proLékaře.cz | 4.5.2024

Legionelózy a ich diagnostika

Kotrbancová M.[1], Špaleková M.[1], Fulová M.[1], Trnková K.[2], Perželová J.[1]

[1]Ústav epidemiológie LFUK, Bratislava, Slovenská republika
[2]Katedra životného prostredia, Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica, Slovenská republika

SÚHRN

Diagnostika legionelóz, hlavne závažnejšej život ohrozujúcej formy, tzv. Legionárskej choroby je zložitá, najmä pre netypické príznaky infekcie, nie vždy dominujúcu atypickú pneumóniu a často veľmi dramatický septický priebeh ochorenia so zlyhávaním orgánov. Stanovenie diagnózy v akútnej fáze ochorenia je možné detekciou legionelového antigénu v moči a dôkazom DNA legionel v PCR/real-time PCR v sére, vzorkách z dolných dýchacích ciest a v moči. Kultivácia na špecifických pôdach zostáva zlatým štandardom, ale pre svoju náročnosť sa využíva málo. Sérologické vyšetrenie si vyžaduje párové vzorky, a tak je prínosom pre diagnostiku v neskoršej fáze infekcie, pričom asi 20 % pacientov vôbec netvorí protilátky. Veľký pokrok sa zaznamenal v typizačných metódach (RFLP, PFGE, metódy založené na PCR, sekvenačné metódy) a rýchlych identifikačných metódach (MALDI-TOF).

KĽÚČOVÉ SLOVÁ:

legionela – Legionárska choroba – laboratórna diagnostika

ABSTRACT

Kotrbancová M., Špaleková M., Fulová M., Trnková K., Perželová J.: Legionellosis and its diagnosis
The diagnosis of legionellosis, especially of its severe, life-threatening form, Legionnaires' disease, is complicated, primarily because of non-typical symptoms of the infection, not always dominating atypical pneumonia, and often a very dramatic septic course of the disease with multiorgan failures. The diagnosis of the acute phase of the disease can be established by the detection of Legionella antigen in urine and by PCR/real-time PCR detection of Legionella DNA in serum and lower respiratory tract and urine samples. Cultivation on specific media remains the gold standard, but this very demanding method is rarely used. Serological testing requires paired samples and thus is relevant to the diagnosis at a later stage of infection, although it is to be noted that about 20% of patients do not produce the antibodies. Great progress has been made in typing methods (RFLP, PFGE, or PCR based and sequence based methods) and rapid identification methods (MALDI-TOF).

KEYWORDS:

legionellae – Legionnaires' disease – laboratory diagnosis

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 66, 2017, č. 3, s. 133–139

ÚVOD

Legionelóza je bakteriálne ochorenie, pôvodcami sú gramnegatívne hydrofilné tyčinky – legionely. Vyskytujú sa v prírodných vodných ekosystémoch spolu s amébami, prežívajú a rozmnožujú sa v prostredí bohatom na organický substrát (kompost), pri teplote 25–45 °C, pH 2,7–8,3, optimálne pri 32–42 °C [1, 2, 3, 4, 5] a odtiaľ sa dostávajú aj do vodovodných systémov. Tieto baktérie môžu byť izolované zo systémov teplej úžitkovej vody (TÚV) až do teploty 66 °C, avšak teplota viac ako 70 °C ich ničí [4]. Pri teplote nižšej ako 20 °C legionely prežívajú, ale nepomnožujú sa. V kontrole a prevencii osídlenia legionelami sa preto odporúča udržiavať teplotu TÚV ≥ 55 °C a studenej vody < 20 °C, osobitne v zdravotníckych zariadeniach [4].
Legionely sú fakultatívne patogény, dôležitá je ich virulencia, asociácia s amébami, spôsob a dĺžka expozície, skôr kvalitatívne osídlenie (druh a typy legionel), menej kvantitatívne parametre osídlenia, najmä pri expozícii ľudí s oslabenou imunitou a rizikovými faktormi [1]. Známych je 60 druhov legionel, ale patogenita bola dokázaná len pre 30 druhov [1, 6, 7]. Ostatné tri druhy legionel (*L. massiliensis, L. tunisiensis, L. saoudiensis*) boli izolované v kokultiváciách s voľne žijúcimi amébami [8]. Najčastejším vyvolávateľom infekcií, v 80–90 % sú legionely druhu *Legionella pneumophila* (L. p.) s 15 séroskupinami (sk), ale ochorenia sú vyvolané najmä L. p. sk 1. Prenášajú sa inhaláciou vodného aerosólu, aspiráciou, manipuláciou s vlhkým kompostom. Niekoľko štúdií dokázalo štatisticky signifikantný vzostup legionelóz po 1–2 týždňoch intenzívnych dažďov [9, 10, 11], čo môže naznačovať určitý podiel legionelóz po kontakte pacientov s vlhkou pôdou.
Najviac ohrození sú jedinci s rizikovými faktormi (vyšší vek, chronické choroby, imunosupresia, malígne ochorenia, nikotinizmus, alkoholizmus, diabetes a iné) [12]. Aj keď sa prenos z človeka na človeka nedokázal, nedávno bol popísaný prvý prípad pravdepodobného prenosu *L. pneumophila* počas veľkej epidémie v Portugalsku v roku 2015 [13].
Legionely spôsobujú dve formy ochorenia, Pontiacku horúčku a tzv. Legionársku chorobu.
Pontiacka horúčka je ľahšie nepneumonické chrípke podobné ochorenie. Inkubačná doba býva 1–4 dni, priemerne 36 hodín. Ochorenie po 3–7 dňoch odoznieva a nelieči sa antibiotikami [4, 14].
Legionárska choroba (LCH) je závažné febrilné ochorenie pľúc, prebieha najčastejšie pod obrazom atypickej pneumónie, ale nezriedka sa manifestuje ako sepsa

