

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Patricia VOLLMEIER

**ZNOTRAJCELIČNO RAZMNOŽEVANJE
BAKTERIJE LEGIONELE V HUMANIH
MONOCITIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Patricia VOLLMEIER

**ZNOTRAJCELIČNO RAZMNOŽEVANJE BAKTERIJE LEGIONELE
V HUMANIH MONOCITIH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**INTRACELLULAR MULTIPLICATION OF BACTERIA
LEGIONELLA IN HUMAN MONOCYTES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila za mentorico magistrskega dela imenovana doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol., ter za recenzenta prof. dr. Rok Kostanjšek.

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

Recenzent: prof. dr. Rok Kostanjšek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

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

Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Patricia Vollmeier

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK UDK 579.61:579.24/.25:579.841(043)=163.6
- KG medicinska mikrobiologija/legionela/*Legionella pneumophila*/serološka skupina 1/
znotrajcelično razmnoževanje/monociti/kultivacija/BMPA- α /elektronska
mikroskopija
- AV VOLLMEIER, Patricia, dipl. mikrobiol. (UN)
- SA KEŠE, Darja (mentorica)/KOSTANJŠEK, Rok (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
- LI 2015
- IN ZNOTRAJCELIČNO RAZMNOŽEVANJE BAKTERIJE LEGIONELE V
HUMANIH MONOCITIH
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
- OP XI, 70 str., 12 pregl., 34 sl., 77 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Legionele so aerobne, po Gramu negativne bakterije, katerih glavno bivalno okolje je voda. Taksonomsko jih uvrščamo v rod *Legionella* in družino *Legionellaceae*. So oportunistični patogeni, ki povzročajo pljučnice pri ljudeh. Najbolj virulentna vrsta je *Legionella pneumophila* serološke skupine 1. Razmnožujejo se znotrajcelično v pljučnih makrofagih, v naravnem okolju pa v praživalih. Skupno ime za bolezni, ki jih povzročajo je legioneloza. Poteka lahko kot legionarska bolezen ali pontiaška vročica. V naši nalogi smo želeli ugotoviti ali obstajajo razlike v znotrajceličnem razmnoževanju med bolj virulentnimi in manj virulentnimi podtipi *L. pneumophila* sg. 1. Dokazali smo razlike v virulentnosti posameznih podtipov, pri čemer je bil najvirulentnejši podtip Philadelphia, ki tudi običajno povzroča največ okužb. Prav tako smo v kultiviranih makrofagih z elektronsko mikroskopijo potrdili značilen cikel razmnoževanja legionel.

KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2

DC UDC 579.61:579.24/.25:579.841(043)=163.6

CX medical microbiology/legionellae/*Legionella pneumophila*/serogroup 1/intracellular multiplication/monocytes/cultivation/BMPA- α /electron microscopy

AU VOLLMEIER, Patricia

AA KEŠE, Darja (supervisor)/KOSTANJŠEK, Rok (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2015

TI INTRACELLULAR MULTIPLICATION OF BACTERIA LEGIONELLA IN HUMAN MONOCYTES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO XI, 70 p., 12 tab., 34 fig., 77 ref.

LA sl

AL sl/en

AB *Legionella* spp. are ubiquitous, aerobic, Gram negative bacteria that mainly reside in aqueous environments. The genus *Legionella* contains more than 50 opportunistic species that can cause pneumonia in humans; however the most commonly found species in human infections is *L. pneumophila* serogroup 1. In aqueous environments legionellae replicates intracellularly in amoebas. Similarly when they infect humans, they replicate in alveolar macrophages. Successful infection and colonization of the human respiratory tract can result in a wide spectre of symptoms from a mild flu like disease (Pontiac's fever) to a serious life threatening pneumonia (Legionnaires' disease). The objective of the thesis was to assess wheter *L. pneumophila* sg. 1 subtypes Philadelphia, Knoxville, Benidorm, Oxford and Bellingham show differences in virulence "in vitro". Additionally we also observed the intracellular replication of *L. pneumophila* using electron microscopy.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ZGODOVINA	4
2.2 TAKSONOMIJA	4
2.3 OSNOVNE ZNAČILNOSTI LEGIONEL	6
2.3.1 Morfologija in mikrobiološke značilnosti bakterije	6
2.3.2 Legionelam podobni amebni patogeni (LLAP)	8
2.3.3 Mikrobna ekologija	9
2.3.4 Življenjski krog bakterije	12
2.3.5 Genom	16
2.3.6 Virulentni dejavniki	18
2.3.6.1 Zunanja membrana	19
2.3.6.2 Periplazma	22
2.3.6.3 Notranja membrana	22
2.3.6.4 Bički in pili	23
2.3.6.5 Vezikli zunanje membrane (OMV)	23
2.3.6.6 Genetski dejavniki, ki omogočajo znotrajcelični parazitizem	24
2.3.6.7 Sistemi izločanja	25
2.3.6.7.1 Sistem izločanja tipa II T2SS ali Lsp	25
2.3.6.7.2 Sistem izločanja tipa IV T4SS ali Dot/Icm	26
2.4 PATOGENEZA	28
2.4.1 Način okužbe	28
2.4.2 Imunski odgovor gostitelja	28
2.4.3 Bolezni, ki jih povzročajo legionele	30
2.4.4 Epidemiologija okužb	31

2.4.5	Zdravljenje in preprečevanje okužb	35
2.4.6	Laboratorijska diagnostika	36
2.4.6.1	Osamitev in kultivacija legionel	36
2.4.6.2	Metoda neposredne imunofluorescence z uporabo monoklonskih protiteles (DIF).....	38
2.4.6.3	Dokaz legionelnega topnega antigena v urinu	38
2.4.6.4	Serološke metode	39
2.4.6.5	Dokaz legionelnih nukleinskih kislin	39
2.4.6.6	Tipizacija legionel.....	40
3	MATERIALI IN METODE	42
3.1	MATERIALI	42
3.1.1	Kemikalije in reagenti.....	42
3.1.2	Drobni laboratorijski material.....	42
3.1.3	Laboratorijska oprema.....	43
3.2	METODE	43
3.2.1	Gojenje legionel	43
3.2.2	Gojenje humanih monocitnih celic Mono Mac 6 (MM6)	44
3.2.3	Okužba celic MM6 z legionelo in znotrajcelično razmnoževanje.....	45
3.2.4	Elektronska mikroskopija	48
4	REZULTATI	49
4.1	ZNOTRAJCELIČNO RAZMNOŽEVANJE LEGIONEL V CELICAH MM6 ...	49
4.2	ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	57
5	RAZPRAVA	59
6	SKLEPI	62
7	POVZETEK.....	63
8	VIRI.....	64
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste bakterij rodu <i>Legionella</i> (DSMZ, 2014)	5
Preglednica 2: Število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Philadelphia po petdnevnem gojenju na ploščah BMPA- α	49
Preglednica 3: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Philadelphia.....	49
Preglednica 4: Število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Knoxville po petdnevnem gojenju na ploščah BMPA- α	51
Preglednica 5: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Knoxville.....	51
Preglednica 6: Število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Benidorm po petdnevnem gojenju na ploščah BMPA- α	52
Preglednica 7: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Benidorm.....	52
Preglednica 8: Število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Oxford po petdnevnem gojenju na ploščah BMPA- α	53
Preglednica 9: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Oxford	53
Preglednica 10: Število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Bellingham po petdnevnem gojenju na ploščah BMPA- α	55
Preglednica 11: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Bellingham	55
Preglednica 12: Število CFU glede na čas inkubacije za posamezne podtipe <i>L. pneumophila</i> sg. 1.....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Fenotipsko razlikovanje sevov <i>L. pneumophila</i> sg. 1 s pomočjo seta monoklonskih protiteles Dresdenskega panela (Helbig in sod., 2002)	5
Slika 2: Bakterije <i>L. pneumophila</i> . (levo) Običkana celica <i>L. pneumophila</i> sg1 (merilo: 1 µm) (Elliott in Johnson, 1981). (desno) Ameba <i>H. vermiformis</i> okužena z bakterijo <i>L. pneumophila</i> po dvajsetih urah inkubacije (povečava: 10000 x) (Abu Kwaik, 1996)	7
Slika 3: Legionele na obogatenih trdnih gojiščih. (levo) videz iridescence in brušenega stekla (Delisle in Tomalty, 2002), (desno) kolonije na agarju BMPA-α	8
Slika 4: Življenjski cikel bakterije <i>L. pneumophila</i> v praživalih (Richards in sod., 2013). 10	
Slika 5: Razvoj in sprostitvev legionel v sistemih pitne vode (vstop legionel in praživali v vodovodni sistem [1], absorbcija v biofilme [2], kolonizacija bakterij [3a]/zaužitje s strani praživali [3b]; usoda legionel po zaužitju varira [4]) (Lau in Ashbolt., 2009)	11
Slika 6: Okužba celice z bakterijo <i>L. pneumophila</i> ; pot okužbe lahko razdelimo v pet korakov (Hoffman in sod., 2014: 16)	14
Slika 7: Shematski in časovni prikaz razvojnega cikla bakterije <i>L. pneumophila</i> (Machner in sod., 2011)	16
Slika 8: Pregled pangenoma (diagram prikazuje skupni del genoma legionel in gene, specifične za seve <i>L. pneumophila</i> Alcoy, Philadelphia, Lens, Paris in Corby; geni, ki se prekrivajo najmanj za 70 % dolžine in imajo 80 % podobnost, so ortologni) (D'Auria in sod., 2010)	18
Slika 9: Shematski prikaz celične stene po Gramu negativne bakterije <i>L. pneumophila</i> (Shevchuk in sod., 2011)	20
Slika 10: Struktura LPS bakterije <i>L. pneumophila</i> (struktura nakazuje njene različne regije; O-specifična veriga, jedro, ki ga sestavlja zunanje in notranje jedro in lipid A) (Shevchuk in sod., 2011)	21
Slika 11: Mikrografi bakterije <i>L. pneumophila</i> in veziklov zunanje membrane (OMV). (A) <i>L. pneumophila</i> odceplja OMV (puščica) iz svoje površine med rastjo v tekočem gojišču, (B) OMV znotraj fagosomov <i>D. discoideum</i> (Shevchuk in sod., 2011)	24
Slika 12: Model sistema izločanja tipa II; C-M = komponente jedra T2S, D = dodekamerični protein sekretin, G = glavni protein psevdopilin, H-K = manjši psevdopilini, O = protein prepilin peptidaza (Cianciotto, 2009)	26
Slika 13: Dot/Icm aparat (domnevne lokacije in topološka razmerja komponent Dot/Icm v celični steni <i>L. pneumophila</i> so pokazane na podlagi študije stabilnosti posameznih beljakovin v prisotnosti opredeljenih delecijjskih mutacij) (Isberg in sod., 2009)	27
Slika 14: Pot okužbe z bakterijami vrste <i>L. pneumophila</i> (A: v okolju lahko vztraja v biofilmih in raste v praživalih; B: pri prenosu s tehničnimi vektorji, kot so prhe, klimatske naprave itd.) (Steinert in sod., 2002)	28
Slika 15: Prirojeni in pridobljeni imunski odziv na okužbo z legionelo (Neild in Roy, 2004)	30

Slika 16: Prijavljeni primeri legioneloze v Sloveniji od 1998 do 2013 (IVZ, 2013; NIJZ, 2014).....	33
Slika 17: Prijavljeni primeri legioneloze po mesecih v letu 2012 (IVZ, 2013).....	34
Slika 18: Prijavljeni primeri legioneloze v Sloveniji po starostnih skupinah v letu 2013 (NIJZ, 2014)	35
Slika 19: Test neposredne imunofluorescence; na sliki vidimo bakterije <i>L. pneumophila</i> (Delisle in Tomalty, 2002).....	38
Slika 20: Shema postopka metode dela	47
Slika 21: Kolonije <i>L. pneumophila</i> Philadelphia na gojiščih BMPA- α po petdnevni inkubaciji	50
Slika 22: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Philadelphia tekom petdnevnega gojenja legionel	50
Slika 23: Kolonije <i>L. pneumophila</i> Knoxville na ploščah BMPA- α po petdnevni inkubaciji	51
Slika 24: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Knoxville tekom petdnevnega gojenja legionel	52
Slika 25: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Benidorm tekom petdnevnega gojenja legionel	53
Slika 26: Kolonije <i>L. pneumophila</i> Oxford na ploščah BMPA- α po petdnevni inkubaciji.	54
Slika 27: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Oxford tekom petdnevnega gojenja legionel	54
Slika 28: Kolonije <i>L. pneumophila</i> Bellingham na ploščah BMPA- α po petdnevni inkubaciji	55
Slika 29: Povprečno število CFU/mL <i>L. pneumophila</i> Bellingham tekom petdnevnega gojenja legionel	56
Slika 30: Kinetika rasti posameznih podtipov <i>L. pneumophila</i> sg. 1 v celicah MM6.....	57
Slika 31: Humane celice MM6; vidni so posamezni monociti (črna puščica) in njihova jedra, legionele niso prisotne (merilo je 5 μ m).....	57
Slika 32: Lokacija legionel (rdeča puščica) in celic MM6 (črna puščica) po 3 urah razmnoževanja; A: legionele so med monociti (merilo: 100 nm), B: legionela vstopa v monocit, membrana se prične uvičavati (merilo: 0.5 μ m), C: nekatere legionele so že vstopile v monocit (merilo: 1 μ m).....	58
Slika 33: Legionele (rdeča puščica) po 24 urah razmnoževanja v monocitih (manjša povečava; merilo: 5 μ m).....	58
Slika 34: Lokacija legionel (rdeča puščica) in celic MM6 po 24 urah razmnoževanja; monocit poč, legionele potujejo iz celice (večja povečava; merilo: 1 μ m).....	58

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
BCYE- α	obogateno gojišče za izolacijo legionel (ang. buffered charcoal yeast extract agar)
BMPA- α	obogateno selektivno gojišče za izolacijo legionel
CAP	pljučnica pridobljena v domačem okolju (ang. community acquired pneumonia)
CFU	število mikroorganizmov, ki lahko tvori kolonije (ang. colony forming units)
CYE	osnovno gojišče za izolacijo legionel (ang. charcoal yeast extract agar)
DFA	test neposredne imunofluorescence (ang. direct fluorescent antibody detection)
Dot/Icm	ang. defect in organelle trafficking/intracellular multiplication
ELISA	encimsko-imunski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
IFA	test posredne imunofluorescence (ang. immunofluorescence antibody assay)
IFN- γ	interferon gama, protein imunskega sistema
<i>L. pn.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LCV	<i>L. pneumophila</i> -vsebujoča vakuola
LLAP	legionelam podobni amebni patogeni (ang. <i>legionella</i> -like amoebal pathogens)
LPS	lipopolisaharid
MAb	monoklonsko protitelo (ang. monoclonal antibody)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (ang. minimal inhibitory concentration)
MIF	znotrajcelična oblika bakterije, ki je infektivna in se ne razmnožuje (ang. mature intracellular form)
Mip	ang. macrophage infectivity potentiator

MLST	metoda tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (ang. multilocus sequence typing)
MM6	celična kultura mono Mac 6
MOMP	glavna beljakovina zunanje membrane (ang. major outer membrane protein)
NK	nukleinska kislina
OMV	vezikli zunanje membrane (ang. outer membrane vesicles)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
RF	replikativna oblika bakterije (ang. replicative form)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (ang. real-time polymerase chain reaction)
SBT	sekvenčna analiza genov (ang. sequence-based typing)
sg. 1	serološka skupina 1
T2SS	sistem izločanja tipa II, imenovan tudi sistem Lsp (ang. type II secretion system)
T4SS	system izločanja tipa IV, imenovan tudi sistem Dot/Icm (ang. type IV secretion system)
VBNC	viabilna oblika bakterije, katere ne moremo gojiti (ang. viable but not culturable)

1 UVOD

Legionele so aerobni, po Gramu negativni, pleomorfni bacili. Njihovo glavno bivalno okolje je voda. Uvrščamo jih v rod *Legionella* in družino *Legionellaceae*. Legionele so oportunistični patogeni, največkrat povzročitelji pljučnic pri ljudeh (Keše, 2002). Najpomembnejša in tudi najbolj virulentna vrsta je *Legionella pneumophila*, ki v Evropi in Združenih državah Amerike povzroča več kot 90 odstotkov vseh legioneloz (Hornei in sod., 2007).

Najpogosteje se bakterije prenašajo na ljudi z vdihavanjem aerosoliziranih vodnih kapljic, ki vsebujejo infektivno obliko bakterije (Harb in sod., 2000). Razmnožujejo se znotrajcelično v pljučnih makrofagih. V naravnem okolju se legionele razmnožujejo v praživalih. Pri okužbi imajo ključno vlogo različni virulentni dejavniki (Shevchuk in sod., 2011)

Legionele povzročajo bolezni, ki jih s skupnim imenom označujemo legioneloza. Poteka v dveh oblikah. To sta legionarska bolezen in pontiaška vročica. Legionarska bolezen poteka kot pljučnica (Steinert in sod., 2002). Pljučnica je lahko blažja ali življenjsko ogrožujoča predvsem v primeru nezdravljenja ter pri starejših in imunsko oslabljenih ljudeh (Edelstein, 2008). Pontiaška vročica pa ima gripi podoben potek bolezni (Steinert in sod., 2002).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Legionele so ubikvitarne, po Gramu negativne bakterije, ki povzročajo pljučnice pri ljudeh. Njihovo naravno okolje so vodni habitati, vlažna zemlja in mulj, kjer parazitirajo v praživalih, predvsem v amebah. Približno 20 vrst legionel je patogenih za človeka, a najbolj virulentna vrsta je *Legionella pneumophila* (Diederer, 2008). *Legionella pneumophila* vsebuje 16 do sedaj prepoznanih seroloških skupin (sg), od katerih *L. pneumophila* serološke skupine (sg. 1) povzroča več kot 80 % zabeleženih legioneloz. Poznano je, da *L. pneumophila* sg. 1 vsebuje več podtipov, ki jih lahko razlikujemo s specifičnimi monoklonskimi protitelesi ali s sekvenčno analizo sedmih genov. Z monoklonskimi protitelesi ločimo podtipe Knoxville, Philadelphia, Benidorm, France/Allentown, OLDA, Oxford, Bellingham, Heysham in Camperdown, ki se med

seboj razlikujejo tudi v virulenci. V magistrski nalogi bomo preučevali virulentnejše podtipi Philadelphia, Knoxville in Benidorm ter manj virulentna podtipa Bellingham in Oxford (Helbig in sod. 2002).

Človek se okuži z vdihavanjem z legionelo kontaminiranih aerosolov. V pljučnih alveolih jo fagocitirajo makrofagi. Znotraj fagosoma legionela sintetizira beljakovine, ki so kodirani z geni *dot/icm* in inhibirajo zlitje fagosoma z lizosomi. Fagosom nato obdajo mitohondriji in vezikli zrnatega endoplazmatskega retikuluma z ribosomi, kar privede do nastanka edinstvene vakuole. Znotraj fagosoma se legionele razmnožujejo s cepitvijo (Taylor in sod., 2009). Če v gostiteljski celici začne primanjkovati aminokislin in maščobnih kislin, legionele preidejo v transmisivno obliko, ki ima debelejšo celično steno, je odpornejša, pridobi več virulentnih determinant, tvori bičke in postane gibljiva, kar ji omogoča sprostitev iz celice ter prehod v nove gostiteljske celice (Newton in sod., 2010). Podoben mehanizem imajo virulentni sevi *L. longbeachae*, nasprotno pa naj bi se večina sevov *L. micdadei* razmnoževala znotraj fagolizosomov, ki niso obdani z ribosomi (Lau in Ashbolt, 2009).

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

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V naši nalogi želimo ugotoviti, ali obstajajo razlike v znotrajceličnem razmnoževanju med bolj virulentnimi podtipi *L. pneumophila* sg. 1 (Philadelphia, Benidorm in Knoxville) in manj virulentnimi podtipi *L. pneumophila* sg. 1 (Oxford in Bellingham). V ta namen smo preučevali legionele vzgojene v čisti kulturi, s katerimi smo okuževali celice monocitov celične kulture MM6.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bomo dokazali razlike v sposobnosti znotrajceličnega razmnoževanja med bolj in manj virulentnimi podtipi *L. pneumophila* sg. 1. Zato predvidevamo, da bo število CFU/ml bolj virulentnih podtipov večje kot število CFU/ml manj virulentnih podtipov *L. pneumophila* sg. 1.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA

Med 58. letno konvencijo Ameriške legije julija 1976 v hotelu Bellevue Stratford v mestu Filadelfija je za hudo pljučnico zbolelo 182 delegatov (od 4000), od katerih je bilo 146 hospitaliziranih, 29 jih je bolezní podleglo. Deset mesecev po izbruhu so iz pljučnega tkiva umrlega legionarja izolirali do tedaj neznano bakterijo. Odkrili so, da je povzročitelj pljučnice po Gramu negativen bacil in zaradi povezave s konvencijo Ameriške legije so ga poimenovali *Legionella pneumophila* (Gomez-Valero in sod., 2009), pljučnico pa legionarska bolezen (Winn, 1988; Diederer, 2008). Vir izbruha okužbe bi naj bila klimatska naprava hotela (Harb in sod., 2000). Kasneje so s testiranjem shranjenih serumov ugotovili, da se je legionarska bolezen pojavila že 33 let pred prvim uradnim izbruhom leta 1976, saj je ta mikroorganizem povzročil izbruhe pljučnice že leta 1947, 1957 in 1974 (Gomez-Valero in sod., 2009). Pojasnili so tudi do takrat še nepojasnen izbruh vročinske bolezni, ki je bila prav tako posledica izpostavitve bakteriji *Legionella*. To bolezen so poimenovali Pontiaška vročica po mestu Pontiac v Michiganu, kjer je bil prvi izbruh opisan (Diederer, 2009).

2.2 TAKSONOMIJA

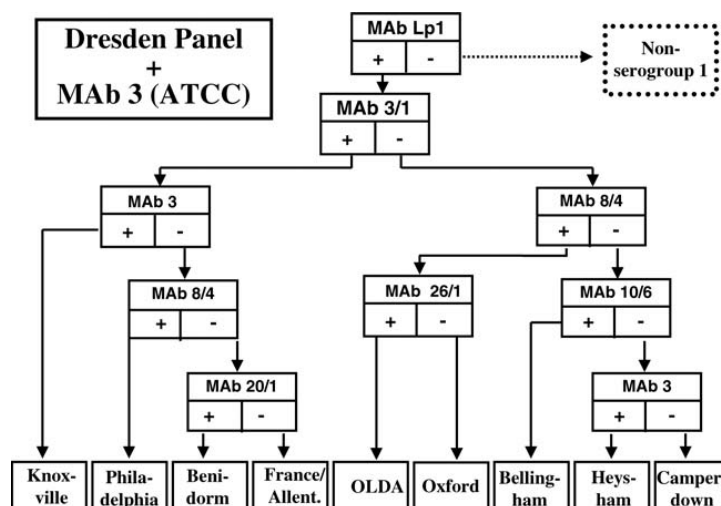
Rod *Legionella* sodi v družino *Legionellaceae*. Nekateri raziskovalci so zaradi nizke stopnje homologije DNA med vrstami legionel (Hornei in sod., 2007a) predlagali njihovo razvrstitev v tri ločene rodove – *Legionella*, *Fluoribacter* in *Tatlockia*, vendar analiza genov za 16S rRNA tega ni potrdila, zato družina *Legionellaceae* vsebuje le en rod *Legionella* in sodi v podskupino bakterij gama-2 *Proteobacteria* (Fields in sod., 2002). Najbližji genetski sorodnik družini *Legionellaceae* je družina *Coxiellaceae*, ki ju skupaj uvrščamo v red *Legionellales*. Tako kot legionele se tudi *C. burnetti* razmnožuje znotrajcelično (Hornei in sod., 2007a). Rod *Legionella* trenutno vsebuje 59 vrst, tri podvrste (DSMZ, 2014) in več kot 70 seroloških skupin (Gomez-Valero in sod., 2009), a njihovo število še naprej narašča (Hornei in sod., 2007a) (Preglednica 1). Vsaj 24 vrst povzroča bolezní pri človeku (Newton in sod., 2010).

