymatycznego testu neutralizacji toksyny ToBI ELISA względem referencyjnego testu neutralizacji toksyny na komórkach Vero.

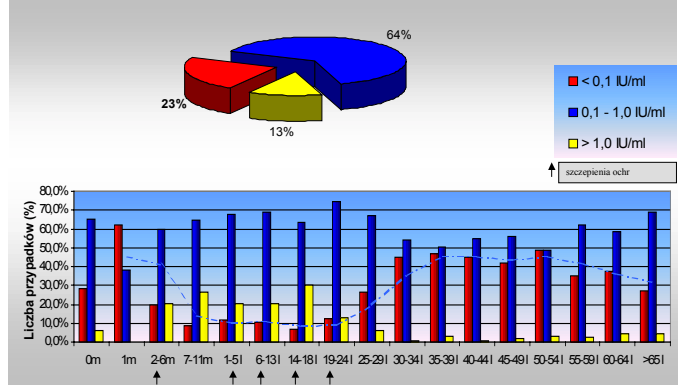
Parametry statystyczne		TEST			
		LATEKS	Toksoid ELISA	ToBI ELISA	NT VERO
Liczebność (N)		100	100	100	100
Miary położenia	Średnia arytmetyczna	0,49	0,54	0,68	0,68
	Błąd śr. arytm.	0,09	0,07	0,13	0,12
	P. ufn. - 95%	0,31	0,40	0,42	0,42
	P. ufn. + 95%	0,67	0,68	0,94	0,93
	Mediana/wartość środkowa/	0,03	0,11	0,07	0,15
Miary zmienności	Rozstęp	4,80	3,20	9,59	9,59
	x - min.	0,009	0,005	0,002	0,002
	x - maks.	4,80	3,21	9,6	9,6
	Odchylenie standardowe	0,91	0,70	1,3	1,29
	Wariancja	0,83	0,50	1,7	1,67
	Wewnątrz- grupowy wsp. zmienności	184 %	129,9 %	190 %	190 %
Miary asymetrii	Skośność /wsp. asymetrii /	2,76	1,43	4,06	4,16
Miary koncentracji/skupienia/	Kurtoza/wsp. koncentracji/	8,91	1,67	22,59	23,63
Miary korelacji względem TN VERO	Wsp. korelacji (r)	$r = 0,74$ $p = 0,00001$	$r = 0,81$ $p = 0,00001$	$r = 0,93$ $p = 0,00001$	$r = 1$ $p = 0,00001$
	Międzygrupowy wsp. Zmienności (CV)	CV= 6%	CV= 60%	CV = 0 %	----
Ocena trafności testu względem TN VERO	Czułość	100 %	93,87 %	95,91%	100 %
	Swoistość	76,47 %	94,11 %	90,19%	100 %



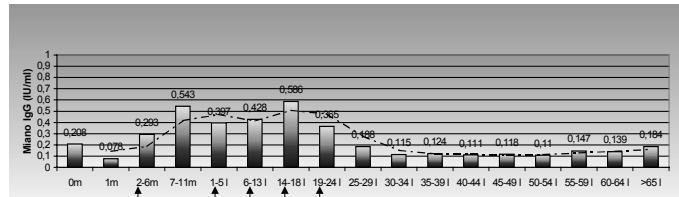
Rys. 2. Porównanie testu Toksoid ELISA z referencyjnym testem NT – Vero.

Ze względu na charakterystyczny rozkład krzywej korelacji wybranego testu Toksoid ELISA z testem referencyjnym za poziom graniczny przeciwciał pozwalający w większości przypadków na całkowitą neutralizację toksyny błoniczej przyjęto poziom 0,1 IU/ml. Stwierdzono, że powyżej tej wartości współczynnik korelacji wyników odnośnie do testu referencyjnego wynosi $r = 0,74$ przy $p < 0,0001$, międzygrupowy współczynnik zmienności (CV) wyniósł 52,9%. Poniżej wartości 0,1 IU/ml uzyskano korelację przeciętną, $r = 0,5$ przy $p = 0,0002$, CV osiągnął wartość 91,8%.

