

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca GORNIK

**OVREDNOTENJE METODE PCR V REALNEM ČASU  
ZA DOKAZ DNA LEGIONELE V SERUMSKIH  
VZORCIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca GORNIK

**OVREDNOTENJE METODE PCR V REALNEM ČASU ZA DOKAZ  
DNA LEGIONELE V SERUMSKIH VZORCIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EVALUATION OF REAL-TIME PCR METHOD FOR DETECTION  
OF LEGIONELLA DNA IN SERUM SAMPLES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije dodiplomskega študija mikrobiologije in na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol., ter za recenzentko prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Mentorica: doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol.

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Darja KEŠE, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Gornik

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 579.61:616-078:616.24-002-008.87:577.2.083(043)=163.6  
KG medicinska mikrobiologija/legionela/*Legionella pneumophila*/diagnostične metode/serum/urin/molekularne tehnike/PCR v realnem času  
AV GORNIK, Mojca  
SA KEŠE, Darja (mentorica)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2011  
IN OVREDNOTENJE METODE PCR V REALNEM ČASU ZA DOKAZ DNA LEGIONELE V SERUMSKIH VZORCIH  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 65 str., 14 pregl., 10 sl., 76 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Bakterije rodu *Legionella* povzročajo legionarsko bolezni, tj. težko obliko pljučnice, ki jo lahko spremlja prizadetost drugih organskih sistemov. Hitra postavitev diagnoze legionelne pljučnice je ključnega pomena za ustrezno zdravljenje, vendar jo otežujejo nespecifične klinične značilnosti in pomankljivosti razpoložljivih diagnostičnih testov. PCR predstavlja obetajočo metodo za dokazovanje DNA legionele v vzorcih seruma in urina. Namen naloge je bil oceniti primernost uporabe metode PCR v realnem času za dokaz DNA legionele v serumskih vzorcih. Pregledali smo 70 serumskih vzorcev 56 bolnikov z legionelozo. DNA smo sočasno izolirali z ročno (QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen) in avtomatizirano metodo (Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Roche Applied Science). PCR v realnem času smo izvedli v aparaturi LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science) in pri tem pomnoževali del specifične 23S-5S medgenske regije (*Legionella* species r-gene Primers/Probe mix, Argene Biosoft). DNA legionele smo dokazali v serumu 30,4 % bolnikov z legionelozo in v 24,3 % vseh analiziranih serumskih vzorcev. Pri testiranju prvih odvzetih serumskih vzorcev s PCR smo dobili več pozitivnih rezultatov (30,8 %) kot pri testiranju drugih odvzetih vzorcev (15,8 %). Največ pozitivnih rezultatov PCR smo dobili med bolniki, ki so bili testirani na prisotnost DNA legionele v kužnini iz dihal (57,1 %), ter med bolniki z močno pozitivnim rezultatom testiranja prisotnosti topnega antiga legionele v urinu (46,7 %). Kljub številnim prednostim se je avtomatska metoda izolacije DNA izkazala za manj občutljivo v primerjavi z ročno metodo izolacije (22,9 % in 10,4 % od 48 bolnikov). Na podlagi izsledkov naše raziskave lahko zaključimo, da ima PCR v realnem času večjo vlogo za zgodnjo diagnostiko okužbe z legionelo, vendar pa ga ne moremo uporabljati kot edino diagnostično metodo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn  
DC UDC 579.61:616-078:616.24-002-008.87:577.2.083(043)=163.6  
CX medical microbiology/legionella/*Legionella pneumophila*/diagnostic methods/serum/urine/molecular techniques/real-time PCR  
AU GORNIK, Mojca  
AA KEŠE, Darja (supervisor)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2011  
TI EVALUATION OF REAL-TIME PCR METHOD FOR DETECTION OF LEGIONELLA DNA IN SERUM SAMPLES  
DT Graduation Thesis (University Studies)  
NO XI, 65 p., 14 tab., 10 fig., 76 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Bacteria of the genus *Legionella* have been shown to cause Legionnaires' disease, a severe multisystem disease involving pneumonia. Rapid diagnosis of the disease is important because it enables adequate treatment, but is limited by the nonspecific clinical features and the shortcomings of conventional diagnostic tests. Therefore PCR technique is a promising new method for detection of *Legionella* DNA in serum and urine samples. The aim of this study was to determine the value of *Legionella* real-time PCR in testing serum samples. We examined 70 serum samples from 56 patients with legionellosis. DNA was simultaneously extracted with a manual (QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN) and an automated method (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Roche Applied Science). Real-time PCR reactions were preformed on the LightCycler® 2.0 instrument (Roche Applied Science) with primers targeting the specific 23S-5S spacer region (*Legionella* species r-gene Primers/Probe mix, Argene Biosoft). Overall, *Legionella* DNA was detected in the serum from 30.4 % patients with legionellosis and the detection rate for all tested serum samples was 24.3 %. More patients tested positive in PCR in the first available serum sample (30.8 %), than in the second available one (15.8%). The highest rates of positive results were found for patients who were tested for the presence of *Legionella* DNA in respiratory samples (57.1%) and for patients with strongly positive results in the *Legionella* urinary antigen test (46.7%). Despite it's many advantages, the automated method of DNA extraction proved to be less sensitive in comparison to the manual one (22.9% and 10.4% of 48 patients). In conclusion, our research indicate that real-time PCR can be beneficial in the early diagnosis of infection, but should not be used as the sole diagnostic tool.

## KAZALO VSEBINE

	stran
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA .....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 SPLOŠNE LASTNOSTI LEGIONEL .....	3
2.1.1 Taksonomija .....	3
2.1.2 Morfologija in biologija .....	4
2.1.3 Genom .....	7
2.1.4 Ekologija .....	9
2.2 PATOGENEZA IN GOSTITELJEVI OBРАМБНИ MEHANIZMI .....	11
2.2.1 Prenos okužbe .....	11
2.2.2 Življenjski krog in virulenčni dejavniki legionel .....	12
2.2.3 Imunski odziv gostitelja .....	15
2.3 BOLEZNI, KI JIH POVZROČAJO LEGIONELE .....	16
2.4 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB .....	17
2.4.1 Vrste in serološke skupine, ki povzročajo okužbe pri človeku .....	20
2.4.2 Tipizacija legionel .....	21
2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽB .....	23

2.6 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA.....	23
2.6.1 Osamitev in identifikacija .....	24
2.6.2 Metoda direktne imunofluorescence.....	25
2.6.3 Dokaz topnega antigena v urinu .....	26
2.6.4 Serološke metode .....	26
2.6.5 Metode pomnoževanja nukleinskih kislin .....	27
2.6.5.1 Izolacija DNA.....	27
2.6.5.2 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo.....	28
2.6.5.3 Pomnoževanje DNA legionele .....	31
3 MATERIALI IN METODE .....	32
3.1 MATERIALI .....	32
3.1.1 Klinični vzorci.....	32
3.1.2 Laboratorijska oprema .....	33
3.2 METODE.....	33
3.2.1 Varnost in kontrola kontaminacije .....	33
3.2.2 Izolacija DNA iz kliničnih vzorcev.....	34
3.2.2.1 Izolacija DNA s kompletom reagentov QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija).....	34
3.2.2.2 Izolacija DNA s kompletom reagentov MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Applied Science, Nemčija) .....	35
3.2.3 Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času ..	36
3.2.3.1 Sestava reakcijske mešanice in pogoji reakcije PCR v realnem času za pomnoževanje DNA legionele .....	37
3.2.3.2 Analiza rezultatov PCR v realnem času .....	38
4 REZULTATI.....	40
4.1 REZULTATI METODE PCR V REALNEM ČASU .....	40
4.2 PRIMERJAVA DVEH METOD ZA IZOLACIJO DNA .....	46
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	49
5.1 RAZPRAVA.....	49
5.2 SKLEPI.....	54

**6    POVZETEK.....55**

**7    VIRI .....56**

**ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste bakterij rodu <i>Legionella</i> (Euzéby, 2010) .....	4
Preglednica 2: Izolirane vrste rodu <i>Legionella</i> v Evropi med leti 1995 in 2005 (Diederer, 2008: 8).....	21
Preglednica 3: Primerjava različnih mikrobioloških metod za dokaz okužbe z legionelami (Blyth in sod., 2009: 158).....	24
Preglednica 4: Program pomnoževanja DNA legionele z reakcijo PCR v realnem času... .	37
Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje interne kontrole z reakcijo PCR v realnem času.....	38
Preglednica 6: Program pomnoževanja interne kontrole z reakcijo PCR v realnem času. .	39
Preglednica 7: Zbirna preglednica rezultatov testiranja vzorcev bolnikov z legionelozo... .	40
Preglednica 8: Rezultati dokazovanja DNA legionele v serumskih vzorcih glede na čas odvzema vzorcev posameznega bolnika. ....	44
Preglednica 9: Primerjava rezultatov dokazovanja DNA legionele v serumskih vzorcih glede na rezultate dokazovanja specifičnih protiteles. ....	44
Preglednica 10: Rezultati testiranja z ustaljenimi metodami in število (odstotek) bolnikov, pri katerih smo z metodo PCR v realnem času v serumskih vzorcih dokazali DNA legionele. ....	45
Preglednica 11: Primerjava rezultatov dokazovanja DNA legionele v serumskih vzorcih glede na rezultate dokazovanja topnega antiga <i>Legionella pneumophila</i> v urinskih vzorcih. ....	46
Preglednica 12: Zbirna preglednica pozitivnih rezultatov (in vrednosti Ct) testiranja serumskih in urinskih vzorcev z metodo PCR v realnem času po ročni in avtomatski metodi izolacije DNA.....	46
Preglednica 13: Primerjava rezultatov dokazovanja DNA legionele v serumskih in urinskih vzorcih po ročni in avtomatski metodi izolacije.....	48
Preglednica 14: Skladnost rezultatov dokazovanja DNA legionele v serumskih vzorcih po ročni in avtomatski metodi izolacije.....	48

## KAZALO SLIK

Slika 1: Elektronska mikroskopija bakterije <i>Legionella pneumophila</i> . (A) Običkana celica (merilo 1 µm) (Elliot in Johnson, 1981: 604). (B) Tipične po Gramu negativne celice v prereplikativni stopnji (merilo 0,5 µm) (Faulkner in Garduño, 2002: 7028). ....	5
Slika 2: Rast legionel na obogatenih trdnih gojiščih. (A) Značilne kolonije ( <i>Legionella</i> on BCYE ... , 2007), (B) videz brušenega stekla in iridesanca (Delisle in Tomalty, 2002). ....	6
Slika 3: Mapa krožnega genoma vrste <i>Legionella pneumophila</i> seva Paris in specifični geni seva Lens (Cazalet in sod., 2004: 1166). ....	8
Slika 4: Pot okužbe z bakterijami vrste <i>Legionella pneumophila</i> (Steinart in sod., 2002: 152). ....	11
Slika 5: Shematski prikaz nastanka vakuole, v kateri se razmnožuje <i>Legionella</i> <i>pneumophila</i> (Isberg in sod., 2009: 14). ....	13
Slika 6: Elektronska mikrografija makrofaga U937 (A) in <i>Acantamoeba polyphaga</i> (B) 24 ur po okužbi z vrsto <i>Legionella pneumophila</i> . Bakterije so v obeh primerih prisotne v citoplazmi (Molmeret in sod., 2005: 23). ....	14
Slika 7: Prijavljeni primeri legioneloze v Sloveniji od leta 1995 do leta 2009 (Epidemiološko spremjanje ... , 2010: 22). ....	20
Slika 8: Prikaz delovanja PCR v realnem času z uporabo (A) TaqMan sonde in (B) FRET hibridizacijskih sond (Espy in sod., 2006: 169). ....	29
Slika 9: Krivulja pomnoževanja tarčnega odseka DNA (Mackay, 2004: 197). ....	30
Slika 10: Shematski prikaz diagnostičnih preiskav, ki so bile opravljene pri bolnikih, vključenih v raziskavo. ....	32

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih delov (ang. amplified fragment length polymorphism)
BCYE	obogateno gojišče za izolacijo legionel (angl. buffered charcoal yeast extract agar)
bp	bazni par
CFU	število mikroorganizmov, ki lahko tvorijo kolonije (ang. colony forming units)
Ct	cikel, v katerem je signal fluorescence vzorca višji od signala fluorescence ozadja, prag detekcije (ang. threshold cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
ELISA	encimsko-imunski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	celični organel endoplazmatski retikulum
EWGLI	Evropska delovna skupina za legioneloze (ang. European Working Group for <i>Legionella</i> Infections)
FAM	fluorofor karboksi-fluorescein (ang. carboxyfluorescein)
FK506	oznaka za imunosupresiv, imenovan tudi takrolimus
FRET	fluorescenčni prenos resonančne energije (ang. fluorescence resonance energy transfer)
IFN- $\gamma$	interferon gama, protein imunskega sistema
IgG/IgM/IgA	protitelo imunoglobulinskega razreda G/M/A
LCV	<i>L. pneumophila</i> -vsebujoč fagosom (ang. <i>Legionella</i> -containing vacuole)
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LPS	lipopolisaharid, imenovan tudi endotoksin
MAb	monoklonsko protitelo (ang. monoclonal antibody)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (ang. major histocompatibility complex)

MIF	popolnoma preoblikovana, zelo odporna in infektivna transmisivna oblika celic <i>L. pneumophila</i> (ang. mature intracellular form)
Mip	ang. macrophage infectivity potentiator
MOMP	poglavitna beljakovina zunanje membrane (ang. major outer membrane protein)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PFGE	pulzna gelska elektroforeza (ang. pulsed-field gel electrophoresis)
ppGpp	gvanozin tetrafosfat, stresni alarmon (ang. guanosine 3',5'-bispyrophosphate)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (ang. ribosomal ribonucleic acid)
SBT	tipizacijske metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja (ang. sequence based typing)
VBNC	živo, vendar nekultivabilno stanje celic (ang. viable but non-culturable)
TAMRA	fluorofor karboksi-tetrametil-rodamin (ang. carboxytetramethylrhodamine)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TLR	Toll-u podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
U	enota za encimsko aktivnost (ang. unit)
UV	ultravijolično
vrt./min	vrtljaji na minuto

## 1 UVOD

Legionele so aerobni, po Gramu negativni pleomorfni bacili, prisotni v različnih vlažnih okoljih, kjer lahko parazitirajo znotraj nekaterih prosti živečih praživali. Uvrščamo jih v gama podskupino proteobakterij in družino *Legionellaceae*, ki vključuje rod *Legionella* (Fields in sod., 2002). Danes poznamo več kot 50 vrst, od katerih je približno polovica patogenih za ljudi. Klinično najpomembnejša je vrsta *Legionella pneumophila*, predvsem serološka skupina 1 (Lau in Ashbolt, 2009; Newton in sod., 2010).

Na človeka se te bakterije navadno prenesejo preko vdihavanja aerosolov iz umetnih vodnih sistemov, v katerih se vzpostavijo idealne razmere za njihovo razmnoževanje, na primer povišana temperatura in rast biofilmov (Diederer, 2008). S podobnim mehanizmom kot v naravnih gostiteljih se tudi v alveolarnih makrofagih izognejo uničenju v fagolizosomih in oblikujejo edinstven organel, znotraj katerega se razmnožujejo (Molofsky in Swanson, 2004).

Bakterije rodu *Legionella* povzročajo dve različni bolezenski sliki, ki ju označujemo z izrazom legioneloza. Blažji, gripi podobni okužbi pravimo pontiaška vročica, resni obliki pljučnice pa legionarska bolezen (Diederer, 2008; Fields in sod., 2002). Slednjo so prvič opisali leta 1977 po epidemiji med udeleženci zbora ameriške legije v Filadelfiji (Edelstein in Cianciotto, 2006). Je zunajbolnišnično ali bolnišnično pridobljena, pojavlja se tako sporadično kot v izbruhih (Diederer, 2008). Problematična je pri starejših osebah in bolnikih s težko osnovno boleznjijo, za katere je značilna velika smrtnost med obolelimi (Palusińska-Szysz in Cendrowska-Pinkosz, 2009).

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Čimprejšnja potrditev okužbe z legionelami omogoča ustrezno zdravljenje, vendar jo otežujejo nespecifična klinična slika in pomanjkljivosti razpoložljivih diagnostičnih testov (Murdoch, 2003a). »Zlati standard« ostaja osamitev bakterij iz respiratornih vzorcev (Blyth

in sod., 2009; Diederer, 2008). V rutinskih laboratorijih se izvajajo še druge fenotipske metode, in sicer direktna imunofluorescensa, serološki testi ter dokaz topnega antiga v urinu. Le-te imajo prenizko občutljivost za dokaz vseh patogenih vrst legionel (Murdoch, 2003a).

Nove možnosti hitre diagnostike okužb z legionelami prinaša uvajanje tehnike verižne reakcije s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času (Herpers in sod., 2003). DNA legionele lahko na ta način dokažemo tudi v nerespiratornih vzorcih, kot sta serum in urin (Diederer, 2008; Murdoch, 2003a). Metoda PCR za dokaz DNA legionele še ni standardizirana in jo uporablja le v redkih laboratorijih. Rezultati dosedanjih raziskav se precej razlikujejo, ugotovljena občutljivost dokazovanja DNA legionele v serumih bolnikov z legionelno pljučnico pa je relativno nizka (Diederer, 2008).

## 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti primernost uporabe metode PCR v realnem času za dokaz DNA legionele v serumskih vzorcih.

## 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bomo z metodo PCR v realnem času v serumih bolnikov z legionelozo lahko dokazali DNA legionele. Glede na rezultate predhodnih raziskav, ki kažejo na zmanjšano občutljivost te metode, smo domnevali, da bomo DNA omenjene bakterije dokazali v serumih pri 40-60 % bolnikov z legionelozo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SPLOŠNE LASTNOSTI LEGIONEL

#### 2.1.1 Taksonomija

Leta 1976 je med udeleženci zbora ameriške legije v Filadelfiji izbruhnila pljučnica, ki so jo Fraser in sodelavci opisali kot legionarsko bolezen (Hornei in sod., 2007a), kasneje odkritega povzročitelja, po Gramu negativno paličasto bakterijo, pa so zavoljo omenjene zgodovinske povezave in značilnosti bolezni poimenovali *Legionella pneumophila* (Newton in sod., 2010). Testiranje protiteles in osamitev na posebnih gojiščih sta bakterije povezala z nekaterimi prej nepojasnjениmi primeri pljučnice. Izolate je Brenner s sodelavci leta 1979 uvrstili v novo družino *Legionellaceae* ter rod *Legionella* (Edelstein in Cianciotto, 2006).

Družina *Legionellaceae* je skupaj z družino *Coxiellaceae* uvrščena v red *Legionellales* in gama-2 podskupino debla *Proteobacteria* (Newton in sod., 2010). Nekateri raziskovalci so zaradi nizke stopnje homologije DNA predlagali razvrstitev legionel v tri ločene robove, *Legionella*, *Fluoribacter* in *Tatlockia*, vendar analize 16S rRNA temu nasprotujejo. Filogenetsko so *Legionellaceae* najbolj sorodne bakteriji *Coxiella burnetii*, povzročiteljici vročice Q, ki ima podoben življenjski cikel (Hornei in sod., 2007a).

Rod *Legionella* trenutno vsebuje vsaj 51 poimenovanih vrst (prikazane v preglednici 1), tri podvrste (Euzéby, 2010) in več kot 70 serološko različnih skupin, a njihovo število še naprej narašča (Hornei in sod., 2007a). Pri *L. pneumophila* ločimo 15 seroloških skupin, pri vrstah *L. bozemanae*, *L. longbeachae*, *L. feeleii*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra*, in *L. quinlivanii* pa po dve (Fields in sod., 2002).