Preglednica 1: Vrste bakterij rodu *Legionella* (DSMZ, 2014)

<i>L. adalaidensis</i>	<i>L. erythra</i>	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. anisa</i>	<i>L. fairfieldensis</i>	<i>L. lytica</i>	<i>L. sainthelensi</i>
<i>L. beliardensis</i>	<i>L. fallonii</i>	<i>L. maceachernii</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. feeleei</i>	<i>L. massiliensis</i>	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. geestiana</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. spiritensis</i>
<i>L. bozemonae</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>L. moravica</i>	<i>L. steelei</i>
<i>L. brunensis</i>	<i>L. gratiana</i>	<i>L. nagasakiensis</i>	<i>L. steigerwaltii</i>
<i>L. busanensis</i>	<i>L. gresilensis</i>	<i>L. nautarum</i>	<i>L. taurinensis</i>
<i>L. cardiaca</i>	<i>L. hackeliae</i>	<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. tucsonensis</i>
<i>L. cherrii</i>	<i>L. impletisoli</i>	<i>L. parisiensis</i>	<i>L. tunisiensis</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. israelensis</i>	<i>L. pittsburghensis</i>	<i>L. wadsworthii</i>
<i>L. drancourtii</i>	<i>L. jamestowniensis</i>	<i>L. pneumophila*</i>	<i>L. waltersii</i>
<i>L. dresdenensis</i>	<i>L. jordanis</i>	<i>L. quateirensis</i>	<i>L. worsleiensis</i>
<i>L. drozanskii</i>	<i>L. lansingensis</i>	<i>L. quinlivanii</i>	<i>L. yabuuchiae</i>
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. rowbothamii</i>	

**Legionella pneumophila* ima tri podvrste: *L. pneumophila* subsp. *fraseri*, *L. pneumophila* subsp. *pascullei* in *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*

Legionella pneumophila ima 16 seroloških skupin (sg), po dve imajo vrste *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleei*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra* in *L. quinlivanii*, preostale vrste imajo po eno serološko skupino (Hornei in sod., 2007a). Helbig je s sodelavci na podlagi reaktivnosti s specifičnimi monoklonskimi protitelesi pri *L. pneumophila* sg. 1 ločil 10 podtipov. Podtipe so identificirali z monoklonskimi protitelesi Dresdenskega panela (MAb Lp1, MAb3/1, MAb3, MAb8/4, MAb26/1, MAb10/6 in MAb20/1) in jih poimenovali v Knoxville, Philadelphia, Benidorm, France/Allentown, OLDA, Oxford, Bellingham, Heysham in Camperdown (Helbig in sod., 2002) (Slika 1).



Slika 1: Fenotipsko razlikovanje sevov *L. pneumophila* sg. 1 s pomočjo seta monoklonskih protiteles Dresdenskega panela (Helbig in sod., 2002)

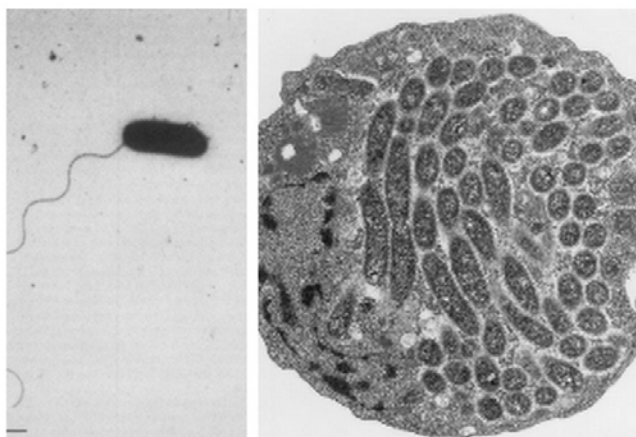
Poleg fenotipskih metod z uporabo monoklonskih protiteles pa poznamo tudi genotipske metode s katerimi lahko opredelimo podtipse vrste *L. pneumophila*. Tako se danes največ uporablja sekvenčna analiza sedmih genov (SBT), ki je obravnavana kot 'zlati standard' za tipizacijo *L. pneumophila* (Edwards in sod., 2008).

Legionella pneumophila povzroča 90 % vseh legioneloz, od tega kar 80 % sg. 1. Tudi druge vrste so lahko povzročiteljice legionarske bolezni. Te vrste so *L. micdadei* (60 %), *L. bozemanii* (15 %), *L. dumoffii* (10 %) ter *L. longbeachae* (5 % v USA in v Evropi ter kar 30 % v Avstraliji in Novi Zelandiji) (Hornei in sod., 2007a).

2.3 OSNOVNE ZNAČILNOSTI LEGIONEL

2.3.1 Morfologija in mikrobiološke značilnosti bakterije

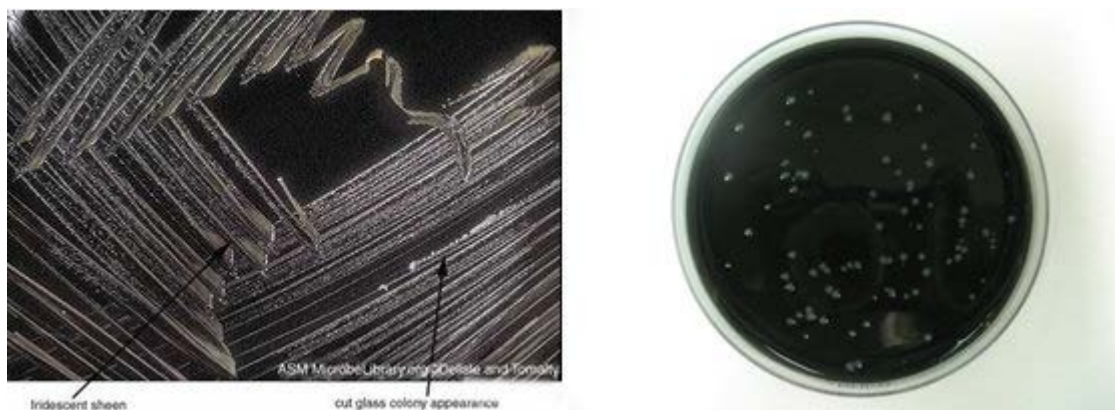
Legionella je mikroorganizem, ki povzroča okužbe predvsem pri imunsko oslabljenih ljudeh. Zaradi njegove pogoste prisotnosti v ogrevanih vodovodnih sistemih predstavlja problem za zdravje ljudi tako v domačem okolju kot v bolnišnicah (Fields in sod., 2002, Taylor in sod., 2009). Rod *Legionella* obsega po Gramu negativne, gibljive kokobacile, ki v širino merijo 0,3 - 0,9 μm in v dolžino 2 - 20 μm (Diederens, 2008). Najpomembnejša in tudi najbolj virulentna vrsta je *L. pneumophila*, ki vsebuje 16 seroloških skupin. Za mikroorganizem so značilne različne fenotipske lastnosti, ki nastanejo kot odgovor na okoljske in prehranske razmere. Večina mikroorganizmov v naravi ima dva načina rasti, rast v planktonski obliki in rast v biofilmu. V biofilmih so legionele filamentozne oblike, kar jim olajša proces pretvorbe v planktonsko obliko. V planktonski obliki, ko so prosto plavajoče in v času razmnoževanja v gostitelju so celice legionel v obliki bacilov (Taylor in sod., 2009). Legionele vsebujejo tudi različne encime, kot so katalaza, želatinaza, lipaza, b-laktaza in druge. V makrofagih ali amebah so bakterije v kokobacilni obliki in v dolžino merijo 1 - 2 μm . Slika 2 prikazuje nekatere opisane lastnosti.



Slika 2: Slika bakterije *L. pneumophila*. (levo) Običkana celica *L. pneumophila* sg1 (merilo: 1 μm) (Elliott in Johnson, 1981). (desno) Ameba *H. vermiformis* okužena z bakterijo *L. pneumophila* po dvajsetih urah inkubacije (povečava: 10000 x) (Abu Kwaik, 1996)

Legionele so obligatni aerobi. Rastejo in razmnožujejo se pri temperaturah od 20 – 42 °C (Diederer, 2008; Blyth in sod., 2009). Sposobne so preživeti v vlažnem okolju dalj časa pri temperaturi med 0 in 60 °C. So termotolerantne bakterije (Diederer, 2008). Temperature nad 60 °C jih uničijo (Surman-Lee in sod., 2007). Preživijo tudi kloriranje, ker imajo povečano toleranco za klor (Diederer, 2008; Blyth in sod., 2009). Bakterije so acidotolerantne in preživijo izpostavitvi kislemu okolju, celo s pH 2 za krajše obdobje. Prav tako so nekatere vrste bakterij našli v območju pH med 2,7 - 8,3 (Surman-Lee in sod., 2007). Kot vir energije uporabljajo beljakovine, saj ne oksidirajo ali fermentirajo ogljikovih hidratov (Steinert in sod., 2002; Diederer, 2008). Za vir ogljika in tudi energije uporabljajo aminokisline (Steinert in sod., 2002).

Klinično pomembne vrste iz rodu *Legionella* najbolje rastejo na gojišču BCYE α , pri temperaturi 35 °C (Fields in sod., 2002) in 35 % CO₂. Kolonije zrastejo po 2 - 5 dneh. Na umetnih gojiščih oblikujejo bacile, dolge do 20 μm . Za njihovo optimalno rast uporabljamo obogatena, selektivna gojišča BCYE α , ki vsebujejo topno železo, L-cistein, α -ketoglutarat in oglje. Pomemben je pH gojišča, ki ga z dodatkom N-2-acetoamino-2-aminoetansulfonične kisline (ACES) uravnavamo na 6.9 (Diederer, 2008).



Slika 3: Legionele na obogatenih trdnih gojiščih. (levo) videz iridescence in brušenega stekla (Delisle in Tomalty, 2002), (desno) kolonije na agarju BMPA-α

2.3.2 Legionelam podobni amebni patogeni (LLAP)

Nekaterih legionel ne moremo gojiti na umetnih gojiščih za legionele BCYE ali katerih drugih znanih bakterioloških gojiščih (Lamoth in Greub, 2010), zato so te legionele poimenovali v legionelam podobni amebni patogeni (LLAP; ang. *Legionella*-like amoebal pathogens). Gre za nekultivabilne, po Gramu negativne bacile, ki imajo sposobnost okužbe in znotrajceličnega razmnoževanja v amebah. Njihov način okužbe in razmnoževanja je enak kot pri legionelah, ki se normalno razmnožujejo v praživalih in alveolarnih makrofagih. Prvi znani LLAP so izolirali iz zemlje na Poljskem leta 1954. Šele leta 1991 so ga prvič opisali in poimenovali v *Sarcobium lyticum* ter kasneje v *Legionella lytica* (Adeleke in sod., 1996). Nove izolate označujemo z zaporedno številko, ki se pripiše za imenom LLAP. Te organizme gojimo v njihovih gostiteljih (Hornei in sod., 2007a).

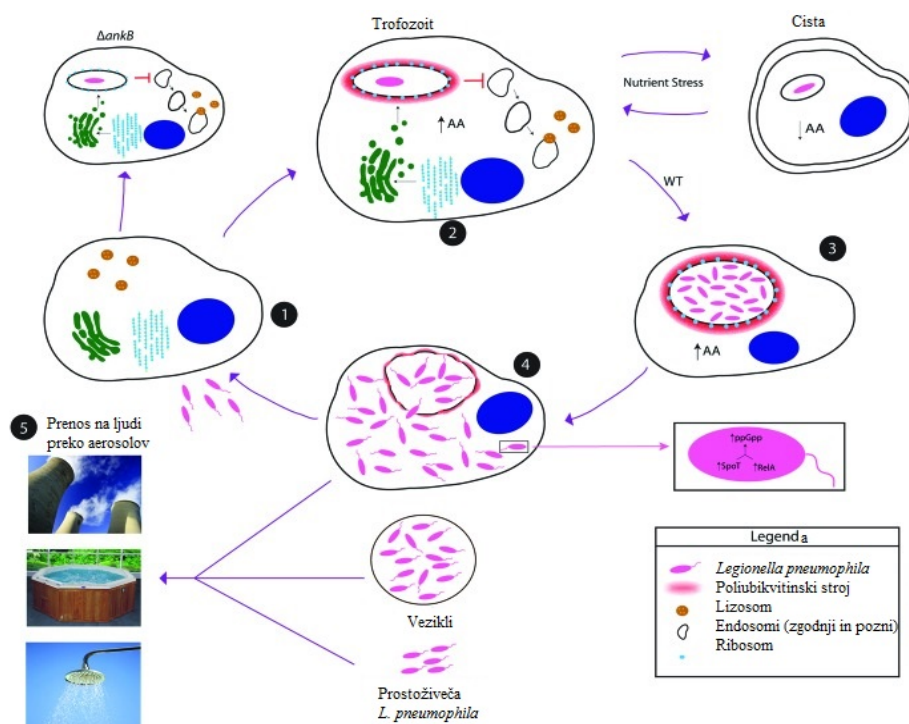
Podtipi LLAP so filogenetsko sorodni legionelam. Imeli naj bi pomembno vlogo pri okužbah, ki se pojavljajo v skupnostih izven bolnišnice (Richards in sod., 2013). Njihova nesposobnost rasti ali razmnoževanja v odsotnosti ameb otežuje izolacijo in identifikacijo iz kliničnih vzorcev. Prav tako še vedno ni na voljo seroloških reagentov za dokazovanje ali identifikacijo v kliničnih vzorcih (Adeleke in sod., 1996). Po novejših podatkih pa lahko danes večino LLAP že gojimo na gojišču BCYE zaradi izboljšanja kvalitete gojišča in postopnega prilagajanja bakterij (Lamoth in Greub, 2010). Vendar pa je še vedno veliko neznanega o teh mikroorganizmih (Hornei in sod., 2007b; Richards in sod., 2013).

2.3.3 Mikrobna ekologija

Legionele so ubikvitarne bakterije, ki jih najdemo po vsem svetu v naravnih in umetnih vodnih okoljih, kot so na primer jezera, reke, potoki in izviri (Harb in sod., 2000). Vendar pa je koncentracija legionel v naravnih habitatih običajno nizka in zato redko povzročajo okužbe pri ljudeh (Steinert in sod., 2002). Bakterija ne preživi v suhih okoljih (Fields in sod., 2002). Edini naravni vodni vir legioneloze so vroči vreli. V njih temperature dosežejo od 35 – 40 °C, kar je optimalna temperatura za njihovo razmnoževanje (Declerck, 2010). Iz svojega naravnega habitata lahko bakterija kolonizira hladilne stolpe, vodovodne cevi za pitno vodo itd. in tako povzroča okužbe pri ljudeh, ki vdihavajo z legionelo kontaminirane aerosolne delce (D' Auria in sod., 2010). Na povečano razmnoževanje legionel v vodi vpliva povišana temperatura nad 20° C in prisotnost drugih mikroorganizmov, ki jim zagotavljajo hranila in jim nudijo zaščito pred neugodnimi dejavniki (Fields in sod. 2002). Vrsto *L. longbeachae* najdemo v vlažni zemlji in mulju (Diederer, 2007; Gomez-Valero in sod., 2009). Izolirali so jo iz komposta (Fields in sod., 2002). Okužba nastane z vdihavanjem kontaminiranih prašnih delcev zemlje. V Avstraliji in Novi Zelandiji povzroča več kot 30 % vseh legioneloz ter približno 50 % legioneloz v Severni Avstraliji in na Tajskem (Cazalet in sod., 2010). Okužbe so pogostejše pri vrtnarjih (Fields in sod., 2002).

Legionele v vodnem okolju parazitirajo v praživalih, ki so njihovi naravni gostitelji in rezervoarji. Poročali so, da legionele parazitirajo v dvajsetih vrstah ameb, vključno z vrstami iz rodu *Acanthamoeba*, *Hartmannella* spp. in *Naegleria*, v treh vrstah migetalkarjev *Tetrahymena pyriformis*, *Tetrahymena vorax* in *Tetrahymena thermophyla* (Surman-Lee in sod., 2007) ter v eni vrsti sluzaste plesni *Dyctiostelium discoideum* (Fields in sod., 2002; Surman-Lee in sod., 2007). Življenjski cikel ameb (slika 4) je sestavljen iz dveh izmenjujočih se faz, trofozoitov in ciste. Do pretvorbe trofozoita v cisto pride v neugodnih, stresnih okoljskih razmerah (Taylor in sod., 2009) kot so pomanjkanje hrane, izsušitev, spremembe v temperaturi in pH-ju. Zato ciste ameb omogočajo legionelam preživetje v manj ugodnem okolju in koloniziranje novih gostiteljev, trofozoiti pa so pomembni za razmnoževanje bakterij (Bouyer in sod., 2007). Legionele vstopajo v praživali s fagocitozo ali mehanizmom, ki ga imenujemo »coiling« fagocitoza, kjer se gostiteljska celična membrana ovije okoli bakterije (Taylor in sod., 2009). Temu sledi nastanek z *L.*

pneumophila-vsebujoče vakuole oz. LCV znotraj trofozoita. Izognitev fuziji fagosoma z lizosomi omogoča sistem izločanja tipa IV Dot/Icm. LCV v nekaj minutah obdajo celični organeli, kot so mitohondriji, ribosomi in majhni vezikli. Temu sledi pridružitvev poliubikvitiniranih beljakovin in razmnoževanje legionele. V poznih fazah znotrajceličnega razmnoževanja *L. pneumophila* pobegne iz LCV v citosol amebe, kjer potečeta še zadnja dva kroga razmnoževanja. Legionele nato pridobijo bičke, ki jim po lizi amebe omogočijo sprostitev iz gostiteljske celice (Richards in sod., 2013).

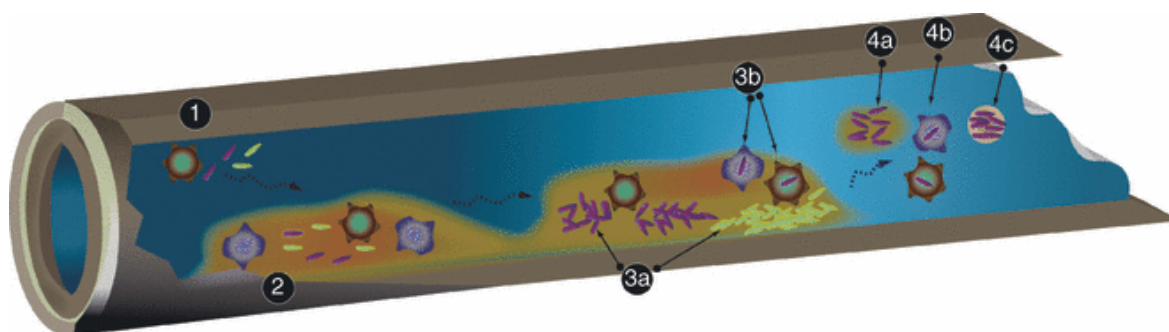


Slika 4: Življenjski cikel bakterije *L. pneumophila* v praživalih (Richards in sod., 2013)

Iz naravnega vodnega okolja lahko legionele prehajajo v antropogene oz. umetne vodne sisteme, kjer mikrobno rast zaznamo skoraj izključno v biofilmih, ki pokrivajo notranjost cevi vodovodnih napeljav in sistemov klimatskih naprav (Lau in Ashbolt, 2009). Tam *L. pneumophila* običajno kolonizira že obstoječe biofilme. Biofilm je definiran kot kompleksna mikrobna populacija (Declerck, 2010), v kateri se posamezne celice povezujejo med seboj z ekstracelularnimi polimernimi snovmi (EPS) in se pritrjujejo na površino oz. substrat. Lahko se tvorijo na živih oz. biotskih ali neživih oz. abiotskih površinah (Hall-Stoodley in sod., 2004), kjer lahko nastajajo na interfazah med vodo in trdno površino, prav tako se lahko pojavijo na interfazi olje-voda. Pogosteje pa nastajajo na

območju nizkega pretoka tekočine oz. tam, kjer ni pretoka vode (Surman-Lee in sod., 2007). Za legionele je tvorba biofilma pomembna zato, ker jim predvsem omogoča preživetje pred biocidnim delovanjem, povišanjem temperature, osmolarnosti (Abdel-Nour in sod., 2013). V biofilmih pogosto najdemo več vrst ameb v katerih se legionele razmnožujejo (Taylor in sod., 2009; Declerck, 2010). Razmnoževanje legionel v amebah tako predstavlja strategijo preživetja v okoljih z nizkimi količinami hranil (Abu Khweek in sod., 2013). Posledično so praživali v antropogenih vodnih virih ocenili kot dejavnik tveganja za izbruh legioneloze (Abdel-Nour in sod., 2013).

Ker je v biofilmih tekmovalnost za hrano velika, je *L. pneumophila* razvila dve poti za pridobitev potrebnih rastnih faktorjev. Legionele so sposobne pridobiti hranila neposredno od drugih mikroorganizmov v biofilmu, kot so odmrle alge ali nekatere heterotrofne bakterije. Druga pot je s pomočjo praživali, v katerih se legionele znotrajcelično razmnožujejo. Med življenjskim ciklom ameb namreč pride do razgrajevanja peptidov in beljakovin, ki jih bakterije uporabijo kot vir hranil. Odcepitev iz biofilma je prav tako ključni del dinamične narave življenja v mikrobni populaciji biofilmov. Legionela se lahko od biofilma odcepi s pomočjo ameb. Amebe iz rodu *Naegleria*, ki so okužene z legionelo, razvijejo dodatne bičke s katerimi odplavajo v stran od biofilma v primeru pomanjkanja hranil. Lahko pa okužene amebe sproščajo vezikle velikosti $< 5 \mu\text{m}$, pri čemer vsak vezikel vsebuje 20 - 200 bakterij *L. pneumophila*. Takšni vezikli se lahko vgradijo v aerosole, kar lahko privede tudi do okužb ljudi (Declerck, 2010).



Slika 5: Razvoj in sprostitvev legionel v sistemih pitne vode (vstop legionel in praživali v vodovodni sistem [1], absorpcija v biofilme [2], kolonizacija bakterij [3a]/zaužitje s strani praživali [3b]; usoda legionel po zaužitju varira [4]) (Lau in Ashbolt., 2009)

Ljudje se običajno okužijo z vdihavanjem vodnih kapljic v obliki aerosolov, ki vsebujejo legionele (Harb in sod., 2000). Zaradi primerne velikosti aerosolov lahko ti vstopajo v pljučne alveole, kjer jih fagocitirajo makrofagi. Nastane posebna *L. pneumophila*-vsebujoča vakuola (LCV; ang. *Legionella*-containing vacuole), podobno kot pri praživalih (Elhelu, 1983). Ko je bakterija znotraj LCV, prične izločati beljakovine, ki jih kodirajo geni *dot/icm*. Beljakovine zavirajo zorenje fagosoma in pritrditev lizosoma. Sledi vezava komponent endoplazmatskega retikuluma na fagosom, kar prepreči nadaljnjo pritrdjevanje lizosomov na fagosom in zakisanje veziklov. Bakterija je tako zaščitena pred uničenjem. Sledi razmnoževanje znotraj zaščitene vakuole, in ko koncentracija aminokislin postane prenizka za nadaljnjo razmnoževanje, nastane biček, ki omogoči bakteriji, da pobegne iz gostiteljske celice in poišče naslednjega gostitelja (Taylor in sod., 2009).

2.3.4 Življenjski krog bakterije

Leta 1980 je Rowbotham opisal sposobnost legionel, da se lahko razmnožujejo znotrajcelično. Ta ugotovitev je vodila do spoznanja, da bakterije pri parazitiranju praživali uporabijo enak način, s katerim okužijo tudi ljudi (Gomez-Valero in sod., 2009). Vendar obstajajo manjše razlike v mehanizmi, ki jih bakterije uporabljajo za vstop in izstop iz omenjenih gostiteljskih celic (Hornei in sod., 2007a).

V življenjskem krogu legionele ločimo dve fazi: replikativno fazo (RF; ang. replicative phase), do katere pride v ugodnih razmerah, in transmisivno oz. infektivno fazo (MIF; ang. mature intracellular form) ob pomanjkanju hranil v LCV (Steinert in sod., 2002; Molofsky in Swanson, 2004). Za legionele v replikativni fazi je značilno, da se razmnožujejo, so dolge, filamentozne in paličaste oblike, nimajo bičkov, odporne so proti natriju. Prav tako je zanje značilna nizka citotoksičnost in odpornost proti stresu. V tej obliki so v času eksponentne faze rasti (Steinert in sod., 2002). Bakterije imajo značilno strukturo celične stene po Gramu negativnih bakterij, vendar izven gostiteljeve celice ne preživijo (Garduno, 2007). Ko začne hranil v vakuoli primanjkovati, se bakterije diferencirajo iz replikativne v transmisivno fazo. Takrat je proces razmnoževanja zaviran (Molofsky in Swanson, 2004). Nastopi stacionarna oz. post-eksponentna faza rasti. V tej obliki so bacili kratki, debeli in paličasti, so običkani in posledično zelo gibljivi, značilna je občutljivost za natrij, so

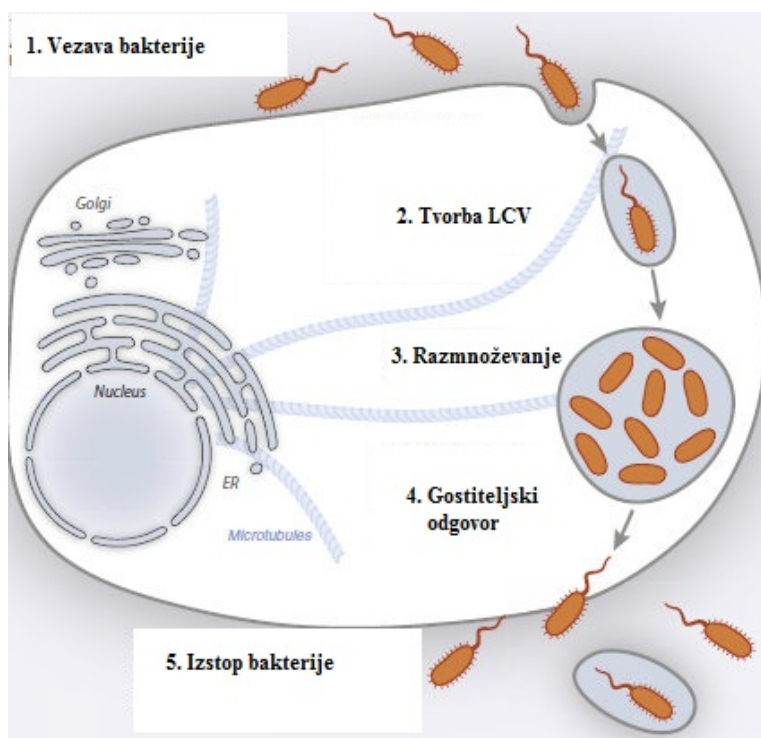
citotoksični in odporni proti stresu (Steinert in sod., 2002). Za razliko od RF, ima bakterija v fazi MIF debelo celično steno z več membranami in sloji ter vsebuje vidne znotrajcelične vključke (Garduno, 2007). Ta oblika bakterije je tudi bolj invazivna in virulentna ter odporna proti biocidom in antibiotikom (Steinert in sod., 2002).