Stwierdzono, że u 23% populacji mieszkańców Polski poziom przeciwciał przeciwbłoniczych znajduje się poniżej progu zabezpieczenia przed zachorowaniem, 64% stanowiły osoby o podstawowym zabezpieczeniu, a 13% osoby o wysokim poziomie zabezpieczenia. Grupę ryzyka zakażenia *C. diphtheriae* stanowiły osoby w przedziale od 30 do 64 roku życia. W przedziale tym 43% nie posiadało zabezpieczającego poziomu przeciwciał (Tabela 3, Rys. 3). Dynamikę rozkładu poziomów przeciwciał przeciwbłoniczych w poszczególnych przedziałach wiekowych przedstawiono na rys. 4.



Rys. 3. Procentowy rozkład poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych w populacji wszystkich badanych regionów.



Rys. 4. Średnie geometryczne mian przeciwciał przeciwbłoniczych w całej populacji regionów / \uparrow - szczepienia ochronne /.

Po szczegółowej analizie wytypowanych regionów okazało się, że znacznie niższy poziom uodpornienia populacji występuje w regionie zachodnim a następnie przygranicznym regionie południowo-wschodnim (Tabela 3-4). Średnia arytmetyczna mian przeciwciał przeciwbłoniczych w tych regionach wynosi odpowiednio 0,40 i 0,45 IU/ml. Najwyższa średnia poziomu przeciwciał występuje w regionie centralnym, wynosi ona 0,59 IU/ml. Spośród analizowanych województw istotnie niższy średni poziom przeciwciał przeciwbłoniczych wykazano w województwie szczecińskim, wynosi on 0,34 IU/ml.

Najwyższy odsetek osób posiadających miano przeciwciał przeciwbłoniczych poniżej 0,1 IU/ml (30%) stwierdzono u mieszkańców przygranicznego regionu południowo-wschodniej Polski. Jest to zbieżne z największą liczbą przypadków zachorowań na błonicę w ostatnich latach obserwowaną właśnie w tym regionie. Wysoki odsetek osób nieuodpornionych stwierdzono również w regionie zachodnim (25%). Niski zaś wykazano w nadgranicznym regionie południowo-wschodnim i północno-wschodnim (19%) oraz centralnym (20%).

Na podstawie analizy grup ryzyka w badanych regionach wykazano, że najniższy średni poziom przeciwciał przeciwbłoniczych występuje w regionie północno-wschodniej Pol-

ski (0,16 IU/ml). Znamienne najwyższy odsetek osób nieuodpornionych w analizowanych grupach ryzyka stwierdzono w przygranicznym regionie południowo-wschodniej Polski (47%). Na podstawie analizy grup ryzyka w badanych województwach wykazano najwyższy odsetek osób nieuodpornionych w województwach przemyskim (50%) i krośnieńskim (48%), najniższy w województwie szczecińskim (33%).

W populacji osób dorosłych powyżej 19 roku życia najniższą średnią arytmetyczną poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych stwierdzono w przygranicznym regionie południowo-wschodnim (0,26 IU/ml) oraz regionie zachodnim (0,27 IU/ml). Wysoki odsetek dorosłych osób nieuodpornionych wykazano w trzech regionach: przygranicznym (42%), centralnym (36%) oraz zachodnim (30%). Rozpatrując analizowane obszary odpowiadające dawnemu podziałowi administracyjnemu największy odsetek dorosłych osób nieuodpornionych wykazano w województwach: przemyskim (44%), krośnieńskim (39%), warszawskim (36%) oraz zielonogórskim (31%). Znamienne najwyższy średni poziom przeciwciał (0,41 IU/ml) jak i najniższy odsetek osób nieuodpornionych (24%) stwierdzono w nadgranicznym regionie południowo-wschodniej Polski.