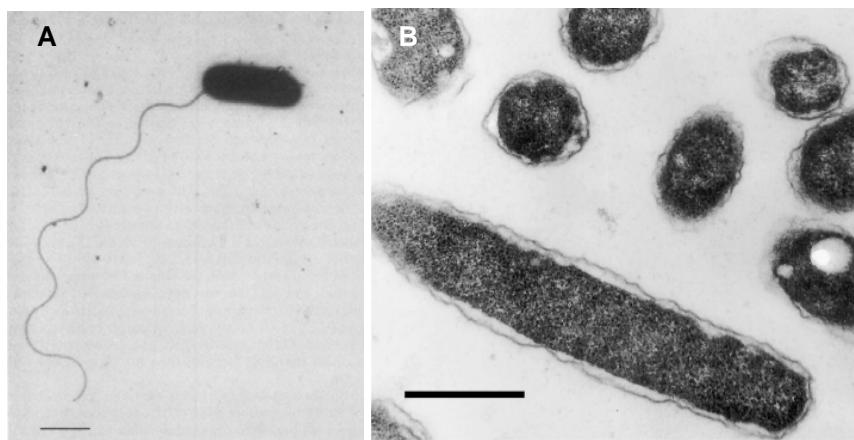
Preglednica 1: Vrste bakterij rodu *Legionella* (Euzéby, 2010).

<i>L. adelaide</i>	<i>L. gormanii</i> <sup>1</sup>	<i>L. parisiensis</i> <sup>1</sup>
<i>L. anisa</i> <sup>1</sup>	<i>L. gratiana</i>	<i>L. pneumophila</i> <sup>1</sup>
<i>L. beliardensis</i>	<i>L. gressilensis</i>	<i>L. quateirensis</i>
<i>L. birminghamensis</i> <sup>1</sup>	<i>L. hackeliae</i> <sup>1</sup>	<i>L. quinlivanii</i>
<i>L. bozemanae</i> <sup>1</sup>	<i>L. impletisoli</i>	<i>L. rowbothamii</i>
<i>L. brunensis</i> <sup>1</sup>	<i>L. israelensis</i> <sup>1</sup>	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. busanensis</i>	<i>L. jamestowniensis</i>	<i>L. sainthelensi</i> <sup>1</sup>
<i>L. cherrii</i>	<i>L. jordanis</i> <sup>1</sup>	<i>L. sancticrucis</i>
<i>L. cincinnatensis</i> <sup>1</sup>	<i>L. lansingensis</i> <sup>1</sup>	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. drancourtii</i>	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. spiritensis</i>
<i>L. drozanskii</i>	<i>L. longbeachae</i> <sup>1</sup>	<i>L. steigerwaltii</i>
<i>L. dumoffii</i> <sup>1</sup>	<i>L. lytica</i> <sup>1</sup>	<i>L. taurinensis</i>
<i>L. erythra</i> <sup>1</sup>	<i>L. maceachernii</i> <sup>1</sup>	<i>L. tucsonensis</i> <sup>1</sup>
<i>L. fairfieldensis</i>	<i>L. micdadei</i> <sup>1</sup>	<i>L. wadsworthii</i> <sup>1</sup>
<i>L. fallonii</i>	<i>L. moravica</i>	<i>L. waltersii</i>
<i>L. feeleii</i> <sup>1</sup>	<i>L. nautarum</i>	<i>L. worsleiensis</i>
<i>L. geestiana</i>	<i>L. oakridgensis</i> <sup>1</sup>	<i>L. yabuuchiae</i>

<sup>1</sup> Izolirane (tudi) iz kužnin bolnikov z legionelozo (Diederer, 2008; Hornei in sod., 2007a; Lück in Steinart, 2006).

### 2.1.2 Morfologija in biologija

Legionele so pleomorfne bakterije. Morfologija celic je odvisna od rastnih pogojev in razvojne stopnje, v kateri se nahajajo (Edelstein in Cianciotto, 2006). Dolge so od 2 do 20 µm, v premeru pa merijo od 0,3 do 0,9 µm (Diederer, 2008; Hornei in sod., 2007b). Večina vrst je gibljivih z 1-3 lateralnimi ali polarnimi bički, vendar to lastnost lahko izgubi. V zadnjih stopnjah rasti znotraj ameb so gibljivih, majhnih (1 µm) kokoidnih oblik, medtem ko v stacionarni fazni rasti na trdih gojiščih oblikujejo dolge (20 µm) negibljive filamente (Edelstein in Cianciotto, 2006). Ob tem se spreminja struktura celične ovojnici (Faulkner in Garduño, 2002). Nekatere vrste tvorijo kapsulo ali njej podoben sloj (Cazalet in sod., 2010; Edelstein in Cianciotto, 2006). Slika 1 prikazuje nekaj omenjenih morfoloških značilnosti.



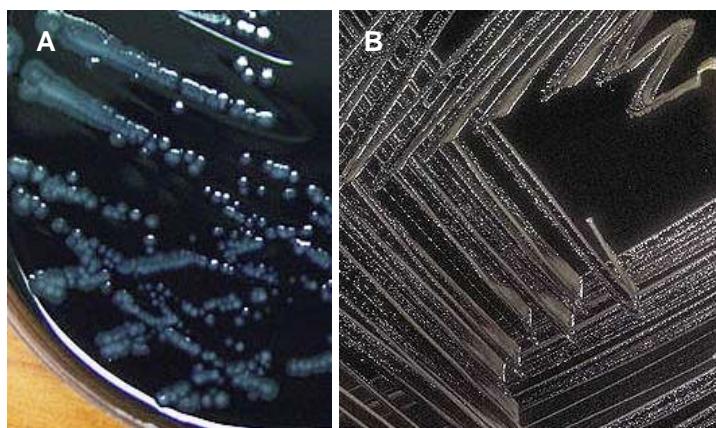
Slika 1: Elektronska mikroskopija bakterije *Legionella pneumophila*. (A) Običkana celica (merilo 1 µm) (Elliot in Johnson, 1981: 604). (B) Tipične po Gramu negativne celice v prereplikativni stopnji (merilo 0,5 µm) (Faulkner in Garduño, 2002: 7028).

Celična stena legionel je po Gramu negativne narave. Predstavljata jo tanek sloj peptidoglikana in zunanja membrana z lipopolisaharidnim (LPS) slojem. Vsebuje večje količine razvejanih maščobnih kislin in ubikinone s stranskimi verigami iz 9 do 14 izoprenских enot. Zaradi takšne sestave celične stene se bakterije slabše barvajo po Gramu. Lažje jih opazujemo, če se pri tem kot kontrastno barvilo uporabi bazični fuksin (Edelstein in Cianciotto, 2006; Hornei in sod., 2007b). Prav tako je neobičajna prisotnost fosfatidilholina v membranah, saj so njegove sinteze zmožne le redke, z evkariontskimi gostitelji tesno povezane bakterije (Conover in sod., 2008).

Pomemben antigen legionel je LPS, ki omogoča ločevanje seroloških skupin vrste *L. pneumophila*. Sestavljen je iz lipida A, na katerega so vezane dolgoveližne maščobne kisline (Lüneberg in sod., 1998). Ima nizko afiniteto za vezavo z receptorjem CD14 na makrofagih in je le šibko endotoksičen (Neumeister in sod., 1998). Vsebuje tudi antigen O, ki je homopolimer t. i. legionaminske kisline, ta pa daje celični površini zaradi odsotnosti hidroksilnih skupin hidrofoben značaj (Lüneberg in sod., 1998). Drugi antigeni legionel so flagelin, stressni protein Hsp60 (ang. heat-shock protein), poglavitna sekretorna proteaza Msp (ang. major secretory protease) in protein zunanje membrane OmpS (ang. outer membrane protein) (Newton in sod., 2010).

Legionele so obligatno aerobne, kemoorganotrofne bakterije. Kot vir energije izkoriščajo predvsem aminokisline, ki jih razgradijo preko Krebsovega cikla, medtem ko sinteza ogljikovih hidratov poteka z glukoneogenezo po Embden-Meyerhof-ovi poti (Edelstein in Cianciotto, 2006). Večina sevov je katalaza pozitivnih, sintetizira beta-laktamazo, lipazo in fosfolipazo ter razgrajuje želatino. V laboratorijih so za izolacijo legionel sprva uporabljali morske prašičke ali kokošja jajca (Hornei in sod., 2007b). Danes se za gojenje uporabljam obogatena in selektivna trdna ali tekoča gojišča s topnim železom in L-cisteinom. Med njimi je najpogosteje gojišče BCYE (ang. buffered charcoal yeast extract agar) z  $\alpha$ -ketoglutaratom, ki spodbuja rast, aktivnim ogljem, kvasnim ekstraktom in organskim pufrom. Legionele rastejo optimalno pri pH 6,8-6,9 in temperaturi 35-37 °C. Določenim vrstam ustreza višje koncentracije ogljikovega dioksida (3-5 %) ali dodatek govejega serumskega albumina (Edelstein in Cianciotto, 2006; Murdoch, 2003a).

Pri začetni izolaciji iz različnih vzorcev zrastejo kolonije legionel na gojišču BCYE z  $\alpha$ -ketoglutaratom v 3-14 dneh, vendar povprečno v 3-4 dneh inkubacije, saj so počasnejše rastoče vrste manj pogoste. Mlade kolonije so sive, okrogle, konveksne in pod mikroskopom podobne brušenemu steklu (slika 2) (Edelstein in Cianciotto, 2006). Pod UV svetlobo rumeno fluorescirajo. Zanje je značilna iridescenca, za nekatere vrste tudi rdeča, bela ali modra autofluorescenca (Hornei in sod., 2007b; Muder in Yu, 2002).



Slika 2: Rast legionel na obogatenih trdnih gojiščih. (A) Značilne kolonije (*Legionella* on BCYE ... , 2007), (B) videz brušenega stekla in iridescenca (Delisle in Tomalty, 2002).

### 2.1.3 Genom

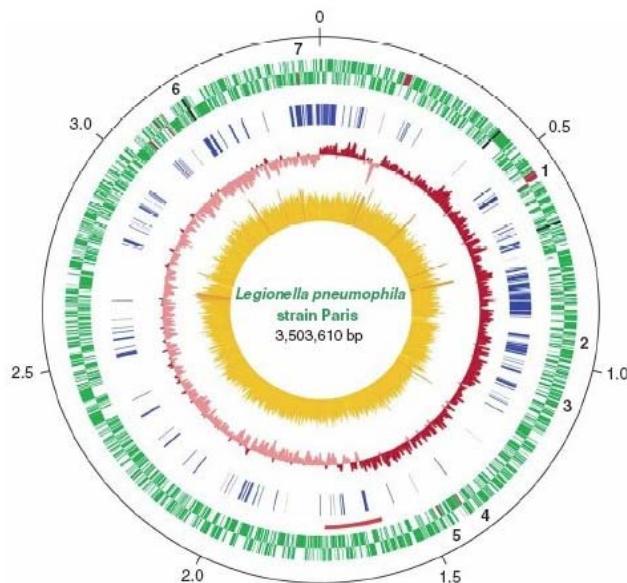
S pulzno gelsko elektroforezo (ang. pulsed field gel electrophoresis, PFGE) so ocenili, da je genom legionel velik približno 3,9 Mb (Steinert in sod., 2002). Delež gvanina in citozina v molekuli DNA je od 38 do 52 %, odvisno od vrste legionel. Znano je, da so legionele sposobne izmenjave genetskega materiala s transformacijo in konjugacijo. Plazmide so odkrili pri nekaterih kliničnih in okoljskih izolatih (Edelstein in Cianciotto, 2006).

Danes so objavljena celotna nukleotidna zaporedja genomov petih kliničnih izolatov, ki pripadajo vrsti *L. pneumophila* serološke skupine 1, in sicer sevov Philadelphia, Paris (slika 3), Lens, Corby ter Alcoy (D'Auria in sod., 2010). Cazalet in sod. (2010) pa so določili nukleotidno zaporedje genoma seva NSW 150 *L. longbeachae* serološke skupine 1.

*L. pneumophila* ima en krožni kromosom, katerega velikost se giblje od 3,3 do 3,6 Mb. Med omenjenimi sevi so ohranjeni delež GC baznih parov (okrog 38 %), število genov (3001-3259) ter delež kodirajočih regij (86-90,2 %). Skupnih je 1979 genov (66,9 %). Ti sestavljajo ohranjeno jedro in imajo zapis za številne esencialne metabolne funkcije, medtem ko je preostali del genoma specifičen za seve. Gre torej za zelo raznoliko vrsto, k čemur prispeva navzočnost mobilnih genetskih elementov, kot so insercijska zaporedja, genomske in patogeni otoki ter plazmidi. Poleg tega je zanjo značilna variabilnost na nivoju genov (Cazalet in Buchrieser, 2007; D'Auria in sod., 2010). Številni geni so edinstveni za rod *Legionella*. Plazmida, ki sta prisotna pri sevih Paris (132 kbp) in Lens (60 kbp), sta verjetno pomembna za prilagoditev na okolje in virulenco. Vsebujejo gene povezane z odpornostjo proti antibiotikom in gene, ki kodirajo virulenčne dejavnike (Cazalet in Buchrieser, 2007).

Druga posebnost genoma *L. pneumophila* je, da kodira nenavadno veliko beljakovin, ki so podobne evkarionskim glede na aminokislinsko zaporedje ali pa vsebujejo evkariontske domene. Preko funkcionalne mimikrije naj bi posegale v različne stopnje okužbe in na ta način omogočale znotrajcelično rast. Geni zanje so ohranjeni med sevi, bakterije so jih

verjetno pridobile s horizontalnim prenosom od različnih evkariontskih gostiteljev (Cazalet in Buchrieser, 2007; Newton in sod., 2010). Zaradi povezave s praživalmi so zmožne okužiti človeške celice (Cazalet in Buchrieser, 2007; Steinert in sod., 2002).



Slika 3: Mapa krožnega genoma vrste *Legionella pneumophila* seva Paris in specifični geni seva Lens (Cazalet in sod., 2004: 1166).

Prvi, zunanji krog prikazuje gene na pozitivni in negativni verigi DNA seva Paris, obarvane zeleno. S črno barvo so označeni rRNA operoni, z rdečo pa znani virulenčni geni: 1 in 6 sistem izločanja tipa IV *dot/icm*; 2 *mip*; 3, 4 in 5 sistem izločanja tipa II *lsp*; 7 *momp*. Rdeča črta označuje inverzijo pri sevu Lens. Drugi krog prikazuje gene, ki so specifični za sev Lens. Tretji krog prikazuje odstopanja v vsebnosti G/C (G+C/G-C) za sev Paris. Četrти krog prikazuje vsebnost G+C za sev Paris: svetlo rumena < 32,5 % G+C; rumena med 32,5 in 44,1 % G+C; temno rumena > 44,1 % G+C. Merilo je navedeno na zunanji strani, položaj 0 je mesto začetka podvojevanja genoma.

Genom vrste *L. longbeachae* je v primerjavi z genomom *L. pneumophila* za 500 kbp večji, drugače organiziran, bolj ohranjen med sevi ter ima le približno 2/3 ortolognih genov (podobni zaradi skupnega izvora). Tudi nekateri sevi *L. longbeachae*, vključno z izbranim sevom NSW 150 (72 kbp), imajo plazmide. Vrsti se razlikujeta v prisotnosti virulenčnih dejavnikov, ki vplivajo na povzročanje bolezni, kot so sistemi izločanja in njihovi substrati. Genom *L. longbeachae* kodira kapsulo, ne pa bičkov. V njem so odkrili gene, ki

kodirajo za rastline značilne proteine in encime za razgradnjo komponent rastlinskih celic, kar nakazuje na zmožnost interakcije s temi evkarionti (Cazalet in sod., 2010).

Okrog 700 baznih parov dolg monocistronskega gena *mip* (ang. macrophage infectivity potentiator) je bil eden izmed prvih genov, ki so jih povezali z virulenco *L. pneumophila* (Engleberg in sod., 1989; Newton in sod., 2010). Kodira peptidil prolin cis-trans izomerazo pretežno evkariotske družine FK506 vezajočih proteinov (Newton in sod., 2010). Gen *mip* je običajno prisoten pri vseh sevih rodu *Legionella*. Je stabilen in ga uvrščamo med vzdrževalne (»hišne«, ang. housekeeping) gene. Njegovo zaporedje je precej ohranjeno (69-97 %), a bolj variabilno od zaporedja gena za 16S rRNA (Ratcliff in sod., 1998). Služi kot tarča v molekularni diagnostiki, pri identifikaciji in tipizaciji legionel (Newton in sod., 2010; Ratcliff in sod., 1998).

Zgodnje dokazovanje bolj virulentnih sevov *L. pneumophila* serološke skupine 1 v kliničnih in okoljskih vzorcih ob izbruhih legioneloze lahko temelji na pomnoževanju gena *lag-1* (1074 bp), ki kodira O-acetyltransferazo, odgovorno za O-acetilacijo legionaminske kisline LPS. Kaže, da je omenjeni gen potreben za izražanje epitopa, s katerim reagira monoklonsko protitelo (ang. monoclonal antibody, MAb) 3/1 (ozioroma MAb 2 z enako reaktivnostjo). Odsotnost epitopa je morda pomembna za preživetje bakterij v okolju, toda zmanjša njihovo virulentnost. MAb 3/1-negativni izolati so izgubili celoten omenjeni gen pri homologni rekombinaciji med zaporedjema, ki ga obdajata, redkeje pa znotraj gena vsebujejo brezsmiselne mutacije ali insercije. Težavo predstavljajo sevi, ki imajo gen *lag-1*, a je ta nefunkcionalen, torej ne reagirajo s protitelesi MAb 3/1 (Kozak in sod., 2009; Thürmer in sod., 2009).

#### 2.1.4 Ekologija

Naravni življenjski prostor legionel so raznolika vodna okolja (vodotoki, jezera, podtalnica, termalna in morska voda), vlažna zemlja ter blato (Diederer, 2008; Surman-Lee in sod., 2007). Prisotne so v nizkih koncentracijah, vendar lahko vstopajo v umetne vodne sisteme, ki so pogostejši vir okužbe, saj se bakterije tu v ugodnih razmerah zelo

namnožijo. Našli so jih v slabo vzdrževani vodovodni napeljavi, hladilnih stolpih, klimatskih napravah, vlažilcih zraka, vodnjakih, bazenih z naravno in termalno vodo, v opremi za izvajanje respiratorne terapije ter zobozdravstveni opremi (Atlas, 1999; Surman-Lee in sod., 2007). Izjema je vrsta *L. longbeachae*, ki je prisotna v zemlji za vrtnarjenje in kompostu (Hornei in sod., 2007a).

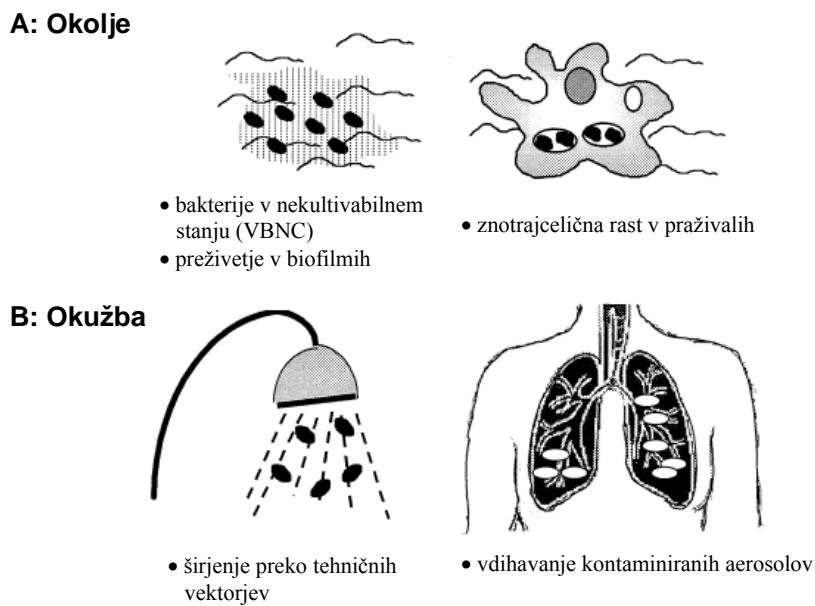
Na rast legionel vplivata predvsem temperatura in prisotnost drugih mikroorganizmov, ki jih ščitijo pred neugodnimi dejavniki, jim zagotavljajo hranila ter omogočajo njihovo razmnoževanje (Diederer, 2008). So termotolerantne, saj preživijo pri temperaturi med 0 in 60 °C, a se razmnožujejo le med 25 in 45 °C (Diederer, 2008; Surman-Lee in sod., 2007). Poleg tega so acidotolerantne, prisotne v okoljih s pH v območju med 2,7 in 9,2 (Declerck, 2010; Surman-Lee in sod., 2007).