Za legionele je značilno, da se lahko razmnožujejo v različnih vrstah praživali in v humanih alveolarnih makrofagih. Interakcije *L. pneumophila* z evkariontskimi celicami nam pomagajo razumeti sposobnost patogena, da povzroči bolezen. Te odnose so preučevali v številnih praživalih (*Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, *Naegleria* spp. in *Dictyostelium discoideum*) in fagocitnih celicah sesalcev (makrofagom podobne tkivne celice, iz mišjega kostnega mozga pridobljeni makrofagi, derivati HeLa, A549 in CHO-K1 epitelijskih celic) (Newton in sod., 2010).

Poleg alveolarnih makrofagov in humanih monocitov obstajajo še različne celične linije, ki imajo podobne lastnosti kot humani fagociti in so sposobne podpirati rast znotrajcelične bakterije. Take celice so tudi HL-60, ki so podobne makrofagom in izvirajo iz promielocitov. Ugotovili so, da se legionela v celicah HL-60 najprej veže na komponento komplekta CR3, redkeje pa vstopi s »coiling«¹ fagocitozo. Podobno kot pri humanih fagocitih, LCV obdajo vezikli endoplazmatskega retikuluma in ribosomi, zato te celice uporabljajo kot model za raziskovanje interakcij humanih makrofagov z *L. pneumophila*. Legionela podobno raste v celični liniji humanih monocitov U937. Celice U937 se lahko diferencirajo v celice z lastnostmi tkivnih makrofagov. Celična linija humanih monocitov THP-1 se po stimulaciji s forbol estri ali 1,25-dihidroksi vitaminom D3 prav tako razvije v makrofagom podobne celice. Cirillo in sodelavci so poročali, da se *L. pneumophila* razmnožuje v celicah THP-1 na podoben način kot v humanih monocitih in makrofagih. Monocitna celična linija Mono Mac 6 (MM6) je fenotipsko in funkcionalno podobna zrelim makrofagom. Pridobljena je iz periferne krvi bolnika z monoblastično levkemijo. V primerjavi z drugimi monoblastičnimi celičnimi linijami (U937 in THP-1) MM6 ne potrebujejo stimulacije s forbol estri. Celice MM6 so bile uspešno uporabljene za preučevanje molekularne patogeneze bakterije *L. pneumophila* in drugih znotrajceličnih patogenov, ki se lahko razmnožujejo v humanih monocitih (Khweek in Amer, 2010).

Okužba gostiteljskih celic z bakterijo *L. pneumophila* poteka v več korakih (Hornei in sod., 2007a; Hoffman in sod., 2014) (slika 6):

- pritrditev oz. vezava bakterij na receptorje gostiteljevih celic in fagocitoza;
- nastanek vakuole, ki vsebuje legionele (LCV);
- prehod v replikativno fazo in znotrajcelično razmnoževanje;
- gostiteljev celični odgovor kot sta avtofagija in apoptoza;
- izstop bakterije iz LCV in propad gostiteljske celice.



Slika 6: Okužba celice z bakterijo *L. pneumophila*; pot okužbe lahko razdelimo v pet korakov (Hoffman in sod., 2014)

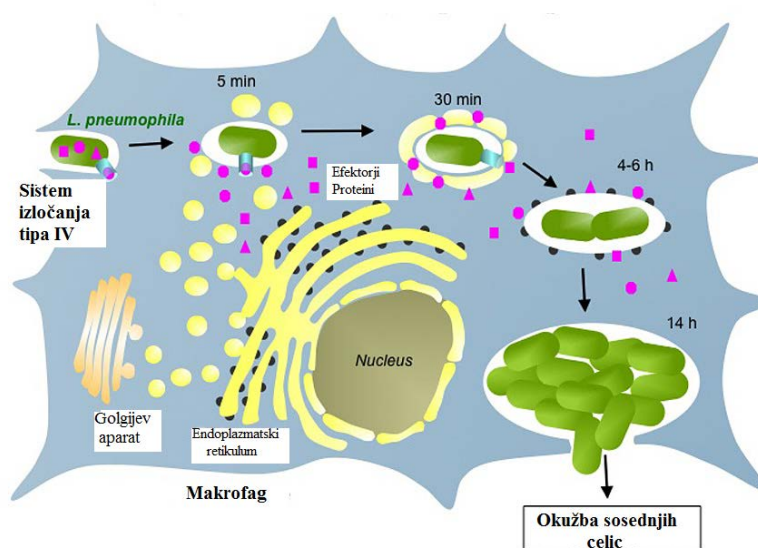
Pritrditev in vstopanje bakterij v celico sta primarna koraka okužbe. Pri tem legionela izraža različne adhezine, s katerimi se specifično veže na gostiteljske celice. Adhezini RtxA, PilE, in EnhC omogočajo pritrditev na amebo *A. castellanii* kot tudi na človeške epiteljske celice. Analog integrina LaiA pa omogoča vezavo le na epiteljske celice (Hoffman in sod., 2014). Bakterijski ligandi, ki prav tako sodelujejo pri vezavi na gostiteljske celice, so bički, pili tipa IV, beljakovina Hsp60, beljakovina Mip (ang. macrophage infectivity potentiator) in beljakovina MOMP (Hornei in sod., 2007a).

Poglavitna beljakovina zunanje membrane (MOMP; ang. major outer membrane protein) bakterije *L. pneumophila* omogoča vezavo na makrofage preko receptorjev komplementa (Hoffman in sod., 2014). Po pritrditvi na gostiteljsko celico *L. pneumophila* vstopi v celico z običajno fagocitozo ali s »coiling« fagocitozo, kjer se psevdopodij fagocita ovije okoli bakterije (Khweek in Amer, 2010). Gre za procesa, ki sta odvisna od aktinskega skeleta gostitelja. Sprejem v gostiteljsko celico je reguliran s sistemom izločanja Dot/Icm (Hoffman in sod., 2014). Nekatere študije so pokazale, da je v proces fagocitoze vključena opsonizacija bakterij s komponento komplementa C3 in poznejša vezava na receptorje komplementa CR1 in CR3, kar sproži fagocitozo (Edelstein in Cianciotto, 2006). Vendar se le virulentni sevi lahko razmnožujejo v fagocitih in preprečijo fuzijo fagosoma z lizosomi. Med fagocitozo legionele sprožijo serijo različnih aktivnosti. Preprečijo zorenje fagosoma, zavrejo oksidativni stres, preprečijo zakisanje vakuole in njeno zlitje z lizosomi ter povzročijo spremembe v znotrajceličnem prometu organelov (Hornei in sod., 2007a). Po sprejemu bakterije v gostiteljsko celico ta preuredi fagosom v vakuolo LCV, ki je vezana na membrano (Hoffman in sod., 2014). V njej je legionela zaščitena pred uničenjem, ki bi ga povzročila zakisanje vakuole in razgradnja z lizosomi. V 4 - 12 urah po okužbi, mitohondriji, gladki in zrnati vezikli endoplazmatskega retikuluma obdajo vakuolo v nekaj minutah. Ta proces vodi bakterija sama (Edelstein in Cianciotto, 2006).

Raziskovalci so s preučevanjem amebe *Dictyostelium discoideum* ugotovili, da majhne GTPaze gostiteljske celice sodelujejo pri vezavi na membrano LCV. Po tvorbi LCV, legionela preide iz transmisivne v razmnoževalno fazo (Hoffman in sod., 2014). Nekatere študije nakazujejo, da naj bi v pozni fazi razmnoževanja morda le prišlo do fuzije z lizosomi, vendar se kljub temu bakterijska rast nadaljuje (Edelstein in Cianciotto, 2006). V vakuoli, obdani z membrano, ki je podobna zrnatemu ER (Khweek in Amer, 2010), se legionele razmnožujejo z binarno cepitvijo, kar vpliva na večanje vakuole, ki zapolni večji del gostiteljske celice (Edelstein in Cianciotto, 2006). LCV ostane obdana z ribosomi, dokler bakterije ne zapolnijo vakuole, sledi liza gostiteljske celice (Khweek in Amer, 2010). Na razmnoževanje legionel vpliva tudi koncentracija železa in timidina v gostiteljevi celici (Edelstein in Cianciotto, 2006). Če gostiteljeva celica vsebuje več železa, je bolj podvržena okužbi z legionelo (Cianciotto, 2007). Bakterija se razmnožuje hitreje pri višjih temperaturah, vendar se njena viabilnost zmanjša pri temperaturi nad 40 °C, medtem

ko propade pri temperaturi 60 °C. Ob koncu replikativne faze se močno poveča izražanje genov, ki kodirajo efektorske beljakovine Dot/Icm (Hoffman in sod., 2014).

Po končanem razmnoževanju bakterija preide v transmisivno fazo, ki ji omogoča izstop iz celice (Hoffman in sod., 2014). Končno fazo okužbe tako predstavlja liza gostiteljske celice ter sprostitev velikega števila novih bakterij v okolje, ki lahko začnejo nov krog okužbe (Edelstein in Cianciotto, 2006). Liza gostiteljske celice lahko poteka na več načinov. Pri amebi *Acanthamoeba polyphaga* in *Acanthamoeba castellanii* so opazili neapoptotično lizo LCV s sekretornimi beljakovinami v kombinaciji z nekrozo celic. Pri makrofagih poteka z apoptozo, ki je odvisna od kaspaza-3 signalne poti. Tretji način izstopa je nelitična sprostitev bakterij iz gostiteljske celice s procesom eksocitoze. Pri vrstah *Acanthamoeba* spp. v času povečanega stresa nastanejo ciste, ki se odcepijo v obdajajoče okolje. V teh cistah lahko legionele preživijo kar do šest mesecev in so delno zaščitene pred delovanjem antibiotikov (Hoffman in sod., 2014).



Slika 7: Shematski in časovni prikaz razvojnega cikla bakterije *L. pneumophila* (Machner in sod., 2011)

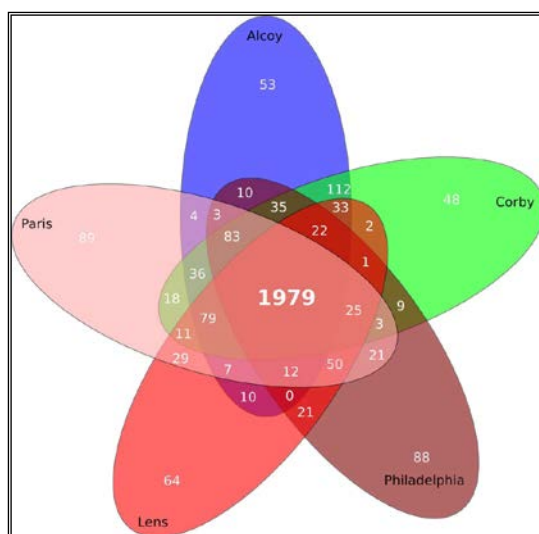
2.3.5 Genom

Danes poznamo celotna nukleotidna zaporedja genomov petih kliničnih podtipov vrste *L. pneumophila* sg. 1 in sicer podtipi Philadelphia, Lens, Paris, Corby in Alcoy (D'Auria in sod., 2010). S tipizacijo na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST; ang. Multi Locus

Sequence Typing) so ugotovili, da so vsi sevi med seboj genetsko sorodni, najbližja sta si Alcoy in Corby (D'Auria in sod., 2010). Cazalet in sodelavci (2010) pa so analizirali nukleotidno zaporedje genoma seva NSW 150, vrste *L. longbeachae* sg. 1.

Legionella pneumophila ima en krožni kromosom, katerega velikost se giblje od 3,3 do 3,5 Mb (Newton in sod., 2010). Seva Paris in Lens poleg krožnega kromosoma vsebujeta še plazmid (Gomez-Valero in sod., 2009). Omenjeni sevi imajo vsebnost GC baznih parov okoli 38 %. Število genov znaša od 3,001 do 3,259, delež kodiranih regij je od 88 % do 90,2 % (Newton in sod., 2010). Za izmenjavo genetskega materiala *L. pneumophila* uporablja procesa konjugacije in transformacije (Edelstein in Cianciotto, 2006). Genom *L. pneumophila* je velik v primerjavi z genomi drugih znotrajceličnih bakterij, kot so *Rickettsia*, *Bartonella* in *Chlamydia* sp. (Gomez-Valero in sod., 2009). Sevi *L. pneumophila* Paris, Lens, Philadelphia in Corby imajo skupnih 1979 (66,9 %) genov, ki predstavljajo skupni del genoma (slika 8). Ti geni imajo zapis za številne esencialne metabolne funkcije. Preostali del genoma je specifičen za posamezne seve (Newton in sod., 2010).

Posebnost genoma *L. pneumophila* je tudi, da vsebuje nenavadno število genov, ki kodirajo beljakovine, ki so podobne evkariontskim (Jules in Buchreiser, 2007) glede na aminokislinsko zaporedje ali pa vsebujejo evkariontske domene. Bakterije so te gene verjetno pridobile s horizontalnim prenosom od različnih evkariontskih gostiteljev (Newton in sod., 2010).



Slika 8: Pregled pangenoma (diagram prikazuje skupni del genoma legionel in gene, specifične za seve *L. pneumophila* Alcoy, Philadelphia, Lens, Paris in Corby; geni, ki se prekrivajo najmanj za 70 % dolžine in imajo 80 % podobnost, so ortologni) (D'Auria in sod., 2010)

Med genomoma vrste *L. longbeachae* in *L. pneumophila* obstaja nekaj razlik. Genom *L. longbeachae* je približno za 500 kbp večji od genoma *L. pneumophila* in ima drugačno organizacijo. Le 65,2 % genov je ortolognih z geni *L. pneumophila*, verjetno zaradi skupnega izvora. Preostala tretjina pa je specifična za *L. longbeachae*. Tudi plazmidi so prisotni v nekaterih podtipih *L. longbeachae*. Vrsti se prav tako razlikujeta po prisotnosti virulentnih dejavnikov, kot so vrsta sistema izločanja in substratov, ki jih izloča (npr. 45 % substratov sistema izločanja tipa II je odsotnih pri *L. longbeachae*). *Legionella longbeachae* vsebuje gene, ki kodirajo beljakovine, značilne za rastline, njen genom kodira kapsulo in ne bičkov (Cazalet in sod., 2010).

2.3.6 Virulentni dejavniki

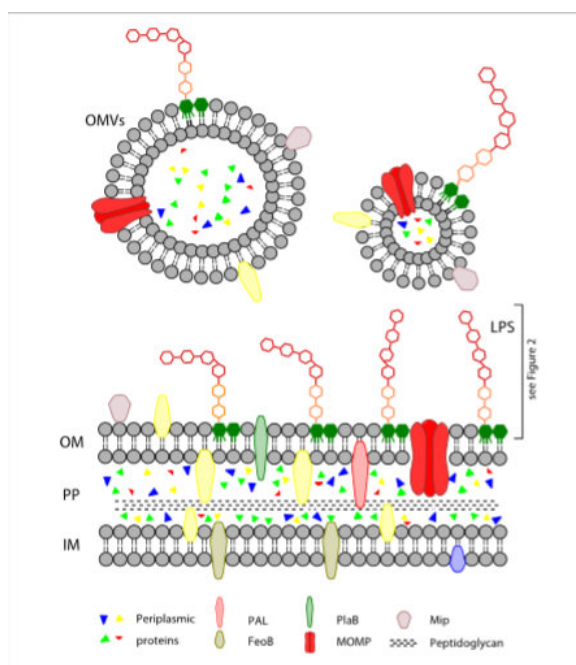
Virulentni dejavniki legionel imajo pomembno vlogo pri okužbi gostitelja, znotrajceličnem razmnoževanju ter predvsem pri zaščiti pred imunskim odzivom gostitelja in vplivi okolja. Celična stena zaščiti bakterijo pred okoljskimi nevarnostmi, omogoča selektivno prepustnost hranil v celico ter odstranjevanje odpadnih produktov in produktov sistema izločanja iz celice. Prav tako ji celična stena omogoča neposreden stik z drugimi mikroorganizmi. (Shevchuk in sod., 2011). Na patogenost *L. pneumophila* tako vplivajo

beljakovine zunanje membrane, lipopolisaharid (LPS), bički, pili in sistem izločanja tipa II (T2SS) (Newton in sod., 2010).

2.3.6.1 Zunanja membrana

Zunanja membrana celične stene je iz lipidnega dvosloja, ki je sestavljen iz fosfolipidov, lipoproteinov, LPS in beljakovin. Fosfolipidi se nahajajo le na notranji strani zunanje membrane, prav tako lipoproteini, ki povezujejo zunanjo membrano s peptidoglikanom. Pomembna komponenta fosfolipidov pri legionelah je molekula fosfatidilholin, saj le 10 % vseh znanih bakterij vsebuje ta lipid v membranah. Večinoma ga vsebujejo bakterije, ki so v tesni povezavi z evkariontskimi gostitelji. Med te bakterije poleg *L. pneumophila* sodijo še *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus abortus* in *Agrobacterium tumefaciens*. Conover in sodelavci (2008) so ugotovili, da se zmanjša citotoksičnost *L. pneumophila* v makrofagih, če tega fosfolipida ni v celični steni. Prav tako se taki sevi *L. pneumophila* slabše vežejo na makrofage kot sevi, ki ta fosfolipid imajo. Pomembnejša beljakovina zunanje membrane, ki je povezana z virulenco in preživetjem *L. pneumophila* je beljakovina PAL (ang. peptidoglycan-associated lipoprotein). Vsebuje za vrsto specifične antigene, ki so pomembni pri diagnostiki legionarske bolezni. Poleg tega te beljakovine inducirajo izločanje inflamatornih citokinov. Skupina beljakovin DotD, DotC in IcmN so komponente sistema izločanja tipa IV (T4SS) in so nepogrešljive za bakterijsko znotrajcelično preživetje (Shevchuk in sod., 2011). Beljakovina PlaB prispeva k citotoksičnosti *L. pneumophila*, saj ima fosfolipazno in lizofosfolipazno aktivnost. Izraža se pred začetkom pozne logaritemske rastne faze legionel in je odgovorna za glavno lipolitično aktivnost med okužbo gostitelja (Heuner in Albert-Weissenberger, 2008). Beljakovina MOMP je najpomembnejša beljakovina v zunanji membrani celične stene legionel. Sodeluje pri vezavi na gostiteljske celice in deluje kot porin. Podobno deluje beljakovina Hsp60 (Shevchuk in sod., 2011), ki je pomembna pri vezavi na gostiteljsko celico in vstopanju v celice v stresnih okoliščinah. Kodira jo operon *htpAB*. Nekatere raziskave so pokazale, da bi lahko spreminjala interakcije med gostiteljem in patogenim mikroorganizmom tako, da bi vplivala na njihove signalne poti (Heuner in Albert-Weissenberger, 2008). Na bakterijski površini je tudi beljakovina Mip, ki je homodimer, vezan na membrano. Vpliva na učinkovito razmnoževanje legionel v gostiteljskih celicah. Pri vezavi in vstopu v

gostiteljske celice sodeluje še beljakovina Lcl, ki je podobna kolagenu (ang. *Legionella* collagen-like protein) (Shevchuk in sod., 2011).

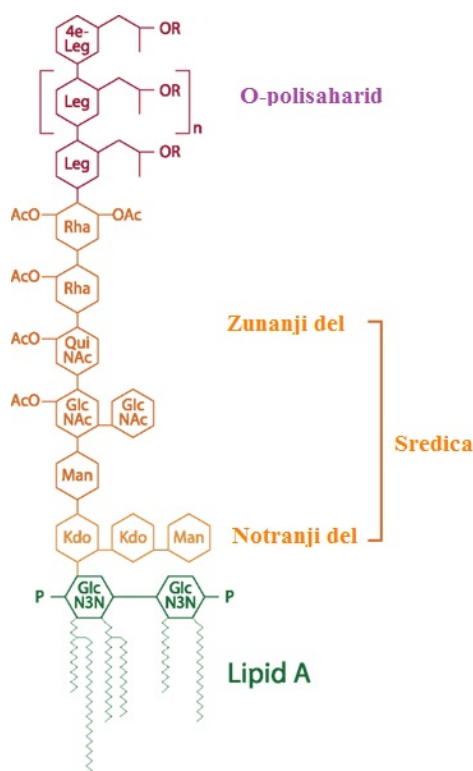


Slika 9: Shematski prikaz celične stene po Gramu negativne bakterije *L. pneumophila* (Shevchuk in sod., 2011)

Pomemben del zunanje membrane predstavlja lipopolisaharid. Nahaja se na zunanji strani zunanje membrane celične stene in predstavlja glavni antigen legionel (Shevchuk in sod., 2011). Zanj je značilna visoka stopnja raznolikosti (Lück in Helbig, 2013), na podlagi katere razvrščamo vrsto *L. pneumophila* v najmanj 16 seroloških skupin (sg). Znotraj vsake sg prepoznamo lahko tudi t.i. monoklonske podskupine (npr. sg. 1 lahko razdelimo v deset monoklonskih podskupin) (Shevchuk in sod., 2011). LPS bakterije *L. pneumophila* sg. 1 ima v primerjavi z drugimi po Gramu negativnimi bakterijami edinstveno strukturo (Lück in Helbig, 2013). Molekule LPS so sestavljene iz antigena O (O-polisaharid), sredice in lipida A, ki je endotoksin in pripenja LPS v zunanjo membrano (Shevchuk in sod., 2011). Lipid A LPS vsebuje veliko dolgih, razvejanih verig maščobnih kislin (Lück in Helbig, 2013) ter O- in N-acetilnih skupin. Posledično je LPS zelo hidrofoben (Shevchuk in sod., 2011). Lipid A ima relativno šibko endotoksično aktivnost (Cianciotto, 2001), najverjetneje zaradi dolgih verig maščobnih kislin (Lück in Helbig, 2013). Antigen O je polisaharidni homopolimer t.i. legionaminske kisline, ki je hidrofozna in specifična za

posamezno serološko skupino (Cianciotto, 2001). Sredica LPS za razliko od drugih po Gramu negativnih bakterij ne vsebuje heptoz, ampak je sestavljena iz spojine Kdo (3-deoksi-D-mano-okt-2-ulosonična kislina), manoze, N-acetil-glukozamina, N-acetil-kvinovozamina in ramnoze (Lück in Helbig, 2013).

Biosinteza celotnega LPS je kompleksen proces, ki poteka v notranji membrani, sledi sestavljanje v periplazmi in translokacija oz. prenos molekul LPS na bakterijsko celično površino. Geni, ki so vpleteni v biosintezo sredice oligosaharida in biosintezo antigena O, so na 30-kb genskem lokusu. LPS lahko prepoznajo molekule TLR (ang. Toll-like receptors). Molekula TRL4 je na površini različnih imunskih celic, kot so makrofagi, neutrofilni granulociti in dendritične celice. Molekula LPS *L. pneumophila* ima ključno vlogo pri interakcijah z gostiteljskimi celicami, kjer edinstvena struktura lipida A pomaga bakterijam, da se izognejo prepoznavi prirojenega imunskega odziva (Shevchuk in sod., 2011).