proLékaře.cz | 4.5.2024

s multisystémovým zlyhávaním. V klinickom obraze LCH po 2–10-dňovej inkubačnej dobe popri dyspnoe, suchom kašli a bolesti na hrudníku nájdeme viaceré nešpecifické príznaky (horúčka, triaška, cefalea, myalgie, malátnosť, únava, zmätenosť, halucinácie) [12]. Asi u 40 % chorých môže byť prítomná i pleuritída a u pacientov s nádorovým ochorením až absces pľúc. Produkcia spúta sa pozoruje len u viac ako polovice pacientov s LCH [15]. Extrapulmonálne prejavy infekcie, napr. hnačky a vomitus, sa vyskytujú u 25–50 % pacientov [4, 16, 17].

LIEČBA

Včasná kauzálna liečba je často pre život pacienta s legionárskou chorobou rozhodujúca. V liečbe LCH sú efektívne antibiotiká s dobrým prienikom do alveolov a rýchlym nástupom účinku. Dávkovanie a aplikácia (intravenózne, per os) antibiotík závisí od závažnosti ochorenia, prítomnosti rizikových faktorov a stavu vedomia pacienta a gastrointestinálneho dyskomfortu chorého [12]. V minulosti, do 90. rokov 20. storočia sa používal takmer výlučne erytromycín, avšak len s bakteriostatickým účinkom a u chorých s imunosupresiou sa používal rifampin [18]. Erytromycín mal veľa nežiadúcich účinkov, zaznamenali sa interakcie s imunosupresívnymi liekmi a na rifampin bola pozorovaná sporadicky rezistencia, a tak sa dnes uprednostňujú novšie makrolidy – azalidy, z nich najmä azitromycín a chinolóny, najmä fluorochinolóny (levofloxacín, ciprofloxacín). Tieto baktericídne antibiotiká vykazujú v in-vitro dilučných a diskových difúznych testoch a v testoch inhibície intracelulárneho rastu legionel ako aj následnej reverzie rastu týchto baktérií v makrofágoch a na zvieracích modeloch porovnateľnú efektívnosť [18].
Americká spoločnosť pre infekčné ochorenia (Americká hrudná spoločnosť – The Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society) a British Thoracic Society odporúčajú liečbu pacientov s LCH počas minimálnej doby 5–14 dní. U závažných infekcií ohrozujúcich život sa indikujú parenterálne podávané fluorochinolóny (750 mg denne) 5–10 dní až do zlepšenia klinického stavu, u ambulatných pacientov s miernym ochorením sa podávajú per os [6, 12]. Terapia sa podľa aktuálneho klinického stavu chorého, imunosupresie a komplikácií (extrapulmonálne prejavy) môže predĺžiť až na 21 dní. V klinických štúdiách liečba levofloxacínom znižovala čas hospitalizácie, výskyt komplikácií a umožnila rýchlejšie uzdravenie pacientov. Kratšie, 3–5 dní trvá odporúčaná liečba azitromycínom (500 mg denne), pretože má dlhší eliminačný polčas a dosahuje vyššie koncentrácie v pľúcach, v indikovaných prípadoch sa však môže liečba predĺžiť na 10 dní [12].
Kombinácie antibiotík sa odporúčajú len u zvlášť závažných stavov s mimopľúcnymi komplikáciami (endokarditída a iné). Skôr sa môže zvažovať kombinácia chinolónov a azitromycínu (eventuálne claritromycínu) ako kombinácie chinolónov (fluorochinolón, ciprofloxacín) s rifampinom, ktoré v in vitro štúdiách neboli viac efektívne ako monoterapia [18].