Tabela 3. Procentowy rozkład uodpornienia oraz charakterystyka statystyczna poziomu przeciwciał przeciwbłoniczych w poszczególnych przedziałach wiekowych populacji wszystkich regionów łącznie.

Przedział wiekowy	< 2m. życia	2m. – 18 r. życia	> 19 r. życia	Łącznie	Grupa ryzyka*
Liczba osób < 0,1 IU/ml (%)	109 (41)	228 (11)	787 (32)	1124 (23)	546 (43)
Liczba osób 0,1-1,0 IU/ml (%)	146 (55)	1404 (66)	1528 (63)	3078 (64)	695 (55)
Liczba osób > 1,0 IU/ml (%)	10 (4)	490 (23)	127 (5)	627 (13)	28 (2)
Średnia arytmetyczna	0,26	0,71	0,31	0,48	0,22
Średnia geometryczna	0,14	0,44	0,17	0,25	0,12
Mediana	0,16	0,56	0,18	0,29	0,11
Odchylenie standardowe	0,28	0,74	0,37	0,60	0,3
Minimum	0,011	0,005	0,003	0,003	0,005
Maksimum	1,55	8,89	5,32	8,89	5,13
Liczebność	265	2122	2442	4829	1269

* - suma osób w przedziałach wiekowych, w których odsetek nieuodpornionych przekracza 30%.

Tabela 4. Analiza różnic statystycznych pomiędzy grupami wiekowymi.

	2m. – 18 rok życia	> 19 roku życia	Gr. ryzyka
< 2 m. życia	p < 0,0000001	p = 0,017182	p = 0,01665
2m. – 18 rok życia		p < 0,0000001	p < 0,0000001
> 19 roku życia			p < 0,0000001

4 OMÓWIENIE WYNIKÓW

Liczne badania przeprowadzone w ostatnich latach w wielu krajach europejskich potwierdzają obserwacje z terenu Polski. W 1995 roku (46) określono poziom przeciwciał w populacji norweskiej oraz populacji rosyjskiej metodą neutralizacji toksyny błoniczej na komórkach Vero. Wśród populacji rosyjskiej u 44% badanych stwierdzono poziom przeciwciał poniżej granicy zabezpieczenia (<0,1IU/ml), podobnie w populacji norweskiej stwierdzono u 40% osób poziom przeciwciał poniżej 0,1IU/ml. Odsetek osób uodpornionych w grupie wiekowej od 30 do 60 roku życia w Norwegii był wyższy niż

stwierdzony w Rosji. Stan uodpornienia zarówno populacji norweskiej jak i rosyjskiej wydaje się być dwukrotnie niższy niż populacji polskiej. Ze względu na odsetek osób nieuodpornionych oba te kraje posiadają wciąż jeszcze utrzymujące się bardzo duże ryzyko wystąpienia epidemii błonicy.

Również w 1995 roku przeprowadzono badania w północnych Niemczech (47) stosując wystandardyzowaną metodę ELISA. U 24% populacji stwierdzono brak uodpornienia (miano $< 0,1 \text{ IU/ml}$), 69% wykazywało podstawowy poziom zabezpieczenia ($0,1-1,0 \text{ IU/ml}$), a tylko 7% posiadało wysoki poziom zabezpieczenia ($\geq 1,0 \text{ IU/ml}$). Najlepiej zabezpieczoną grupę stanowiły dzieci od 1 do 10 lat. Od 11 roku życia w kolejnych przedziałach wiekowych stwierdzono stopniowo zmniejszający się odsetek osób zabezpieczonych. Żadna z osób powyżej 50 roku życia nie posiadała poziomu przeciwciał przeciwbłonicych powyżej wartości $1,0 \text{ IU/ml}$. Poziom przeciwciał osób powyżej 50 roku życia nie różnił się od występującego u noworodków. W porównaniu z polskim schematem szczepień niemiecki zawiera mniejszą liczbę dawek, przede wszystkim nie uwzględnia dawki przypominającej w 19 roku życia. Mimo, że obserwuje się zbieżność w odsetkach osób niezabezpieczonych obu populacji (w Polsce 23% $< 0,1 \text{ IU/ml}$), to jednak odsetek osób uodpornionych długoterminowo w populacji polskiej jest dwukrotnie wyższy. Ponadto, odsetek osób zabezpieczonych w Polsce wykazuje wyraźny spadek dopiero po 25 roku życia, w porównaniu z populacją niemiecką (po 11 roku życia). W 1997 roku (48) wykorzystując test neutralizacji toksyny błoniczej na komórkach Vero wykazano u 46% dorosłej niemieckiej populacji pomiędzy 19 a 54 rokiem życia całkowity brak uodpornienia przeciw błonicy. Należy podkreślić, że w badaniach własnych w polskiej populacji u osób powyżej 19 roku życia odsetek niezabezpieczonych wynosi 32%.