Bakterije rodu *Legionella* na površini vodnih sistemov sooblikujejo biofilme, ki so relativno bogati s hrани. V takšnem okolju so izpostavljene fagocitozi s strani praživali, na kar pa so se prilagodile (Declerck, 2010). So namreč fakultativni ali obligatni znotrajcelični paraziti prostoživečih praživali, in sicer vsaj 20 vrst ameb, vključno s predstavniki rodov *Acanthamoeba*, *Naegleria* in *Hartmanella*, treh vrst migetalkarjev (*Tetrahymena pyriformis*, *Tetrahymena thermophila* in *Cyclidium spp.*) ter ene izmed vrst gliv sluzavk (*Dictyostelium discoideum*) (Declerck, 2010; Lau in Ashbolt, 2009). Praživali predstavljajo njihove naravne gostitelje in rezervoarje (Lau in Ashbolt, 2009). Vse legionele ne rastejo v istih vrstah praživali, kar nakazuje na določeno stopnjo vrstne specifičnosti. Študije so odkrile, da je prisotnost naravnih gostiteljev v biofilmu morda potrebna za razmnoževanje teh bakterij (Surman-Lee in sod., 2007). V njihovi odsotnosti so občasno opazili živo, a nekultivabilno stanje celic (ang. viable but non-culturable, VBNC). V biofilmih so bakterije manj dovetne za delovanje biocidov, kot je klor, znotraj praživali pa so odpornejše tudi proti visokim temperaturam, osmolarnosti in kislosti (Steinert in sod., 2002). Medtem ko se planktonske legionele hitro inaktivirajo, lahko v povezavi z gostitelji preživijo več mesecev. Sposobnost preživetja znotraj praživali je torej pomembna za selekcijo virulentnih sevov, ki povzročajo bolezni pri človeku (Carratalà in Garcia-Vidal, 2010).

## 2.2 PATOGENEZA IN GOSTITELJEVI OBRAMBNI MEHANIZMI

### 2.2.1 Prenos okužbe

Človek je naključni gostitelj legionel (Edelstein in Cianciotto, 2006). Okužba najpogosteje nastane z vdihavanjem aerosolov, drobnih vodnih delcev, v katerih so bakterije (slika 4). Prenesejo se nekaj kilometrov daleč od vira in so dovolj majhni, da zaidejo v pljučne alveole, kjer jih fagocitirajo makrofagi, včasih tudi epitelne celice (Edelstein in Cianciotto, 2006; Hornei in sod., 2007a). V primeru bolnišničnih okužb z legionelo je možno širjenje z aspiracijo kontaminirane vode, ob spiranju s takšno vodo pa prihaja do okužb ran (Diederer, 2008; Hornei in sod., 2007a). Način prenosa bakterij vrste *L. longbeachae* ni jasen (Hornei in sod., 2007a), domnevno pa se širijo z vdihavanjem prahu kontaminirane zemlje (Cazalet in sod., 2010). Prenos legioneloze s človeka na človeka ni znan (Fields in sod., 2002; Hornei in sod., 2007a).



Slika 4: Pot okužbe z bakterijami vrste *Legionella pneumophila* (Steinart in sod., 2002: 152).

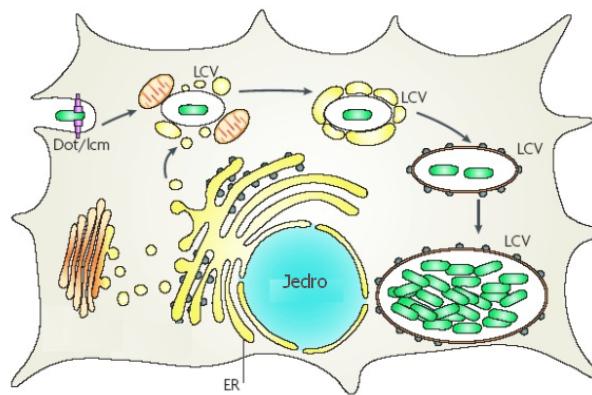
## 2.2.2 Življenjski krog in virulenčni dejavniki legionel

Pomembno vlogo v patogenezi okužb z legionelami ima njihova sposobnost znotrajceličnega razmnoževanja. Življenjska cikla teh bakterij v praživalih in človeških fagocitnih celicah sta si zelo podobna, obstajajo pa razlike med mehanizmom vstopa in izstopa iz omenjenih gostiteljskih celic (Fields in sod., 2002; Hornei in sod., 2007a). Za preučevanje procesov v sesalskih celicah so raziskovalci uporabili različne tkivne kulture ter divje seve in avirulentne mutante legionel (Newton in sod., 2010).

Legionele vstopajo v gostiteljevo celico z običajnim mehanizmom fagocitoze, redkeje s »coiling« fagocitozo, kjer se nastali psevdopodij ovije okrog bakterije (Newton in sod., 2010; Steinert in sod., 2002). Bakterijski ligandi, ki sodelujejo pri vezavi na gostiteljske celice, so bički, pili tipa IV, protein Hsp60, protein Mip (ang. macrophage infectivity potentiator) in poglavitni protein zunanje membrane MOMP (ang. major outer membrane protein), ki je tarča vezave komponent komplementa (Edelstein in Cianciotto, 2006; Hornei in sod., 2007a). Sprožitveni dejavnik požiranja s strani makrofagov je vezava s komponento C3 opsoniziranih bakterij na receptorja komplementnega sistema CR1 in CR3 (Edelstein in Cianciotto, 2006; Steinert in sod., 2002) ali vezava bakterij na lektinske receptorje (Lau in Ashbolt, 2009).

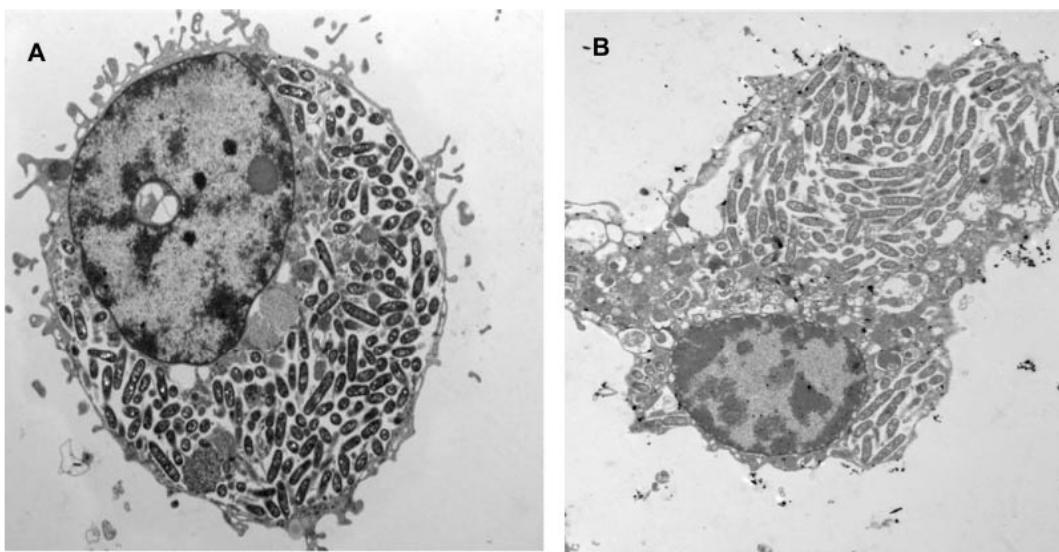
Po vnosu bakterije v gostiteljsko celico virulentni sevi legionel preprečijo zorenje fagosoma, zakisanje vakuole in njen zlitje z lizosomom (Hornei in sod., 2007a). Vplivajo na znotrajcelični promet organelov, pri čemer prihaja do razlik med vrstami (Lau in Ashbolt, 2009). *L. pneumophila*-vsebujoč fagosom (ang. *Legionella*-containing vacuole, LCV) obdajo mitohondriji, gladki vezikli in zrnati endoplazmatski retikulum (ER), kar vodi do nastanka edinstvene zrnatemu ER podobne vakuole, znotraj katere se bakterije razmnožujejo z binarno delitvijo in zapolnijo gostiteljsko celico (slika 5) (Edelstein in Cianciotto, 2006; Steinert in sod., 2002). K temu naj bi prispevala avtofagija (samožrtje ali proces razgradnje celičnih sestavin s pomočjo lizosomov, ki zagotavlja hranila) (Newton in sod., 2010). Podoben mehanizem imajo virulentni sevi *L. longbeachae*, večina sevov

*L. micdadei* pa naj bi se razmnoževala znotraj fagolizosomov, ki niso obdani z ribosomi (Edelstein in Cianciotto, 2006; Lau in Ashbolt, 2009).



Slika 5: Shematski prikaz nastanka vakuole, v kateri se razmnožuje *Legionella pneumophila* (Isberg in sod., 2009: 14).

Razmnoževanje legionel sčasoma privede do uničenja gostiteljske celice z apoptozo ali nekrozo in sprostitev velikega števila bakterij, ki začnejo nov krog okužbe (Hornei in sod., 2007a). Molmeret in sod. (2010) v nasprotju s prvotno domnevo, da *L. pneumophila* povzroči nastanek por v membrani vakuole, predvidevajo, da je liza le-te posledica mehanskega pritiska zaradi vse večjega števila bakterij. Sledi ji liza makrofaga (Molmeret in sod., 2010). Slika 6 prikazuje zadnje stopnje razmnoževanja *L. pneumophila* v dveh različnih gostiteljih.



Slika 6: Elektronska mikrografija makrofaga U937 (A) in *Acantamoeba polyphaga* (B) 24 ur po okužbi z vrsto *Legionella pneumophila*. Bakterije so v obeh primerih prisotne v citoplazmi (Molmeret in sod., 2005: 23).

Legionele imajo dvostopenjski razvojni krog; v ugodnih razmerah obstajajo v replikativni obliki, ko prične v vakuoli primanjkovati hrani, pa preidejo v transmisivno obliko, ki je infektivna (Molofsky in Swanson, 2004). Do preoblikovanja bakterij vrste *L. pneumophila* naj bi prišlo po sprostitvi bakterij v citosol (Molofsky in sod., 2010). Sproži ga stresni odziv oziroma kopiranje alarmona ppGpp (gvanozin tetrafosfat) (Hammer in Swanson, 1999), ki preko alternativnih sigma faktorjev in dvokomponentnega sistema LetA/S vpliva na izražanje virulenčnih genov transmisivne faze (Molofsky in Swanson, 2004). Regulacija je dodatno odvisna od zaznavanja celične gostote (ang. quorum sensing) (Newton in sod., 2010). Ob tem se spremeni izražanje skoraj polovice genov v genomu (Steinert in sod., 2007). Popolnoma preoblikovana transmisivna oblika, imenovana MIF (ang. mature intracellular form), je v nasprotju z replikativno obliko debelostenska, gibljiva, zelo odporna in infektivna ter tako pomembna za preživetje in širjenje teh bakterij (Molofsky in Swanson, 2004). Pri *L. longbeachae* je prehod med fazama manj izrazit, v regulacijo pa so morda vključeni sekundarni obveščevalci (Cazalet in sod., 2010).

Za virulenco legionel je poglaviten sekrecijski sistem tipa IV, imenovan Dot/Icm (ang. defective for organelle trafficking/intracellular multiplication), ki ga pri vrsti

*L. pneumophila* kodira 25 genov (De Buck in sod., 2007). Potreben je za izmikanje imunskemu odzivu, oblikovanje LCV, za znotrajcelično razmnoževanje, poleg tega sodeluje pri vstopu *L. pneumophila* v gostiteljsko celico in izstopu iz nje (Newton in sod., 2010). Beljakovine tega sistema oblikujejo poro v membrani vakuole in gostiteljske celice (Isberg in sod., 2009), preko katere je v citoplazmo slednje prenesenih okrog 200 efektorjev (Newton in sod., 2010). Ti privabijo vezikle zrnatega ER, ki obdajo fagosom in ga zaščitijo (Newton in sod., 2010).

Že omenjeni protein Mip se nahaja v zunanji membrani bakterij in je povezan z njihovo sposobnostjo razmnoževanja v gostiteljskih celicah. Nedavno so pokazali, da se veže na kolagen, sodeluje pri razgradnji ekstracelularnega matriksa ter omogoča prehod bakterij preko pljučne epitelne bariere (Newton in sod., 2010). Je eden izmed proteinov transmisivne faze *L. pneumophila* (Molofsky in Swanson, 2004). Drugi virulenčni dejavniki so sistem izločanja tipa II ali Lsp, morda tudi citotoksini, stresni proteini, fosfolipaze, lipopolisaharidi, molekule, ki so povezane s kopičenjem železa, in metaloproteaze (Fields in sod., 2002). Delovanje nekaterih izmed njih lahko vodi do poškodb tkiva, te pa so prav tako posledica gostiteljeve obrambe (Edelstein in Cianciotto, 2006).

### 2.2.3 Imunski odziv gostitelja

Okužba z legionelami sproži delovanje tako prirojenega kot pridobljenega, specifičnega humorалnega in celično-posredovanega imunskega odziva. Močan zgodnji vnetni odziv se razvije po prepoznavi določenih strukturnih determinant legionel s strani receptorjev TLR (Toll-u podobni receptorji, ang. Toll-like receptors) in vključuje izločanje interferona gama (IFN- $\gamma$ ) na mestu okužbe. Ta naj bi omejil razmnoževanje bakterij, delno z zmanjšanjem dostopnosti železa in delovanjem reaktivnih dušikovih zvrsti (Neild in Roy, 2004; Newton in sod., 2010). Citokini makrofagov vplivajo na nastanek vnetnega infiltrata, edema in abscesov (Edelstein in Cianciotto, 2006). Raziskave, delane na miškah, so pokazale, da glavna gostiteljeva obramba sloni predvsem na mehanizmih T-celičnega odziva, tj. delovanju celic T pomagalk in citotoksičnih celic T, ki je potrebno za odstranitev bakterij.

Zato je legionarska bolezen pogostejša pri osebah z oslabljeno celično posredovano imunostjo. Celice T-pomagalke se razvijejo v bezgavkah ob stiku s kompleksi antigen-molekula MHC (poglavitni histokompatibilnostni kompleks, ang. major histocompatibility complex) razreda II na površini dendritičnih celic, nato pa z izločanjem IFN- $\gamma$  aktivirajo okužene makrofage (Neild in Roy, 2004; Newton in sod., 2010). Razvoj zaščitne celično posredovane imunosti lahko sprožita vsaj dva proteina, ki nista virulenčna dejavnika, in sicer proteaza Msp ter protein OmpS (Hornei in sod., 2007a).

Med okužbo nastajajo protitelesa, za katera kaže, da niso zaščitna (Hornei in sod., 2007a). Razvijejo se lahko v prvem tednu po pojavu bolezenskih znakov, povečini pa kasneje. Gre za protitelesa imunoglobulinskih razredov (Ig) G, M ali A oziroma njihove različne kombinacije (Murdoch, 2003a). Glede na rezultate raziskav so pri številnih bolnikih z legionelozo protitelesa IgM prisotna predvsem ob začetku bolezni, prav tako so opisani primeri, ko so pri bolnikih dokazali le serokonverzijo protiteles IgG (Diederer, 2008).

### 2.3 BOLEZNI, KI JIH POVZROČAJO LEGIONELE

Bakterije rodu *Legionella* povzročajo dve različni bolezenski sliki, in sicer legionarsko bolezen ter pontiaško vročico, možne pa so tudi izvenpljučne oblike okužbe. Pri številnih osebah je okužba z legionelami asimptomatska (Diederer, 2008; Fields in sod., 2002; Hornei in sod., 2007a).

Legionarska bolezen je večsistsmska okužba s pljučnico, ki jo je klinično težko ločiti od drugih bakterijskih pljučnic (Fields in sod., 2002). Razvije se pri majhnem deležu izpostavljenih oseb (1 do 5 %) (Hornei in sod., 2007a). Inkubacijska doba navadno traja 2 do 10 dni, redkeje tudi dlje. Bolezen se začne s splošnimi znaki, kot so utrujenost, glavobol, izguba teka in bolečine v mišicah. Sledijo lahko kašelj, bolečina v prsnem košu in gastrointestinalni znaki, predvsem vodena diareja. Značilna je močno povišana telesna temperatura. Pri polovici bolnikov se pojavi nevrološke motnje, na primer zmedenost in delirij. Sputuma je običajno malo, je gnojen ali krvav. Rentgenogram prikaže napredujoče infiltrate in v tretjini primerov plevralni izliv. Na legionelno pljučnico naj bi med drugim

nakazovale nizka koncentracija natrija ter visoki koncentraciji C-reaktivnega proteina in laktat dehidrogenaze v serumu. Na to bolezen se pomisli, če se bolnik ne odziva na betalaktamske antibiotike (Diederer, 2008; Hornei in sod., 2007a; Palusińska-Szysz in Cendrowska-Pinkosz, 2009). Ob imunski oslabljenosti ali neustreznem zdravljenju pride do zapletov, ki vključujejo septični šok ter odpoved dihal, ledvic, jeter in drugih organov, bolezen pa se lahko konča s smrtnim izidom. Bolniki s težjo obliko okužbe imajo lahko več mesecev težave, kot so oteženo dihanje, utrujenost, slabši spomin, cerebelarne motnje (Hornei in sod., 2007a).

Pontiaška vročica je akutno, samoomejujoče, gripi podobno obolenje (Hornei in sod., 2007a), ki pa ni natančno opredeljeno (Edelstein, 2007). Patogeneza bolezni prav tako ni povsem pojasnjena (Edelstein, 2007). Zboli do 95 % izpostavljenih oseb (Hornei in sod., 2007a). Inkubacijska doba je kratka, običajno 24 do 48 ur. Bolezen se začne nenadno s povišano telesno temperaturo, mrzlico, glavobolom in bolečinami v mišicah, ki so jih Tossa in sod. (2006) izpostavili kot glavne bolezenske znake. Ni je potrebno zdraviti, v 2 do 5 dneh mine sama (Hornei in sod., 2007a).

Legionele lahko prizadenejo poleg dihal tudi druge organske sisteme. Tovrstne okužbe se pojavljajo redko, predvsem pri imunsko oslabljenih osebah. Lahko so pridružene pljučnici. Največkrat so prizadeti srce (miokarditis, perikarditis, endokarditis) in ledvici (pielonefritis), možne so okužbe živčnega sistema (encefalomielitis, možganski abscesi). Nadalje so opisani primeri sinuzitisa, celulitisa, miozitisa, pankreatitisa in peritonitisa (Hornei in sod., 2007a; Palusińska-Szysz in Cendrowska-Pinkosz, 2009; Stout in Yu, 1997).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIJA OKUŽB

Tveganje za razvoj okužbe z legionelami predstavljajo naprave, ki ustvarjajo aerosole kontaminirane tople vode, saj omogočajo hitro namnožitev in širjenje teh bakterij (Edelstein in Cianciotto, 2006; Palusińska-Szysz in Cendrowska-Pinkosz, 2009). Kot vir okužbe so največkrat omenjeni hladilni stolpi, vodovodne napeljave in termalna kopališča

(Joseph in Ricketts, 2010). Podatki epidemiološkega spremljanja z vodo prenesenih bolezni v ZDA kažejo, da je legioneloza najpogostejša med njimi (Yoder in sod., 2008). Pri nekaterih vrstah, kot je *L. longbeachae*, ki povzroča legionarsko bolezen večinoma pri vrtnarjih, je vir okužbe z legionelami kontaminirana zemlja (Fields in sod., 2002; Hornei in sod., 2007a).

Legionarska bolezen se pogosteje pojavlja pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom, a tudi med sicer zdravimi osebami. Dejavniki tveganja zajemajo starost nad 40 let, moški spol, kajenje, preobremenitev z železom, alkoholizem, nedavna potovanja, sladkorno bolezen, kronične srčne in pljučne bolezni, kronično odpoved ledvic, hematološke maligne bolezni ter imunosupresijo. Za bolnišnično pridobljeno okužbo so bolj občutljivi kirurški bolniki, posebno po presaditvi organov ali operacijah raka glave in vratu, drugi bolniki z rakom ter bolniki, ki prihajajo v stik z respiratorno opremo. Zdi se, da pri bolnikih z aidsom tveganje za okužbo ni večje, vendar je potek bolezni težji. Legionele le redko povzročajo pljučnico pri otrocih (Diederer, 2008; Hornei in sod., 2007a; Palusińska-Szysz in Cendrowska-Pinkosz, 2009; Stout in Yu, 1997).