Slika 10: Struktura LPS bakterije *L. pneumophila* (struktura nakazuje njene različne regije; O-specifična veriga, jedro, ki ga sestavljata zunanje in notranje jedro in lipid A) (Shevchuk in sod., 2011)

2.3.6.2 Periplazma

Periplazma je gelu podobna plast, sestavljena iz topnih beljakovin in močno zamreženega peptidoglikana, ki je nameščen med zunanjo in notranjo membrano. V njej so proteaze, nukleaze in drugi razgradni encimi, kot so metaloproteaze, fosfataze, izomeraze. Peptidoglikan bakterije *L. pneumophila* vsebuje muramično kislino, glukozamin, glutaminsko kislino, alanin in mezodiaminopimelinsko kislino (mezo-DAP). Delno je odporen proti delovanju gostiteljevih lizocimov, zato ima peptidoglikan pomembno vlogo pri preživetju legionel v makrofagih in amebah (Shevchuk in sod., 2011). Periplazma vsebuje veliko encimov, ki razgrajujejo škodljive snovi, ki vstopajo v bakterijsko celico. Eden takšnih encimov je baker-cinkova superoksid dismutaza (Cu-Zn-SOD), ki katalizira razpad superoksidnih radikalov v neškodljive molekule in je zato pomembna za preživetje legionel v stacionarnih fazah rasti (Cianciotto, 2001; Shevchuk in sod., 2011). Ker mora *Legionella* preživeti dolga obdobja, ko gostitelja ni na voljo, ta encim pomaga bakteriji v tej fazi premagati oksidativni stres. V periplazmi najdemo še dve beljakovini, ki sta povezani z virulenco in preživetjem *L. pneumophila*. Beljakovina KatA razgradi vodikov peroksid. Sodeluje tudi pri okužbi makrofagov in ameb (Shevchuk in sod., 2011). Beljakovina KatB je v citoplazmi in sodeluje pri znotrajcelični okužbi (Cianciotto, 2001). Beljakovina IcmX pa je ena izmed komponent aparata Dot/Icm in je pomembna pri vzpostavitvi LCV ter pri tvorbi por v celičnih membranah makrofagov (Shevchuk in sod., 2011).

2.3.6.3 Notranja membrana

Notranja membrana celične stene se imenuje tudi citoplazemska membrana. Sestavljena je iz lipidnega dvosloja. Ima pomembno vlogo pri privzemanju železa. Pri tem procesu sodeluje beljakovina FeoB, ki je od GTP odvisna Fe(II) prenašalka in s tem pomaga pri optimalni rasti bakterije. Njena vloga je tudi uničenje makrofagov. Druge beljakovine notranje membrane so povezane z virulenco in preživetjem bakterije. To sta beljakovini IraA/IraB. IraA je majhna molekula metiltransferaze, ki sodeluje pri privzemu železa in je potrebna pri okužbi humanih makrofagov. IraB je integralna beljakovina, ki je homologna bakterijskim peptidnim prenašalcem. Najdemo ju v vseh patogenih legionelah, ne pa v avirulentnih vrstah. Multibakrova oksidaza (MCO) je pomembna beljakovina, ki je vezana na citoplazemsko membrano *L. pneumophila* in oksidira železo. Beljakovina LadC je

adenilat ciklaza in sodeluje pri pritrditvi na makrofage in znotrajceličnem razmnoževanju. V notranji membrani je še beljakovina TatB, ki vpliva na privzemanje železa in druge celične procese, kot je izločanje beljakovin (Shevchuk in sod., 2011).

2.3.6.4 Bički in pili

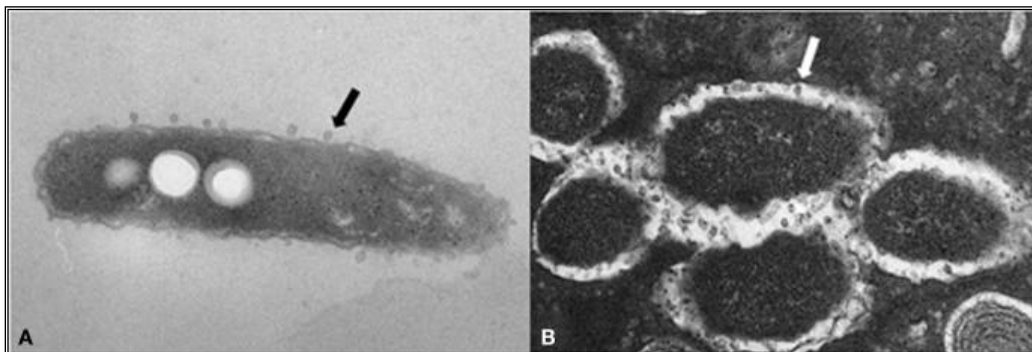
Navzočnost bičkov in pilov na površini *L. pneumophila* je prvi opisal Rodgers s sodelavci leta 1980. Pili so lahko dolgi (0,8 – 1,5 µm) in kratki (0,1 – 0,6 µm) (Shevchuk in sod., 2011). Daljši pili tvorijo snope in jih imenujemo pili tipa IV (Cianciotto, 2001). Njihova pomembna sestavina je beljakovina Pile, ki sodeluje pri pritrdjevanju in vezavi na gostiteljske celice (Shevchuk in sod., 2011). Mutacija v genu *pilE* ne vpliva na znotrajcelično preživetje in razmnoževanje bakterij (Cianciotto, 2001). Pri sintezi pilov tipa IV sodeluje tudi beljakovina prepilin peptidaza PilD, ki je pomembna za uspešno znotrajcelično razmnoževanje. Obe beljakovini tudi sodelujeta pri tvorbi biofilmov *L. pneumophila* (Shevchuk in sod., 2011).

Zelo pomembna lastnost legionel v transmisivni fazi je tvorba bička in z njim povezana gibljivost bakterije (Molofsky in sod., 2005). Legionela ima polarni biček, ki ima pomembno vlogo pri celičnem gibanju, okužbi gostiteljev in pri nastajanju biofilmov (Shevchuk in sod., 2011). Sestavni del bička je beljakovina flagelin, ki jo kodira gen *flaA* (Cianciotto, 2001). Gen *flaA* najdemo pri skoraj vseh legionelnih sevih. Na izražanje flagelina (*flaA*) vpliva nizka temperatura, visoka osmolarnost ali nizke količine hranil, medtem ko je izražanje gena zavirano med eksponentno fazo rasti, pri povišani temperaturi (več kot 37 °C), visoki viskoznosti in pri obilnih količinah hranil (predvsem aminokislin serina in treonina) (Heuner in Albert-Weissenberger, 2008).

2.3.6.5 Vezikli zunanje membrane (OMV)

Pri bakteriji *L. pneumophila* in tudi drugih po Gramu negativnih bakterijah nastanejo z odcepitvijo iz zunanje membrane vezikli, ki v premeru merijo od 100 - 250 nm. Vezikli naj bi vsebovali 18 različnih beljakovin, ki vplivajo na patogenost in virulenco bakterije. Značilno je njihovo lipolitično in proteolitično delovanje in preprečevanje zlitja fagosomov

z lizosomi. Prav tako naj bi vezikli *L. pneumophila* sodelovali pri prenosu virulentnih faktorjev v okolje (Shevchuk in sod., 2011).



Slika 11: Mikrografi bakterije *L. pneumophila* in vezikov zunanje membrane (OMV). (A) *L. pneumophila* odceplja OMV (puščica) iz svoje površine med rastjo v tekočem gojišču, (B) OMV znotraj fagosomov *D. discoideum* (Shevchuk in sod., 2011)

2.3.6.6 Genetski dejavniki, ki omogočajo znotrajcelični parazitizem

Genom *L. pneumophila* vsebuje več genskih lokusov, ki nosijo zapise za sintezo beljakovin, ki so potrebni pri znotrajceličnem razmnoževanju in preživetju bakterije. Pomembni geni, ki sodelujejo pri okužbi gostiteljskih celic so *mip*, *dot/icm*, *pmi* ter *pilBCD* in sistem T2SS (Harb in sod., 2000). Gen *mip* (ang. macrophage infectivity potentiator) so odkrili leta 1989 in je prvi prepoznani gen, ki je vključen v patogenezo gostiteljskih celic (Fields in sod., 2002). Kodira sintezo površinske beljakovine Mip, ki je ohranjena v več vrstah legionel. Pripada družini beljakovin, imenovanih peptidil-prolil *cis/trans* izomeraze (PPIaze) (Harb in sod., 2000; Fields in sod., 2002). Ugotovili so, da se beljakovina Mip izraža ves čas tako v prosto živeči legioneli kot v znotrajcelični, čeprav je transkripcijska aktivnost promotorja *mip* po okužbi monocitov celične linije Mono Mac 6 zavirana. Njegova aktivnost se nato povrne po 24 urah znotrajceličnega razmnoževanja (Heuner in Albert-Weissenberger, 2008). Genski lokus *dot/icm* (*Dot* ang. defect in organelle trafficking, *icm* ang. intracellular multiplication) je sestavljen iz 23 genov. Pri mutantih z okvaro na tem lokusu sistem izločanja tipa IV ne deluje pravilno. Posledično ni pravilnega zorenja fagosoma in indukcije apoptoze. Geni sistema *dot/icm* sodelujejo pri transportu efektorskih makromolekul, ki so potrebne za znotrajcelični transport, indukcijo apoptoze v gostiteljskih celicah in za sestavo toksina, ki oblikuje pore v membrani. Geni *pilBCD* sodelujejo pri nastajanju pilov tipa IV in pri vzpostavitvi sistema T2SS (Harb in sod., 2000).

2.3.6.7 Sistemi izločanja

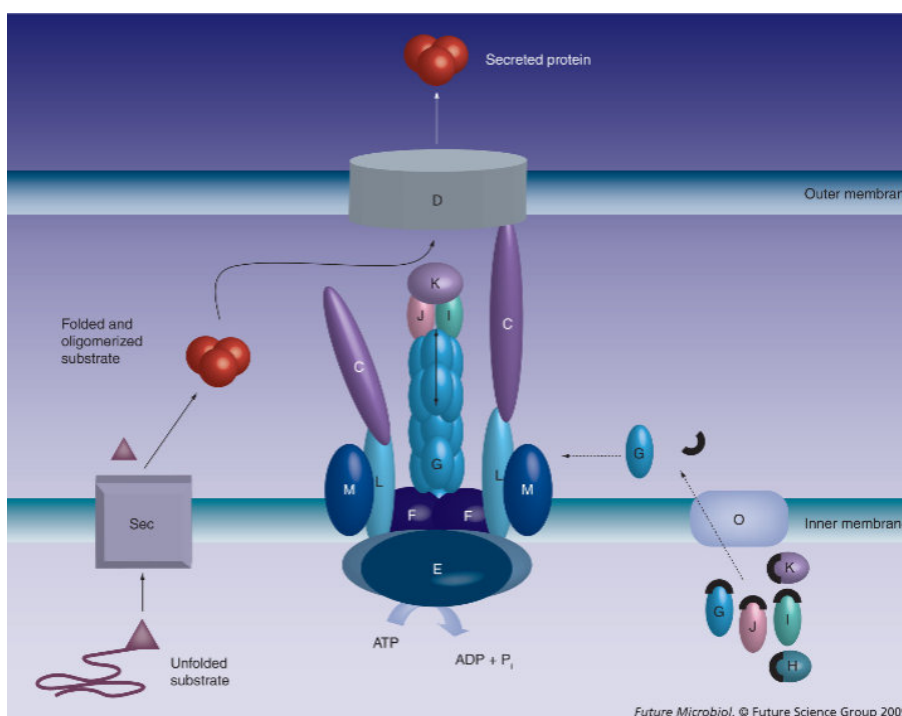
Patogeneza bakterije *L. pneumophila* je v veliki meri odvisna od sposobnosti izločanja virulentnih dejavnikov, ki jih najdemo na bakterijski celični površini. Te dejavnike bakterija izloča v zunajcelično plast ali jih sprošča direktno v gostiteljsko celico. Bakterija *L. pneumophila* vsebuje več različnih tipov sistemov izločanja. Na virulenco bakterije najbolj vplivata sistem izločanja tipa IV ali Dot/Icm in sistem izločanja tipa II ali Lsp (Heuner in Albert-Weissenberger, 2008).

2.3.6.7.1 Sistem izločanja tipa II T2SS ali Lsp

Prvi odkriti sistem izločanja je tipa II ali T2SS (ang. type II secretion system), ki ga imenujemo Lsp (Heuner in Albert-Weissenberger, 2008). Sistem izločanja T2SS *L. pneumophila* je sestavljen iz 12 beljakovin (slika 12) (Newton in sod., 2010), in sicer citoplazemske ATPaze, treh beljakovin notranje membrane, ki ustvarijo vezavno mesto za ATPaze, nato večjih in manjših beljakovin psevdopilinov, ki oblikujejo pilu podobno strukturo, ki se razteza skozi periplazmo, beljakovine notranje membrane, imenovane prepilin peptidaza, ter beljakovine zunanje membrane, imenovane sekretin, ki oblikuje poro, in beljakovine, ki povezuje zunanjo in notranjo membrano (Cianciotto, 2009). Zapis za beljakovine, ki sestavljajo T2SS je na genskem lokusu *pilBCD*, ki sodeluje pri biogenezi pilov tipa IV. Na izražanje lokusa *pilBCD* vpliva temperatura, in sicer je povečano pri temperaturi manj kot 30 °C (Heuner in Albert-Weissenberger, 2008).

T2SS omogoča legioneli izločanje molekul skozi celično steno, okužbo gostiteljskih celic, znotrajcelično razmnoževanje, zunajcelično preživetje in izločanje beljakovin v gostiteljsko celico. Gre za proces, ki poteka v več delih. Najprej se nastale beljakovine prenesejo skozi bakterijsko notranjo membrano v periplazmo z mehanizmom Tat in Sec. Nato se iz periplazme prenesejo v zunanost skozi poro, ki se oblikuje v zunanji membrani celične stene. Pri tem sodeluje beljakovinski kompleks T2SS. Večina beljakovin, ki se izločajo s pomočjo sistema T2SS, ima encimsko delovanje (Rossier in sod., 2008). Znano je, da legionela izloča najmanj 27 beljakovin preko T2SS. Le te so hitinaza ChiA, cinkova

metaloproteaza ProA ali Msp, kisle fosfataze (Newton in sod., 2010), različne lipaze, fosfolipaza C, fosfolipaza A, lizofosfolipaza A, RNaza in druge (Rossier in sod., 2008).



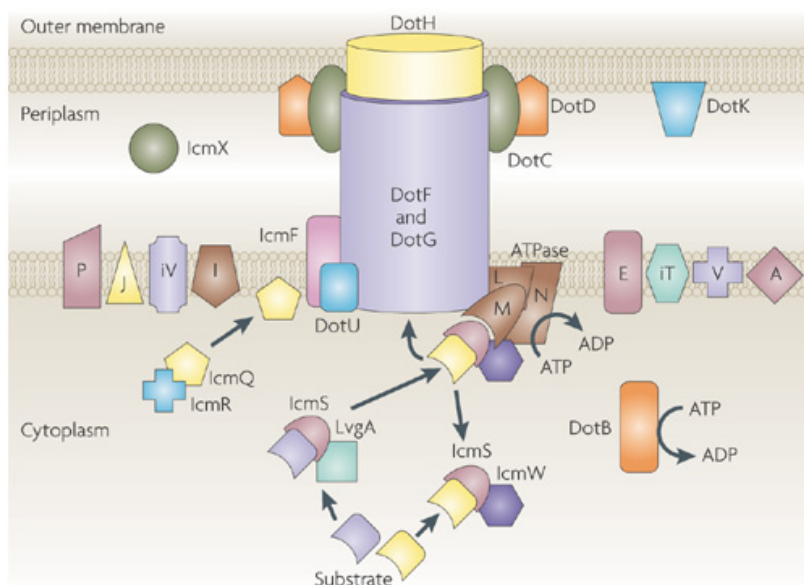
Slika 12: Model sistema izločanja tipa II; C-M = komponente jedra T2S, D = dodekamerični protein sekretin, G = glavni protein pseudopilin, H-K = manjši pseudopilini, O = protein prepilin peptidaza (Cianciotto, 2009)

2.3.6.7.2 Sistem izločanja tipa IV T4SS ali Dot/Icm

Sistem izločanja tipa IV je pomemben za virulenco številnih patogenih mikroorganizmov, saj omogoči prenos nukleinskih kislin, beljakovin ali kompleksov obeh v evkariontske celice. Sistem Dot/Icm sodeluje pri nastanku vakuole LCV v gostiteljevi celici, pri inhibiciji zlitja fagosomov z lizosomi (Cianciotto, 2001) in pri znotrajceličnem razmnoževanju v praživalih in humanih makrofagih (Heuner in Albet-Weissenberger, 2008). Prav tako efektorske molekule inhibirajo apoptozo gostiteljske celice in sodelujejo pri izstopu bakterije iz gostiteljske celice (Newton in sod., 2010). Za učinkovito tvorbo LCV in uspešno znotrajcelično razmnoževanje legionel je potrebnih 27 genov *dot/icm* (Isberg in sod., 2009). Po uspešnem nastanku vakuole in primernih razmerah za razmnoževanje v vakuoli, postanejo ti geni nepotrebni in zanemarljivi (Steinert in sod., 2002).

Sestav Dot/Icm je iz večih beljakovin in se razteza preko notranje in zunanje membrane bakterijske celične stene (Newton in sod., 2010). Beljakovine sistema Dot/Icm spominjajo na komponente konjugacijskega sistema bakterij za prenos DNA (Cianciotto, 2001; Isberg in sod., 2009). Ena ali več beljakovin sistema Dot/Icm oblikujejo poro v membrani LCV. Preko te pore se v citoplazmo gostitelja prenesejo bakterijske efektivske beljakovine oz. efektorji, ki privabijo vezikle zrnatega endoplazmatskega retikuluma (ER) gostiteljske celice. Vezikli obdajo LCV in ga tako zaščitijo (Newton in sod., 2010).

Gene sistema Dot/Icm najdemo na dveh ločenih regijah genoma, ki merita približno 20 kb v dolžino. Regija I je sestavljena iz sedmih genov *dotDCB* in *dotA-icmVWX*, regija II pa vključuje 18 genov, ki so poimenovani tako s kratico *dot* kot *icm*. Med celične procese gostitelja, ki so tarča efektorjev sistema Dot/Icm, spadajo uravnavanje gostiteljevih GTPaz, translacija beljakovin gostitelja, sprožitev odgovora na stres in inhibicija apoptoze (Newton in sod., 2010).



Nature Reviews | Microbiology

Slika 13: Dot/Icm aparat (domnevne lokacije in topološka razmerja komponent Dot/Icm v celični steni *L. pneumophila* so pokazane na podlagi študije stabilnosti posameznih beljakovin v prisotnosti opredeljenih delecijских mutacij) (Isberg in sod., 2009)

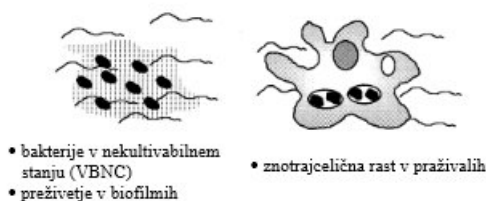
2.4 PATOGENEZA

2.4.1 Način okužbe

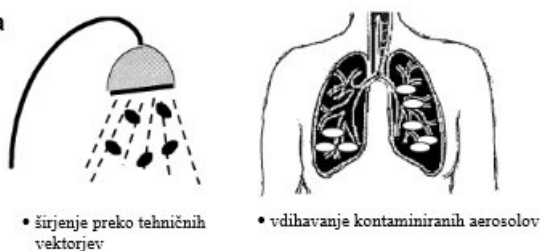
Legionele so mikroorganizmi, katerih naravni življenjski prostor je voda. Iz naravnih voda lahko prehajajo v umetne vodne sisteme, kjer običajno kolonizirajo klimatske naprave, vodovodne cevi in druge vodne sisteme. Hladilni stolpi, bazeni, masažne kadi, klimatske naprave, fontane, prhe, naprave za led, itd. z mehanskim delovanjem omogočajo nastanek aerosolov, ki so lahko kontaminirani z legionelo (Harb in sod., 2000; Steinert in sod., 2002). Ob nastanku aerosolov voda v kapljici zelo hitro izhlapi, pri čemer za seboj pusti trdi delec v zraku. Ta je dovolj majhen, da ga lahko vdihnemo. Delci, manjši od 5 μm v premeru, lahko vstopijo v dihala in povzročijo okužbo (Hornei in sod., 2007a). Pogosteje zbolijo starejši in ljudje z oslabljenim imunskim sistemom (Steinert in sod., 2002).

Obstajata dva načina okužbe z legionelami (slika 14), z vdihavanjem bakterijskih aerosolov oz. v bolnišnicah pogosteje z mikroaspiracijo (Harb in sod., 2000). Prenos okužbe iz človeka na človeka ni poznan (Hornei in sod., 2007a).

A: Okolje



B: Okužba



Slika 14: Pot okužbe z bakterijami vrste *L. pneumophila* (A: v okolju lahko vztraja v biofilmih in raste v praživalih; B: pri prenosu s tehničnimi vektorji, kot so prhe, klimatske naprave itd.) (Steinert in sod., 2002)

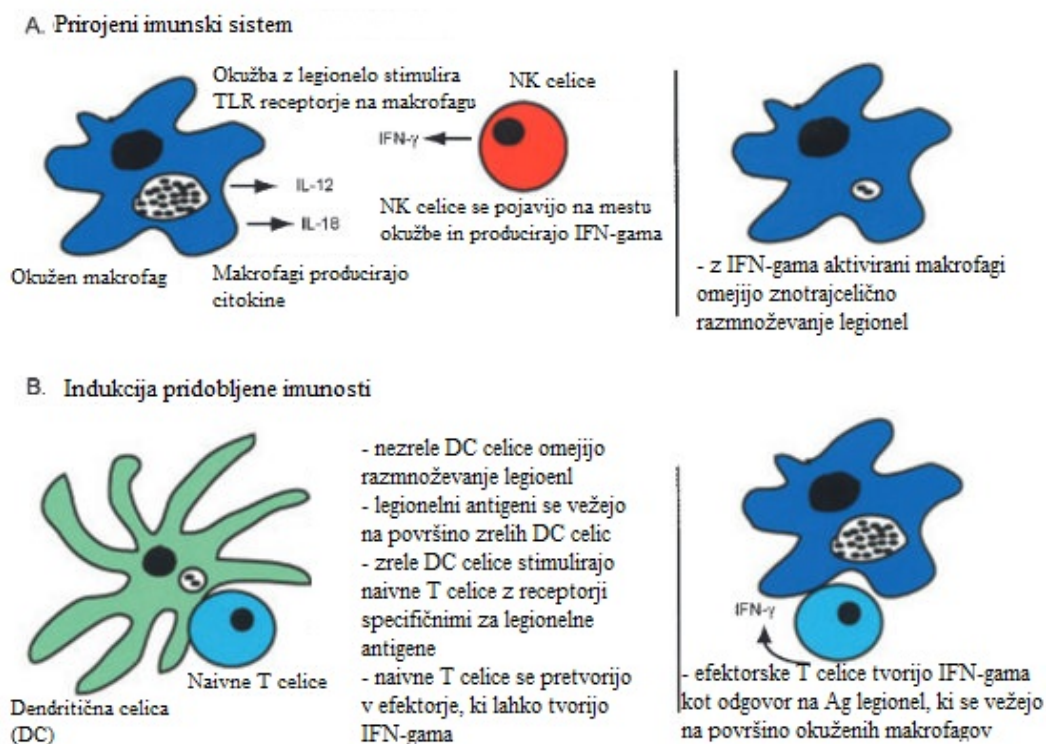
2.4.2 Imunski odgovor gostitelja

Legionella pneumophila sproži v gostitelju imunski odgovor, ki lahko omeji ali prepreči znotrajcelične okužbe (Shin S., 2012). Okužba z legionelami sproži v gostitelju prirojeni in

pridobljeni, specifični humoralni in celično- posredovani imunski odziv (Neild in Roy, 2004).

Čeprav se legionela izogne fuziji fagosoma z lizosomi, pa interakcija med legionelami in makrofagi sproži gostiteljeve celične odzive, ki najprej aktivirajo prirojeni imunski odziv (Neild in Roy, 2004). Prirojeni imunski sistem omogoči prvo obrambo pred okužbo s patogenimi mikroorganizmi (Luo, 2012). Legionele stimulirajo gostiteljeve receptorje TLR (ang. Toll-like receptor), ki se nahajajo na površini makrofagov, kar sproži sproščanje citokinov kot je interferon- gama ($\text{IFN-}\gamma$) na mestu okužbe. Posledično se makrofagi aktivirajo (Neild in Roy, 2004) in po prepoznavi določenih strukturnih determinant legionele (LPS, peptidoglikan, itd.) se razvije zgodnji vnetni odziv (Newton in sod., 2010). Ta naj bi omejil razmnoževanje legionel, delno tudi z zmanjševanjem dostopnosti železa (Khweek in Amer, 2010).