Podobne dane dotyczące uodpornienia przeciwko błonicy uzyskano również we Francji w 1997 r. w badaniach przeprowadzonych przez Ballereau i wsp. (49). Wykazano, że w grupie 1004 osób ponad połowa populacji (53,6%) posiadała miano poniżej $0,1 \text{ IU/ml}$. Grupę ryzyka określono w przedziale wiekowym od 40 do 65 lat, gdzie 54% stanowiły osoby niezabezpieczone. U osób w podeszłym wieku (> 65 rok życia) osoby niezabezpieczone stanowiły 67%.

Badania przeprowadzone testem immunoenzymatycznym ELISA we Włoszech wykazały, że w 1997 roku tylko 23% spośród badanych osób posiadało miano powyżej $0,1 \text{ IU/ml}$ (50).

Badania stanu uodpornienia przeciwko błonicy w Danii przeprowadzone w 1988 r. (51) wykazały dwie grupy ryzyka. Pierwsza obejmowała kobiety w wieku 30-39 lat życia (brak uodpornienia u 68% badanych), druga osoby pomiędzy 60 a 69 rokiem życia, w której brak uodpornienia stwierdzono u 36% osób. Wyższy odsetek nieuodpornionych kobiet w stosunku do mężczyzn spowodowany jest prawdopodobnie prowadzonymi w Danii szczepieniami u dorosłych przeprowadzanymi podczas odbywania służby wojskowej.

W Szwecji z powodu braku zachorowań na błonicę w ramach zmian w kalendarzu szczepień od roku 1979 zastosowano skrócony schemat szczepień. W chwili obecnej większość populacji szwedzkiej wykazuje niski stan uodpornienia. Odsetek osób nieuodpornionych znacząco wzrasta już w populacji dzieci w wieku powyżej 10 lat osiągając odsetek 48% (52,53).

Próby porównania sytuacji w różnych krajach europejskich, mimo iż mają charakter orientacyjny, pozwalają na sformułowanie ogólnego wniosku, że w większości krajów w populacji osób dorosłych obserwujemy niezadowalający stan uodpornienia przeciwko błonicy. W minionych latach programy szczepień ochronnych skoncentrowane były przede wszystkim na populacji dziecięcej, ponieważ błonica była jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych wieku dziecięcego. Przypadki błonicy u osób dorosłych występowały sporadycznie, ponieważ dorośli nabywali odporność drogą naturalną. Powszechne szczepienia ochronne wyeliminowały możliwość nabycia odporności tą drogą, a objęcie immunizacją tylko populacji dzieci i młodzieży doprowadziło do powstania nowych grup osób narażonych na zakażenie, przede wszystkim dorosłych, u których poziom przeciwciał ochronnych obniża się z wiekiem. Poziom uodpornienia przeciwko błonicy osób dorosłych w naszym kraju nie odbiega znacząco od tego, który obserwujemy w państwach Europy Zachodniej. Stan uodpornienia przeciwko błonicy populacji dorosłych znajduje się na niskim poziomie, który stwarza realne zagrożenie epidemiczne, zwłaszcza że częstość przypadków zakażenia błonicą w niektórych krajach europejskich utrzymuje się na stałym poziomie.