Primeri bolezni se pojavljajo po celi svetu, povečini sporadično ali pa kot epidemije oziroma endemije (Edelstein in Cianciotto, 2006). Okužbe delimo na bolnišnične ali nozokomialne, pridobljene v domačem okolju in povezane s potovanjem (Hornei in sod., 2007a). Sporadični primeri in bolnišnične okužbe se pojavljajo vse leto, medtem ko so epidemije pogosteje poleti in jeseni, domnevno zaradi višjih temperatur, vlažnosti in večjega števila ljudi, ki potujejo (Diederer, 2008). Več raziskovalcev je potrdilo, da je *L. pneumophila* eden izmed glavnih povzročiteljev bolezni pri bolnikih s težjo obliko pljučnice, pridobljeno v domačem okolju, ki potrebujejo hospitalizacijo (Carratalà in Garcia-Vidal, 2010; Hornei in sod., 2007a; Stout in Yu, 1997). Izolirane so v 1 do 40 % primerov bolnišnične pljučnice (Diederer, 2008).

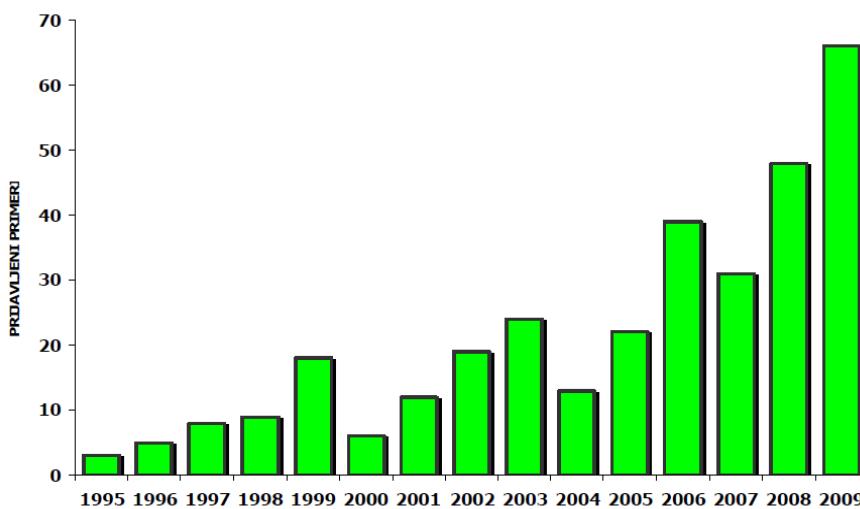
Zaradi uporabe različnih diagnostičnih metod in razlik v poročanju o primerih, natančna incidenca legionarske bolezni v svetu ni znana, a dejstvo je, da je število okužb po uradnih podatkih podcenjeno (Fields in sod., 2002; Hornei in sod., 2007a). V zadnjih letih tako v Evropi kot v ZDA opažajo bistveno povečanje incidence bolezni, do česar je privedla

razširjena uporaba metode detekcije antiga v urinu (Benin in sod., 2002; Carratalà in Garcia-Vidal, 2010). Skupaj z empiričnim zdravljenjem pljučnic je to pripomoglo k zmanjšanju smrtnosti, predvsem v primeru bolnišničnih okužb. Stopnja smrtnosti (ang. case-fatality rate) je od 1 do 80 % (Diederer, 2008). Odvisna je od zdravstvenega stanja bolnika, pravočasne potrditve diagnoze in uvedbe ustreznega zdravljenja ter tega, ali je okužba sporadična, bolnišnična ali del izbruha (Benin in sod., 2002; Hornei in sod., 2007a). Na potek bolezni nadalje vplivata virulenza bakterijskega seva in količina bakterij, ki pridejo v telo (Lück in Steinart, 2006).

Po novejših podatkih iz ZDA in Avstralije je stopnja smrtnosti med bolnišničnimi okužbami 14 %, med okužbami, pridobljenimi v domačem okolju, pa 5-10 % (Hornei in sod., 2007a; Palusińska-Szysz in Cendrowska-Pinkosz, 2009). V Evropi je med leti 2005 in 2008 znašala 6,6 % (Joseph in Ricketts, 2010; Palusińska-Szysz in Cendrowska-Pinkosz, 2009). V tem obdobju je bilo letno prijavljenih približno 6000 primerov legionarske bolezni, incidenčna stopnja prijavljenih primerov je bila 1,1 na 100.000 prebivalcev (Joseph in Ricketts, 2010). Do največjega do sedaj zabeleženega izbruha legionarske pljučnice je prišlo v Španiji leta 2003, kjer je bil vir okužbe hladilni stolp bolnišnice; zbolelo je 449 oseb, smrtnost med njimi pa je bila le 1 % (Hornei in sod., 2007a). Bolezen je pogostejša še na Nizozemskem in Danskem, v Švici, Franciji ter Italiji (Joseph in Ricketts, 2010).

Za razliko od legionarske bolezni se pontiaška vročica navadno pojavlja v obliki epidemij, pri tem pa starost, moški spol in kajenje ne predstavljajo dejavnikov tveganja. V primeru, da kljub benignosti in neznačilnim znakom ni spregledana, opozori na kontaminacijo okolja z vrstami rodu *Legionella* (Tossa in sod., 2006).

Število okužb z legionelami narašča tudi v Sloveniji, na kar kažejo epidemiološki podatki Inštituta za varovanje zdravja RS (slika 7). V letu 2009 je bilo prijavljenih 66 primerov legioneloze, štirje s smrtnim izidom. Incidenca je znašala 3,23 na 100.000 prebivalcev, kar nas uvršča med države z visoko prijavno stopnjo (Epidemiološko spremiščanje ..., 2010).



Slika 7: Prijavljeni primeri legioneloze v Sloveniji od leta 1995 do leta 2009 (Epidemiološko spremljanje ... , 2010: 22).

#### 2.4.1 Vrste in serološke skupine, ki povzročajo okužbe pri človeku

Približno polovica vrst rodu *Legionella* je patogenih za človeka (preglednica 2), vendar je mogoče, da v ustreznih razmerah bolezen pri imunsko oslabljenih osebah povzroči katera koli med njimi (Newton in sod., 2010). Najpogosteje je iz kužnin bolnikov bodisi z bolnišnično ali v domačem okolju pridobljeno legionelozo izolirana *L. pneumophila* (preglednica 2) (Diederen in sod., 2008; Palusińska-Szysz in Cendrowska-Pinkosz, 2009). Vrsta povzroča okrog 90 % legionelnih pljučnic, kar 84 % serološka skupina 1 (Yu in sod., 2002). Kaže, da je bolj virulentna od ostalih vrst rodu *Legionella*, katerih koncentracija v okoljskih vzorcih je sicer večja (Den Boer in sod., 2008; Newton in sod., 2010).

Prav tako so pomembne druge serološke skupine iste vrste, zlasti skupini 4 in 6, ter druge vrste rodu *Legionella* (Yu in sod., 2002), kot so *L. longbeachae*, *L. bozemanae*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii* in *L. anisa* (Blyth in sod., 2009; Diederen in sod., 2008; Yu in sod., 2002). V nasprotju z Evropo in ZDA je v Avstraliji in na Novi Zelandiji *L. pneumophila* serološke skupine 1 odgovorna le za okrog 50 % primerov v domačem okolju pridobljene pljučnice, medtem ko okrog 30 % primerov povzroča vrsta

*L. longbeachae* (Yu in sod., 2002). Za nekatere vrste je bil prijavljen le en sam primer okužbe človeka. Legionele, ki ne sodijo v vrsto *L. pneumophila*, navadno povzročajo pljučnico pri imunsko oslabljenih osebah (Muder in Yu, 2002). Število okužb z njimi je zaradi pomanjkanja ustreznih testov morda podcenjeno (Hornei in sod., 2007a). Kot povzročiteljice pontiaške vročice so opisane različne serološke skupine vrste *L. pneumophila* (1, 6 in 7), *L. micdadei*, *L. feeleii* in *L. anisa* (Tossa in sod., 2006).

Preglednica 2: Izolirane vrste rodu *Legionella* v Evropi med leti 1995 in 2005 (Diederer, 2008: 8).

Vrste	Število izolatov
<i>L. pneumophila</i>	3867
<i>L. micdadei</i>	24
<i>L. bozemanae</i>	19
<i>L. longbeachae</i>	18
<i>L. dumoffii</i>	5
<i>L. gormanii</i> , <i>L. anisa</i>	3
<i>L. feeleii</i> , <i>L. cincinnatensis</i>	2
<i>L. brunensis</i> , <i>L. jordanis</i> , <i>L. parisiensis</i> , <i>L. sainthelensi</i>	1
<i>Legionella</i> spp.	109
skupno	4056

#### 2.4.2 Tipizacija legionel

Tipizacijske metode so pomembne z epidemiološkega vidika, saj omogočajo primerjavo med okoljskimi in kliničnimi izolati, prepoznavo vira okužbe ter določitev preventivnih ukrepov (van Belkum in sod., 2007). Obstaja več fenotipskih in genotipskih metod, s katerimi opredelimo seve vrste *L. pneumophila*.

Sprva se je v ta namen uporabljala serotipizacija z monoklonskimi protitelesi (Lück, 2008), ki ima lahko vlogo presejalnega testa (Helbig in sod., 2002). Metoda prepoznavava razlike v površinskih antigenih, in sicer v zgradbi LPS. Tako ločimo znotraj seroloških skupin 1, 4, 5 in 6 več podtipov (Wagner in sod., 2007). Sevom *L. pneumophila* serološke skupine 1, ki so pogosteje povezani z legionelozo pri ljudeh, je skupen z virulenco povezan epitop, s

katerim reagira protitelo MAb 3/1 (Hornei in sod., 2007a; Wagner in sod., 2007). Helbig in sod. (2002) so ugotovili, da t. i. MAb 3/1-pozitivni podtip povzroča okrog 66,8 % primerov legionarske bolezni, najbolj očitno pa prevladuje med okužbami, povezanimi s potovanji (85,8 %). Razlog za to naj bi bila večja hidrofobnost epitopa in posledično izboljšano preživetje teh bakterij v aerosolih. Pri bolnišničnih okužbah je MAb 3/1-pozitivni podtip redkejši, kar odraža porazdelitev serotipov v vodovodnih sistemih.

Serotipizacija je sicer enostavna in hitra, toda vključuje zahtevno pripravo monoklonskih protiteles ter ima slabšo sposobnost razlikovanja med posameznimi sevi (Lück, 2008). Zato se je povečalo zanimanje za molekularne tipizacijske metode, s katerimi odkrivamo razlike na nivoju bakterijskega genoma (van Belkum in sod., 2007). Med njimi sta PFGE in AFLP (polimorfizem dolžin pomnoženih delov, ang. amplified fragment length polymorphism) (Ginevra in sod., 2009), ki temeljita na restrikciji ter ločevanju vzorcev na gelu (van Belkum in sod., 2007). Slednjo so uporabljali člani Evropske delovne skupine za legioneloze (ang. European Working Group for *Legionella* Infections, EWGLI), a so zaradi težav s primerjavo profilov in identifikacijo razvili metode, pri katerih se določa nukleotidno zaporedje izbranih selekcijsko nevtralnih vzdrževalnih genov in variabilnih genov (ang. sequence-based typing, SBT) (Gaia in sod., 2005). Pristop, ki je obravnavan kot »zlati standard« za tipizacijo *L. pneumophila*, analizira 7 genov: *flaA* (podenota bička), *pilE* (pilin tipa IV), *asd* (aspartat-β-semialdehid dehidrogenaza), *mip* (peptidil prolil izomeraza), *mompS* (protein zunanje membrane), *proA* (cinkova metaloproteaza) in *neuA* (N-acilneuraminat citidilil transferaza) (Edwards in sod., 2008; Ginevra in sod., 2009; Ratzow in sod., 2007). Vsakemu drugačnemu zaporedju gena je dodeljena nova številka, njihova kombinacija pa da alelni profil ali sekvenčni tip. Rezultate je tako enostavno primerjati med laboratoriji in jih shranjevati v centralno bazo podatkov (Gaia in sod., 2005; Ginevra in sod., 2009). Na ta način so odkrili raznolikost posameznih podtipov (Ratzow in sod., 2007). Indeks diskriminativnosti (sposobnost metode, da loči med dvema sevoma, naključno izbranimi iz populacije določene bakterijske vrste) znaša 0,963 (Ratzow in sod., 2007; van Belkum in sod., 2007). SBT ne zahteva predhodne osamitve bakterije; Ginevra in sod. (2009) so razvili SBT, ki vključuje vgnezdeno PCR, in s tem dosegli visoko občutljivost metode tudi v primeru, da je izvedena neposredno na kliničnih vzorcih.

## 2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽB

Zakasnjena uvedba ustreznega zdravljenja legionelne pljučnice občutno poveča tveganje za smrt, zato naj bi empirično zdravljenje težje oblike pljučnice, pridobljene v domačem okolju, vključevalo protilegionelno terapijo (Stout in Yu, 1997). Uporabljajo se antibiotiki, ki dobro prehajajo v celice in dosežejo visoke znotrajcelične koncentracije (Diederer, 2008). Eritromicin sta kot antibiotika izbire nadomestila učinkovitejša levofloksacin (ali drugi fluorokinoloni) in azitromicin (Carratalà in Garcia-Vidal, 2010).

Pri preprečevanju okužb je pomembno prepoznavanje mest, kjer bi lahko bili izpostavljeni legionelam, in izvajanje ukrepov, ki zmanjšujejo možnost razrasta teh bakterij (Stout in Yu, 1997). Preventivni ukrepi zajemajo vzdrževanje ustreznih temperature vode v sistemih, onemogočanje njenega zastajanja ter odstranjevanje snovi in drugih mikroorganizmov, ki so ugodni za bakterijsko rast (Surman-Lee in sod., 2007). V splošnem je potrebno ukrepati, če koncentracija legionel v vodi preseže 1 CFU/ml (število mikroorganizmov, ki lahko tvorijo kolonije, ang. colony forming units), pri koncentraciji nad 10 CFU/ml pa se priporoča takojšnje razkuževanje (Hojs in sod., 2002). Izvaja se s pregrevanjem in spiranjem vodovodnega sistema, kloriranjem, ozoniranjem, ionizacijo s kovinami ter z uporabo UV sevanja in biocidov. Parazitiranje legionel v praživalih in prisotnost biofilmov zmanjšata učinkovitost metod (Steinert in sod., 2002).

Nekaj starejših raziskav je ugotavljalo možnosti uporabe različnih antigenov za razvoj cepiv proti bakteriji *L. pneumophila*, vendar na tem področju v zadnjih letih ni bilo veliko aktivnosti (Newton in sod., 2010).

## 2.6 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

Legionelne pljučnice klinično ne moremo ločiti od drugih bakterijskih pljučnic. V pomoč so epidemiološki podatki, bistvena za postavitev diagnoze pa je izvedba ustreznih mikrobioloških testov (preglednica 3) (Diederer, 2008). Ti se razlikujejo v občutljivosti in

specifičnosti. Najbolj zanesljivi so za dokazovanje okužbe z *L. pneumophila* serološke skupine 1 (Hornei in sod., 2007b).

Preglednica 3: Primerjava različnih mikrobioloških metod za dokaz okužbe z legionelami (Blyth in sod., 2009: 158).

Metoda	Čas trajanja	Vzorec	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)
osamitev	3-10 dni	sp. dihala	10-80	100
direktna imunofluorescenca	<4 ure	sp. dihala	25-70	>95
dokaz topnega antigena v urinu	<3 ure	urin	70-90	>99
serološke metode	3-10 tednov	serum	60-80	>95
PCR	<4 ure	sp. dihala	80-100	>90
		serum	30-50	>90
		urin	46-86	>90

Sp. dihala = kužnine iz spodnjih dihal.

V skladu z definicijo EWGLI legionelozo potrdimo z osamitvijo bakterije rodu *Legionella*, z dokazom topnega antigena bakterije *L. pneumophila* v urinu ali z dokazom porasta specifičnih protiteles proti bakteriji *L. pneumophila* serološke skupine 1. S pozitivnim PCR ali z dokazom posamičnega visokega titra specifičnih protiteles proti vrstam rodu *Legionella* opredelimo le verjetne primere legioneloze (Odločba Komisije ... , 2008).

### 2.6.1 Osamitev in identifikacija

Osamitev legionel je zaradi visoke specifičnosti (100 %) v diagnostiki legionarske bolezni opredeljena kot »zlati standard« (Blyth in sod., 2009). Legionele osamimo iz različnih vzorcev, najpogosteje se uporablajo kužnine iz spodnjih dihal (sputum, lavat bronha) (Murdoch, 2003a). Priporočljivo jih je odvzeti pred uvedbo antibiotičnega zdravljenja (Hornei in sod., 2007b) in nemudoma nacepiti na ustrezno gojišče (Murdoch, 2003a). Z barvanjem po Gramu legionel v preparatih kliničnih vzorcev običajno ne vidimo (Muder in Yu, 2002). Osnovno gojišče za kultivacijo legionel je BCYE z  $\alpha$ -ketoglutaratom. Dodana so mu protimikrobnna sredstva, s katerimi zavremo rast normalne bakterijske flore in kvasovk, na primer polimiksin, anizomicin ter vankomicin ali cefamandol (Diederer,

2008). Gojišča s cefamandolom inhibirajo rast legionel, ki ne proizvajajo beta-laktamaze (*L. micdadei*, *L. bozemanae*), in so specifična za rast vrste *L. pneumophila* (Muder in Yu, 2002). Identifikacijo lahko olajšamo z dodatkom barvil (Murdoch, 2003a). Občutljivost metode povečamo s predhodno razredčitvijo vzorca in s kislinsko ali topotno obdelavo (Edelstein in Cianciotto, 2006; Stout in Yu, 1997). Uspešnost izolacije je odvisna od vrste kužnine in tega, kako resna je okužba. Vzorci odvzeti z bronhoskopijo so primernejši od sputumov. Pri težjih oblikah pljučnice te bakterije včasih izoliramo tudi iz hemokultur (Murdoch, 2003a).

Kultivacija omogoča dokaz vseh vrst in seroloških skupin rodu *Legionella* ter nadaljnjo epidemiološko tipizacijo (Blyth in sod., 2009). Pomanjkljivosti metode so zahtevnost, nižja občutljivost in zamudnost, zaradi počasne rasti legionel (vsaj 3 dni, posamezne vrste do 10 dni inkubacije) (Diederer, 2008). Več kot polovica bolnikov nima produktivnega kašla, posledično so za odvzem respiratornih vzorcev potrebni invazivni postopki (Blyth in sod., 2009).

Za identifikacijo ter razlikovanje med vrstami in serološkimi skupinami legionel je na voljo več metod. Temeljijo na dokazovanju fenotipskih lastnosti in reakcijah s specifičnimi monoklonskimi protitelesi. Nekatere legionele prepoznamo le z uporabo molekularnih metod, kot sta DNA-DNA hibridizacija in sekvenčna analiza (Edelstein in Cianciotto, 2006).

### **2.6.2 Metoda direktne imunofluorescence**

Imunofluorescenčna mikroskopija je hitra, a tehnično zahtevna metoda za dokaz legionel v respiratornih izločkih in tkivu pljuč (Blyth in sod., 2009). Poleg tega se uporablja za serotipizacijo izolatov (Fields in sod., 2002). Poliklonska protitelesa lahko navzkrižno reagirajo z nekaterimi drugimi bakterijskimi vrstami iz rodov *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* in *Flavobacterium*, kar privede do lažno pozitivnih rezultatov (Murdoch, 2003a). Prednostno se uporabljajo s fluorokromom označena monoklonska protitelesa, s katerimi dokažemo vse serološke skupine vrste *L. pneumophila* (Edelstein in

Cianciotto, 2006; Fields in sod., 2002). Okužbo dokažemo še nekaj dni po uvedbi antibiotičnega zdravljenja (Fields in sod., 2002). Metoda je slabo občutljiva in tako bolj uspešna, ko je v vzorcu prisotno večje število bakterij (težje oblike pljučnice) (Blyth in sod., 2009). Uporablja se v manjši meri in sama ni zadostna za potrditev legioneloze (Murdoch, 2003a).