VÝSKYT LEGIONELÓZ

Medzinárodnému hláseniu podlieha len Legionárska choroba. Podľa mikrobiologických kritérií sa hlásia ako **potvrdené prípady** ochorenia s izoláciou legionel z biologických vzoriek alebo z inak sterilných miest človeka, s dôkazom legionelového antigénu v moči pacienta a so sérologicky dokázanou infekciou L.p.1 v párových vzorkách sér. Ochorenia diagnostikované inými metódami (priama imunofluorescencia, PCR) alebo sérologický dôkaz infekcie inými séroskupinami L.p. a dôkaz protilátok proti L.p.1 v jednej vzorke séra pacienta sú klasifikované ako **pravdepodobné legionelózy** [19].
Z epidemiologického hľadiska delíme legionelózy podľa expozície na komunitné, infekcie spojené so zdravotníckou starostlivosťou (nozokomiálne a iné) a cestovné (tuzemské a získané v zahraničí).
Incidencia LCH v Európe narastá. V roku 2015 predbežne hlásilo 30 krajín 7 034 prípadov LCH, podľa medzinárodných kritérií bolo 6 573 laboratórne potvrdených a 461 pravdepodobných. V roku 2014 hlásilo 28 krajín EU a Nórsko 6941 ochorení (13,5/milión) s 8% letalitou, pričom 74 % bolo komunitných infekcií, 18 % získaných s súvislosti s cestovaním a 7 % infekcií bolo získaných v zdravotníckych zariadeniach. Celkovo viac ako 80 % pacientov s LCH boli osoby staršie ako 50 rokov. Medzi chorými prevažovali muži v pomere 2,6 : 1 [19].
Na Slovensku je výskyt legionelózy nízky, v rokoch 1985–2015 sa infekcia diagnostikovala u 117 pacientov, 71 mužov a 46 žien (1,54 : 1). Ročne sa hlásilo 0–15 prípadov s maximálnou incidenciou 2,6/milión v roku 2014. V roku 2015 sa zaznamenalo 14 ochorení (incidencia 2,4/milión). Podľa expozície 61,2 % tvorili infekcie komunitné, 10,3 % nozokomiálne legionelózy, 14,7 % cestovné legionelové infekcie a 13,8 % bolo bez objasnenej expozície. Veková štruktúra legionelóz je u nás podobná ako v Európskej únii [19], s maximom ochorení vo veku 50–59 rokov aj u mužov aj u žien. Vyšší výskyt sa zaznamenal aj u mužov vo veku 70–79 rokov. Desaťkrát legionelové ochorenie končilo letálne (8,55 %).
Nízky počet hlásených ochorení LCH môže súvisieť aj s tým, že diagnostika legionelóz sa na Slovensku nevykonáva rutinne, ale iba na jedinom pracovisku, na Ústave epidemiológie LF UK v Bratislave, ktoré používa všetky uvedené priame (kultivácia, močový antigén, u vybraných vzoriek PCR) a nepriame diagnostické testy (aglutinácia s 21 antigénmi, nepriama IF) pre vyšetrenie legionelóz. Rozšírenie diagnostiky, najmä rýchlych metód (urinárny antigén) aj do iných laboratórií by pomohlo zvýšiť záchyt a včasnú liečbu týchto infekcií. Osobitne v kolonizovaných nemocniciach má význam nielen monitorovanie osídlenia legionelami vyšetrením vôd, ale aj sledovaním legionelových infekcií možného nozokomiálneho pôvodu [20].