W wielu krajach, na wniosek epidemiologów zmodyfikowano kalendarz szczepień, wprowadzając dodatkowe dawki przypominające dla osób dorosłych.

Aktualnie w Polsce obowiązkowym szczepieniom ochronnym przeciw błonicy podlega grupa osób do 19 roku życia, w której wskaźnik realizacji szczepień jest wysoki. Na podstawie uzyskanych wyników, należy rozważyć rozszerzenie zakresu szczepień przypominających u wszystkich dorosłych powyżej 30 roku życia na obszarze całego kraju.

5 WNIOSKI:

Test Toksoid ELISA spełnia wymagania testu diagnostycznego, który mógłby być powszechnie stosowany w placówkach zajmujących się zagadnieniem uodpornienia przeciwko błonicy. W teście tym za graniczny poziom uodpornienia należy przyjąć wartość 0,1 IU/ml, wynikającą z charakterystycznego rozkładu korelacji z testem referencyjnym.

Największy odsetek osób niezabezpieczonych oraz najniższy średni poziom przeciwciał stwierdzono w województwach należących do przygranicznego regionu południowo-wschodniego i regionu zachodniego.

Wśród osób powyżej 19 roku życia u 63% stwierdzono podstawowy poziom zabezpieczający wymagający podania w ciągu 1-5 lat dawki przypominającej szczepienia.

Ze względu na niski poziom uodpornienia grupę największego ryzyka zakażenia błonicy w badanych regionach stanowią osoby w wieku od 30 do 64 roku życia.

Proponuje się sukcesywne szczepienie wszystkich osób osiagających 30 rok życia oraz następnie ich doszczepianie w odstępach co 10 lat szczepionką Td.

Podziękowania: Badanie to było częściowo finansowane przez KBN (projekt 4PO5A 029 16). Dziękujemy regionalnym współpracownikom: Chudnicka A., Gedrys-Kalemba S., Golec K., Opania A., Pilarska M., Prosiecki R., Rudewicz-Kowalska M., Skowronek B, bez których udziału niniejszy projekt by nie powstał.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Brzozowski R. *Vademecum Diagnostyki i Terapii*. Wyd. Lek. PZWL, 1993.
- 2) Mandell GL, Bennett JE, Dolin R: *Principles and Practice of Infectious diseases*. 4ed. Gram-positive bacilli. MacGregor RR: *Corynebacterium diphtheriae*, 1865-1872, 1995.
- 3) Galazka A.M, Robertson S.E. Diphtheria: changing patterns in the developing world and the industrialized world. *Eur J Epidemiol* 11: 107-117, 1995.
- 4) Hardy IRB, Dittmann S, Sutter RW. Current situation and control strategies for resurgence of diphtheria in newly independent states of the Soviet Union. *Lancet* 347: 1739-1744, 1996.
- 5) *Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce. Rok 1992-1998*. MZiOS. Departament Zdrowia Publicznego, PZH. Warszawa 1993-1999.
- 6) Tomaszunas-Błaszczak J.: Błonica w Polsce. *Przegl. Epid.* 1995, 1/2:203.
- 7) Jorn Lyng: Toxoids as international reference materials defining LF-units for diphtheria and tetanus toxoids. Report WHO, Geneva, 11-19 october 1988.
- 8) Ipsen J.: Circulating antitoxin at the onset of diphtheria in 425 patients. *Journal of Immunology* 54: 325-347, 1946.
- 9) Bjorkholm B, et al. Antitoxin antibody levels and the outcome of illness during outbreak of diphtheria among alcoholics. *Scand J Infect Dis* 18: 235-239, 1986.
- 10) Christenson B, Bottiger M. Serological immunity to diphtheria in Sweden in 1978 and 1984. *Scand J Infect Dis* 18: 227-233, 1986.
- 11) Cellesi C, et al. Immunity to diphtheria in a sample of adult population from central Italy. *Vaccine* 7: 417-420, 1989.
- 12) Galazka A, Abgarowicz A. Assays of diphtheria and tetanus antibodies by the passive haemagglutination method. *Epidemiol Rev* 21: 237-252, 1967.
- 13) Klouche M., Luhmann D., i Kirchner H.: Low Prevalance of Diphtheria Antitoxin in Children and Adults in Northern Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14: 682-685, 1995.
- 14) Vahlquist B: Response of infants to diphtheria immunisation. *Lancet* 1:16-18,1949.
- 15) Papadatos C, Papavangelou G, Koukou D: Diphtheria antitoxin levels and the Schick reaction in mothers and their newborns. *Acta Paediatr Scand* 172 (suppl): 181-185, 1967.
- 16) Wright PG, Clark WM: Schick reactions in recently confined women and their infants. *Br Med J* 2:146-148,1944.
- 17) Jensen C: Die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherietoxin und Antitoxin, Copenhagen, 1933.
- 18) Glenny AT, Liewellyn-Jones M: The intracutaneous method of testing diphtheria toxin and antitoxin. *J Path Bacteriol* 34: 143-156, 1931.
- 19) Miyamura K, et al. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titers using Vero cell. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J Biol Stand* 2: 189-201, 1974.
- 20) Miyamura K, et al. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titers using VERO cells. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for seroepidemiological studies. *J Biol Stand* 2:203-209, 1974.
- 21) BBL: *BBL Manual of Products and Laboratory Procedures* (5th ed.). Cockeysville MD, Becton Dickinson Microbiology Systems, 1973.