### 2.6.3 Dokaz topnega antiga na v urinu

Večino primerov legioneloze ugotavljamo z dokazom topnega antiga legionel v urinu bolnika (Hornei in sod., 2007b; Diederer, 2008; Joseph in Ricketts, 2010). V ta namen uporabljamo predvsem encimsko imunske teste ter novejši imunokromatografski test, s katerim dobimo rezultat v 15 minutah (Blyth in sod., 2009). Antigen, ki je komponenta LPS celične stene, lahko dokažemo že v 1 do 3 dneh po pojavu bolezenskih znakov in še več dni ali mesecev kasneje (Fields in sod., 2002). Zaznamo ga tudi pri okužbah, ki potekajo brez pljučnice, in med antibiotičnim zdravljenjem (Hornei in sod., 2007b). Metoda je visoko specifična za *L. pneumophila* serološke skupine 1 ( $>99\%$ ) (Hornei in sod., 2007b; Murdoch, 2003a). Najbolj je občutljiva za dokaz okužb, povezanih s potovanji, oziroma MAb 3/1-pozitivnih podtipov (Hornei in sod., 2007b; Diederer, 2008). Njena omejitev je nizka občutljivost za dokaz legionel drugih vrst in seroloških skupin. Občutljivost je slabša pri blažjih oblikah okužbe, povečamo jo s koncentriranjem urina (Diederer, 2008). Antigen se ob dolgotrajnem shranjevanju urinskih vzorcev lahko razgradi in dobimo lažno negativne rezultate (Fields in sod., 2002). Topne antigene legionel so sicer dokazali še v drugih vzorcih (sputum, tkivo pljuč, serum), toda njihove uporabe niso ovrednotili (Murdoch, 2003a).

### 2.6.4 Serološke metode

Posredne metode, s katerimi dokazujemo navzočnost specifičnih protiteles v serumu bolnika, so koristne v epidemioloških študijah, v klinični diagnostiki pa je zaradi dolgotrajnosti njihov pomen manjši (Murdoch, 2003a). Najpogosteje uporabljam

indirektni imunofluorescenčni test, ki je referenčen, in encimsko imunske teste (Blyth in sod., 2009). Za boljšo občutljivost naj bi zaznavali celokupna specifična protitelesa vseh treh razredov IgA, IgM in IgG (Murdoch, 2003a). Diagnoza legioneloze temelji na najmanj štirikratnem porastu titra protiteles med akutno in rekonvalsentno fazo vsaj do 1:128 (ali 1:32, odvisno od testa) (Edelstein in Cianciotto, 2006; Murdoch, 2003a). Posamičen visok titer protiteles v akutnem serumu kaže na verjetno okužbo, a ni zanesljiv. Do serokonverzije pride običajno v 3 do 4 tednih, redkeje šele v 10 tednih po nastopu bolezni. Priporoča se odvzem parnih serumov v razmiku 3 tednov in odvzem dodatnih rekonvalsentnih vzorcev, če je rezultat negativen (Murdoch, 2003a). Protitelesa IgM pri številnih bolnikih zaznamo že prej, vendar pa niso značilna le za akutno okužbo in se včasih ohranijo daljše časovno obdobje, kar onemogoča zanesljivost enega samega testiranja (Fields in sod., 2002; Murdoch, 2003a). Vsi bolniki ne razvijejo protiteles, po drugi strani pa je njihova navzočnost morda posledica pretekle okužbe, kar je pomanjkljivost testa. Zaznavanje okužb z vsemi vrstami in serološkimi skupinami legionel je problematično. Nadalje so slabost navzkrižne reakcije znotraj družine *Legionellaceae* ter z drugimi bakterijami, kot so *Rickettsia typhi*, vrste rodov *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacteroides* in *Campylobacter* (Murdoch, 2003a).

### 2.6.5 Metode pomnoževanja nukleinskih kislin

Pomanjkljivosti naštetih testov so botrovale temu, da se danes v diagnostiko okužb z bakterijami rodu *Legionella* vpeljuje molekularne tehnike. Osnovna metoda je verižna reakcija s polimerazo.

#### 2.6.5.1 Izolacija DNA

Pred izvedbo verižne reakcije s polimerazo je potrebno DNA izolirati iz kužnine. V ta namen so na voljo različni komercialno dostopni kompleti, pri čemer pa imajo zaradi hitrosti, enostavnosti, zmanjšanja možnosti kontaminacije ter večjega izkupička in čistosti izolirane nukleinske kisline prednost avtomatizirane metode. Uporabljajo trdne nosilce, kot

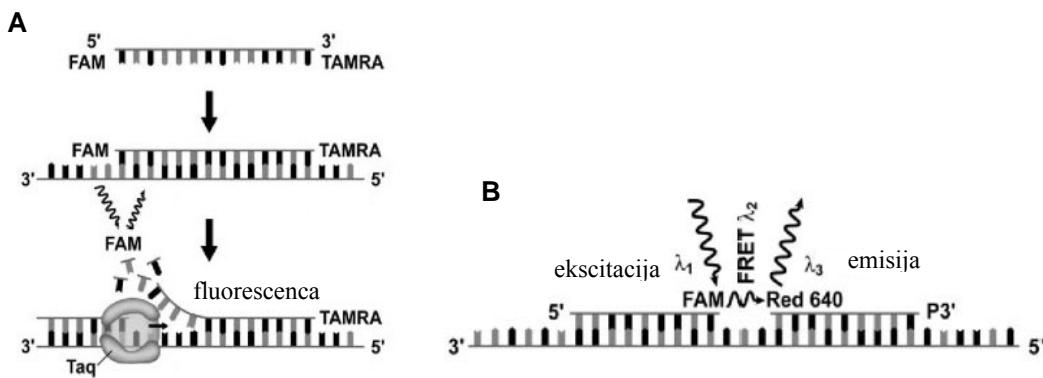
so magnetni delci prekriti s steklom, na katere se po lizi celic in razgradnji beljakovin veže nukleinska kislina. Magnet, ki se nahaja zunaj epruvetke, ustvari magnetno polje in omogoči ločitev magnetnih delcev od vzorca. Nečistoče se nato odstranijo z večkratnim spiranjem s sistemom pufrov, koraki centrifugiranja pa so izpuščeni iz postopka. Elucija vezane nukleinske kisline je dosežena s segrevanjem ter spremembo ionske jakosti ali pH pufra. Eden izmed takšnih sistemov je MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics, Nemčija) (Berensmeier, 2006; Kirchgesser in sod., 2003).

#### 2.6.5.2 Teoretične osnove verižne reakcije s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, pri kateri s ponavljanjem temperaturnih ciklov v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij določenega odseka nukleinske kisline. Temelji na denaturaciji DNA, prileganju izbranih oligonukleotidnih začetnikov na matrico in izgradnji komplementarne DNA na območju med njima, za kar se najpogosteje uporablja temperaturno obstojna *Taq* DNA-polimeraza. Dokazovanje produkta reakcije PCR navadno temelji na uporabi gelske elektroforeze (Valasek in Repa, 2005).

PCR v realnem času je različica PCR, ki omogoča sprotno spremljanje poteka pomnoževanja tarčnega zaporedja v zaprtem sistemu, kar znatno zmanjša nevarnost pojave kontaminacije. Metoda je nadalje izredno občutljiva in hitra ter olajša kvantifikacijo. Za dokazovanje produktov reakcije se uporablajo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvojerižno DNA, ali s fluorescentnimi barvili označeni specifični oligonukleotidi začetniki in sonde, ki so komplementarni tarčnemu zaporedju. Slednje temelji na prenosu svetlobne energije med sosednjima barviloma, govorimo o principu fluorescenčnega prenosa resonančne energije (ang. fluorescence resonance energy transfer, FRET). Najbolj razširjene so sonde TaqMan, ki imajo na 5' koncu vezan reporterski fluorofor (FAM, karboksi-fluorescein) in na 3' koncu dušilec fluorescence (TAMRA, karboksi-tetrametil-rodamin). Med pomnoževanjem DNA-polimeraza s 5' nukleazno aktivnostjo cepi sonda, reporterski fluorofor se oddalji od dušilca in jakost fluorescence se poveča. Pogosto se uporablajo tudi FRET hibridizacijske sonde. Pri tem se oligonukleotida drug ob drugem vežeta na komplementarno DNA. Tisti bliže 5' koncu

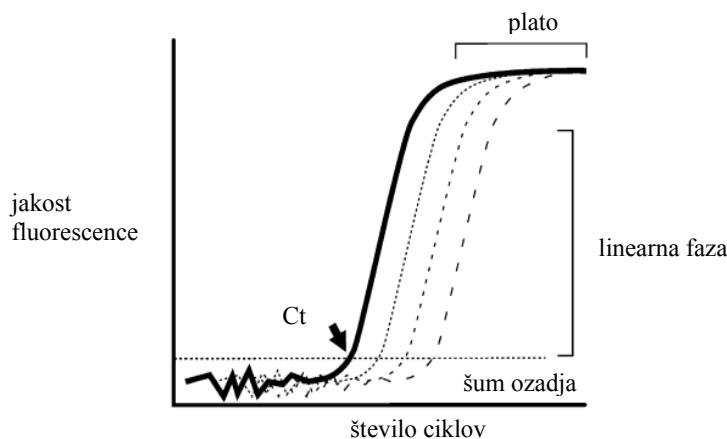
matrice ima na 3' koncu fluorofor z vlogo donorja fotonov (FAM), drugi pa ima na 5' koncu vezan akceptorski fluorofor (Red 640) in fosforiliran 3' konec, da ga polimeraza ne uporabi kot oligonukleotidni začetnik. Tako lahko pride do pojava FRET. Končni fluorofor emitira svetlobo daljše valovne dolžine (slika 8) (Espy in sod., 2006; Mackay, 2004).



Slika 8: Prikaz delovanja PCR v realnem času z uporabo (A) TaqMan sonde in (B) FRET hibridizacijskih sond (Espy in sod., 2006: 169).

(A) Taq = *Taq* DNA polimeraza, FAM = reporterski fluorofor karboksi-fluorescein, TAMRA = dušilec fluorescence karboksi-tetrametil-rodamin. (B) FAM = donorski fluorofor, Red 640 = akceptorski fluorofor Red-640-N-hidroksi-sukcinimid ester.

Naraščanje fluorescence in s tem količine produkta reakcije spremljamo s pomočjo računalniškega programa, ki izriše sigmoidno krivuljo (slika 9). Cikel, v katerem prvič zaznamo pomnoževanje tarčnega zaporedja, saj se fluorescenza povzpne nad fluorescenco ozadja, najpogosteje imenujemo Ct (ang. threshold cycle). Nastajanje produkta merimo v eksponentni ali linearni fazi, ko je jakost fluorescence sorazmerna količini izhodiščnega materiala. Na koncu reakcije je namreč zaradi primanjkanja reagentov in kopiranja inhibitorjev dosežen plato. Vrednost Ct je obratnosorazmerna količini tarčne nukleinske kisline v vzorcu; nižja kot je začetna količina tarče v vzorcu, višja bo vrednost Ct (Mackay, 2004; Valasek in Repa, 2005).



Slika 9: Krivulja pomnoževanja tarčnega odseka DNA (Mackay, 2004: 197).

C<sub>t</sub> = cikel praga detekcije.

Pri vsakem izvajanju reakcije PCR je za veljavnost rezultatov potrebno zadostiti določenim pogojem. Da se prepričamo o uspešnosti pomnoževanja tarčnega zaporedja in odsotnosti kontaminacije, uporabimo pozitivno in negativno kontrolo (Mackay, 2004). Lažno negativni rezultati so posledica izgube vzorčne DNA zaradi postopka izolacije, razgradnje DNA z encimi ali inhibicije delovanja DNA-polimeraze (Valentine-Thon, 2002). Na stabilnost DNA in občutljivost reakcije PCR prav tako vplivata večkratno zamrzovanje in odtajevanje vzorcev (Diederer in sod., 2007a). Kvaliteto vzorca, uspešnost izolacije nukleinske kisline in odsotnost zaviralcev pomnoževanja preverimo z interno kontrolo, ki je lahko endogena (»hišni« geni, ki so že prisotni v preiskovanem vzorcu) ali eksogena (v vzorec jo dodamo, da se hkrati izolira in pomnoži). Eksogena kontrola pa je homologna (ima enaka robna zaporedja kot tača in se pomnoži z istima oligonukleotidnima začetnikoma) ali heterologna (za pomnoževanje in detekcijo potrebujemo dodaten par oligonukleotidnih začetnikov in sond) (Espy in sod., 2006; Ieven, 2007; Mackay, 2004). Uporabljajo se tudi DNA polimeraze, odporne proti nekaterim inhibitorjem (Valasek in Repa, 2005).

### 2.6.5.3 Pomnoževanje DNA legionele

Metoda PCR se uporablja za dokazovanje DNA legionele v različnih okoljskih in kliničnih vzorcih. Z njo dokazujemo vse znane vrste in serološke skupine iz rodu *Legionella*, tako je pomembna za zgodnje odkrivanje predvsem bolnišničnih okužb (Hornei in sod., 2007b). Pri dokazovanju povzročitelja v kužninah iz spodnjih dihal ima metoda večjo ali vsaj enako občutljivost kot kultivacija (Murdoch, 2003a).

Osamitev legionel iz hemokultur in antigenurija v zgodnji fazni okužbe kažeta na to, da so lahko v serumu in urinu bolnika prisotni različni razgradni produkti, vključno z bakterijsko DNA (Murdoch in sod., 1996). Raziskovalci so DNA legionele iz omenjenih vzorcev uspešno pomnožili, vendar je občutljivost metode relativno nizka (30-86 %). Večja je, če gre za zgodnjo fazo bolezni, težjo obliko bolezni ali pa če testiramo več (različnih tipov) vzorcev posameznega bolnika. Dokaz DNA v nerespiratornih vzorcih je koristen v primerih, ko sputum ni na voljo, poleg tega kri in urin bolnika tudi lažje pridobimo (Diederer in sod., 2007b; Murdoch, 2003a).

Tarčna zaporedja PCR testov so najpogosteje bodisi 16S ribosomska DNA, 5S ribosomska DNA, 23S-5S medgenska regija ali *mip* gen (Diederer, 2008; Herpers in sod., 2003). Običajno so testi, ki temeljijo na pomnoževanju genov rRNA, specifični za rod, medtem ko so tisti, ki temeljijo na pomnoževanju gena *mip*, specifični za vrsto *L. pneumophila* (Hornei in sod., 2007b).

Trenutno se legionelna PCR uporablja le v redkih laboratorijih. Razvite metode je potrebno ovrednotiti in standardizirati (Diederer, 2008; Murdoch, 2003a). Ena izmed težav je občasna kontaminacija nekaterih komercialnih kompletov za izolacijo DNA z legionelami. Z njihovo uporabo lahko dobimo lažno pozitivne rezultate, kar poudarja pomen kontrol (Ieven, 2007; Murdoch, 2003b).

### 3 MATERIALI IN METODE

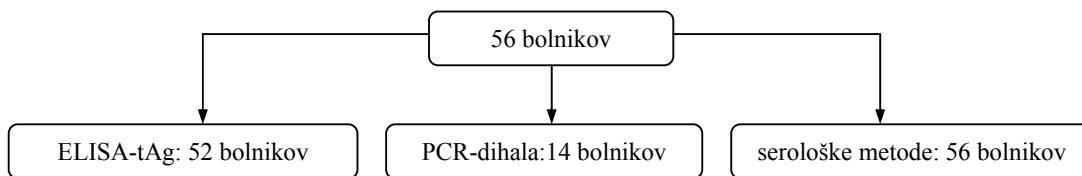
#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Klinični vzorci

V raziskavo smo vključili 70 akutnih in rekonvalcentnih serumskih vzorcev 56 bolnikov z dokazano legionelozo, ki so bili med januarjem leta 2005 in novembrom leta 2009 poslani v Laboratorij za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Pri 47 bolnikih je bila okužba z legionelo predhodno potrjena z dokazom topnega antigena legionele v urinu (*Legionella* urine antigen EIA, Biotest, Nemčija), medtem ko je bila pri 9 bolnikih dokazana DNA legionele v kužnini iz dihal.

Serumi so bili testirani na prisotnost protiteles z metodo indirektne imunofluorescence (RIDA® Fluor *Legionella* IgG, R-Biopharm, Nemčija) ter shranjeni pri temperaturi -20 °C ali -30 °C. Izbrali smo takšne, ki so vsebovali najmanj 200 µl seruma, kar je bil volumen, potreben za izolacijo DNA z eno izmed uporabljenih metod. Pri štirih bolnikih so DNA legionele v serumu dokazali že v redni diagnostiki.

Dodatno smo testirali 9 urinskih vzorcev bolnikov, pri katerih smo DNA legionele pred tem dokazali v serumu. Odvzeti so bili v istem obdobju kot serumi in shranjeni pri -80 °C.



Slika 10: Shematski prikaz diagnostičnih preiskav, ki so bile opravljene pri bolnikih, vključenih v raziskavo. ELISA-tAg = encimsko imunski test za dokaz topnega antigena v urinu, PCR-dihala = verižna reakcija s polimerazo za dokaz DNA legionele v kužninah iz dihal.

### 3.1.2 Laboratorijska oprema

Uporabljena laboratorijska oprema in aparature:

- zaščitna komora LFV91T (Iskra PIO d.o.o., Slovenija)
- UV komora (Herolab, Nemčija)
- toplotni stresalniki epruvetk TS-100 (70 °C) (BIOSAN, Latvija), Thermomixer 5436 (56 °C) in Thermomixer Comfort (65 °C, 95 °C) (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Centrifuge 5403 (Eppendorf, Nemčija)
- namizna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Nemčija)
- namizna centrifuga/mešalo vorteks CombiSpin FVL-2400N (BIOSAN, Latvija)
- mešalo vorteks Bio Vortex V1 (BIOSAN, Latvija)
- sistem za izolacijo nukleinske kisline MagNA Pure Compact (Roche Applied Science, Nemčija)
- sistem za pomnoževanje nukleinske kisline v realnem času LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science, Nemčija)
- avtomatske pipete z različnimi območji pipetiranja (Eppendorf, Gilson)
- nastavki s filtri za avtomatske pipete (Neptune, Eppendorf)
- stojalo za epruvetke (Eppendorf)
- sterilne plastične epruvetke (1,5 ml) (Eppendorf)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Varnost in kontrola kontaminacije

Zbrane kužnine bolnikov s pljučnico smo z reakcijo PCR v realnem času testirali na prisotnost bakterij rodu *Legionella*. Pri tem smo upoštevali navodila za varno delo v mikrobiološkem laboratoriju, ki so opisana v dokumentu N IMI-21, ter pravila, ki veljajo za delo v laboratoriju biološke varnostne stopnje 2. Posamezne postopke smo izvedli v ločenih prostorih, v brezprašnih zaščitnih komorah BSC II tip A. Pozorni smo bili na pravilno umivanje in razkuževanje rok pred delom in po njem, pogosto menjavo rokavic, uporabo maske, laboratorijske halje ter aseptične tehnike dela. Za posamezne stopnje dela

smo uporabljali za to namenjene sete pipet in potrošnega materiala, ki jih nismo prenašali v druge prostore. V testiranje smo poleg vzorcev vključili negativne kontrole. Po končanem delu smo površine in laboratorijsko opremo ustrezno očistili ter izpostavili delovanju UV svetlobe.

### **3.2.2 Izolacija DNA iz kliničnih vzorcev**

DNA smo iz posameznih serumskih in urinskih vzorcev vzporedno izolirali na dva načina, z ročno in avtomatsko metodo, ki temeljita na različnih principih. Pri prvi se pred spiranjem nečistoč DNA adsorbira na silika-gel membrano, pri drugi pa na magnetne steklene delce. V kolikor posameznega vzorca ni bilo dovolj za izvedbo obeh postopkov izolacije, smo DNA izolirali le z ročno metodo.

#### **3.2.2.1 Izolacija DNA s kompletom reagentov QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija)**

Postopek ročne izolacije DNA smo izvedli v zaščitni komori LFV91T (Iskra PIO d.o.o., Slovenija). Uporabili smo komercialno dostopen komplet reagentov QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija), ki vsebuje:

- mikrokolone s silika-gel membrano (QIAamp Mini Spin Column)
- zbiralne epruvetke (2 ml)
- lizacijska pufra ATL in AL
- spiralna pufra AW1 in AW2
- elucijski pufer AE
- proteinazo K.