DIAGNOSTIKA LEGIONELÓZ

Diagnostika ochorenia sa opiera predovšetkým o špecifické laboratórne testy a epidemiologickú anamnézu (expozícia vode, vlhkej pôde alebo kompostu) [5], nakoľko príznaky LCH nie sú typické pre túto infekciu a v klinickom obraze nie vždy pneumónia dominuje [17]. Pri podozrení na legionelózu sa pri epidemiologickom vyšetrení pátra po faktoroch prenosu kultivačným vyšetrením vzoriek vôd z vodovodnej siete (zásobné tanky teplej úžitkovej vody, ústia siete), klimatizačných jednotiek (chladiace veže, práčky vzduchu), bazénov, zariadení hydroterapie

proLékaře.cz | 4.5.2024

Tabuľka 1. Senzitivita a špecificita testov pre diagnostiku legionelóz

Table 1. The sensitivity and specificity of the tests for diagnostics of legionellosis

Metóda	Materiál	Senzitivita %	Špecificita %	Časová náročnosť	Komentár
Kultivácia	BAL, spútum	< 10–80	100	3–7 dní	detekcia všetkých druhov rodu Legionella trvá 10 dní
Sérológia	sérum	60–80	< 95	3–9 týždňov	2 vzorky séra
Detekcia antigénu legionel v moči	moč	70–90	< 95	do 3 hodín	komerčný kit – *L. pneumophila* sk 1
PCR	BAL	80–100	< 90	do 4 hodín	detekcia DNA legionel druhu/rodu Legionella podľa primera
	sérum	30–50	< 90		
	moč	46–86	< 90		

Zdroj: Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection, Clin Infect Dis, 2003;36(1):64-69-upravené

a termálnych vôd, prípadne záhradného kompostu. V niektorých prípadoch sa na vyšetrenie vôd používa aj PCR, nedokazuje však vždy živé legionely, dôležité pre infekciu [21].

V diferenciálnej diagnostike treba vylúčiť inú etiológiu, často pneumokokovú, ale najmä pôvodcov iných atypických pneumónií, jednak nezoonotických (*Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae*...), ale aj zoonotických (*Chlamydia psittaci, Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*) [22]. Dôležité je väčšinou stanovenie špecifických protilátok u všetkých uvádzaných infekcií, prípadne chladových aglutinínov u mykoplazmových infekcií a u Q horúčky. V laboratórnych parametroch u legionelózy môže byť dôležitá hyponatrémia, hypofosfatémia a zvýšené hladiny kreatínfosfokinázy, feritínu, transamináz a vyššie hodnoty CRP (> 30). Z ďalších nešpecifických laboratórnych vyšetrení dominuje leukocytóza s relatívnou lymfopéniou. Významnú úlohu pri diagnostike zohráva aj epidemiologická anamnéza.

V laboratórnej priamej aj nepriamej diagnostike legionelóz sa používajú testy s rôznou senzitivitou a špecificitou (tabuľka 1).

LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA – PRIAME METÓDY

V akútnom štádiu ochorenia majú väčší význam pre diagnostiku a liečbu testy priamej diagnostiky (kultivácia, dôkaz antigénu v moči a DNA legionel).

Kultivácia

Legionely sú nutrične náročné, nevyhnutný je vysoký obsah železa a L-cysteín [16]. Kultivačné metódy pre vysokú špecifickosť dôkazu legionel sú považované za „zlatý štandard". Kultivácia umožňuje izoláciu všetkých *Legionella* spp, epidemiologické vyšetrenie ohniska nákazy (expozícia vode, pôde, kompostu) a testovanie citlivosti izolátov na antibiotiká [6].

Pre izolačné záchyty z bronchoalveolárnej laváže (BAL), aspirátov z dolných dýchacích ciest, spúta a vzoriek vôd sa používajú špeciálne selektívne BCYEα pôdy s antibiotikami a vzorky sa kultivujú 7–10 dní pri 35–37 °C v atmosfére 2,5% CO_2. Najčastejšie sa na potlačenie rastu nežiaducej mikroflóry v pôdach pri vyšetrení vôd okrem glycínu používajú vankomycín a polymyxín B s anisomycínom (MWY pôda) alebo cykloheximidom (GVPC pôda), resp. s anisomycínom a cefamandolom pre klinické vzorky (BMPA pôda), ako potvrdili Descours et al. [23]. Z toho istého dôvodu je potrebné vzorky opracovať tepelne (50 °C/30 minút) alebo s kyslým pufrom (HCl-KCl, pH 2,2). Spracovanie klinických vzoriek si vyžaduje skúsenosti, napr. opracovanie spúta 0,1% dithiotreitolom na lýzu buniek a uvoľnenie intracelulárnych legionel, riedenie vzoriek a vzorky BAL je potrebné zakoncentrovať (1 200g/10 minút). Legionely nerastú na krvnom agare, a ani na BCYEα pôdach bez esenciálneho L-cysteínu.