Pri odstranjevanju okužbe sodeluje tudi pridobljeni imunski odziv (Newton in sod., 2010), predvsem celično-posredovani, kjer sodelujejo celice T pomagalk in citotoksične celice T. Zato se legionarske bolezni razvijejo pri osebah z oslabljeno celično posredovano imunostjo (Neild in Roy, 2004). Pri pridobljenem imunskem odzivu so pomembne dendritične celice (DC), ki spadajo v skupino antigen-predstavitvenih celic (APC; ang. antigen- presenting cells). Te imajo vlogo predstavitve antigena na molekulah poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC; ang. major histocompatibility complex) razreda I in razreda II celicam T (Newton in sod., 2010). Legionele najprej okužijo nezrele DC v pljučih, ki legionelam preprečijo nadaljnjo rast. Sledi proces zorenja DC in prenos slednjih do limfatičnih organov, kar omogoči začetek tvorbe legionelnih antigenov. Te antigene DC predstavijo celicam T (ECDC, 2015), ki s tvorbo $\text{IFN-}\gamma$, aktivirajo okužene makrofage in sodelujejo pri odstranjevanju okužbe (Newton in sod., 2010). Raziskave o imunskem odgovoru so pokazale, da se med okužbo z legionelo poleg celično-posredovanega sproži tudi humoralni imunski odziv. S serokonverzijo zaznavamo okužbe z legionelo, saj med samo okužbo nastajajo specifična protitelesa proti legioneli, ki se lahko razvijejo že v prvem tednu po pojavu bolezenskih znakov ali kasneje (Neild in Roy, 2004).



Slika 15: Prirojeni in pridobljeni imunski odziv na okužbo z legionelo (Neild in Roy, 2004)

2.4.3 Bolezni, ki jih povzročajo legionele

Okužba z legionelo lahko poteka asimptomatsko, pri nekaterih pa se razvije klinična slika (Fields in sod., 2002). Skupno ime za vse bolezni, ki jih povzročajo bakterije iz rodu *Legionella*, je legioneloza. Legioneloza lahko poteka kot pljučnica ali legionarska bolezen, ki ima inkubacijsko dobo 2 - 10 dni. Druga oblika legioneloze je gripi podobna oblika bolezni, ki se imenuje pontiaška vročica z inkubacijsko dobo 24 – 48 ur (Steinert in sod., 2002).

Legionarska bolezen (LD) je sistemska okužba s pljučnico, ki jo je težko ločiti od pljučnic drugih povzročiteljev (Fields in sod., 2002). Inkubacijska doba traja 2 - 10 dni, čeprav se lahko podaljša na več kot deset dni. Zgodnji simptomi LD so pogosto nespecifični in se kažejo kot blagi prehlad z nizko vročino, slabim počutjem, anoreksijo in bolečinami v mišicah. Kasneje začetni simptomi preidejo v visoko vročino, bronhialitis, alveolitis in pljučnico. Pri polovici bolnikov se pojavijo nevrološke motnje, kot so spremembe duševnega stanja, delirij, zmedenost, depresija, halucinacije in motnje v hoji (Palusinska-Szys in Cendrowska-Pinkosz, 2009). Pogosti so gastrointestinalni simptomi, saj ima okoli

50 % bolnikov vodeno diarejo (Hornei in sod., 2007a). Legioneloza se pri otrocih pojavi zelo redko (Palusinska-Szys in Cendrowska-Pinkosz, 2009). Brez zdravljenja se stanje bolnika zelo hitro poslabša in ogroža njegovo življenje. Ob ustreznem in dovolj hitrem zdravljenju bolnik popolnoma okreva (Hornei in sod., 2007a).

Pontiaška vročica je kratkotrajna, gripi podobna bolezen brez pljučnice (Hornei in sod., 2007a). Še danes ni znano, ali je vročica posledica vdihavanja nelegionelnih bakterijskih toksinov, živih ali mrtvih legionel (Edelstein, 2008). Pontiaška vročica ne povzroča zapletov, nima značilnih kliničnih lastnosti in bolniki okrevajo brez zdravljenja, zato pogosto ostane neprepoznavna. Značilnosti pontiaške vročice so zelo kratka inkubacijska doba (24 - 48 ur), bolezen traja le 2 - 5 dni, za ozdravitev pa ni potrebno antibiotično zdravljenje (Diederer, 2008).

Bakterija *L. pneumophila* se lahko razširi iz respiratornega sistema in prizadene druge organe telesa. Dokazali so jo v vranici, jetrih, ledvicah, kosteh in kostnem mozgu, sklepih, prebavnem traktu ter v dimeljskih in intratorakalnih bezgavkah. Najpogosteje je prizadeto srce, kjer povzroči miokarditis, perikarditis in endokarditis (Hornei in sod., 2007a).

2.4.4 Epidemiologija okužb

Legionarska bolezen se lahko pojavlja sporadično ali v izbruhih. Okužbe z legionelo so pridobljene v bolnišnicah, v domačem okolju ali na potovanju (Gomez-Valero in sod., 2009). Sporadični primeri se pojavljajo skozi vse leto. Povečano število bolnikov z legionelno pljučnico, pridobljeno v domačem okolju (CAP; ang. community-acquired pneumonia) beležimo pozno poleti in zgodaj jeseni. Pojavlja se pri vseh starostnih skupinah, a je najbolj pogosta pri odraslih, starih več kot 50 let (Cunha, 2010). Dejavniki tveganja, ki vplivajo na povečano dovzetnost za okužbo, so diabetes, maligna obolenja, aids ali kronična odpoved ledvic, starost bolnika, moški spol, imunosupresija, kajenje itd. Prav tako tveganje za okužbe povečujejo različne naprave, ki proizvajajo aerosole kontaminirane vode, kot so prhe, hladilni stolpi, termalna kopališča, okrasne fontane ali naprave za izhlapevanje. V skladu s CDC (ang. Center for disease control and prevention) stopnja smrtnosti za okužbe z legionarsko boleznijo znaša od 5 do 40 % in se v zadnjih

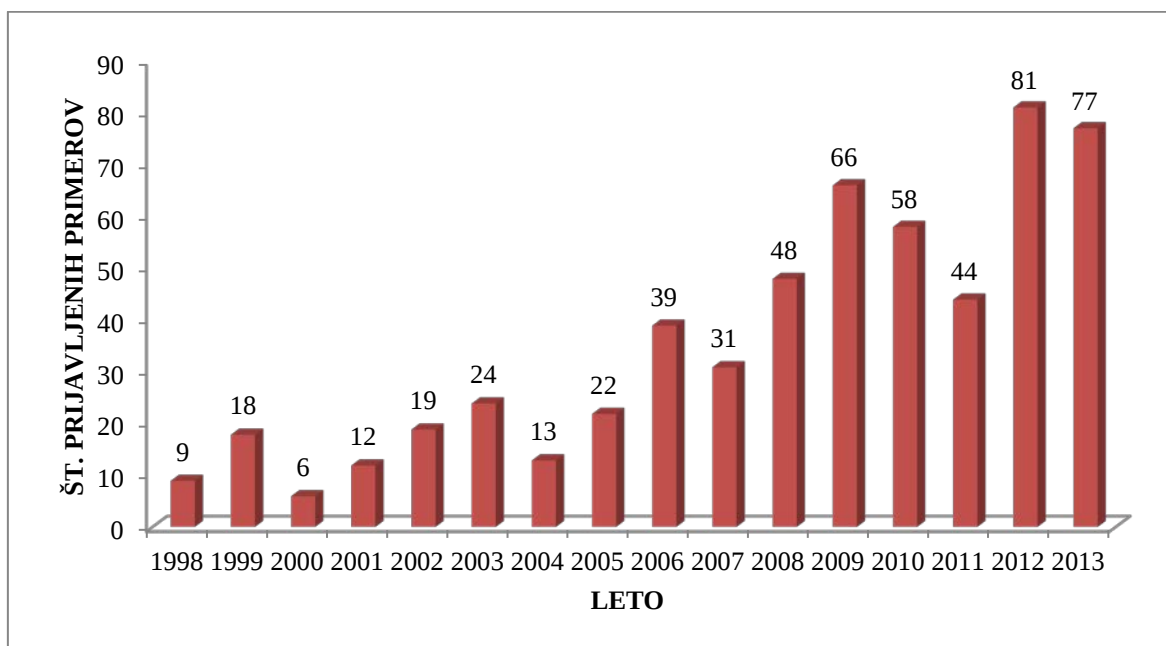
letih zmanjšuje zaradi hitrejšega dokazovanja in boljšega zdravljenja okužb. Največji delež primerov povzročajo okužbe, ki so pridobljene v domačem okolju (Gomez-Valero in sod., 2009).

Med letoma 1995 in 2005 je bilo v ZDA prijavljenih 656 izbruhov legioneloze, pri čemer je bilo 100 izbruhov povezanih z okužbami v bolnišnicah, 160 z okužbami v domačem okolju, 390 z okužbami na potovanjih in šest nepojasnjenih (Gomez-Valero in sod., 2009).

Za evropsko spremljanje legioneloz so leta 1986 ustanovili Evropsko delovno skupino za spremljanje legionelnih okužb (EWGLI; ang. European Working Group for *Legionella* infections), kjer so leto kasneje izdali Evropsko shemo spremljanja legionarske bolezni (EWGLINET; ang. European Surveillance Scheme for Travel Associated Legionnaires' Disease). Od aprila leta 2010 je ta shema pod okriljem ECDC in se imenuje Evropska mreža za spremljanje legioneloz (ELDSNet; ang. European Legionnaires' Disease Surveillance Network). Vključene so vse članice države Evropske unije (EU) ter Norveška in Islandija (EEA). Slovenija se je pridružila leta 1999 (ECDC, 2015).

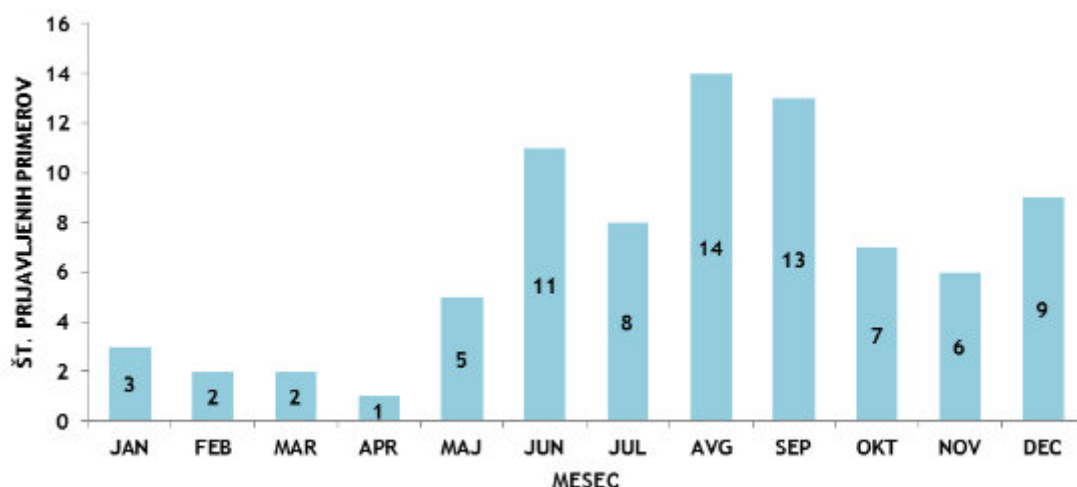
Avgusta leta 2010 je v Sloveniji izbruhnila legionarska bolezen v enem izmed domov za ostarele. Zbolelo je 15 oseb izmed 234 nastanjenih. Povprečna starost bolnikov je bila 55 let. Okužbo z *L. pneumophila* sg. 1 so potrdili z dokazom topnega antigena v urinu bolnikov, s serokonverzijo protiteles ter z metodo PCR. Iz kužnine enega bolnika so bakterijo tudi izolirali. Prav tako so odvzeli 23 vzorcev vode iz različnih lokacij, pri čemer so v enem izmed vzorcev izolirali *L. pneumophila* sg. 1. S sekvenčno analizo sedmih genov legionele, izolirane iz bolnikove kužnine in iz vode, so dokazali enaka genotipa in s tem potrdili vir okužbe bolnikov. Po izbruhu legioneloze so opravili kemijsko in toplotno dezinfekcijo vroče in hladne vode (Trop Skaza in sod., 2010).

Število prijavljenih okužb z legionelami se je v Sloveniji od leta 2011 do leta 2012 povečalo za skoraj dvakrat (slika 16) (IVZ, 2013).



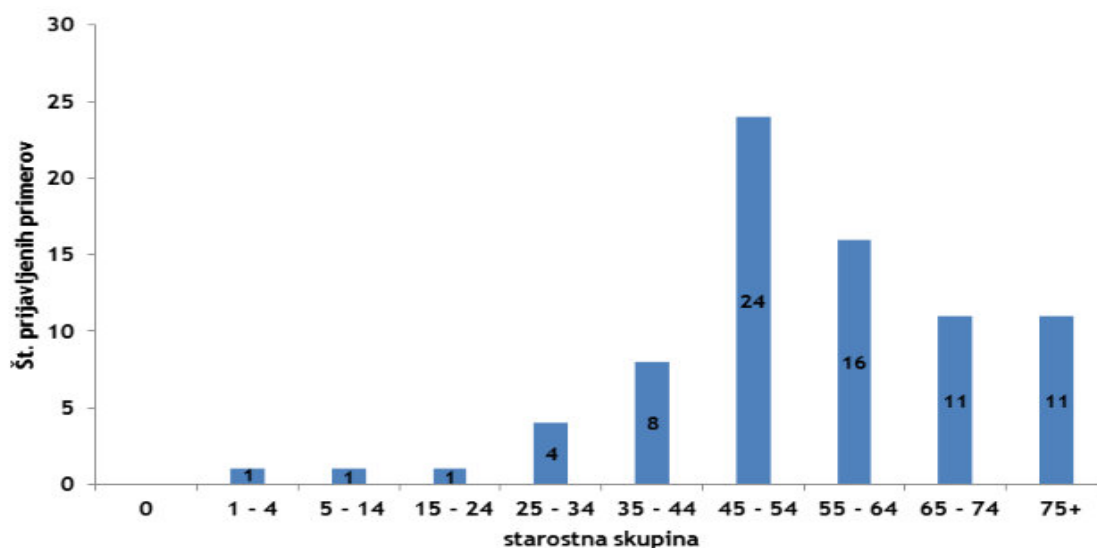
Slika 16: Prijavljeni primeri legioneloze v Sloveniji od 1998 do 2013 (IVZ, 2013; NIJZ, 2014)

V Sloveniji je bilo v letu 2011 prijavljenih 44 bolnikov z legionelozo. Incidenca je znašala 2,14 na 100 000 prebivalcev (IVZ, 2012). Leta 2012 je bilo v Evropi prijavljenih 5856 primerov legioneloze v 30 državah z najmanj 419 smrtnih izidov (ECDC, 2014), medtem ko je v Sloveniji bilo prijavljenih 81 bolnikov z enim smrtnim izidom. Incidenca je znašala 3,9 na 100 000 prebivalcev, kar kaže, da Slovenija ostaja ena izmed držav v Evropi z najvišjo incidenčno stopnjo legioneloz. Povprečna starost bolnikov je bila 56,8 leta, pri čemer je več kot polovica bolnikov zbolela od začetka junija do konca septembra (slika 17). Pri vseh prijavljenih bolnikih je laboratorijska diagnoza temeljila na dokazanem legionelnem topnem antigenu v urinu, pri čemer so trije bolniki imeli v izločku dihal dokazano tudi legionelno DNA. Dvema bolnikoma so iz kužnin dihal legionelo prav tako izolirali (IVZ, 2013).



Slika 17: Prijavljeni primeri legioneloze po mesecih v letu 2012 (IVZ, 2013)

V letu 2013 je bilo prijavljenih 77 bolnikov z legionarsko boleznijo s štirimi smrtnimi izidi. Incidenca je znašala 3,7 na 100 000 prebivalcev, kar je nekoliko nižje od leta 2012. Povprečna starost bolnikov je bila 55,6 let, pri čemer je malo manj kot polovica bolnikov zbolela od začetka maja do konca septembra. Pri 75 prijavljenih bolnikih je diagnoza temeljila na dokazu antigena legionele v urinu, trije od teh so imeli dodatno pozitiven test PCR v izločku dihal. En bolnik je imel legionelozo potrjeno na osnovi 4-kratnega porasta titra protiteles in eden na osnovi pozitivnega testa PCR v bronhoalveolarnem izpirku (NIJZ, 2014).



Slika 18: Prijavljeni primeri legioneleze v Sloveniji po starostnih skupinah v letu 2013 (NIJZ, 2014)

V državah EU in EEA se je legionarska bolezen od leta 2012 pa vse do 2014 večinoma pojavljala sporadično z nizko incidenčno stopnjo (1,1 na 100 000 prebivalcev). Največ primerov (84 % od vseh) legioneloz je bilo prijavljenih v Italiji, Franciji, Španiji, Nemčiji, Angliji in Nizozemski. Do edinega večjega izbruha je prišlo v Nemčiji, v mestu Warstein, kjer se je okužilo približno 160 ljudi (ECDC, 2014).

2.4.5 Zdravljenje in preprečevanje okužb

Za usepešen izid zdravljenja legionarske bolezni je pomemben pravočasen pričetek ustrezne terapije, bolnikova starost in njegov imunski status (Palusinska-Szyszl in Cendrowska-Pinkosz, 2009). V preteklosti so za zdravljenje legionarske bolezni uporabljali eritromicin. Zaradi njegovih stranskih učinkov, se sedaj uporabljata predvsem azitromicin in levofloksacin oz. drugi fluorokinoloni (Fields in sod., 2002).

Za preprečevanje okužb z legionelo je pomembno odstranjevanje mikroorganizmov iz vodnih sistemov. Na območjih z visokim tveganjem, kot so bolnišnične enote za intenzivno nego, se priporoča redno spremljanje koncentracij legionel v vodi. Pri koncentraciji 10 CFU/mL vode se priporoča razkuževanje. Opisane so različne metode za preprečevanje rasti legionel v sistemih pitne vode. Najpogosteje se uporablja kloriranje vode in pregrevanje s spiranjem vodovodnega sistema, lahko se uporablja tudi obsevanje z

ultravijolično svetlobo, ionizacija s kovinami in uporaba biocidov (Steinert in sod., 2002). Legionele, ki so znotraj praživali, kažejo veliko večjo odpornost proti razkužilom (Taylor in sod., 2009). Da bi lahko preprečili okužbe z legionelami, je priporočena temperatura hladne vode manj kot 20 °C (Surman-Lee in sod., 2007). Segrevanje vode 10 minut pri 80 °C, je zelo učinkovito pri zmanjševanju števila legionel in trofozoitov praživali, ni pa učinkovito pri uničevanju cist praživali (Taylor in sod., 2009).

2.4.6 Laboratorijska diagnostika

Legionele povzročajo od 2 do 15 % vseh doma pridobljenih pljučnic. Obolevnost in izid bolezni je odvisen od imunskega stanja bolnika in zdravljenja (Blyth in sod., 2009). Čeprav so se diagnostične metode od njenega odkritja leta 1976 izboljšale, pa še vedno ni na voljo testa z visoko občutljivostjo in visoko specifičnostjo, s katerim bi lahko dokazali okužbo s katerokoli vrsto iz rodu *Legionella* (Diederer, 2008). Legionele osamimo iz bolnikove kužnine na gojišču BCYE, razen vrst *L. oakridgensis* in *L. spiritensis*. Vrste znotraj rodu *Legionella* lahko razlikujemo z biokemijsko analizo, serološkimi testi, analizo nukleinskih kislin (Fields in sod., 2002) in z monoklonskimi protitelesi (Hornei in sod., 2007b).

Po evropskih smernicah (ECDC; ang. European Centre for Disease Prevention and Control) legionarsko bolezen potrdimo z osamitvijo bakterije iz bolnikove kužnine, z dokazom legionelnega topnega antigena v urinu bolnika ali s 4-kratnim povečanjem specifičnih protiteles proti bakteriji *L. pneumophila* sg. 1 v parnih serumih. Verjetno okužbo z legionele pa ugotovimo z dokazom legionelne DNA s testom PCR, z dokazom protiteles proti *L. pneumophila* sg. 2 – 14 ali drugim vrstam legionel ter z odkrivanjem antigena bakterije *L. pneumophila* z metodo DIF (Sočan in Šubelj, 2012). Ker pa ima vsaka diagnostična metoda omejitve glede občutljivosti in specifičnosti, se za dokaz legioneleze priporoča uporaba kombinacije večih testov (Blyth in sod., 2009).

2.4.6.1 Osamitev in kultivacija legionel

Bakterijo *L. pneumophila* so prvič izolirali tako, da so za gojenje uporabili Müller-Hintonov agar z dodatkom hemoglobina in reagenta isovitalex (MH-IH). Izkazalo se je, da legionele potrebujejo za svojo rast topno obliko železa in aminokislino L-cistein. Te

ugotovitve so vodile do razvoja agarja Feeley-Gorman, ki je zagotovil boljšo rast mikroorganizma. Kasneje so v gojišče vključili še oglje in kvasni ekstrakt in ga poimenovali agar CYE (Fields in sod., 2002). To gojišče so nato obogatili z α -ketoglutaratom in ga poimenovali v BCYE- α , ki je sedaj standardno gojišče za kultivacijo legionel. Običajno v gojišče dodamo še polimiksin, cikloheksimid in vankomicin, s katerimi zavremo rast drugih bakterij in gliv. Za boljšo rast nekaterih vrst legionel (npr. *L. bozemanii* in *L. micdadei*) agarju BCYE α dodamo goveji serumski albumin (Diederer, 2008).

Osamitev bakterije *L. pneumophila* velja za zlati standard pri dokazovanju legionarske bolezni zaradi 100 % specifičnosti, a žal ima le 50 - 60 % občutljivost (Blyth in sod., 2009). Bakterijo izoliramo najpogosteje v sedmih do desetih dneh, druge vrste legionel lahko rastejo še počasneje. Izoliramo jo lahko iz različnih kužnin (Diederer, 2008), kot so sputum, bronhoalveolarni izpirek (BAL; ang. bronchoalveolar lavage), bronhialni aspirat, pljučno tkivo in kri (Fields in sod., 2002). Vendar bolniki z legionarsko boleznijo redko proizvajajo sputum (Blyth in sod., 2009). Legionelo so izolirali tudi iz različnih izvenpljučnih kužnin, kot so kostni mozeg, prostetične srčne zaklopke in rane na prsnici (Fields in sod., 2002). Nekatere vrste legionel bolje rastejo v prisotnosti 5 % CO₂. Mlade kolonije so sive, okrogle in imajo videz brušenega stekla. V premeru merijo 0,25 - 0,5 mm. Nato kolonije postanejo konveksne, v premeru merijo 1 - 2 mm, pod UV-svetlobo rumeno fluorescirajo. Zanje je prav tako značilna iridescenca, za nekatere vrste tudi modro-bela ali rdeča avtofluorescenca. Več dni stare kolonije počasi izgubljajo videz brušenega stekla in iridescenco, maksimalni premer le teh je 3 - 4 mm. Sčasoma se kolonije popolnoma izravnajo. Stare kolonije je glede na morfološke lastnosti težko ločiti od kolonij drugih bakterij, zato je zelo pomembno zgodnje pregledovanje kolonij legionel. Za identifikacijo lahko uporabimo dokaz rasti v odvisnosti od L-cisteina, molekularne tehnike in serotipizacijo. Večina sevov je katalaza pozitivnih, razgrajuje želatino, sintetizira beta-laktamazo, lipazo in fosfolipazo (Edelstein in Cianciotto, 2006). Tudi dodatek indikatorskih barvil pomaga pri identifikaciji (Murdoch, 2002).

2.4.6.2 Metoda neposredne imunofluorescence z uporabo monoklonskih protiteles (DIF)
Z metodo neposredne imunofluorescence (DIF) lahko dokažemo legionele v respiratornih izločkih in vzorcih tkiva bolnika. Metoda je hitra, s specifičnostjo več kot 90 %, a ima slabšo občutljivost (25 – 66 %), zato se le redko uporablja v diagnostične namene (Blyth in sod., 2009). Pri uporabi poliklonskih protiteles so možne navzkrižne reakcije z bakterijami iz rodov *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* in *Flavobacterium*. Navzkrižnim reakcijam se lahko izognemo z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles (Murdoch, 2003), ki reagirajo z beljakovino zunanje membrane in prepoznajo serološke skupine vrste *L. pneumophila*. Metodo DIF z monoklonskimi protitelesi uporabljamo predvsem za identifikacijo in potrditev izolatov *L. pneumophila*, manj pa za dokaz legionele v kužnini bolnika (Fields in sod., 2002).



Slika 19: Test neposredne imunofluorescence; na sliki vidimo bakterije *L. pneumophila* (Delisle in Tomalty, 2002)

2.4.6.3 Dokaz legionelnega topnega antigena v urinu

Za dokazovanje okužb z legionelo najpogosteje uporabljamo metodo za dokaz legionelnega topnega antigena v urinu bolnika. Topni antigen legionele dokazujemo s testom ELISA in z imunokromatografskim membranskim testom ICT, s katerim rezultate pridobimo v 15 minutah in ni potrebna posebna laboratorijska oprema (Fields in sod., 2002). Test ICT je enostaven za izvedbo, specifičnost in občutljivost pa sta podobni kot pri testih ELISA (Blyth in sod., 2009). Topni antigen je komponenta LPS celične stene legionel in je toplotno stabilen. Dokažemo ga že prvi do tretji dan po pojavu bolezenskih znakov, v urinu ostaja od nekaj dni do nekaj tednov, medtem ko so v eni izmed raziskav dokazali legionelni topni antigen v urinu še 300 dni po okužbi. Metoda ima visoko

specifičnost (nad 99 %), je hitra in ima relativno dobro občutljivost (70 %), zato se najpogosteje uporablja za dokazovanje legionelne okužbe (Diederer, 2002). Občutljivost metode lahko povečamo za 20 %, če koncentriramo urin pred začetkom testiranja (Murdoch, 2003). Glavna pomanjkljivost teh testov je, da zaradi slabše občutljivosti z njimi ne moremo dokazovati okužb z drugimi vrstami kot je *L. pneumophila* sg. 1 (Fields in sod., 2002).