Potrebovali smo še etanol (96-100 %), ki ni priložen v kompletu. Proteinazo K smo hranili v hladilniku, ostale reagente pa pri sobni temperaturi (15-20 °C).

Vzorce smo odtajali pri sobni temperaturi in premešali na mešalu. DNA smo nato izolirali po navodilih proizvajalca. Pri serumskih vzorcih smo sledili opisanemu protokolu za

izolacijo DNA iz krvi in drugih telesnih tekočin. V vsako epruvetko smo prenesli 200 µl serum, dodali 20 µl proteinaze K in 200 µl pufra AL. Nastalo mešanico smo vorteksirali 15 sekund in jo inkubirali 10 minut pri 56 °C. Po lizi smo epruvetke na kratko centrifugirali, da smo odstranili kapljice z notranjih sten. Dodali smo 200 µl etanola, mešanico zopet premešali z vorteksiranjem in jo na kratko centrifugirali. Lizat smo previdno prenesli v mikrokolono, vloženo v zbiralno epruvetko, in 1 minuto centrifugirali pri 8000 vrt./min. Filtrat smo zavrgli, mikrokolono z vezano DNA pa prenesli v novo zbiralno epruvetko. Nečistoče smo sprali z uporabo pufrov AW1 in AW2. V mikrokolono smo najprej dodali 500 µl pufra AW1, jo ponovno centrifugirali 1 minuto pri 8000 vrt./min in namestili v novo zbiralno epruvetko. V naslednjem koraku smo vanjo odpipetirali 500 µl pufra AW2 in jo centrifugirali 3 minute pri 14000 vrt./min. Zopet smo jo prenestili in centrifugirali še 1 minuto pri polni hitrosti. Zatem smo jo prenesli v epruvetko, dodali 50 µl pufra AE z nizko ionsko jakostjo in vzorec inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Izolirano DNA smo z enominutnim centrifugiranjem pri 8000 vrt./min sprali iz membrane mikrokolone ter jo shranili pri -20 °C.

V primeru urinskih vzorcev smo izolacijo izvedli po protokolu za izolacijo DNA iz tkiv. V epruvetko smo prenesli enak volumen kužnine, torej 200 µl. Dodali smo 180 µl pufra ATL in 20 µl proteinaze K. Mešanico smo dobro premešali z vorteksiranjem in jo inkubirali na stresalniku pri 56 °C 3 ure oziroma čez noč. Po kratkem centrifugiranju smo vanjo odpipetirali 200 µl pufra AL, jo ponovno premešali z vorteksiranjem in 10 minut pustili pri 70 °C. Dodali smo 200 µl etanola ter v nadaljevanju ravnali enako kot pri izolaciji DNA iz serumov.

### 3.2.2.2 Izolacija DNA s kompletom reagentov MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Applied Science, Nemčija)

Izolacija z avtomatsko metodo smo izvedli na aparaturi MagNA Pure Compact (Roche Applied Science, Nemčija) s pomočjo MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I istega proizvajalca, ki vsebuje:

- kartuše z reagenti za posamezno izolacijo (proteinaza K, lizacijski pufer, magnetni stekleni delci, 3 spiralni pufri in elucijski pufer)
- nastavke za pipete
- epruvetke za vzorce (2 ml)
- elucijske epruvetke (2 ml)
- pokrovčke za elucijske epruvetke.

Reagenti so stabilni pri sobni temperaturi.

V epruvetke smo odpipetirali po 200 µl vsakega serumskega vzorca, ki smo ga pred tem odtajali in premešali na mešalu. Stojala v aparaturi smo postopoma napolnili s kartušami, vzorci in ostalimi potrebnimi pripomočki, kot je bilo zahtevano. Reagente v kartušah smo dobro pretresli, da so se magnetni delci enakomerno razporedili. Izbrali smo protokol »Total NA Plasma«, volumen vzorca 200 µl in elucijski volumen 50 µl.

Urinske vzorce smo pred tem dodatno obdelali. K 200 µl vzorca smo odpipetirali 180 µl lizacijskega pufra MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (BLB) in 20 µl proteinaze K (Roche Applied Science, Nemčija), premešali z vorteksiranjem ter inkubirali na stresalniku 10 minut pri 65 °C. Inkubacijo smo podaljšali za 10 minut pri 95 °C. Mešanice smo ohladili, jih na kratko centrifugirali in prenesli v epruvetke za vzorce. Izbrali smo protokol »DNA Bacteria«, volumen vzorca 400 µl in volumen elucije 50 µl.

Aparatura dopušča izolacijo nukleinske kisline iz 8 vzorcev naenkrat, za kar je potrebnih 25 minut. Po končanem postopku smo elucijske epruvetke z izolirano DNA pokrili, ustrezno označili in shranili pri -20 °C.

### **3.2.3 Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času**

Za pomnoževanje DNA v realnem času smo uporabili reagente *Legionella* species r-gene Primers/Probe mix (Argene Biosoft, Francija) in sistem LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science, Nemčija).

### 3.2.3.1 Sestava reakcijske mešanice in pogoji reakcije PCR v realnem času za pomnoževanje DNA legionele

Reakcijsko mešanico smo najprej pripravili v epruvetki, jo premešali z vorteksiranjem in na kratko centrifugirali. Za eno reakcijo smo potrebovali 0,4 µl HotStarTaq® Plus DNA polimeraze (5 U/µl) (QIAGEN GmbH, Nemčija) in 15 µl že pripravljene mešanice reagentov *Legionella* species r-gene Primers/Probe mix (Argene Biosoft, Francija) z oligonukleotidnimi začetniki, ki pomnožujejo del 23S-5S medgenske regije, specifične za genom *Legionella* spp. (nukleotidnega zaporedja ne poznamo). Delo smo nadaljevali v drugem prostoru, v UV komori (Herolab, Nemčija). Mešanico smo razdelili v steklene kapilare, postavljene v hladilni blok, ki je ohranjal dovolj nizko temperaturo, da ni prišlo do predčasne reakcije med reagenti. Dodali smo 10 µl izolirane, predhodno odtaljene DNA ter kapilare sproti zapirali s pokrovčki. Za vsak PCR smo pripravili še kapilari s pozitivno in negativno kontrolo namesto izolirane DNA. Kot pozitivna kontrola nam je služila DNA *L. pneumophila*, kot negativna kontrola pa voda, namenjena delu z molekularnimi metodami. Kapilare smo nato prenesli v nosilec in jih centrifugirali 15 sekund v centrifugi LightCycler® Carousel Centrifuge 2.0 pri 3000 vrtljajih/sekundo. Nosilec smo vstavili v aparaturo LightCycler® in izbrali ustrezni protokol (preglednica 4).

Preglednica 4: Program pomnoževanja DNA legionele z reakcijo PCR v realnem času.

<b>Stopnja</b>		<b>Temperatura</b>	<b>Čas</b>
1. začetna aktivacija		95 °C	5 min
2. 10 ciklov	denaturacija	95 °C	10 s
	prileganje	60 °C	20 s
	podaljševanje	72 °C	10 s
3. 45 ciklov	denaturacija	95 °C	10 s
	prileganje	55 °C	20 s
	podaljševanje	72 °C	10 s
4. ohlajanje		40 °C	30 s

Količino nastalega produkta smo spremljali z meritvijo fluorescence pri valovni dolžini 530 nm.

### 3.2.3.2 Analiza rezultatov PCR v realnem času

Pomnoževanju je sledila analiza dobljenih rezultatov s pomočjo programa LightCycler®. Ta nam je omogočil absolutno kvantifikacijo, nam izrisal krivulje pomnoževanja in izpisal vrednosti Ct. Če so bili rezultati vprašljivi ali je bila fluorescenza šibka, smo PCR ponovili.

Po izolaciji DNA iz serumskih vzorcev smo z interno kontrolo preverili odsotnost inhibicije reakcije PCR. Pomnoževali smo odsek DNA za humani beta-globin, za kar smo potrebovali dodaten par oligonukleotidnih začetnikov in sond: hu β-GLO se, hu β-GLO as, hu β-GLO FL ter hu β-GLO LC (TIB® MOLBIOL GmbH, Nemčija). Uporabili smo jih skupaj z reagenti kompleta LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Applied Science, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Tako kot ostale reagente za PCR smo jih hranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Pred uporabo smo jih odtajali in premešali. V sterilni epruvetki smo najprej pripravili reakcijsko zmes brez vzorca, in sicer v vrstnem redu, ki je prikazan v preglednici 5.

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje interne kontrole z reakcijo PCR v realnem času.

Komponenta	Končna koncentracija	Volumen za 1 vzorec
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Mix <sup>1</sup>	1x	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	0,8 µl
hu β-GLO se	0,5 µM	0,2 µl
hu β-GLO as	0,5 µM	0,2 µl
hu β-GLO FL	0,2 µM	0,2 µl
hu β-GLO LC	0,2 µM	0,2 µl
H <sub>2</sub> O		11,4 µl
DNA vzorca		5 µl
skupni volumen		20 µl

<sup>1</sup> LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe Mix vsebuje: FastStart Taq DNA polimerazo, reakcijski pufer z dNTP-ji (dUTP namesto dTTP) in 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

Pogoji pomnoževanja z aparaturom LightCycler® so navedeni v preglednici 6.

Preglednica 6: Program pomnoževanja interne kontrole z reakcijo PCR v realnem času.

Stopnja	Temperatura	Čas
1. začetna aktivacija	95 °C	10 min
2. 45 ciklov	denaturacija	95 °C 15 s
	prileganje	55 °C 8 s
	podaljševanje	72 °C 11 s
3. ohlajanje	40 °C	30 s

Fluorescenco, ki jo je oddal akceptorski fluorofor LC®-Red 640, smo merili na drugem meritvenem kanalu, pri valovni dolžini 640 nm. V primeru, da pomnoževanje ni bilo uspešno, bi morali vzorec redčiti in PCR ponoviti.

## 4 REZULTATI

Z metodo PCR v realnem času smo pregledali skupno 79 kužnin 56 bolnikov z dokazano legionelozo, in sicer 70 akutnih in rekonvalescentnih serumskih vzorcev ter 9 urinskih vzorcev. Podatki, ki smo jih uporabili za analizo rezultatov, so shranjeni v laboratorijskem informacijskem sistemu.

### 4.1 REZULTATI METODE PCR V REALNEM ČASU

PCR v realnem času smo uporabili kot kvalitativno metodo, zato smo vzorce po izolaciji in dokazovanju prisotnosti DNA legionele razdelili le na pozitivne in negativne. Rezultate smo opredelili kot pozitivne, če smo DNA uspeli pomnožiti po ročni in/ali avtomatski izolaciji. Skupaj z rezultati drugih testiranj so prikazani v preglednici 7. Bolnike smo označili s številkami od 1 do 56, ki smo jih ohranili v nadaljnjih analizah, prav tako smo s številkami od 1 do 77 označili serumske vzorce.

Preglednica 7: Zbirna preglednica rezultatov testiranja vzorcev bolnikov z legionelozo.

Bolnik	Serum	Spol	Starost (leta)	ELISA -tAg	PCR-dihala	Int.	Serologija (protitelesa)	PCR-serum	PCR-urin
1	1	Ž	85	+++	POZ		celokupna NEG	POZ	NEG
2	2	M	48	+++	NT	95	celokupna 1:128	POZ	NT
	3						celokupna 1:512		
3	4	Ž	40	+++	NT	27	celokupna NEG	POZ	NEG
	5						celokupna 1:1024		
4	6	M	37	+++	NT	11	IgG 1:128; IgM 1:64	POZ	POZ
	7						celokupna 1:1024		
5	8	M	59	+++	NT	11	IgG NEG; IgM NEG	POZ	NEG
	9						celokupna 1:512		
6	10	Ž	54	+++	NEG	8 41	IgG NEG; IgM 1:32	POZ	NEG
	11						celokupna 1:1024		
	12						celokupna 1:1024		

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7: Zbirna preglednica rezultatov testiranja vzorcev bolnikov z legionelozo.

Bolnik	Serum	Spol	Starost (leta)	ELISA -tAg	PCR-dihala	Int.	Serologija (protitelesa)	PCR-serum	PCR-urin
7	13	M	36	+++	NT	19	celokupna 1:512	NEG	NEG
	14						celokupna 1:512	POZ	
8	15	M	70	+	NT		celokupna 1:64	POZ	POZ
9	16	M	46	+	NT	6	celokupna NEG	NT	NT
	17						celokupna 1:1024	POZ	
10	18	Ž	55	+	NT	25	celokupna NEG	NT	NEG
	19						celokupna 1:1024	POZ	
11	20	M	71	SC	NT		celokupna NEG	POZ	NEG
12	21	M	24	NEG	POZ		celokupna 1:512	POZ	NT
13	22	M	57	NEG	POZ		celokupna NEG	POZ	NT
14	23	M	33	NEG	POZ		celokupna NEG	POZ	NT
15	24	M	56	NEG	POZ		celokupna NEG	POZ	NT
16	25	Ž	82	NT	POZ		celokupna 1:1024	POZ	NT
17	26	Ž	58	NT	POZ		celokupna NEG	POZ	NT
18	27	Ž	53	+++	NT		celokupna 1:512	NEG	NT
19	28	M	73	+++	NT		celokupna 1:64	NEG	NT
20	29	M	47	+++	NT		celokupna NEG	NEG	NT
21	30	Ž	59	+++	NT		celokupna NEG	NEG	NT
22	31	M	57	+++	NT	26	IgG NEG; IgM 1:32	NEG	NT
	32						celokupna 1:64	NEG	
23	33	M	57	+++	NT	12	celokupna NEG	NEG	NT
	34						celokupna 1:64	NEG	
24	35	M	36	+++	NT	22	celokupna NEG	NT	NT
	36						celokupna 1:512	NEG	
25	37	M	47	+++	NT	46	celokupna 1:64	NT	NT
	38						celokupna 1:1024	NEG	
26	39	M	50	++	NT		celokupna 1:1024	NEG	NT
27	40	M	73	++	NT		celokupna 1:512	NEG	NT
28	41	M	38	++	NT		celokupna 1:256	NEG	NT
29	42	M	42	++	NT		IgG 1:256; IgM 1:64	NEG	NT
30	43	M	48	++	NT		celokupna 1:128	NEG	NT

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7: Zbirna preglednica rezultatov testiranja vzorcev bolnikov z legionelozo.

Bolnik	Serum	Spol	Starost (leta)	ELISA -tAg	PCR-dihala	Int.	Serologija (protitelesa)	PCR-serum	PCR-urin
31	44	M	29	++	NT		celokupna 1:128	NEG	NT
32	45	M	47	++	NT		celokupna 1:64	NEG	NT
33	46	M	25	++	NT		IgG NEG; IgM NEG	NEG	NT
	47					6	IgG 1:512; IgM 1:32	NEG	
34	48	M	88	++	NT		IgG NEG; IgM NEG	NEG	NT
	49					26	celokupna 1:128	NEG	
35	50	M	77	++	NT		IgG NEG; IgM NEG	NEG	NT
	51					21	celokupna NEG	NEG	
36	52	M	77	+	POZ		IgG NEG; IgM NEG	NEG	NT
37	53	M	59	+	NT		celokupna 1:1024	NEG	NT
38	54	M	40	+	NT		celokupna 1:1024	NEG	NT
39	55	M	44	+	NT		celokupna 1:256	NEG	NT
40	56	M	33	+	NT		celokupna 1:128	NEG	NT
41	57	M	58	+	NT		celokupna 1:64	NEG	NT
42	58	M	68	+	NT		celokupna 1:64	NEG	NT
43	59	M	36	+	NT		celokupna NEG	NEG	NT
44	60	M	57	+	NT		celokupna NEG	NEG	NT
45	61	Ž	82	+	NT		celokupna NEG	NEG	NT
46	62	M	77	+	NT		celokupna NEG	NEG	NT
47	63	M	53	+	NT		celokupna NEG	NEG	NT
48	64	M	53	+	NT		IgG 1:128; IgM 1:32	NEG	NT
	65					12	celokupna 1:512	NEG	
49	66	M	73	+	NT		IgG NEG; IgM NEG	NEG	NT
	67					13	celokupna 1:256	NEG	
50	68	M	73	+	POZ		IgG 1:1024; IgM 1:128	NEG	NT
	69					18	celokupna 1:2048	NEG	
51	70	M	54	+	NT		IgG NEG; IgM NEG	NT	NT
	71					19	celokupna 1:512	NEG	
52	72	M	64	SC	NT		celokupna 1:512	NEG	NT
53	73	Ž	86	SC	NEG		IgG NEG; IgM NEG	NEG	NT
54	74	Ž	35	NEG	POZ		celokupna NEG	NEG	NT

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7: Zbirna preglednica rezultatov testiranja vzorcev bolnikov z legionelozo.

Bolnik	Serum	Spol	Starost (leta)	ELISA -tAg	PCR-dihala	Int.	Serologija (protitelesa)	PCR-serum	PCR-urin
55	75	M	62	NT	POZ	8	celokupna NEG	NT	NT
	76						celokupna 1:128		
56	77	M	37	NT	POZ		celokupna NEG	NEG	NT

ELISA-tAg = encimsko imunski test za dokaz topnega antiga v urinu; +++ = optična gostota (OD) nad 1,5; ++ = OD med 0,7 in 1,499; + = OD med 0,25 in 0,699; SC = siva cona; PCR-dihala/serum/urin = verižna reakcija s polimerazo v realnem času za dokaz DNA legionele v kužninah iz dihal/serumu/urinu; int. = št. dni med odvzemoma serumskih vzorcev; POZ = pozitivni rezultat; NEG = negativni rezultat; NT = ni testirano; siva barva označuje bolnike, pri katerih smo v serumu dokazali DNA legionele.

Bolniki vključeni v raziskavo so bili na dan vzorčenja stari od 24 do 88 let (povprečno 55,0 let), večina je bila moškega spola (45 moških in 11 žensk, v razmerju 4,1).

DNA legionele smo v serumih dokazali pri 17 od 56 (30,4 %) bolnikov z legionelozo. Pri 37 bolnikih je bil odvzet in testiran le posamezen oziroma prvi serumski vzorec, 13 bolnikom pa smo testirali tudi serumske vzorce, odvzete v razmaku 8-41 dni. Ker pri šestih bolnikih prvih odvzetih serumov ni bilo (dovolj), smo testirali le druge odvzete serumske vzorce. DNA legionele smo dokazali v 10 od 37 (27,0 %) edinih odvzetih serumskih vzorcev, v štirih od 13 (30,8 %) prvih ter v treh od 19 (15,8 %) drugih odvzetih serumskih vzorcev. V tretjem odvzetem serumu bolnika je nismo dokazali. Skupno smo DNA legionele dokazali v 17 od 70 (24,3 %) analiziranih serumskih vzorcev (preglednica 8). Pri bolniku z oznako 6 v preglednicah 7 in 12 smo DNA legionele dokazali v prvem serumskem vzorcu, v vzorcu, odvzetem po 8 dneh, pa je nismo več zaznali. Pri bolniku z oznako 10 smo DNA legionele dokazali v rekonvalescentnem vzorcu, odvzetem po 25 dneh. Pozitiven IgM titer v prvem ali drugem serumskem vzorcu je imelo 7 bolnikov, dva (28,6 %) sta bila pozitivna na prisotnost DNA legionele (preglednica 7).

Od 9 urinskih vzorcev bolnikov, pri katerih smo DNA legionele predhodno že dokazali v serumu, sta bila PCR pozitivna le dva (22,2 %) (preglednica 7).

Preglednica 8: Rezultati dokazovanja DNA legionele v serumskih vzorcih glede na čas odvzema vzorcev posameznega bolnika.

Serumski vzorci		Št. bolnikov	Št. (%) pozitivnih PCR-serum
testiran 1 vzorec bolnika (št. = 43)	prvi	37	10 (27,03 %)
	drugi	6	2 (33,33 %)
testirana 2 vzorca bolnika (št. = 12)	prvi	12	3 (25,00 %)
	drugi		1 (8,33 %)
testirani 3 vzorci bolnika (št. = 1)	prvi	1	1 (100,00 %)
	drugi		0 (0,00 %)
	tretji		0 (0,00 %)
skupaj		56	17 (30,36 %)

PCR- serum = verižna reakcija s polimerazo v realnem času za dokaz DNA legionele v serumu.