Senzitivita kultivačného vyšetrenia (tabuľka 1) závisí od druhu vzoriek, uvádza sa 30–80 %, najväčšia je zo vzoriek z dolných dýchacích ciest, zo spúta len 10 % [24].

Vzorky vôd sa odoberajú z centrálnych zásobníkov TÚV a z distálnych koncoviek rozvodov TÚV vodovodnej siete (sprchy, kohútiky), ako aj z rozvodov studenej vody, chladiacich veží, dentálnych jednotiek a iných vodných producentov aerosólu [4]. Odoberajú sa vzorky rôznych objemov (200 ml až 1 liter) a koncentrujú sa na membránových filtroch (0,22 µm; 0,45 µm) alebo centrifugáciou (3000 g/30 minút). Následne sa koncentrované vzorky v troch porciách (bez opracovania, s tepelným opracovaním 50 °C/30 minút a s kyslým pufrom) očkujú na selektívne pôdy s inkubáciou 10 dní. Suspektné kolónie legionel sa preočkujú na selektívne médium BCYEα a krvný agar/BCYEα bez L-cysteínu.

Mikroskopické metódy

Legionely sa nešpecificky znázorňujú v tkanivách farbením podľa Gimenéza, striebrením a špecificky v priamej imunofluorescencii len s monoklonovými protilátkami [25], preto už dnes nemajú v diagnostike legionelóz väčší význam.

Detekcia legionelového antigénu v moči

Dôkaz legionelového antigénu v moči pacientov je vysoko špecifický (99 %) – viď tab. 1, rýchly a dostatočne senzitívny (70–90 %) test [26]. Odporúča sa vzorky moča opracovať tepelne (100°C/5min) a centrifugáciou zakoncentrovať (1200 g/15min). Keďže komerčné urinárne testy sú cielené najmä pre dôkaz legionel L.p. sk.1 asi 30 % prípadov môže unikať diagnostike [27, 16]. Antigén, ktorý je časťou LPS bunkovej steny legionel, sa dokazuje v ELISA alebo imunochromatograficky u oboch foriem legionelózy. Asi 80 % osôb intermitentne vylučuje antigén v niektorej fáze ochorenia. Nakoľko antigenúria u LCH je detekovateľná už veľmi skoro, sú tieto rýchle testy v rutinnej

proLékaře.cz | 4.5.2024

Tabuľka 2. Laboratórna diagnostika Legionárskej choroby v EÚ/EEA v r. 2010–2014

Table 2. Laboratory diagnostics of Legionnaires' disease in EU in 2010–2014

Testy	Rok 2010	Rok 2011	Rok 2013	Rok 2014
Urinárny test	82 %	77 %	88 %	87 %
Kultivácia	10,3 %	12 %	11 %	12 %
Sérologické: 4 x vzostup titra/jednotlivý titer	1,1 %/4 %	2 %/6 %	1 %/3 %	1 %/4 %
Priama imunofluorescencia	0 %	< 1 %		
PCR	2,6 %	4 %	7 %	8 %
Spolu testy/prípady LCH	6 323/5 180	5 018/4 897	6 601/5 851	7 750/6 941
	1,22: 1	1,02:1	1,3:1	1,12:1

Zdroj: European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease in Europe, 2014. Stockholm: ECDC, 2016 – upravené

diagnostike používané najčastejšie [19, 26, 28, 29, 30]. Vylučovanie môže končiť buď hneď po terapii, alebo u 50–75% pacientov až po 1–2 mesiacoch i neskôr [28, 29]. Niektorí autori uvádzajú, že citlivosť detekcie močového antigénu koreluje so závažnosťou ochorenia [31, 32, 33].