- 22) Palmer SR, Balfour AH, Jephcott AE. Immunization of adults during outbreak of diphtheria. *Br Med J* 286:624-626,1983.
- 23) Kreeftenberg JG, et al. An investigation of a mouse model to estimate the potency of diphtheria component in vaccines. *J Biol Stand* 13: 229-234, 1985.
- 24) Kjeldsen K., Simonsen O., Heron I.: Immunity against diphtheria and tetanus in the age group 30-70 years. *Scand J Infect Dis*, 20(2): 177-85, 1988.
- 25) Kriz B, et al. Determination of diphtheria antitoxin in guinea-pig sera by the Jensen and tissue-culture methods. *J Biol Stand* 2: 289-295, 1974.
- 26) Allerdist H, Ehrengut-Lange J. Serokonversion nach Diphtherieschutzimpfung bei Jugendlichen und Erwachsenen. Eine Studie am Hamburger Krankenhauspersonal. *Dtsch Med Wochenschr* 107: 1755-1760, 1982.
- 27) Crossley K, et al. Tetanus and diphtheria immunity in urban Minnesota adults. *JAMA* 242: 2298-2300, 1979.
- 28) Fulthorpe A. Multiple diphtheria antigen-antibody systems by passive haemagglutination techniques. *Immunology* 5: 30-45, 1962.
- 29) Galazka A, Abgarowicz A. Assays of diphtheria and tetanus antibodies by the passive haemagglutination method. *Epidemiol Rev* 21: 237-252, 1967.
- 30) Galazka A., Kardymowicz B. Immunity against diphtheria in adults in Poland. *Epidemiol Infect* 103: 287-293, 1989.
- 31) Gałazka A, Sporzyńska Z: Odczyn biernej hemaglutynacji. *Wyd Met PZH, Warszawa* 1975.
- 32) Koblin BA, Townsend TR. Immunity to diphtheria and tetanus in inner-city women of childbearing age. *Am J Public Health* 79: 1297, 1989.
- 33) Millian SJ, et al. A serologic survey of tetanus and diphtheria immunity in New York City. *Arch Environ Health* 15: 776-781, 1967.
- 34) Thorley JD, et al. Passive transfer of antibodies of maternal origin from blood to cerebrospinal fluid in infants. *Lancet* 1:651-653,1975.
- 35) Comargo ME, et al. Immunoenzymatic assay of antidiphtheric toxin antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 20: 772-774, 1984.
- 36) Melville-Smith M, Balfour A. Estimation of *Corynebacterium diphtheriae* anti-toxin in human sera: a comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with the toxin neutralization test. *J Med Microbiol* 25: 279-283, 1988.
- 37) Knight PA, Tilleray J, Queminet J. Studies on the correlation of range of immunoassays for diphtheria antitoxin with the guinea-pig intradermal test. *Dev Biol Stand* 64: 25-32, 1986.
- 38) Galazka AM: The Immunological Basis for Immunization. WHO/EPI/Geneva/12, 1993.