2.4.6.4 Serološke metode

Okužbe z legionelo lahko ugotavljamo tudi z dokazovanjem protiteles. Zaradi zamika v protitelesnem imunskem odzivu je potrebno testirati parne serume (Blyth in sod., 2009). Najpogosteje dokazujemo protitelesa IgM, IgG in IgA s testom posredne imunofluorescence (IFA) (Diederer, 2008), ki je serološki referenčni test. Dokazovanje protiteles IgM ima manjši pomen, saj po akutni okužbi ta protitelesa lahko ostajajo v krvi daljše obdobje ali pa ne nastajajo. Zato okužbo ugotavljamo s testiranjem parnih serumov in dokazom serokonverzije celokupnih protiteles. Večinoma 4-kratno povečanje titra protiteles zaznamo šele v treh do štirih tednih po prvem odvzemu seruma, lahko pa šele po več kot desetih tednih (Murdoch, 2003). Opažene so bile tudi navzkrižne reakcije zaradi prisotnosti protiteles proti bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* pri bolnikih s cistično fibrozo in navzkrižne reakcije med bakterijama vrste *Legionella* in *Campylobacter* (Fields in sod., 2002). Pomanjkljivost serološkega testiranja se kaže v nezmožnosti dokazovanja protiteles proti posameznim vrstam legionel (Diederer, 2008). Serološke metode se tako danes uporabljajo predvsem v epidemiološke namene in še vedno ostajajo edina metoda za prepoznavanje preteklih okužb z legionelo (Blyth in sod., 2009).

2.4.6.5 Dokaz legionelnih nukleinskih kislin

Danes pogosto uporabljamo verižno reakcijo s polimerazo (PCR) za dokaz zgodnje okužbe z legionelo, saj zagotovi rezultate v kratkem času. S testom PCR lahko dokazujemo okužbe, ki jih je povzročila katerakoli vrsta legionel ali njena serološka skupina (Fields in sod., 2002). Metoda PCR ima enako ali boljšo občutljivost kot metoda kultivacije (Murdoch, 2003). PCR v realnem času se z uporabo hibridizacijske sonde lahko uporabi za hitro dokazovanje legionel v kliničnih vzorcih. S tem se zmanjša tveganje za navzkrižno

kontaminacijo, ker ni dodatne analize pridelkov PCR po končani reakciji PCR (Fields in sod., 2002). Tarčna DNA diagnostičnih testov PCR so specifične regije genov za 16S rRNA, 23S-5S »spacer« regije, 5S rDNA (Diederer, 2008), gen za 5S rRNA (Fields in sod., 2002) in gen *mip*. Legionelno DNA lahko dokažemo tudi v urinu, serumu in polni krvi bolnikov z legionarsko boleznijo, vendar ima PCR v tem primeru manjšo občutljivost (30 – 86 %) (Diederer, 2008).

2.4.6.6 Tipizacija legionel

Tipizacija legionel se uporablja predvsem v epidemiološke namene. Glavni pomen tipizacije bakterije *L. pneumophila* je ugotavljanje vira okužbe bolnika z legionelo, saj omogoča primerjavo legionele izolirane iz okolja in iz kužnin bolnika (Gomez-Valero in sod., 2009). Za opredelitev podtipov vrste *L. pneumophila* obstaja več fenotipskih in genotipskih metod (Gaia in sod., 2005).

Najprej se je uporabljala serotipizacija z monoklonskimi protitelesi, kjer gre za fenotipsko metodo razlikovanja podtipov *L. pneumophila*, predvsem sg. 1. V ta namen so izdelali monoklonska protitelesa, ki jih imenujemo protitelesa Dresdenskega panela (Helbig in sod., 2002). S slednjimi ločimo serološke skupine in podtipe oz. monoklonske podskupine glede na razlike v površinskih antigenih LPS posameznih sevov (Wagner in sod., 2007). Vsaka serološka skupina ima specifičen epitop, ki ga najdemo na LPS (Helbig in sod., 2009). S podtipi *L. pneumophila* sg. 1, ki nosijo z virulenco povezan epitop, reagira monoklonsko protitelo MAb 3/1 in le ti povzročajo največ primerov legioneloz (Wagner in sod., 2007). Helbig in sodelavci (2002) so ugotovili, da kar 66,8 % legioneloz povzroča MAb 3/1-pozitivni podtip *L. pneumophila* sg. 1. S temi podtipi prevladujejo okužbe povezane s potovanji (85,8 %), medtem ko je bolnišnično pridobljenih okužb najmanj. Z monoklonskimi protitelesi lahko razlikujemo le deset podtipov *L. pneumophila* sg. 1.

Za tipizacijo *L. pneumophila* se uporablja tudi več genotipskih metod, ki temeljijo na odkrivanju sprememb, razlik na nivoju bakterijskega genoma. Med temi metodami so pulzna gelska elektroforeza (PFGE; ang. pulsed-field gel electrophoresis), metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP; restriction fragment length polymorphism) in metoda polimorfizma dolžin pomnoženih delov (AFLP; ang. amplified

fragment length polymorphism) (Gomez-Valero in sod., 2009). Slednjo so uporabljali člani skupine EWGLI, a so zaradi težav s primerjavo profilov legionelnih izolatov med posameznimi laboratoriji, razvili metodo pri kateri določamo nukletidno zaporedje izbranih sedmih genov (SBT; ang. sequence-based typing) (Gaia in sod., 2005). Le ta je bolj robustna, neodvisna od izolacije seva in velja za »zlati standard« za tipizacijo *L. pneumophila* (Ginevra in sod., 2008). Z njo analiziramo sedem genov, in sicer *flaA* (podenota bička), *pilE* (pilin tipa IV), *asd* (aspartat- β -semialdehid dehidrogenaza), *mip* (peptidil prolil izomeraza), *mompS* (beljakovina zunanje membrane), *proA* (cinkova metaloproteaza) in *neuA* (N-acilneuraminat citidilil transferaza) (Edwards in sod., 2008; Ginevra in sod., 2009). Kombinacija zaporedij genov nam poda alelni profil ali sekvenčni tip. Rezultati se shranjujejo v centralni bazi podatkov in se zlahka izmenjujejo ali primerjajo med laboratoriji (Ginevra in sod., 2008). Ginevra in sodelavci (2008) pa so razvili nSBT, ki vključuje vgnezdno PCR (nSBT; ang. nested-PCR based sequence-based typing). Metoda omogoča genotipizacijo legionele neposredno iz kliničnih vzorcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in reagenti

- tripansko modrilo
- gentamicin 100µg/mL
- gojišče RPMI-1640M
- agar za gojenje legionel (BMPA- α in BCYE- α)
- 2-% glutaraldehid
- 2-% osmij
- etanol 30-, 50- in 70 %
- absolutni etanol
- propilenov oksid, 100 %
- smola za vklapljanje
- PBS-pufer
- bacilol
- razkužilo proti mikoplazmam

3.1.2 Drobni laboratorijski material

- avtomatske pipete z različnimi območji pipetiranja
- hemocitometer
- krovna stekelca
- mikrocentrifugirke, 1,5 mL in 2 mL
- pipete za enkratno uporabo, 10 mL in 25 mL
- pipetni nastavki za 10-100 µL in 100-1000 µL
- mikrotiterske ploščice s 24-imi vdolbinicami (24-well)
- plastične centrifugirke, 10 mL in 50 mL
- sterilne hokejke
- stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke
- plastične eze
- fiole, 10 mL
- stekleničke za gojenje celičnih kultur za 25 cm² in 75 cm²

- petrijevke za gojenje legionel
- posoda za inkubacijo gojišč
- lateksne rokavice
- ustna maska
- laboratorijska halja
- pasterjevke, 1 mL, 2 mL in 3 mL
- spatula
- britev

3.1.3 Laboratorijska oprema

- nefelometer
- centrifugi Eppendorf 5424R in Sigma 3K15
- inkubator CO₂
- invertni mikroskop NIKON ECLIPSE TS100
- hladilnik (+ 4 °C) in zamrzovalnik (- 20 °C)
- fluorescentni mikroskop NIKON ECLIPSE E400
- presevni elektronski mikroskop JEOL 1200-EX II.
- pipetor za pipete
- zaščitna mikrobiološka komora
- naprava za rezanje ultratankih rezin – ultramikrotom Ultracut Reichert Jung
- namizna centrifuga Eppendorf MiniSpin
- mešalo/vorteks

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje legionel

Posamezne podtype *L. pneumophila* sg. 1 smo gojili na gojišču BCYE α z L-cisteinom. Gojišče BCYE- α vsebuje aktivirano oglje (2 mg/L), kvasni ekstrakt (10 mg/L), agar (13 mg/L), pufer ACES (10 g/L), α -ketoglutarat (1,0 g/L), L-cistein HCl (0,4 g/L) in železov pirofosfat (0,25 g/L). Gojišče smo umerili na pH 7.

Na gojišču BCYE- α smo gojili virulentnejše podtipa *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia, Knoxville in Benidorm ter manj virulentna podtipa Oxford in Bellingham. Plošče smo inkubirali pri 37 °C in 5 % CO₂. Po 3 do 4 dneh so na gojišču zrasle sivo bele kolonije z rožnatim robom. Legionele smo nato pripravili v koncentraciji 3×10^8 /mL za okužbo celic MM6. V ta namen smo kolonije legionel iz gojišča BCYE- α postopoma prenašali v fiole s sterilno in destilirano vodo do zelene koncentracije 1 McFarland, ki ustreza koncentraciji bakterij 3×10^8 CFU/mL.

3.2.2 Gojenje humanih monocitnih celic Mono Mac 6 (MM6)

Humane monocitne celice Mono Mac 6 (MM6) smo pridobili iz Inštituta DSMZ (Deutsche Sammlung von Micro-organismen und Zellkulturen GmbH) iz Nemčije. Celična linija monocitov MM6 izvira iz periferne krvi pacienta z monoblastno levkemijo. Je edina celična linija, ki neprestano izraža fenotipske in funkcionalne lastnosti zrelih makrofagov in za razliko od drugih monoblastičnih celičnih linij (U937 in THP-1) ne potrebuje stimulacije s forbol estri. Celice se ne pritrajajo na dno, ampak so suspenzijska celična linija (Khweek in Amer, 2010). Gojili smo jih pri 37 °C in 5 % CO₂ v stekleničkah z gojiščem RPMI-1640M, ki smo mu dodali 10 % fetalni telečji serum (FTS), 2 mM L-glutamin, 1 % neesencialne aminokisline (NEAA) in OPI (150 µg oksalacetat, 150 µg piruvat in 8,2 µg/mL goveji inzulin). Pomnoževalni čas celic je 2 dni, zato smo jih razmnoževali dvakrat na teden v razmerju 1 : 3 s svežim gojiščem RPMI-1640M tako, da smo jih iz stekleničke prenesli v epruveto, jih centrifugirali 8 min/100xg pri sobni temperaturi in nato odstranili supernatant. Usedlino smo resuspendirali v 4 mL gojišča RPMI-1640M, nežno premešali in nato prenesli v nove stekleničke. Natančnejša metoda gojenja celic MM6 je opisana v ICCVAM Test Method Evaluation Report: AppendixC5-2008. Po namnožitvi celic MM6 v gojišču RPMI-1640M, smo slednje s pomočjo hemocitometra pripravili v koncentraciji 2×10^7 /mL. Neposredno pred uporabo v eksperimentu, smo jih dvakrat spirali z RPMI-1640M brez FTS, ter po zadnjem centrifugiranju usedlini celic dodali 2 mL RPMI-1640M brez FTS in premešali.

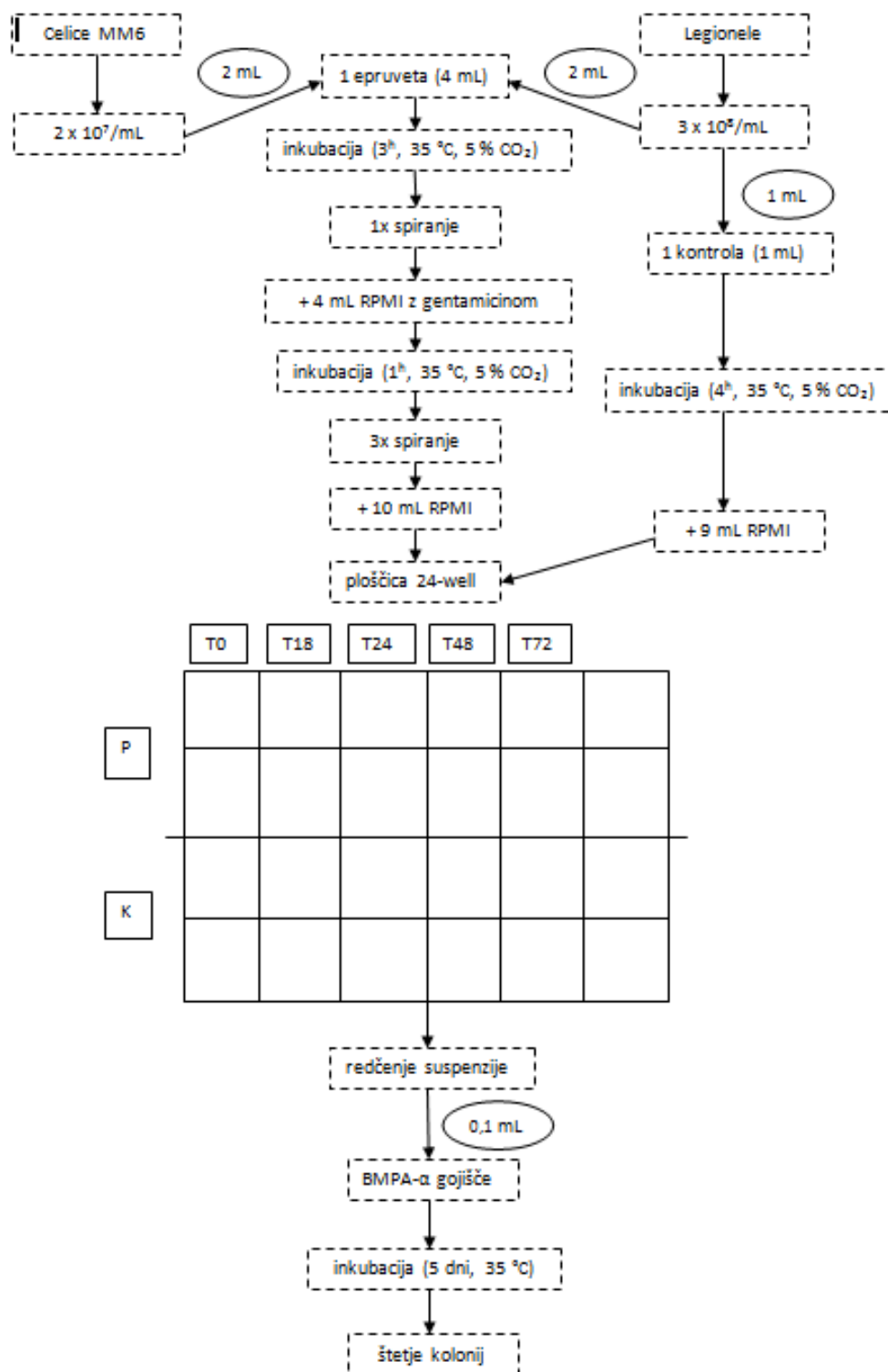
3.2.3 Okužba celic MM6 z legionelo in znotrajcelično razmnoževanje

Legionele, ki smo jih imeli pripravljene v vodni raztopini v koncentraciji 3×10^8 CFU/mL, smo centrifugirali 20 min/5000xg. Supernatant smo po centrifugiranju odstranili ter sedimentu dodali 3 mL gojišča RPMI-1640M. Po premešanju, smo 1 mL suspenzije odvzeli za kontrolne postopke, preostala 2 mL pa smo združili z 2 mL pripravljenih celic MM6. Celice z legionelami smo inkubirali tri ure pri 35 °C in 5 % CO₂. Med inkubacijo smo epruveti večkrat premešali, da ni nastala usedlina. Po inkubaciji smo epruveto z legionelami in celicami MM6 centrifugirali 10 min/400xg, odstranili supernatant in sedimentu dodali 4 mL gojišča RPMI-1640M z dodanim gentamicinom ter inkubirali eno uro. Na ta način smo uničili vse legionele, ki so bile zunaj celic. Nato smo celice MM6 z legionelami trikrat sprali z gojiščem RPMI-1640M brez seruma, s čimer smo odstranili antibiotik iz gojišča. Po tretjem spiranju legionel s celicami MM6 smo sedimentu dodali 10 mL gojišča RPMI-1640M, premešali in porazdelili v ploščico s 24 vdolbinicami, in sicer v vsako vdolbinico po 1 mL. V vsaki vdolbinici smo imeli koncentracijo 10^6 celic. Enak postopek smo izvedli pri kontroli, kjer smo legionele inkubirali v gojišču RPMI-1640M brez seruma. Pri kontroli smo enemu mL suspenzije legionel brez celic dodali 9 mL gojišča RPMI-1640M, premešali in po 1 mL porazdelili v ploščico s 24 vdolbinicami. Ploščico smo ustrezno označili in inkubirali v različnih časih: t₀, t_{18^h}, t_{24^h}, t_{48^h} in t_{72^h}. Test smo izvajali v paralelkah. Po določeni inkubaciji smo naredili serijo redčitev s sterilno vodo in centrifugirali 10 minut. Supernatant smo nato prenesli v novi mikrocentrifugirki, sediment pa hipotonično lizirali z dodatkom sterilne destilirane vode in dobro premešali. Lizirane celice in supernatant smo združili ter 0,1 mL suspenzije inokulirani na gojišče BMDA-α in inkubirali 5 dni pri 35 °C. Iz vdolbinice s kontrolo smo tudi odvzeli 0,1 mL in inokulirali na gojišče BMDA-α ter prav tako inkubirali 5 dni pri 35 °C. Gojišče BMDA-α vsebuje agar BCYE z dodanim cefamandolom, polimiksinom in anizomicinom. Vsak dan smo pregledovali gojišča glede rasti legionel. Ko so na gojišču legionele zrasle v kolonijah, smo jih prešteli in rezultate vpisali v tabelo.

Pri končnih rezultatih smo upoštevali povprečje števila CFU obeh paralelk. Za izračun števila CFU/mL smo uporabili naslednjo enačbo (Bacterial dilutions and a fool proof way to figure them out, 2015):

$$\text{CFU/mL} = (\text{št.kolonij na gojišču/delovni volumen})/\text{dilucijski faktor} \quad \dots(1)$$

Pri tem CFU pomeni število kolonij, ki so zrasle na gojišču po določenem času inkubacije. Dilucijski faktor pomeni razredčino, ki smo jo cepili na gojišče (npr. 10^{-4}), kot delovni volumen pa smo vzeli volumen razredčine, ki smo jo cepili na gojišče in v našem primeru je ta volumen znašal 100 μL oz. 0,1 mL. Končne rezultate smo prikazali v preglednicah, grafih in slikah.



Slika 20: Shema postopka metode dela

3.2.4 Elektronska mikroskopija

Z elektronsko mikroskopijo smo opazovali razmnoževalni cikel legionel v celicah MM6 po določenih urah inkubacije (2^h, 3^h, 24^h). Celice MM6 smo okužili z legionelami na enak način kot smo predhodno opisali. Po spiranju celic z legionelami smo vzorec fiksirali v 2 % glutaraldehidu. Inkubirali smo preko noči pri sobni temperaturi. Glutaraldehid smo odstranili s trikratnim spiranjem s PBS pH 7,4. Nato smo vzorec inkubirali eno uro v 1 % OsO₄, ki fiksira lipide. Ponovno smo trikrat spirali s PBS. Po spiranju smo celice vklapljali v 2 % agarozo in pustili 30 minut v hladilniku, da se je strdila. Strjeno agarozo z vzorcem smo 20 minut dehidrirali pri sobni temperaturi, in sicer najprej s 30 % etanolom, nato s 50 % in na koncu še s 70 % etanolom. Nato smo etanol nadomestili s propilen oksidom, le tega pa postopoma zamenjali s smolo, ki tako nadomesti vodo v celicah. V zadnjem koraku smo izvedli polimerizacijo vzorca preko noči pri 60 °C, pri čemer smo agarozne koščke s celicami prenesli v polimerizacijske kapsule. Naslednji dan smo pripravili ultratanke rezine, jih kontrastirali z uranilnim acetatom in svinčevim citratom ter pregledovali s presevnim elektronskim mikroskopom.

4 REZULTATI

4.1 ZNOTRAJCELIČNO RAZMNOŽEVANJE LEGIONEL V CELICAH MM6

V samem postopku smo pregledali 300 plošč, ki smo jih tudi slikovno dokumentirali. Rezultati v spodnjih tabelah tako predstavljajo število kolonij *L. pneumophila*, podtipov Philadelphia, Knoxville, Benidorm, Oxford in Bellingham, izraženih v CFU/mL, ki so zrasle po 5- dnevni inkubaciji na ploščah BMPA- α . Ta števila predstavljajo število legionel, ki so se razmnožile v monocitih tekom svojega razmnoževalnega cikla pri različnih časih. Za izračun CFU/mL smo uporabili povprečje obeh paralelek. Dodana je tudi kontrola v dveh paralelkah.