S primerjavo v preglednici 9 smo želeli ugotoviti, kdaj v poteku bolezni glede na pojav protiteles je metodo PCR smiselno uporabiti za dokazovanje DNA v serumu. Štiriindvajset bolnikov z legionelozo je imelo negativen rezultat serološkega testa v prvem ali edinem serumskem vzorcu, ki je bil poslan v preiskavo. DNA legionele smo dokazali v 8 (33,3 %) tovrstnih serumih. Protitelesa v drugem ali edinem poslanem serumskem vzorcu so bila dokazana pri 37 bolnikih. Na prisotnost DNA legionele je bilo pozitivnih 6 (16,2 %) takšnih serumov. Iz analize smo ob tem izključili bolnike, pri katerih prvih/drugih odvzetih serumskih vzorcev z metodo PCR v realnem času nismo testirali (preglednica 9).

Preglednica 9: Primerjava rezultatov dokazovanja DNA legionele v serumskih vzorcih glede na rezultate dokazovanja specifičnih protiteles.

Serologija	Št. bolnikov	Št. (%) pozitivnih PCR-serum
negativni v prvem ali edinem vzorcu	24	8 (33,33 %)
pozitivni v drugem ali edinem vzorcu	37	6 (16,22 %)

PCR- serum = verižna reakcija s polimerazo v realnem času za dokaz DNA legionele v serumu.

Na prisotnost topnega antiga legionele v urinu je bilo testiranih 52 bolnikov z legionelozo. Pri 47 (90,4 %) izmed njih je bil rezultat testa pozitiven. DNA legionele smo dokazali v serumu 15 od 52 (28,9 %) bolnikov. Kužnine 14 bolnikov so bile testirane z

metodo PCR. Dvanajst (85,7 %) bolnikov je bilo pozitivnih na prisotnost DNA legionele v kužnini iz dihal, v serumu pa smo DNA te bakterije dokazali pri 8 (57,1 %) bolnikih. S serološkimi metodami je bilo testiranih vseh 56 bolnikov. Specifična protitelesa proti legioneli so bila dokazana pri 31 (55,4 %) izmed njih. Pozitiven rezultat smo v večji meri dobili med 18 bolniki, pri katerih sta bila odvzeta po dva serumska vzorca za dokaz porasta specifičnih protiteles; okužba je bila z vsaj štirikratnim porastom titra protiteles potrjena pri 15 (83,3 %) bolnikih, pri 7 (38,9 %) bolnikih smo v serumu dokazali DNA.

Preglednica 10: Rezultati testiranja z ustaljenimi metodami in število (odstotek) bolnikov, pri katerih smo z metodo PCR v realnem času v serumskih vzorcih dokazali DNA legionele.

Metoda testiranja	Št. bolnikov	Št. (%) pozitivnih	Št. (%) pozitivnih PCR-serum
ELISA-tAg	52	47 (90,38 %)	15 (28,85 %)
PCR-dihala	14	12 (85,71 %)	8 (57,14 %)
Serologija: vsaj 4x porast titra	56	31 (55,36 %)	17 (30,36 %)
titer $\geq 1:128$	18	15 (83,33 %)	7 (38,89 %)
	38	16 (42,10 %)	10 (26,32 %)

ELISA-tAg = encimsko imunski test za dokaz topnega antiga v urinu; PCR-dihala/serum = verižna reakcija s polimerazo v realnem času za dokaz DNA legionele v kužninah iz dihal/serumu.

V preglednici 11 so prikazani rezultati PCR v realnem času glede na rezultate dokazovanja topnega antiga *L. pneumophila* v urinu. Z obema metodama smo testirali 52 bolnikov. DNA legionele smo dokazali v serumih 7 (46,7 %) bolnikov z močno pozitivnim rezultatom testa prisotnosti antiga legionele v urinu, pa tudi pri štirih (80,0 %) bolnikih z negativnim rezultatom testiranja (pri teh je bila DNA legionele dokazana še v kužninah iz dihal), medtem ko je v serumih bolnikov s srednje pozitivnim rezultatom testiranja nismo zaznali.

Preglednica 11: Primerjava rezultatov dokazovanja DNA legionele v serumskih vzorcih glede na rezultate dokazovanja topnega antiga Legiomella pneumophila v urinskih vzorcih.

PCR-serum	ELISA-tAg						Skupaj
	+++	++	+	SC	NEG	NT	
št. bolnikov	15	10	19	3	5	4	56
št. (%) pozitivnih	7 (46,67 %)	0 (0,00 %)	3 (15,79 %)	1 (33,33 %)	4 (80,00 %)	2 (50,00 %)	17 (30,36 %)

ELISA-tAg = encimsko imunski test za dokaz topnega antiga v urinu; PCR- serum = verižna reakcija s polimerazo v realnem času za dokaz DNA legionele v serumu; +++ = OD nad 1,5; ++ = OD med 0,7 in 1,499; + = OD med 0,25 in 0,699; SC = siva cona; POZ = pozitivni rezultat; NEG = negativni rezultat; NT = ni testirano.

## 4.2 PRIMERJAVA DVEH METOD ZA IZOLACIJO DNA

Iz 62 serumskih vzorcev 48 bolnikov ter iz 9 urinskih vzorcev smo DNA legionele izolirali tako z ročno kot z avtomatsko metodo. Zanimala nas je uspešnost izolacije DNA legionele glede na uporabljeno metodo (preglednice 12-14). Pri bolniku z oznako 36 je bila po avtomatski metodi izolacije DNA iz seruma reakcija PCR inhibirana, zato smo rezultat izključili iz analize. V preglednici 12 lahko opazimo, da so bile dobljene vrednosti Ct relativno visoke (pogosto nad 30).

Preglednica 12: Zbirna preglednica pozitivnih rezultatov (in vrednosti Ct) testiranja serumskih in urinskih vzorcev z metodo PCR v realnem času po ročni in avtomatski metodi izolacije DNA.

Bolnik	Serum	PCR-serum (Ct)		PCR-urin (Ct)	
		Ročna izolacija	Avtomatska izol.	Ročna izolacija	Avtomatska izol.
1	1	<b>POZ (21,31)</b>	NT	NEG	NEG
2	2	<b>POZ (31,02; 32,17)</b>	NEG	NT	NT
	3	NT	NT		
3	4	<b>POZ (31,27)</b>	<b>POZ (27,53)</b>	NEG	NEG
	5	NEG	NEG		
4	6	<b>POZ (34,78; 32,21)</b>	NEG	NEG	<b>POZ (36,37)</b>
	7	NEG	NEG		

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 12: Zbirna preglednica pozitivnih rezultatov (in vrednosti Ct) testiranja serumskih in urinskih vzorcev z metodo PCR v realnem času po ročni in avtomatski metodi izolacije DNA.

Bolnik	Serum	PCR-serum (Ct)		PCR-urin (Ct)	
		Ročna izolacija	Avtomatska izol.	Ročna izolacija	Avtomatska izol.
5	8	<b>POZ (31,85)</b>	NEG	NEG	NEG
	9	NEG	NEG		
6	10	<b>POZ (32,9)</b>	<b>POZ (33,94)</b>	NEG	NEG
	11	NEG	NEG		
	12	NEG	NEG		
7	13	NEG	NEG	NEG	NEG
	14	<b>POZ (28,46)</b>	NEG		
8	15	<b>POZ (34,35; 31,89)</b>	NEG	<b>POZ (29,72)</b>	NEG
9	16	NT	NT	NT	NT
	17	<b>POZ (35,23; 34,12)</b>	NEG		
10	18	NT	NT	NEG	NEG
	19	<b>POZ (36,13; 35,78)</b>	NEG		
11	20	NEG	<b>POZ (34,03)</b>	NEG	NEG
12	21	<b>POZ (28,81)</b>	<b>POZ (30,87)</b>	NT	NT
13	22	<b>POZ</b>	NT	NT	NT
14	23	<b>POZ</b>	NT	NT	NT
15	24	<b>POZ</b>	NT	NT	NT
16	25	<b>POZ (27,07)</b>	<b>POZ (28,89)</b>	NT	NT
17	26	<b>POZ</b>	NT	NT	NT

PCR-serum/urin = verižna reakcija s polimerazo v realnem času za dokaz DNA legionele v serumu/urinu;  
POZ = pozitivni rezultat; NEG = negativni rezultat; NT = ni testirano.

Rezultate smo opredelili kot pozitivne, če smo DNA legionele dokazali vsaj v enem testiranem serumskem/urinskom vzorcu bolnika. Ob uporabi ročne metode izolacije DNA smo DNA legionele dokazali v serumu 11 od 48 (22,9 %) bolnikov, v primeru uporabe avtomatizirane metode pa smo okužbo dokazali pri petih od 48 (10,4 %) bolnikov. V enem urinskem vzorcu smo DNA legionele dokazali ob uporabi ročne metode izolacije, v drugem pa ob uporabi avtomatizirane metode (11,1 %) (preglednica 13).

Preglednica 13: Primerjava rezultatov dokazovanja DNA legionele v serumskih in urinskih vzorcih po ročni in avtomatski metodi izolacije.

<b>Metoda izolacije</b>	<b>Serumski vzoreci</b>		<b>Urinski vzoreci</b>	
	št. bolnikov	št. (%) pozitivnih	št. bolnikov	št. (%) pozitivnih
ročna	48	11 (22,92 %)	9	1 (11,11 %)
avtomatska		5 (10,42 %)		1 (11,11 %)

V primeru serumskih vzorcev so se rezultati ujemali pri 40 (83,3 %) bolnikih. Z obema metodama izolacije je bilo negativno testiranih 36 od 48 (75,0 %) bolnikov. Pri štirih (8,3 %) bolnikih smo DNA legionele izolirali ob uporabi obeh metod. Pri 8 (16,7 %) bolnikih se rezultati niso ujemali. Prisotnost DNA smo dokazali z uporabo ene izmed metod, in sicer večinoma z ročno izolacijo (14,6 %) (preglednica 14).

Preglednica 14: Skladnost rezultatov dokazovanja DNA legionele v serumskih vzorcih po ročni in avtomatski metodi izolacije.

<b>Metoda izolacije</b>	<b>Ročna izolacija</b>	
	pozitivni	negativni
<b>Avtomatska izolacija</b>	pozitivni	4 (8,33 %)
	negativni	7 (14,58 %)
		36 (75,00 %)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Bakterije rodu *Legionella*, predvsem pa vrsta *L. pneumophila*, so povzročiteljice težke oblike pljučnice, ki jo lahko spremlja prizadetost drugih organskih sistemov. Bolezen najbolj ogroža imunsko oslabljene osebe. Hitra postavitev diagnoze legionelne pljučnice je ključnega pomena za pravočasno uvedbo ustreznega antibiotičnega zdravljenja in prepoznavanje izbruhov. Ker so klinični znaki nespecifični, je potrebna mikrobiološka potrditev okužbe (Diederer, 2008).

Okužbo z legionelami dokazujemo z različnimi diagnostičnimi testi, ki imajo določene omejitve. Metoda kultivacije legionel sicer velja za zlati standard in je najbolj specifičen test. Njene pomanjkljivosti se kažejo v zahtevnosti in dolgotrajnosti postopka, težji dosegljivosti kužnine pri številnih bolnikih in nizki občutljivosti. S serološkimi metodami z dokazom protiteles v parnih serumih lahko diagnozo postavimo le retrospektivno. Zaradi različnih imunskih odzivov bolnikov je rezultate seroloških metod včasih težko interpretirati. V diagnostiki okužb z legionelami se najpogosteje uporablja dokazovanje legionelnega topnega antiga v urinu. Postopek je hiter in omogoča odkrivanje zgodnje faze okužbe. Žal je zanesljiv le za *L. pneumophila* serološke skupine 1 in slabše občutljiv za dokazovanje bolnišničnih okužb, saj so te redkeje povezane z MAb 3/1-pozitivnim podtipom (Blyth in sod., 2009; Diederer, 2008; Murdoch, 2003a).

Nove možnosti hitre diagnostike okužb z legionelami prinaša uvajanje tehnike verižne reakcije s polimerazo (Herpers in sod., 2003). PCR omogoča specifično pomnoževanje zelo majhnih količin DNA vseh znanih vrst in seroloških skupin legionel (Murdoch, 2003a). PCR v realnem času ima prednosti v zmanjšani možnosti kontaminacije, naknadno rokovanje s PCR pridelki ni potrebno in rezultate pridobimo hitreje (Fields in sod., 2002). Pri odkrivanju povzročitelja v kužninah iz spodnjih dihal je metoda obetajoča. Legionelno

DNA lahko s PCR dokažemo tudi v nerespiratornih vzorcih, kot sta serum in urin, vendar pa je njena vloga pri tem manj jasna (Diederer, 2008; Murdoch, 2003a).

Namen diplomskega dela je bil preizkusiti metodo PCR v realnem času za dokazovanje DNA legionele v serumskih vzorcih. V raziskavo smo vključili vzorce bolnikov z legionelozo, pri katerih je bila okužba predhodno potrjena z dokazom topnega antiga legionele v urinu ali dokazom DNA legionele v kužnini iz dihal. DNA smo iz vzorcev izolirali na dva načina; ročno izolacijo smo opravili s kompletom reagentov QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Nemčija) in avtomatsko z reagenti MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Applied Science, Nemčija). Z reakcijo PCR v realnem času (sistem LightCycler® 2.0, Roche Applied Science, Nemčija) smo pomnožili del 23S-5S medgenske regije, specifične za genom *Legionella* spp. Da bi se izognili lažno pozitivnim in lažno negativnim rezultatom, smo uporabili tudi pozitivno, negativno in interno kontrolo reakcije. Dodatno smo testirali urinske vzorce bolnikov, pri katerih smo DNA legionele dokazali v serumih.

Legioneloza se pogosteje pojavlja pri osebah starejših od 40 let in osebah moškega spola, kar je značilno tudi za skupino bolnikov, zajeto v našo raziskavo (povprečna starost 55,5 let, 80,4 % moških). Z metodo PCR v realnem času smo testirali 70 serumskih vzorcev 56 bolnikov, med njimi so bili serumski vzorci štirih bolnikov testirani že v redni diagnostiki. DNA legionele smo dokazali v serumih 30,4 % bolnikov z legionelozo ter v 24,3 % vseh analiziranih serumskih vzorcev. Dokazali smo jo v 10 od 37 (27,0 %) edinih odvzetih serumskih vzorcev, v štirih od 13 (30,8 %) prvih ter v treh od 19 (15,8 %) drugih odvzetih serumskih vzorcev (preglednica 8). Po pričakovanjih smo pri testiranju prvih odvzetih vzorcev s PCR dobili več pozitivnih rezultatov kot pri testiranju drugih odvzetih vzorcev. Od 9 urinskih vzorcev bolnikov, pri katerih smo DNA legionele dokazali v serumih, sta bila z metodo PCR pozitivna le 2 (22,2 %) (preglednici 7 in 12). Metoda PCR je bila tako manj uspešna kot kažejo nekatere nedavne študije, omenjene v nadaljevanju (Diederer in sod., 2007b; Helbig in sod., 1999; Lindsay in sod., 2004).

Negativni rezultat testiranja z metodo PCR ne izključuje okužbe, saj je možnih več razlogov, zakaj do zaznave DNA ni prišlo. Vzorci morda niso bili odvzeti v primerenem

časovnem obdobju glede na potek bolezni in količina bakterijske DNA v njih ni bila zadostna. Raziskovalci so namreč v serumskih vzorcih nekaterih bolnikov DNA legionele zaznali šele nekaj dni po pričetku bolezni (van der Veerdonk in sod., 2009). Lindsay in sod. (2004) so z reakcijo PCR pomnoževali del 5S ribosomske DNA, produkte so dokazovali z metodo Southern blot. DNA legionele so dokazali v serumih kar 80,5 % bolnikov. Najvišjo koncentracijo DNA so zabeležili med 6 in 10 dnevom po nastopu bolezni. Na nizko začetno količino tarčne nukleinske kisline v vzorcih naše raziskave nakazujejo višje vrednosti Ct (preglednica 12). Pri bolniku z oznako 10 smo DNA legionele dokazali v rekonvalescentnem serumu, ki je bil odvzet po 25 dneh, medtem ko je pri bolniku z oznako 6 nismo več zaznali že v serumu, odvzetem v razmaku 8 dni (preglednica 7). Pri testiranju urinskih vzorcev so negativni rezultati lahko posledica neenakomernega sproščanja DNA v urin, čemur se izognemo z odvzemom vzorcev na več zaporednih dni (Murdoch in sod., 1996). Ustrezno protimikrobnemu zdravljenju hospitaliziranih bolnikov zmanjša preživetje bakterij v respiratornih vzorcih in s tem negativno vpliva na uspešnost reakcije PCR (Eržen in sod., 2007). Nemara ima takšen vpliv tudi na serumske in urinske vzorce.

Občutljivost PCR je odvisna od vrste in priprave vzorca. Naši rezultati kažejo, da so urinski vzorci manj primerni za tak način testiranja, vendar pa moramo upoštevati, da smo analizirali manjše število vzorcev. K boljšim rezultatom bi morda pripomogla predhodna koncentracija DNA oziroma večja izhodiščna količina vzorca. Na občutljivost nadalje vplivajo način izolacije nukleinske kisline, uporabljeni pari začetnih oligonukleotidov in različne metode PCR (Murdoch, 2003b; van der Veerdonk in sod., 2009). Diederer in sod. (2007b) so primerjali 3 različice PCR v realnem času, katerih tarčna zaporedja so bila 5S ribosomalna DNA, *mip* gen in 16S ribosomalna DNA. Prva različica se je izkazala za najbolj občutljivo, saj je dala pozitivne rezultate pri testiranju prvih dosegljivih serumskih vzorcev 54,4 % vključenih bolnikov, medtem ko drugi dve pri 52,9 % in 30,9 % bolnikov. Nizka občutljivost metode PCR je lahko prav tako posledica razpada DNA zaradi dolgotrajnega neustreznega shranjevanja ter večkratnega zamrzovanja in odtajevanja vzorcev pred testiranjem (Diederer in sod., 2007a; Helbig in sod., 1999).

Rezultate testiranja serumskih vzorcev s PCR v realnem času smo primerjali z rezultati, ki so jih v laboratoriju pridobili z ustaljenimi diagnostičnimi metodami. Topni antigen legionele so dokazali v urinu 47 od 52 (90,4 %) bolnikov, DNA legionele v kužnini iz dihal pri 12 od 14 (85,7 %) bolnikov in specifična protitelesa proti legioneli pri 31 od 56 (55,4 %) testiranih bolnikov (preglednica 10). Pri dokazovanju DNA legionele v serumu bolnikov smo dobili manj pozitivnih rezultatov kot s posamezno ustaljeno metodo. Največji odstotek pozitivnih rezultatov PCR smo dobili med bolniki, ki so bili testirani na prisotnost DNA legionele v kužnini iz dihal (57,1 % od 14 bolnikov). Serološke metode so dale več pozitivnih rezultatov med bolniki, pri katerih sta bila odvzeta po dva serumска vzorca za dokaz porasta specifičnih protiteles (38,9 % od 18 bolnikov) (preglednica 10). DNA legionele smo dokazali v 33,3 % prvih ali edinih poslanih negativnih serumov ter v 16,2 % drugih ali edinih poslanih serumov, v katerih so bila dokazana protitelesa (preglednica 9). To kaže, da je z reakcijo PCR serum smiselno testirati zgodaj po pojavi bolezenskih znakov.

DNA legionele smo dokazali v serumu 28,9 % od 52 bolnikov, ki so bili testirani na prisotnost topnega antiga legionele v urinu (preglednica 10). Dokazali smo jo pri 7 od 15 (46,7 %) bolnikov z močno pozitivnim rezultatom testiranja prisotnosti topnega antiga v urinu, a tudi pri štirih od petih (80,0 %) bolnikov z negativnim rezultatom testiranja (preglednica 11). Ti primeri so bili morda povzročeni s strani legionel, ki ne sodijo v vrsto *L. pneumophila*. Metoda dokazovanja antiga v urinu je zanje slabše občutljiva, medtem ko pri PCR takšne omejitve ni. Rezultati bi lahko bili negativni tudi zaradi razgradnje antiga ob dolgotrajnem shranjevanju urinskih vzorcev (Fields in sod., 2002). Lindsay in sod. (2004) so ugotovili, da sta koncentracija DNA legionele v serumu in koncentracija topnega antiga legionele v urinu najvišji v enakem časovnem obdobju. Helbig in sod. (1999) so DNA legionele dokazali v urinskih vzorcih 72 % bolnikov s potrjeno legionelozo. Največ pozitivnih rezultatov PCR so dobili med bolniki z antigenurijo (79 %). Sklepali so, da je DNA verjetno v urinu manj stabilna od LPS.