- 39) Hendriksen C.F.M., v. d. Gun J.,W., Kreeftenberg J.G.: The use of the Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of the diphtheria component of vaccines. *J. Biol. Stand.* 17, 241-247, 1989.
- 40) Hendriksen C.F.M., v. d. Gun J.,W.,Nagel J., Kreeftenberg J.G.: The toxin binding inhibition test as a reliable in vitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J. of Biol. Stand.*, 16, 287-297, 1988.
- 41) Hendriksen C.F.M., van der Gun J.,W., Kreeftenberg J.G.: Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the *in vitro* Toxin-Binding Inhibition (ToBI) test. *J. Biol. Stand.*, 17, 191-200,1989.
- 42) Laboratory methods for the potency of diphtheria (D), tetanus (T), pertussis (P) and combined vaccines. WHO. BLG/92,1.
- 43) Pawlowski F.: Elementy statystyki dla lekarzy. PZWL, Warszawa 1982.
- 44) Stanisław A.: Przystępny kurs statystyki w oparciu o program *STATISTICA* PL. Na przykładach z medycyny. StatSoft Polska Sp. z o. o. Kraków 1988.
- 45) Zgirski A., Gondko R.: Obliczenia biochemiczne. PWN, Warszawa 1975.
- 46) Jenum P.A., Skogen V., Danilova E., Esklid A., Sjurson H.: Immunity to Diphtheria in Northern Norway and Northwestern Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14: 794-798, 1995.
- 47) Klouche M., Luhmann D., i Kirchner H.: Low Prewalence of Diphtheria Antitoxin in Children and Adults in Northern Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14: 682-685, 1995.
- 48) Hasselhorn H.M., Nubling M., Tiller F.W., Hofmann F.: Diphtheria booster immunization for adults. *Dtsch Med. Wochenschr.* Mar 7,122 (10): 281-6, 1997.
- 49) Ballereau F., Schrive I., Fisch A., Speich M., Laurichesse H., Tournade S., Rey M.: A multicentre serosurvey on diphtheria immunity in a French population of 1004 subjects. *Eur. J. Epidemiol.* 14(5): 499-503, 1998.
- 50) Gasparini R., Pozzi T., Fragapane E., Severini R., Cellesi C., Fabrizi P., Provvedi A, Bergamini M.: Immunity to diphtheria in Siena. *Epidemiol Infect* 119(2): 203-8, 1997.
- 51) Kjeldsen K., Simonsen O., Heron I.: Immunity against diphtheria and tetanus in the age group 30-70 years. *Scand J Infect Dis*, 20(2): 177-85, 1988.
- 52) Bjorkholm B., Granstrom M., Taranger J., Wahl M., Hagberg L.: Influence of high titers of maternal antibody on serologic response of infants to diphtheria vaccination at three, five and twelve months of age. *Pediatr Infect Dis J*, Oct 14(10): 846-50, 1995.
- 53) Mark A., Christenson B., Strandell A., Wickbom B., Bottiger M.: Immunity and immunization of children against diphtheria in Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Mar 8(3), 214-219, 1989.