Prikaz sposobnosti razmnoževanja virulentnejših sevov *L. pneumophila* sg. 1:

- *Legionella pneumophila* Philadelphia

Preglednica 2: Število CFU/mL *L. pneumophila* Philadelphia po petdnevem gojenju na ploščah BMPA- α

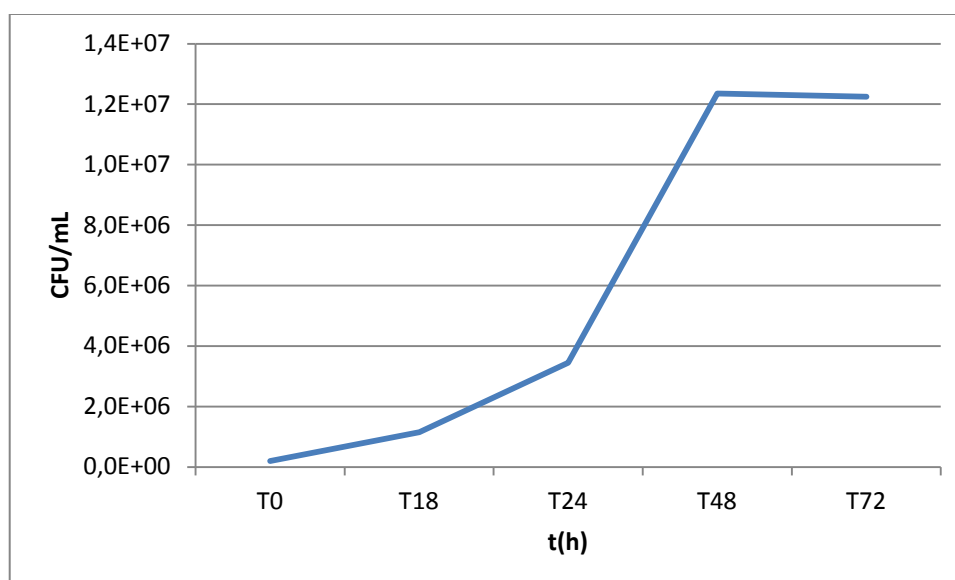
	Časi inkubacije (h)				
5.dan	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelka 1	$2,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$9,5 \times 10^6$
Paralelka 2	0	$1,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
Kontrola 1	$3,8 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$
Kontrola 2	$4,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$

Preglednica 3: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Philadelphia

	Časi inkubacije (h)				
Povprečje	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelke	$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
Kontrole	$3,9 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$



Slika 21: Kolonije *L. pneumophila* Philadelphia na ploščah BMPA- α po petdnevni inkubaciji



Slika 22: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Philadelphia tekom petdnevnega gojenja legionel

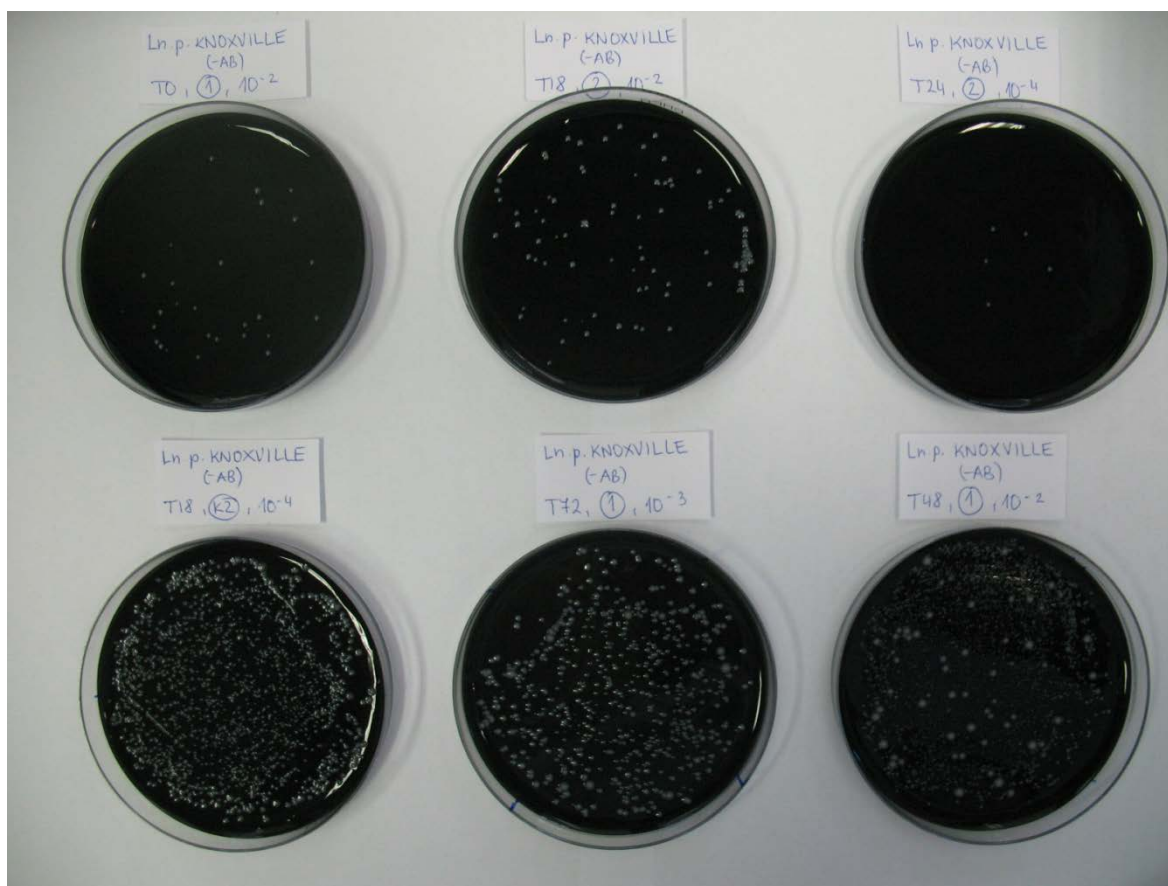
- *Legionella pneumophila* Knoxville

Preglednica 4: Število CFU/mL *L. pneumophila* Knoxville po petdnevnem gojenju na ploščah BMPA- α

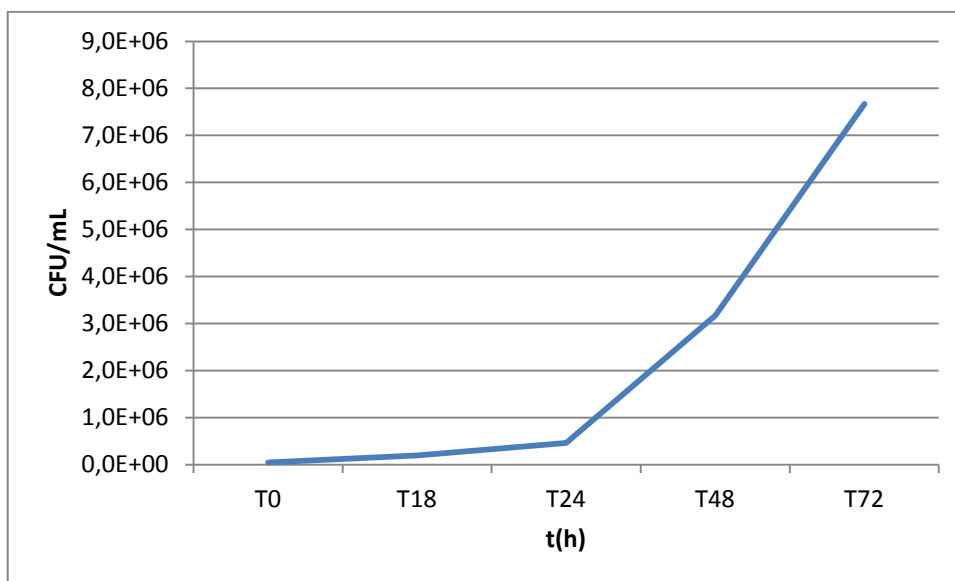
5.dan	Časi inkubacije (h)				
	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelka 1	$2,7 \times 10^4$	$2,9 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$4,7 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$
Paralelka 2	$6,8 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$5,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$
Kontrola 1	$1,1 \times 10^8$	$9,3 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$
Kontrola 2	$3,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$

Preglednica 5: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Knoxville

Povprečje	Časi inkubacije (h)				
	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelke	$4,8 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$
Kontrole	$2,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$



Slika 23: Kolonije *L. pneumophila* Knoxville na ploščah BMPA- α po petdnevni inkubaciji



Slika 24: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Knoxville tekom petdnevnega gojenja legionel

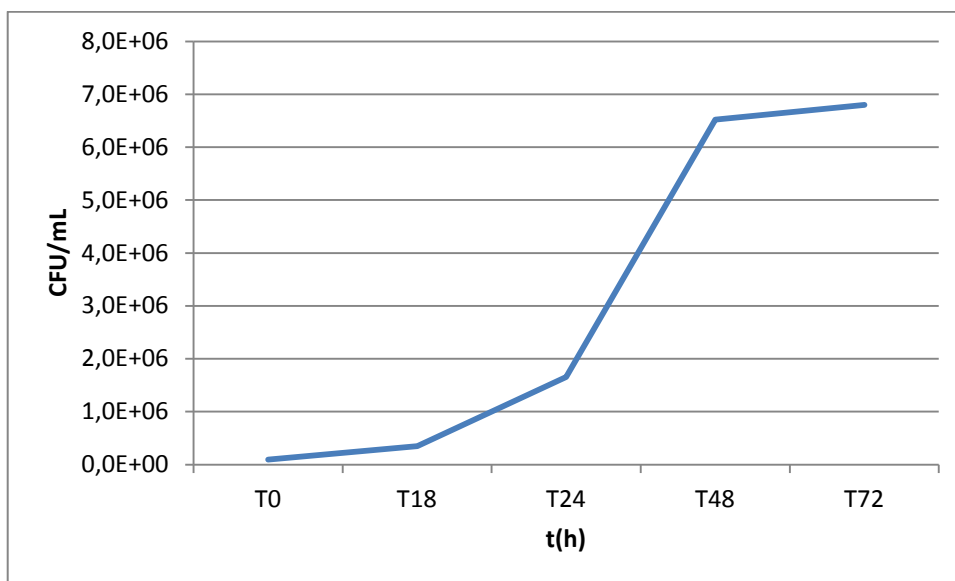
- *Legionella pneumophila* Benidorm

Preglednica 6: Število CFU/mL *L. pneumophila* Benidorm po petdnevem gojenju na ploščah BMPA- α

5.dan	Časi inkubacije (h)				
	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelka 1	$9,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$
Paralelka 2	$9,3 \times 10^4$	$4,6 \times 10^5$	$9,8 \times 10^5$	$5,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$
Kontrola 1	$1,0 \times 10^8$	$9,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$8,1 \times 10^7$	$9,6 \times 10^7$
Kontrola 2	$3,6 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$

Preglednica 7: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Benidorm

Povprečje	Časi inkubacije (h)				
	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelke	$9,3 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$
Kontrole	$2,3 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$



Slika 25: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Benidorm tekom petdnevnega gojenja legionel

Manj virulentni sevi:

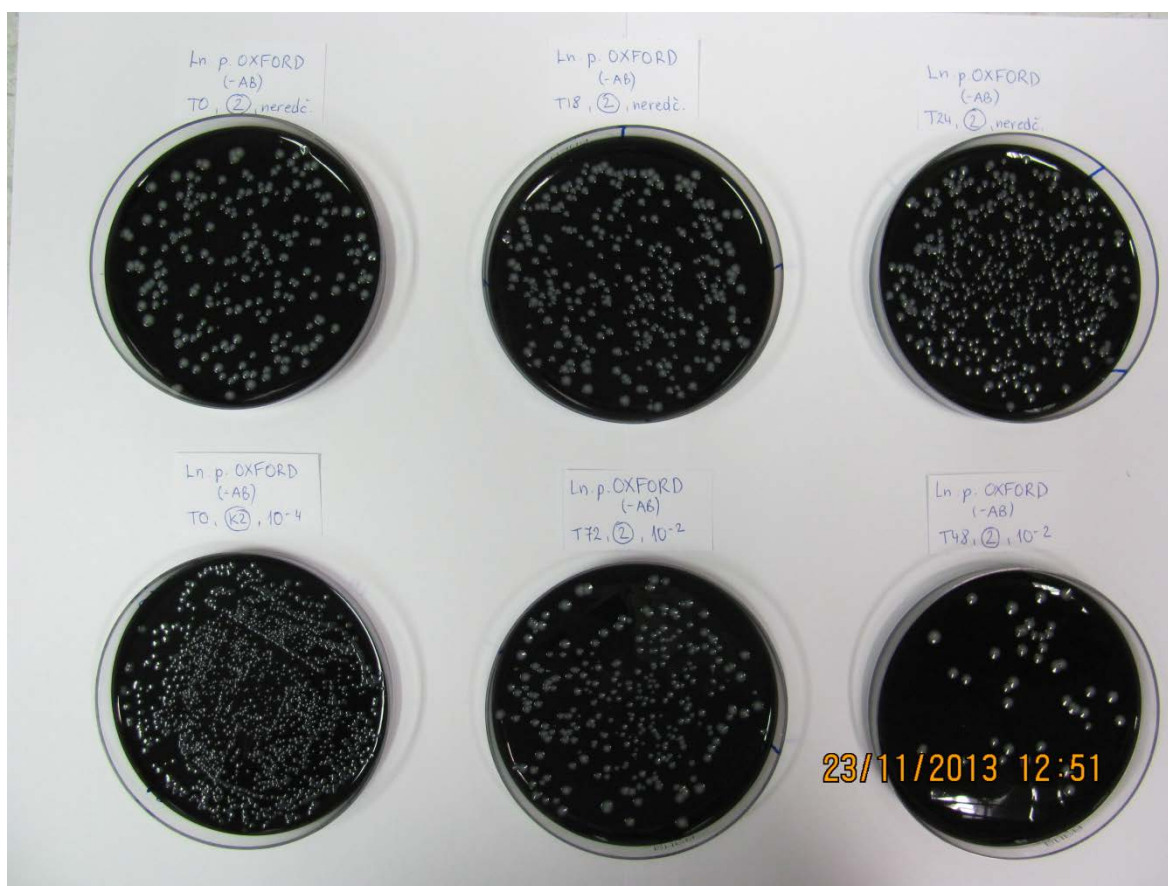
- *Legionella pneumophila* Oxford

Preglednica 8: Število CFU/mL *L. pneumophila* Oxford po petdnevem gojenju na ploščah BMPA- α

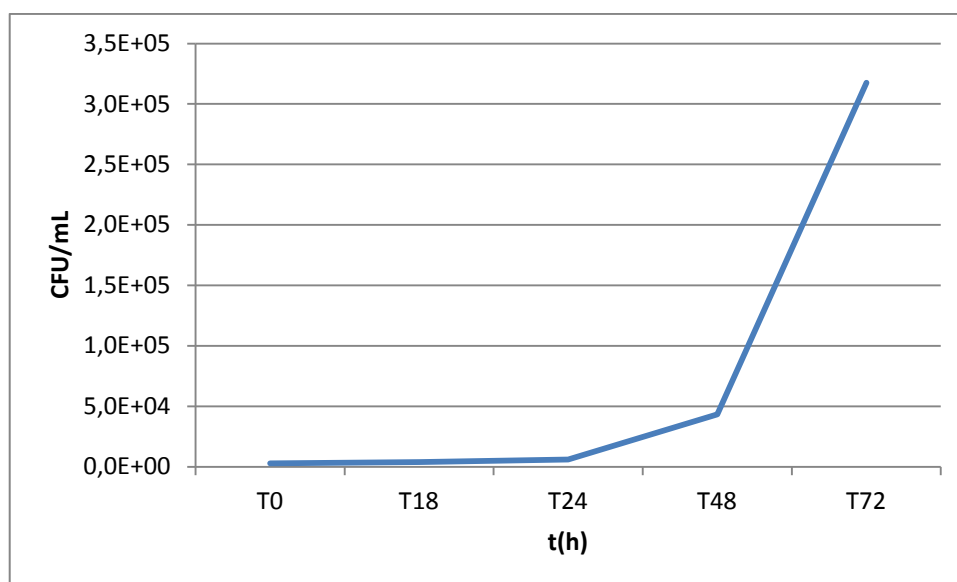
5.dan	Časi inkubacije (h)				
	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelka 1	$3,3 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$4,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5$
Paralelka 2	$2,4 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	$4,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5$
Kontrola 1	$9,9 \times 10^7$	$9,8 \times 10^7$	$9,8 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
Kontrola 2	$2,6 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$9,6 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$

Preglednica 9: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Oxford

Povprečje	Časi inkubacije (h)				
	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelke	$2,8 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5$
Kontrole	$1,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$8,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$



Slika 26: Kolonije *L. pneumophila* Oxford na ploščah BPA- α po petdnevni inkubaciji



Slika 27: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Oxford tekom petdnevnega gojenja legionel

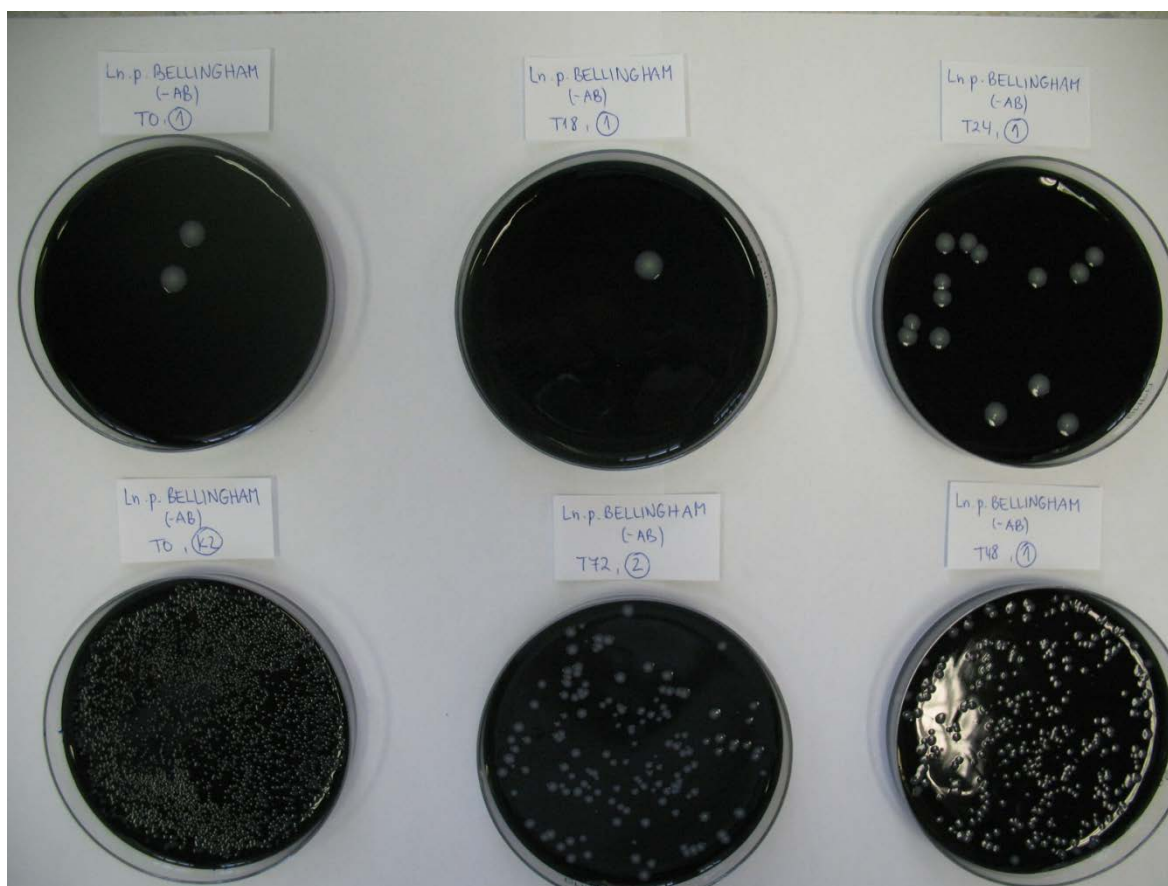
- *Legionella pneumophila* Bellingham

Preglednica 10: Število CFU/mL *L. pneumophila* Bellingham po petdnevnem gojenju na ploščah BMPA- α

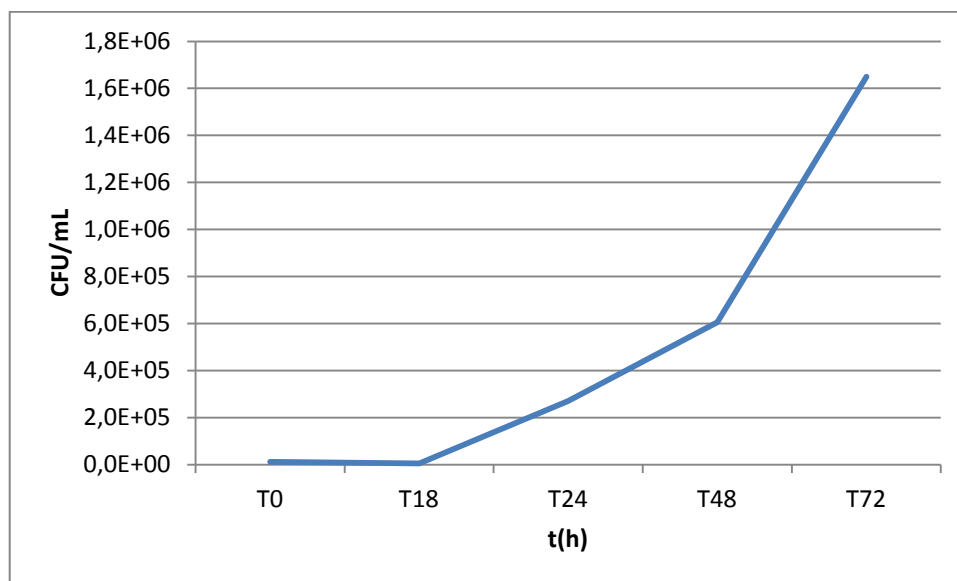
	Časi inkubacije (h)				
5.dan	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelka 1	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
Paralelka 2	$2,4 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
Kontrola 1	$1,4 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$4,8 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
Kontrola 2	$3,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$8,7 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$

Preglednica 11: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Bellingham

	Časi inkubacije (h)				
Povprečje	T0	T18	T24	T48	T72
Paralelke	$1,1 \times 10^4$	$5,1 \times 10^3$	$2,7 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$
Kontrole	$2,4 \times 10^8$	$8,8 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$



Slika 28: Kolonije *L. pneumophila* Bellingham na ploščah BMPA- α po petdnevni inkubaciji

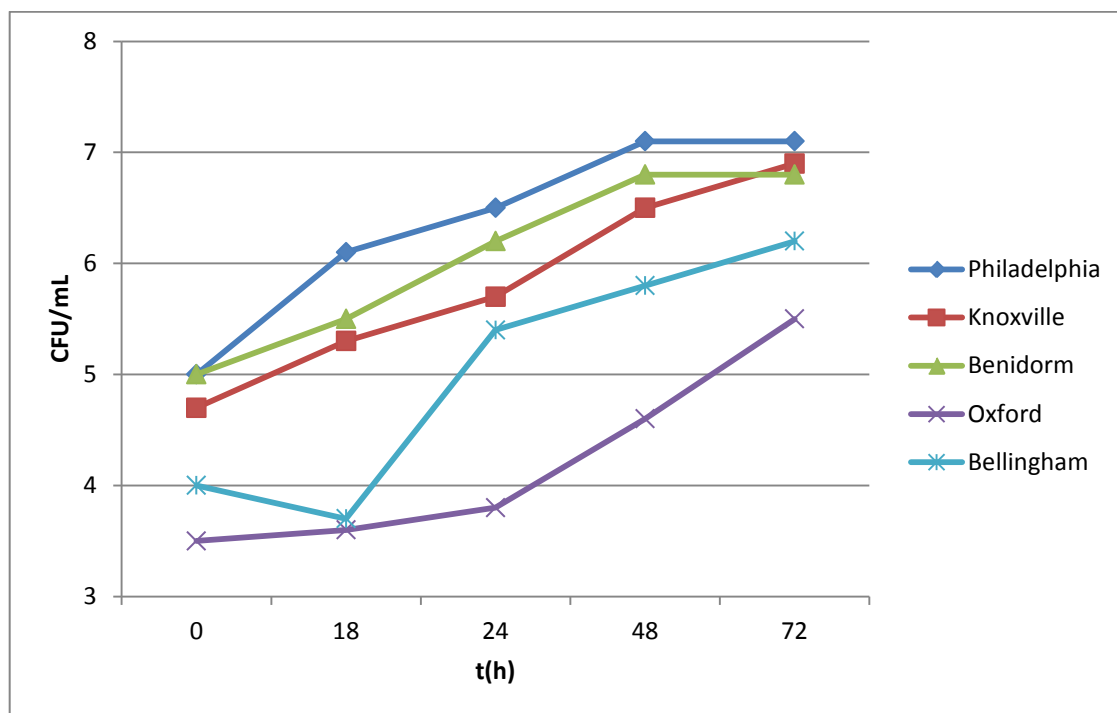
Slika 29: Povprečno število CFU/mL *L. pneumophila* Bellingham tekom petdnevnega gojenja legionel

V preglednici 12 smo prikazali rezultate števila CFU/mL v skupni tabeli. Za lažji pregled in primerjavo smo rezultate predstavili kot števila z isto potenco. Preglednica predstavlja števila CFU/mL, kjer smo celice MM6 gojili v gojišču RPMI 1640-M.

Preglednica 12: Število CFU glede na čas inkubacije za posamezne podtipе *L. pneumophila* sg. 1

<i>L. pneumophila</i> podtip	Število CFU glede na čas inkubacije				
	t0	t18	t24	t48	t72
Philadelphia	0,1 x10 ⁶	1,2 x10 ⁶	3,5 x10 ⁶	12 x10 ⁶	12 x10 ⁶
Knoxville	0,048 x10 ⁶	0,19 x10 ⁶	0,46 x10 ⁶	3,2 x10 ⁶	7,7 x10 ⁶
Benidorm	0,093 x10 ⁶	0,35 x10 ⁶	1,7 x10 ⁶	6,5 x10 ⁶	6,8 x10 ⁶
Oxford	0,0028 x10 ⁶	0,0039 x10 ⁶	0,0059 x10 ⁶	0,043 x10 ⁶	0,32 x10 ⁶
Bellingham	0,011 x10 ⁶	0,0051 x10 ⁶	0,27 x10 ⁶	0,6 x10 ⁶	1,7 x10 ⁶

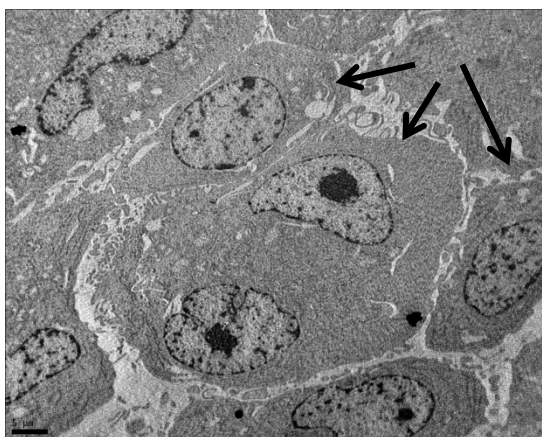
Spodnja slika grafov (slika 30) prikazuje kinetiko rasti posameznih podtipov *L. pneumophila* sg. 1 v celicah MM6.



Slika 30: Kinetika rasti posameznih podtipov *L. pneumophila* sg. 1 v celicah MM6

4.2 ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

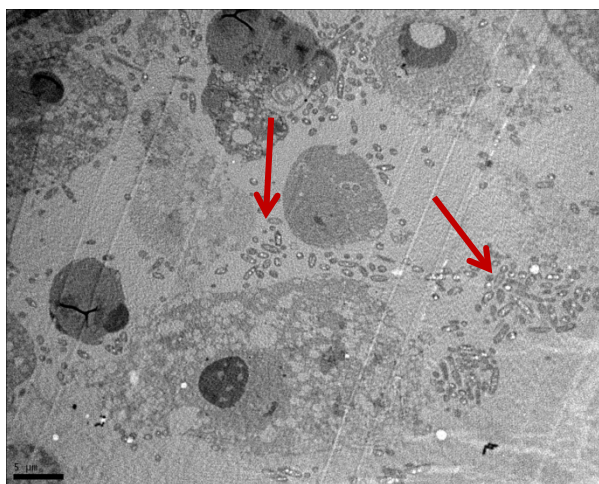
S pomočjo transmissijskega elektronskega mikroskopa smo si ogledali časovni potek razmnoževalnega cikla bakterije *Legionella pneumophila* po 3 in 24 urah inkubacije.