Ob uporabi ročne metode izolacije smo DNA legionele iz serumov izolirali pri večjem odstotku bolnikov kot ob uporabi avtomatske metode (22,9 % in 10,4 % od 48 bolnikov) (preglednica 13). Razlike med rezultati lahko pripisemo razlikam med postopkoma in

vplivu človeka. K visokemu odstotku ujemanja med rezultati obeh metod (83,3 %) je prispevalo veliko število negativnih rezultatov. S primerjavo le pozitivnih vzorcev je razlika v ujemaju bolj očitna (8,3 %) (preglednica 14). Neskladnost je lahko posledica kontaminacije vzorcev ali razgradnje DNA med izvedbo enega od načinov izolacije, na primer med centrifugiranjem. Negativni rezultat po avtomatski izolaciji je lahko posledica manjše občutljivosti metode zaradi slabše elucije. Za natančnejše rezultate bi bilo potrebno določiti koncentracijo izolirane DNA v izolatih.

Razvoj standardizirane molekularne diagnostike okužbe z legionelo bi pomenil velik prispevek k hitrejši diagnostiki, vendar podatki trenutno ne zadoščajo za zanesljivo oceno občutljivosti in specifičnosti PCR ali primerjavo PCR z drugimi metodami. Predvsem na območjih, kjer je *L. pneumophila* serološke skupine 1 manj pomembna, dokazovanje prisotnosti antigena legionele v urinu ne more predstavljati edine diagnostične metode. Za zanesljivo zgodnjo potrditev okužbe se zdi najboljša možnost kombinacija z metodo PCR oziroma PCR v realnem času. Potrebne so nadaljne raziskave, da bo mogoče opredeliti vlogo nerespiratornih vzorcev (Murdoch, 2003b).

## 5.2 SKLEPI

- Z metodo PCR v realnem času smo DNA legionele dokazali v serumih 30,4 % bolnikov z legionelozo in v 24,3 % vseh analiziranih serumskih vzorcev. Pri testiranju prvih odvzetih serumskih vzorcev smo dobili več pozitivnih rezultatov (30,8 %) kot pri testiranju drugih odvzetih vzorcev (15,8 %).
- Največ pozitivnih rezultatov PCR smo dobili med bolniki, ki so bili testirani na prisotnost DNA legionele v kužnini iz dihal (57,1 %), ter med bolniki z močno pozitivnim rezultatom testiranja prisotnosti topnega antiga legionele v urinu (46,7 %).
- Kljub številnim prednostim avtomatske metode izolacije, se je ta izkazala za manj občutljivo od ročne metode izolacije DNA legionele iz seruma (22,9 % in 10,4 % od 48 bolnikov).
- Z metodo PCR je serum smiselno testirati pred nastankom protiteles, torej kmalu po pojavu bolezenskih znakov, kar pomeni, da ima večjo vlogo za zgodnjo diagnostiko okužbe z legionelo.
- Preizkušena metoda PCR v realnem času ni zadosti občutljiva, da bi prestavljala edino diagnostično metodo za dokazovanje okužb z legionelami.

## 6 POVZETEK

Legionele so po Gramu negativni bacili, prisotni v različnih vlažnih okoljih, kjer parazitirajo znotraj nekaterih prosto živečih praživali. Danes poznamo več kot 50 vrst, klinično najpomembnejša pa je vrsta *L. pneumophila*, predvsem serološka skupina 1. Legionele se na človeka običajno prenesejo preko vdihavanja aerosolov iz umetnih vodnih sistemov. Povzročijo lahko težko obliko pljučnice, ki ji pravimo legionarska bolezen. Hitra postavitev diagnoze legionelne pljučnice je ključnega pomena za ustrezeno zdravljenje, vendar jo otežujejo nespecifične klinične značilnosti in pomanjkljivosti razpoložljivih diagnostičnih testov. PCR predstavlja obetajočo metodo za dokazovanje DNA legionele v vzorcih seruma in urina.

V naši nalogi smo želeli oceniti primernost uporabe metode PCR v realnem času za dokaz DNA legionele v serumskih vzorcih. S tem namenom smo pregledali 70 serumskih vzorcev 56 bolnikov z legionelozo. DNA smo sočasno izolirali z ročno (QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen) in avtomatizirano metodo (Magna Pure Compact nukleinske kisline Isolation Kit I, Roche Applied Science). PCR v realnem času smo izvedli v aparaturi LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science) in pri tem pomnoževali del specifične 23S-5S medgenske regije (*Legionella* species r-gene Primers/Probe mix, Argene Biosoft).

DNA legionele smo dokazali v serumu 30,4 % bolnikov z legionelozo in v 24,3 % vseh analiziranih serumskih vzorcev. Pri testiranju prvih odvzetih serumskih vzorcev s PCR smo dobili več pozitivnih rezultatov (30,8 %) kot pri testiranju drugih odvzetih vzorcev (15,8 %). Največ pozitivnih rezultatov PCR smo dobili med bolniki, ki so bili testirani na prisotnost DNA legionele v kužnini iz dihal (57,1 %), ter med bolniki z močno pozitivnim rezultatom testiranja prisotnosti topnega antiga legionele v urinu (46,7 %). Kljub številnim prednostim se je avtomatska metoda izolacije DNA izkazala za manj občutljivo v primerjavi z ročno metodo izolacije (22,9 % in 10,4 % od 48 bolnikov). Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da ima PCR v realnem času večjo vlogo za zgodnjo diagnostiko okužbe z legionelo, vendar pa ga ne moremo uporabljati kot edino diagnostično metodo.

## 7 VIRI

Atlas R.M. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. Environmental Microbiology, 1, 4: 283-293

Benin A.L., Benson R.F., Besser R.E. 2002. Trends in legionnaires disease, 1980–1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. Clinical Infectious Diseases, 35: 1039-1046

Berensmeier S. 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Applied Microbiology and Biotechnology, 73: 495-504

Blyth C.C., Adams D.N., Chen S.C.A. 2009. Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection. New South Wales Public Health Bulletin, 20, 10: 157-161

Carratalà J., Garcia-Vidal C. 2010. An update on *Legionella*. Current Opinion in Infectious Diseases, 23: 152-157

Cazalet C., Rusniok C., Brüggemann H., Zidane N., Magnier A., Ma L., Tichit M., Jarraud S., Bouchier C., Vandenesch F., Kunst F., Etienne J., Glaser P., Buchrieser C. 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nature Genetics, 36: 1165-1173

Cazalet C., Buchrieser C. 2007. *Legionella pneumophila* pathogenesis: lessons learned from genomics. V: *Legionella pneumophila*: pathogenesis and immunity. 1<sup>st</sup> ed. Hoffman P., Friedman H., Bendinelli M. (eds.). New York, Springer: 1-31

Cazalet C., Gomez-Valero L., Rusniok C., Lomma M., Dervins-Ravault D., Newton H.N., Sansom F.M., Jarraud S., Zidane N., Ma L., Bouchier C., Etienne J., Hartland E.L., Buchrieser C. 2010. Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome

uncovers unique strategies to cause legionnaires' disease. PLoS Genetics, 6, 2: e1000851, doi:10.1371/journal.pgen.1000851: 16 str.

Conover G.M., Martinez-Morales F., Heidtman M.I., Luo Z.Q., Tang M., Chen C., Geiger O., Isberg R.R. 2008. Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants. Cellular Microbiology, 10, 2: 514-528

D'Auria G., Jiménez-Hernández J., Peris-Bondia F., Moya A., Latorre A. 2010. *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. BMC Genomics, 11: 181, doi: 10.1186/1471-2164-11-181: 13 str.

De Buck E., Anné J., Lammertyn E. 2007. The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. Microbiology, 153: 3948-3953

Delisle G., Tomalty L. 2002. *Legionella pneumophila*. Washington, D.C., American Society for Microbiology: 1 str.

<http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=452&Lang=> (28. jun. 2010)

Den Boer J.W., Bruin J.P., Verhoef L.P., Van der Zwaluw K., Jansen R., Yzerman E.P. 2008. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006. Clinical Microbiology and Infection, 14, 5: 459-466

Declerck P. 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. Environmental Microbiology, 12, 3: 557-566

Diederens B.M.W. 2008. *Legionella* spp. and legionnaires' disease. Journal of Infection, 56, 1: 1-12

Diederer B.M.W., Bruin J.P., den Boer J.W., Marcel F. Peeters M.F., Yzerman E.P.F. 2007a. Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 1255-1255

Diederer B.M.W., de Jong C.M.A., Marmouk F., Kluytmans J.A.J.W., Peeters M.F., van der Zee A. 2007b. Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 94-101

Edelstein P.H. 2007. Urine antigen tests positive for pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 2: 229-231

Edelstein P.H., Cianciotto N.P. 2006. *Legionella* species and legionnaires' disease. V: The prokaryotes. Volume 6: Proteobacteria: Gamma subclass. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 988-1033

Edwards M.T., Fry N.K., Harrison T.G. 2008. Clonal population structure of *Legionella pneumophila* inferred from allelic profiling. *Microbiology*, 154: 852-864

Elliot J.A., Johnson W. 1981. Immunological and biochemical relationships among flagella isolated from *Legionella pneumophila* serogroups 1, 2 and 3. *Infection and Immunity*, 33, 2: 602-610

Engleberg N.C., Carter C., Weber D.R., Cianciotto N.P. Eisenstein B. 1989. DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infection and Immunity*, 57, 4: 1263-1270

Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezni v Sloveniji, 2009. 2010. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 98 str.  
[http://www.ivz.si/gradiva\\_nalezljive\\_bolezni?pi=5&\\_5\\_Filename=2491.pdf&\\_5\\_MediaId=2491&\\_5\\_AutoResize=false&pl=105-5.3.](http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (23. okt. 2010)) (23. okt. 2010)

Eržen R., Korošec P., Šilar M., Košnik M. 2007. Vpliv protimikrobnega zdravljenja na občutljivost tehnike PCR pri okužbah z *Legionello pneumophilo*-prikaz treh primerov. Zdravstveni Vestnik, 76: 95-100

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. III, Smith T.F. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews, 19, 1: 165-256

Euzéby J.P. 2010. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Legionella*. Toulouse, Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire: 23 str.  
<http://www.bacterio.cict.fr/l/legionella.html> (28. jun. 2010)

Faulkner G., Garduño R.A. 2002. Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. Journal of Bacteriology, 184, 24: 7025-7041

Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. 2002. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clinical Microbiology Reviews, 15, 3: 506-526

Gaia V., Fry N.K., Afshar B., Lück P.C., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R., Harrison T.G. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology, 43, 5: 2047-2052

Ginevra C., Lopez M., Forey F., Reyrolle M., Meugnier H., Vandenesch F., Etienne J., Jarraud S., Molmeret M. 2009. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with legionnaires' disease. Journal of Clinical Microbiology, 47, 4: 981-987

Hammer B.K., Swanson M.S. 1999. Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. Molecular Microbiology, 33: 721-731

Helbig J.H., Bernander S., Castellani Pastorini M., Etienne J., Gaia V., Lauwers S., Lindsay D., Lück P.C., Marques T., Mentula S., Peeters M.F., Pelaz C., Struelens M., Uldum S.A., Wewalka G., Harrison T.G. 2002. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21, 10: 710-716

Helbig J.H., Engelstradter T., Maiwald M., Uldum S.A., Witzleb W., Lück P.C. 1999. Diagnostic relevance of the detection of Legionella DNA in urine samples by polymerase chain reaction. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 18: 716-722

Herpers B.L., de Jongh B.M., van der Zwaluw K., van Hannen E.J. 2003. Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology, 41, 10: 4815-4816

Hojš A., Petrovič A., Furlan N. 2002. Preprečevanje legioneloz v javnih objektih. Zdravstveno varstvo, 41: 299-304

Hornei B., Ewig S., Martin E., Tartakovsky I., Lajoie L., Dangendorf F., Surman-Lee S., Fields B. 2007a. Legionellosis. V: *Legionella* and the prevention of legionellosis. Bartram J., Chartier Y., Lee J.V., Pond K., Surman-Lee S. (eds.). Geneva, World Health Organization Press: 1-28

Hornei B., Ewig S., Martin E., Tartakovsky I., Lajoie L., Surman-Lee S., Fry N., Fields B. 2007b. Laboratory aspects of *Legionella*. V: *Legionella* and the prevention of legionellosis. Bartram J., Chartier Y., Lee J.V., Pond K., Surman-Lee S. (eds.). Geneva, World Health Organization Press: 175-194

Ieven M. 2007. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infection. Journal of Clinical Virology, 40: 259-276

Isberg R.R., O'Connor T., Heidtman M. 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cozy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 1: 13-24

Joseph C.A., Ricketts K.D. 2010. Legionnaires' disease in Europe 2007–2008. *Eurosurveillance*, 15, 8: pii=19493: 8 str.  
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19493> (26. jul. 2010)

Kirchgesse M., Schlagenhauf R., Kirchner B., Adem C., Malmberg W., Tgetgel A., Huber I., Nieswandt V., Walter T. 2003. The new MagNA Pure Compact nucleic acid isolation kits – fast and flexible fully automated sample preparation. *Biochemica*, 4: 12-14

Kozak N.A., Benson R.F., Brown E., Alexander N.T., Taylor T.H. Jr., Shelton B.G., Fields B.S. 2009. Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 8: 2525-2535

Lau H.Y., Ashbolt N.J. 2009. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 368-378

*Legionella* on BCYE agar plate. 2007. Phoenix, EMLab P&K: 1 str.  
[http://www.emlab.com/s/services/legionella\\_testing\\_lab.html](http://www.emlab.com/s/services/legionella_testing_lab.html) (7. okt. 2010)

Lindsay D.S.J., Abraham W.H., Findlay W., Christie P., Johnston F., Edwards G.F.S. 2004. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 3: 183-187

Lück P.C. 2008. Diagnostics and clinical disease treatment. V: *Legionella: Molecular microbiology*. Heuner K., Swanson M. (eds.). Norfolk, Horizon Scientific Press: 19-34

Lück P.C., Steinart M. 2006. Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Legionella*-Infektion. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 49, 5: 439-449

Lüneberg E., Zähringer U., Knirel Y.A., Steinmann D., Hartmann H., Steinmetz I., Rohde M., Köhl J., Frosch M. 1998. Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. Journal of Experimental Medicine, 188, 1: 49-60

Mackay M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10: 190-212

Molmeret M., Horn M., Wagner M., Santic M., Kwaik Y.A. 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Applied and Environmental Microbiology, 71, 1: 20-28

Molmeret M., Jones S., Santic M., Habyarimana F., Garcia Esteban M.T., Abu Kwaik J. 2010. Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by *Legionella pneumophila* after bacterial escape into the host cell cytosol. Environmental Microbiology, 12, 3: 704-715

Molofsky A.B., Swanson M.S. 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. Molecular Microbiology, 53, 1: 29-40

Muder R.R., Yu V.L. 2002. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. Clinical Infectious Diseases, 35: 990-998

Murdoch D.R. 2003a. Diagnosis of *Legionella* infection. Clinical Infectious Diseases, 36, 1: 64-69

Murdoch D.R. 2003b. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. Clinical Infectious Diseases, 36, 9: 1162-1170

Murdoch D.R., Walford E.J., Jennings L.C., Light G.J., Schousboe M.I., Chereshsky A.Y., Chambers S.T., Town G.I. 1996. Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. Clinical Infectious Diseases, 23, 3: 475-480

Neumeister B., Faigle M., Sommer M., Zähringer U., Stelter F., Menzel R., Schütt C., Northoff H. 1998. Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. Infection and Immunity, 66, 9: 4151-4157

Neild A.L., Roy C.R. 2004. Immunity to vacuolar pathogens: what can we learn from *Legionella*. Cellular Microbiology, 6, 11: 1011-1018

Newton H.J., Ang D.K.Y., van Driel I.R., Hartland E.L. 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clinical Microbiology Reviews, 23, 2: 274-298

Odločba Komisije z dne 28. aprila 2008 o spremembi Odločbe 2002/253/ES o opredelitvi primerov nalezljivih bolezni za poročanje mreži Skupnosti v skladu z Odločbo št. 2119/98/ES Evropskega parlamenta in Sveta. 2008. Uradni list Evropske unije, 51, L 159: 46-90

Palusińska-Szysz M., Cendrowska-Pinkosz M. 2009. Pathogenicity of the family Legionellaceae. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 57, 4: 279-290

Ratcliff R.M., Lancer J.A., Manning P.A., Heuzenroeder M.W. 1998. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. Journal of Clinical Microbiology, 36, 6: 1560-1567

Ratzow S., Gaia V., Helbig J.H., Fry N.K., Lück P.C. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding *N*-acylneuraminate cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 6: 1965-1968

Steinert M., Hentschel U., Hacker J. 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 149-162

Steinert M., Heuner K., Buchrieser C., Albert-Weissenberger C., Glöckner G. 2007. *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology*, 297: 577-587

Stout J.E., Yu V.L. 1997. Legionellosis. *New England Journal of Medicine*, 337, 10: 662-667

Surman-Lee S., Fields B., Hornei B., Ewig S., Exner M., Tartakovsky I., Lajoie L., Dangendorf F., Bentham R., Cabanes P.A., Fourrier P., Trouvet T., Wallet F. 2007. Ecology and environmental sources of *Legionella*. V: *Legionella* and the prevention of legionellosis. Bartram J., Chartier Y., Lee J.V., Pond K., Surman-Lee S. (eds.). Geneva, World Health Organization Press: 29-38

Thürmer A., Helbig J.H., Jacobs E., Lück P.C. 2009. PCR-based 'serotyping' of *Legionella pneumophila*. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 588-95

Tossa P., Deloge-Abarkan M., Zmirou-Navier D., Hartemann P., Mathieu L. 2006. Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health*, 6: 112, doi: 10.1186/1471-2458-6-112: 10 str.

Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159

Valentine-Thon E. 2002. Quality control in nucleic acid testing – where do we stand?  
Journal of Clinical Virology, 25: 13-21

van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisson S, Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13, 3: 1-46

van der Veerdonk F.L., de Jager C.P., Schellekens J.J., Huijsmans C.J., Beaumont F., Hermans M.H., Wever P.C. 2009. *Legionella pneumophila* DNA in serum samples during Legionnaires' disease in relation to C-reactive protein levels. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 28, 4: 371-376

Wagner C., Krönert C., Lück P.C., Jacobs E., Cianciotto N.P., Helbig J.H. 2007. Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* reveals genes associated with lipopolysaccharide synthesis and recognition by typing monoclonal antibodies. Journal of Applied Microbiology, 103, 5: 1975-1982

Yoder J., Roberts V., Craun G.F., Hill V., Hicks L., Alexander N.T., Radke V., Calderon R.L., Hlavsa M.C., Beach M.J., Roy S.L. 2008. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking—United States, 2005–2006. Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries, 57: 39-62

Yu V.L., Plouffe J.F., Pastorius M.C., Stout J.E., Schousboe M., Widmer A., Summersgill J., File T., Heath C.M., Paterson D.L., Chereshsky A. 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. Journal of Infectious Diseases, 186, 1: 127-128

## ZAHVALA

Najprej bi se želela zahvaliti mentorici, doc. dr. Darji Keše, za ponujeno priložnost opravljanja diplomske naloge na področju, ki me zanima, za strokovno vodenje, dragocene nasvete, spodbudne besede in razumevanje.

Recenzentki, prof. dr. Evi Ružić-Sabljić, hvala za skrben pregled diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem iz Laboratorija za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami, ki so mi pri delu priskočili na pomoč. Hvala zlasti Roku Kogoju za potrpežljivo uvajanje v laboratorijsko delo in njegova pojasnila.

Najlepša hvala družini za vsestransko podporo in prijateljem, da so mi polepšali študijsko obdobje.