Slika 31: Humane celice MM6; vidni so posamezni monociti (črna puščica) in njihova jedra, legionele niso prisotne (merilo je 5 μ m)



Slika 32: Lokacija legionel (rdeča puščica) in celic MM6 (črna puščica) po 3 urah razmnoževanja; A: legionele so med monociti (merilo: 100 nm), B: legionela vstopa v monocit, membrana se prične uvihavati (merilo: 0.5 μm), C: nekatere legionele so že vstopile v monocit (merilo: 1 μm)



Slika 33: Legionele (rdeča puščica) po 24 urah razmnoževanja v monocitih (manjša povečava; merilo: 5 μm)



Slika 34: Lokacija legionel (rdeča puščica) in celic MM6 po 24 urah razmnoževanja; monocit počí, legionele potujejo iz celice (večja povečava; merilo: 1 μm)

5 RAZPRAVA

Legionella pneumophila vsebuje 15 seroloških skupin. Med njimi je najbolj virulentna *L. pneumophila* sg. 1, pri kateri ločimo več podtipov glede na razlike v zgradbi LPS celične stene in stopnji virulence (Messi in sod., 2013). Ti podtipi se razlikujejo tudi po virulentnosti. Sevi *L. pneumophila* Philadelphia, Knoxville, Benidorm in France/Allentown veljajo za bolj virulentne podtipe, medtem ko so sevi Oxford, OLDA, Bellingham, Heysam in Camperdown manj virulentni.

V naši nalogi smo preučevali razlike v sposobnosti razmnoževanja med posameznimi podtipi *L. pneumophila* sg. 1, kar vpliva na njihovo virulenco. Pričakovali smo, da bo število CFU/mL pri bolj virulentnih sevih višje kot pri manj virulentnih sevih, kar smo tudi dokazali. Opazili smo manjše razlike v številu CFU/mL znotraj skupine bolj virulentnih sevov in znotraj skupine manj virulentnih sevov.

Okužbo monocitov z legionelami smo izvedli s 3-urno inkubacijo in jo nato prekinili z dodatkom gentamicina, s katerim smo uničili nefagocitirane legionele. Nato smo vzorce inkubirali v različnih časih in sicer nič minut (t_0), 18 ur (t_{18}), 24 ur (t_{24}), 48 ur (t_{48}) in 72 ur (t_{72}). Po končani inkubaciji smo vzorce nacepili na gojišče BMPA- α in inkubirali. Rast kolonij smo opazili po 5 dneh. Najmanjše število kolonij je zraslo na ploščah, ki so bile nacepljene z legionelami inkubiranimi s celicami 0 minut, saj se legionele še niso razmnožile v celicah in je bilo število kolonij na gojišču le odraz števila legionel, ki so okužile monocite. Najvišje število kolonij smo dokazali z 48 in 72 urno inkubacijo legionel v celicah MM6. Namreč, po 24 urah večina monocitov počí, s čimer legionele izstopijo in vstopijo v nove celice. V teh primerih je bila večina inokuliranih gojišč neštevna in konfluentna rast legionel. Zato smo naredili več redčitev izhodne suspenzije legionel in celic MM6, kar nam je omogočilo štetje kolonij in kasneje izračun CFU/mL. Za šteвне plošče se upoštevajo samo tiste, na katerih zraste med 20 in 250 kolonij, oz. tudi med 30 in 300 kolonij. Mi smo izjemoma prešteli in v končnih rezultatih uporabili vse plošče, saj smo želeli videti značilen trend naraščanja števila kolonij glede na razmnoževalni cikel legionel. Kolonije legionel so na gojišču zrasle pri vseh časih inkubacije. Opazili smo značilen trend naraščanja števila kolonij glede na cikel razmnoževanja.

Horwitz s sod. (1983) je opravil eno prvih raziskav o razmnoževalnem ciklu bakterije *L. pneumophila*. Humane monocite je inkubiral z visoko koncentracijo legionel. Ugotovil je, da so že po 15 minutah nastale vakuole oz. fagosomi LCV (Horwitz in Silverstein, 1980). Več kot 95 % vakuol je bilo po 15 minutah obdanih z vezikli gladkega ER in približno 30 % je bilo obdanih tudi z mitohondriji. Eno uro po infekciji so mitohondriji še v večjem deležu obdali vakuolo kot po 15 minutah, prav tako so bili prisotni še vezikli. Po štirih urah se je v bližini LCV zmanjšalo število veziklov in mitohondrijev. Pojavili so se ribosomi, a še niso bili pritrjeni na membrano vakuol. Po osmih urah je bilo več kot 95 % LCV obdanih z ribosomi in prvič so opazili več kot eno legionelo znotraj vakuole. Domnevali so, da naj bi se bakterije začele razmnoževati štiri do deset ur po okužbi (Horwitz, 1983). Prejšnje raziskave Horwitza in Silversteina (1980) so pokazale, da se legionele v monocitih začnejo razmnoževati nekje po osmih urah z generacijskim časom dve uri (Horwitz in Silverstein, 1980). Molmeret s sod. (2004) je raziskoval pozne faze razmnoževanja legionel, ki vključujejo predvsem izstop bakterije iz gostiteljske celice. Bakterije naj bi izstopile iz celice v dveh stopnjah. Najprej se zrahlja membrana LCV, kar omogoči bakterijam prehod v citoplazmo gostitelja, nato lizira celična plazemska membrana in bakterije se sprostijo v zunajcelično okolje (Molmeret in Abu Kwaik, 2002). Prve rahle spremembe v membrani LCV so opazili po 12 urah po infekciji medtem, ko je liza okužene celice nastopila po 12 do 18 urah po infekciji. Po 18 urah po infekciji se je membrana LCV stanjšala, prekinjena je bila na več delih in po 24 urah je bila večina celic liziranih, večji del membrane LCV pa je izginil. Citoplazemski organeli so bili razpršeni med bakterijami, slednje pa so se sprostile v okolje (Molmeret in sod., 2004). Tudi v naši raziskavi smo s pomočjo elektronske mikroskopije pokazali, da bakterije izstopijo iz celice po 24 urah po okužbi. Celica je lizirala zaradi prevelikega števila namnoženih bakterij. Prav tako nam izstop iz gostiteljske celice po 24 urah potrjuje tudi število CFU na gojišču BCYE- α , saj se je v tem času število kolonij povečalo, kar pomeni, da so se v 24 urah namnožile in sprostile v okolje.

Če primerjamo razmnoževalni cikel legionel v monocitih in v naravnih gostiteljih-praživalih, ugotovimo, da sta si cikla podobna (Bozue in Johnson 1996). *Acanthamoeba* ima podobne receptorje celične površine kot humani makrofagi in fagocitne aktivnosti (Messi in sod., 2013). Bakterija se najprej izogne fuziji fagosoma z lizosomi tudi v amebah

(Bozue in Johnson, 1996). Sledi lag faza, ki traja približno štiri ure, ko se bakterije prilagajajo na novo okolje, nato pa se približno po osmih urah po infekciji pričnejo razmnoževati (Molmeret in sod., 2004). Pri amebi *Hartmannella vermiformis* so dokazali fagocitozo 30 minut po okužbi z legionelo medtem, ko je bila večina LCV obdanih s številnimi vezikli in mitohondriji že po dveh urah in pol. Kasneje so se še pridružili ribosomi (Abu Kwaik, 1996). Razmnoževanje legionel v praživalih tudi močno poviša njeno sposobnost, da okuži humane monocite, pri čemer je zaščitena pred kemično dezinfekcijo, delovanjem biocidov in antibiotikov. V raziskavi, kjer so miške okužili z *L. pneumophila* skupaj z amebo *H. vermiformis* so ugotovili težjo obliko pljučnice v primerjavi s klinično sliko po vdihavanju samih legionel (Neumeister in sod., 2000). Prav tako je Brieland s sod., (1997) v raziskavi z miškami, ki jih je okužil s samimi legionelami ali v raznih kombinacijah z amebami ugotovil, da se razmnoževanje legionel v kombinaciji z amebami vedno kaže v težji obliki pljučnice pri miškah. Povečanje infektivnosti legionel spremljajo spremembe v bakterijski morfologiji, v sestavi celične stene ter v načinu poti vstopa v makrofage (Garduno in sod., 2002). Chiaraviglio s sod. (2008) je v študiji prikazal, da lahko legionele vstopijo in se razmnožujejo tudi v celični kulturi humanih endotelijskih celic. Ugotovili so, da je potek okužbe endotelijskih celic enak kot pri makrofagih in praživalih (Chiaraviglio in sod., 2008).

Messi s sod. (2013) je v svoji raziskavi preučevala znotrajcelično razmnoževanje *L. pneumophila* različnih seroloških skupin in sicer *L. pneumophila* sg. 1, *L. pneumophila* sg. 6 in *L. pneumophila* sg. 9 v celični liniji humanih makrofagov U937 in v amebi *A. polyphaga*. Ugotovili so, da ima *L. pneumophila* sg. 1 najvišjo zmožnost razmnoževanja v makrofagih v primerjavi z ostalimi serološkimi skupinami. V naši raziskavi smo uporabili enak postopek okužbe monocitov z legionelami kot Messijeva v svoji raziskavi. Pri tem smo po inkubaciji legionel in monocitov z dodatkom gentamicina odstranili nefagocitirane legionele, le da smo preučevali razlike v sposobnosti razmnoževanja med posameznimi podtipi *L. pneumophila* sg. 1. Z našo raziskavo smo dokazali, da je izmed petih podtipov *L. pneumophila* sg. 1 ravno *L. pneumophila* Philadelphia imela najvišjo učinkovitost razmnoževanja v celicah MM6. Messi s sod. (2013) so prav tako ugotavljali citopatogeno aktivnost *L. pneumophila* v makrofagih U936. Mi le-te nismo ugotavljali, vendar bi jo v prihodnje bilo smiselno izvesti.

6 SKLEPI

- V raziskavi smo dokazali, da so virulentnejši podtipi *L. pneumophila* sg. 1, kot so Philadelphia, Knoxville in Benidorm bolj sposobni razmnoževanja v monocitni celični kulturi MM6, v primerjavi z manj virulentnima podtipoma Bellingham in Oxford
- Ugotovili smo, da se v primerjavi z ostalimi podtipi, *L. pneumophila* sg. 1 podtip Philadelphia najuspešneje razmnožuje v celični kulturi MM6
- Z elektronsko mikroskopijo smo dokazali in potrdili, da monociti po 24 urah infekcije z legionelami lizirajo, legionele pa se sprostijo iz gostiteljske celice

7 POVZETEK

Legionele so po Gramu negativni, aerobni bacili, katerih glavno bivalno okolje je voda. Najdemo jih tudi v vlažni zemlji in mulju, kjer parazitirajo v praživalih, predvsem amebah. Pri ljudeh največkrat povzročajo pljučnice. Izmed 59 do sedaj poznanih vrst, je klinično najpomembnejša in tudi najbolj virulentna vrsta *Legionella pneumophila*, predvsem serološka skupina 1, ki povzroča več kot 90 % vseh legioneloz. Legionele se najpogosteje na ljudi prenesejo z vdihavanjem z legionelo kontaminiranih aerosolov. Razmnožujejo se znotrajcelično v pljučnih makrofagih. Povzročijo lahko bolezni, ki jih pod skupnim imenom imenujemo legioneloza. Ta poteka v dveh oblikah, legionarska bolezen in pontiaška vročica.

V naši nalogi smo želeli ugotoviti, ali obstajajo razlike v znotrajceličnem razmnoževanju med virulentnejšimi podtipi *L. pneumophila* sg. 1 (Philadelphia, Knoxville, Benidorm) in manj virulentnimi podtipi *L. pneumophila* sg. 1 (Oxford, Bellingham). V ta namen smo preučevali legionele, ki so bile sposobne vstopanja in razmnoževanja v monocitih. Uporabili smo metodo, kjer smo monocitne celice MM6 najprej inkubirali s posameznim podtipom *L. pneumophila* sg. 1 v določenih časovnih intervalih in jih nato nacepili na gojišča BMPA- α . Po inkubaciji smo prešteli število CFU/mL. S pomočjo elektronske mikroskopije smo prav tako opazovali razmnoževalni cikel legionel v celicah MM6.

Dokazali smo razlike v virulentnosti posameznih podtipov *L. pneumophila* sg. 1. Podtipi *L. pneumophila* Philadelphia, Knoxville in Benidorm so glede na število CFU/mL bolj virulentni kot podtipa *L. pneumophila* Oxford in Bellingham. V skupini bolj virulentnih podtipov izstopa Philadelphia, kar se sklada tudi z dejstvom, da povzroča tudi največ okužb.

Z elektronsko mikroskopijo smo potrdili značilen cikel razmnoževanja legionel, ki se konča z izstopom in sproščanjem legionel po 24 urah okužbe monocitov.

8 VIRI

- Abdel-Nour M., Duncan C., Low D.E., Guyard C. 2013. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. International Journal of Molecular Sciences, 14, 11: 21660-21675
- Abu Kwaik Y. 1996. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. Applied and Environmental Microbiology, 62, 6: 2022-2028
- Abu Khweek A., Fernandez Davila N.S., Caution K., Akhter A., Abdulrahman B.A., Tazi M., Hassan H., Novotny L.A., Bakaletz L.O., Amer A.O. 2013. Biofilm- derived *Legionella pneumophila* evades the innate immune response in macrophages. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 3: 18, doi: 10.3389/fcimb.2013.00018: 8 str.
- Adeleke A., Pruckler J., Benson R., Rowbotham T., Halablab M., Fields B. 1996. *Legionella*-like amoebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease. Emerging Infectious Diseases, 2, 3: 225-230
- Blyth C.C., Adams D.N., Chen S.C. 2009. Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection. New South Wales Public Health Bulletin, 20, 9-10: 157-161
- Bouyer S., Imbert C., Rodier M.H., Hechard Y. 2007. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. Environmental Microbiology, 9, 5: 1341-1344
- Bozue J.A., Johnson W. 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. Infection and Immunity, 64, 2: 668-673
- Brieland J.K., Fantone J.C., Remick D.G., LeGendre M., McClain M., Engleberg N.C. 1997. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaires' disease. Infection and Immunity, 65, 12: 5330-5333
- Cazalet C., Gomez-Valero L., Rusniok C., Lomma M., Dervins-Ravault D., Newton H.J., Sansom F.M., Jarraud S., Zidane N., Ma L., Bouchier C., Etienne J., Hartland E.L., Buchreiser C. 2010. Analysis of *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. PLoS Genetics, 6: 2, doi: 10.1371/journal.pgen.1000851: 16 str.
- Chiaraviglio L., Brown D.A., Kirby J.E. 2008. Infection of cultured human endothelial cells by *Legionella pneumophila*. PloS One, 3: 4, doi: 10.1371/journal.pone.0002012: 5 str.
- Cianciotto N.P. 2001. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. International Journal of Medical Microbiology, 291, 5: 331-343

- Cianciotto N.P. 2007. Iron acquisition by *Legionella pneumophila*. *Biometals: an International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine*, 20, 3-4: 323-331
- Cianciotto N.P. 2009. Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiology*, 4, 7: 797-805
- 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
- Cunha B.A. 2010. Legionnaires' disease: Clinical differentiation from typical and other atypical pneumonias. *Infectious Disease Clinics of North America*, 24, 1: 73-105
- D'Auria G., Jimenez-Hernandez N., 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.
- Declerck P. 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*, 12, 3: 557-566
- Delisle J., Tomalty L. 2002. ASM MicrobeLibrary: *Legionella pneumophila*. Washington, American Society for Microbiology: 1 str.
<http://www.microbelibrary.org/library/bacteria/2605-legionella-pneumophila>
(18.12.2013)
- Diederer B.M.W. 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection*, 56, 1: 1-12
- DSMZ. 2014. Prokaryotic nomenclature up-to-date. Leibniz, Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: 1 str.
http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?genus=Legionella (11.12.2014)
- Edelstein P.H. 2008. Legionnaires' disease: History and clinical findings. V: *Legionella: Molecular microbiology*. Heuner K., Swanson M. (eds.). Norfolk, UK, Caister Academic Press: 1- 17
- 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

- Elhelu M.A. 1983. The role of macrophages in immunology. *Journal of the National Medical Association*, 75, 3: 314-317
- Elliott 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
- ECDC. 2014. Annual epidemiological report – Respiratory tract infections. ECDC Surveillance Report. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 16-16
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Respiratory-tract-infections-annual-epidemiological-report-2014.pdf> (14.01.2015)
- ECDC. 2015. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 1 str.
<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ELDSNet/Pages/index.aspx> (14.01.2015)
- 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., Luck C.P., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R., Harrison T.G. 2005. Consensus sequece-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5: 2047-2052
- Garduno R.A., Garduno E., Hiltz M., Hoffman P.S. 2002. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and Immunity*, 70, 11: 6273- 6283
- Garduno R.A. 2007. Life cycle, growth cycles and developmental cycle of *Legionella pneumophila*. V: *Legionella pneumophila: Pathogenesis and immunity*. Bendinelli M., Hoffman P., Friedman H. (eds.). New York, Springer: 65-84
- 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
- Gomez-Valero L., Rusniok C., Buchreiser C. 2009. *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 5: 727-739
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews: Microbiology*, 2, 2: 95-108

- Harb O.S., Gao L-Y., Abu Kwaik Y. 2000. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environmental Microbiology*, 2, 3: 261-265
- Helbig J.H., Bernander S., Castellani Pastoris M., Etienne J., Gaia V., Lauwers S., Lindsay D., Luck 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 serogroups. *European Journal of clinical microbiology & infectious diseases*: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 21, 10: 710-716
- Helbig J.H., Amemura- Maekawa J. 2009. Serotyping of *Legionella pneumophila* and epidemiological investigations. *Nova Medycyna*, 16, 1: 69-75
- Heuner K., Albert-Weissenberger C. 2008. The flagellar regulon of *Legionella pneumophila* and the expression of virulence traits. V: *Legionella: Molecular microbiology*. Heuner K., Swanson M. (eds.). Norfolk, UK, Caister Academic Press: 101- 121
- Hoffman C., Harrison C.F., Hilbi H. 2014. The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cellular Microbiology*, 16, 1: 15-26
- Hornei B., Ewig S., Exner M., 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., Exner M., 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
- Horwitz M.A. 1983. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 158, 4: 1319-1331
- Isberg R.R., O Connor T.J., Heidtman M. 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews. Microbiology*, 7, 1: 13-24
- IVZ. 2012. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2011. Kraigher A., Sočan M., Klavs I., Frelih T., Kolman J., Čakš Jager N., Grilc E., Grgič Vitek M., Učakar V. (ur.). Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 109 str.
http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije/datoteke/epidemilosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2011.pdf (23.5.2015)

- IVZ. 2013. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2012. Kraigher A., Sočan M., Klavs I., Frelj T., Grilc E., Grgič Vitek M., Učakar V., Kolman J. (ur.). Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 107 str.
http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2012.pdf (23.5.2015)
- Jules M., Buchrieser C. 2007. *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: Clues from genomics and transcriptomics. FEBS Letters, 581, 15: 2829-2838
- Keše D. 2002. Legionele. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 175-178
- Khweek A.A., Amer A. 2010. Replication of *Legionella pneumophila* in human cells: why are we susceptible? Frontiers in Microbiology, 1: 133, doi: 10.3389/fmicb.2010.00133: 8 str.
- Lamoth F., Greub G. 2010. Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. FEMS Microbiology Reviews, 34, 3: 260-280
- 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, 2: 368-378
- Lück C., Helbig J.H. 2013. Characterization of *Legionella* lipopolysaccharide. V: *Legionella: Methods and protocols*. Buchrieser C., Hilbi H. (eds.). New York, Springer: 381- 390
- Luo Z.Q. 2012. *Legionella* secreted effectors and innate immune responses. Cellular Microbiology, 14, 1: 19- 27
- Machner M., Gaspar A., Neunuebel M.R., Evans T., Chen Y. 2011. Host cell modulation by the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. Maryland, National Institutes of Health: 1 str.
<http://2011annualreport.nichd.nih.gov/ump.html> (31.12.2013)
- Messi P., Bargellini A., Anacarso I., Marchesi I., de Niederhäusern S., Bondi M. 2013. Protozoa and human macrophages infection by *Legionella pneumophila* environmental strains belonging to different serogroups. Archives of Microbiology, 195, 2: 89- 96
- Molmeret M., Abu Kwaik Y. 2002. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? Trends in Microbiology, 10, 6: 258-260
- Molmeret M., Bitar D.M., Han L., Abu Kwaik Y. 2004. Disruption of the phagosomal membrane and egress of *Legionella pneumophila* into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and *Acanthamoeba polyphaga*. Infection and Immunity, 72, 7: 4040-4051

- Molofsky A.B., Swanson M.S. 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology*, 53, 1: 29-40
- Molofsky A.B., Shetron-Rama L.M., Swanson M.S. 2005. Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infection and Immunity*, 73, 9: 5720- 5734
- Murdoch D.R. 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. *Medical Microbiology*, 36: 64-69
- Neild A.L., Roy C.R. 2004. Immunity to vacuolar pathogens: what can we learn from *Legionella*? *Cellular Microbiology*, 6, 11: 1011- 1018
- Neumeister B., Reiff G., Faigle M., Dietz K., Northoff H., Lang F. 2000. Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of *Legionella* species in human monocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3: 914- 919
- 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
- NIJZ. 2014. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2013. Kraigher A., Sočan M., Klavs I., Frelj T., Grilc E., Grgič Vitek M., Učakar V., Kolman J. (ur.). Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje: 118 str.
http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2013.pdf (23.5.2015)
- Palusinska-Szys M., Cendrowska-Pinkosz M. 2009. Pathogenicity of the family *Legionellaceae*. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 57, 4: 279- 290
- Richards A.M., Von Dwingelo J.E., Price C.T., Abu Kwaik Y. 2013. Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence*, 4, 4: 307-314
- Rossier O., Dao J., Cianciotto N.P. 2008. The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3: 753- 761
- Rowbotham T.J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*, 33, 12: 1179-1183
- Shevchuk O., Jager J., Steinert M. 2011. Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Frontiers in Microbiology*, 2: 74, doi: 10.3389/fmicb.2011.00074: 12 str.
- Shin S. 2012. Innate immunity to intracellular pathogens: Lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Advances in Applied Microbiology*, 79: 43-71

- Sočan M., Šubelj M. 2012. Definicije prijavljivih nalezljivih bolezni za namene epidemiološkega spremljanja. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 122 str.
http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/datoteke/difinicija_prijavljivih_nb_za_namene_epi_spremljanja.pdf (14.01.2015)
- Steinert M., Hentschel U., Hacker J. 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. FEMS Microbiology Reviews, 26, 2: 149-162
- 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
- Taylor M., Ross K., Bentham R. 2009. *Legionella*, protozoa, and biofilms: Interactions within complex microbial systems. Environmental Microbiology, 58, 3: 538-547
- Trop Skaza A., Beskovnik L., Storman A., Uršič S., Groboljšek B., Keše D. 2010. Outbreak of Legionnaires' disease in a nursing home, Slovenia, august 2010: preliminary report. EuroSurveillance, 15, 39: pii=19672
<http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N39/art19672.pdf>: 3 str.
- Wagner C., Kronert C., Luck 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: 1975-1982
- Winn W.C. Jr. 1988. Legionnaires disease: historical perspective. Clinical Microbiology Reviews, 1, 1: 60-81
- Young S. 2009. Bacterial dilutions and a fool-proof way to figure them out. Bellingham, Western Washington University, Biology Department: 2 str.
http://biol.wvu.edu/young/321/stuff/resources/dilution_worksheet.pdf (20.4.2015)

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorici, doc. dr. Darji Keše, univ. dipl. biol. za priložnost opravljanja magistrskega dela na zelo zanimivem in aktualnem področju, za razumevanje, pomoč, vse nasvete in predvsem za potrpežljivost ob branju in popravljanju same naloge.

Prav tako se zahvaljujem Roku, Ines in Sabini iz Laboratorija za diagnostiko infekcij s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami za vso pomoč pri delu v laboratoriju.

Recenzentu, prof. dr. Roku Kostanjšku bi se rada zahvalila za hiter in strokoven pregled magistrskega dela.

Še posebej pa bi se želela zahvaliti svoji družini, mami Miheli, sestri Rebeci in stricu Danilu ter fantu Jerneju za vso podporo, pomoč in predvsem vzpodbudne besede tekom opravljanja magistrskega dela, ki sem jih občasno močno potrebovala. Brez vas mi ne bi uspelo!