Detekcia nukleovej kyseliny

Genetické amplifikačné metódy a najmä tie, ktoré sú založené na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR, resp. real-time PCR, multiplex PCR) [34, 35], sa rýchlo stávajú metódou voľby pre detekciu pomaly alebo ťažko rastúcich baktérií [36]. Na amplifikáciu legionela špecifických DNA sekvencií v biologických vzorkách sa už využili primery cielené na gény 16S rRNA [37], 5S rRNA [38], 23S rRNA [39] a na gén *mip* (macrophage infectivity potentiator) [40], ale aj na kombinácie 23S-5S rRNA [41]. DNA amplifikácia pomocou PCR je vysoko špecifická (< 90 %) a senzitívna metóda pre dôkaz legionel v rôznych vzorkách, porovnateľná s kultiváciou a urinárnym testom [26]. PCR a real-time PCR bola použitá na dôkaz DNA legionel v BAL [42, 43, 44], v sére, v leukocytoch [1, 15] a v moči pacientov [45] s rôznou senzitivitou (viď tab. 1). Nižšia senzitivita dôkazu DNA legionel v spúte v PCR je často spôsobená kontamináciou orofaryngeálnou flórou. Rýchlosť PCR/real-time PCR a jej vysoká špecificita, najmä pre BAL a aspiráty z dolných dýchacích ciest, sú veľkou výhodou v akútnej fáze LCH pre správne a rýchle nasadenie terapie, keď sú kultivačné a sérologické vyšetrenia ešte negatívne [26, 34, 37, 42]. Tieto metódy sa vykonávajú v špecializovaných laboratóriách a dosiaľ PCR metódy nie sú zahrnuté medzi diagnostické metódy potvrdzujúce prípady legionelóz.

LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA – NEPRIAME METÓDY

Sérologické vyšetrenie

V nepriamej diagnostike sa protilátky v sére dokazujú v testoch nepriamej imunofluorescencie (NIF) a v aglutinačnej reakcii, boli použité aj ELISA sety s porovnateľnou senzitivitou ako NIF [29]. Vo väčšine prípadov je 4-násobný vzostup titra protilátok proti legionelám zistený v najmenej dvoch vzorkách počas 3–10 týždňov dôkazom infekcie. V jedinej dostupnej vzorke séra sa titer ≥ 1 : 256 pri zodpovedajúcom klinickom obraze a epidemiologických súvislostiach hodnotí ako diagnostický [1, 26]. Nástup a pretrvávanie protilátok je individuálne, asi u 20 % pacientov s LCH nedochádza vôbec k tvorbe protilátok [26]. Skrížená reaktivita protilátok proti LPS iných baktérií sa vyskytuje pomerne zriedka [46].

Z analýzy hlásených prípadov LCH v Európe a použitých diagnostických metód za roky 2010–2011 a 2013–2014 (tabuľka 2) vyplýva, že sa najviac využíva urinárny test (77–88 %) a najmenej mikroskopické a sérologické metódy (1–6 %), ktoré sa pre svoju náročnosť vykonávajú spolu s PCR len v špecializovaných laboratóriách. Za ostatné roky sa zvyšuje podiel ochorení LCH diagnostikovaných v PCR z takmer 3 % v roku 2010 na 8 % v roku 2014. Využitie kultivácie je stabilne veľmi nízke (10–12 %), takže skutočnú etiologickú štruktúru LCH často nepoznáme. Pri diagnostike jedného prípadu LCH sa priemerne použilo 1,16 testu [19], a tak sa niektoré ochorenia ani nemusia zachytiť.

IDENTIFIKÁCIA A TYPIZÁCIA LEGIONELOVÝCH IZOLÁTOV

Identifikácia izolátov je založená na klasických fenotypových sérologických metódach (aglutinácia, imunofluorescencia) s monoklónovými [47] alebo polyklónovými protilátkami [17], na genotypových metódach a v poslednej dobe aj na MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) [3, 48]. Genotypizačné moderné metódy boli vyvinuté pre *L. pneumophila*. Využívajú sa hlavne pre epidemiologické účely jednak pri typizácii legionel z klinických a environmentálnych vzoriek (vody, vlhkej pôdy, kompostu) pri hromadnom výskyte LCH, ale aj v prevalenčných štúdiach. Jednou z prvých metód molekulárnej typizácie vyvinutej pre *L. pneumophila* bola RFLP (polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov) [49]. Neskôr vyvinuté metódy, ako sú pulzná gélová elektroforéza – PFGE a metódy založené na PCR (polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov – AFLP, amplifikácia vzácnych reštrikčných miest – IRS-PCR, PCR s náhodnými primermi – AP-PCR a iné) majú väčšiu diskriminačnú schopnosť [49]. PFGE má vysokú rozlišovaciu schopnosť, najmä pri použití reštrikčnej endonukleázy *Sfi*I, má však aj niekoľko nevýhod, napr. je časovo náročná (2–4 dni na získanie výsledkov), vyžaduje si elektroforézu a špeciálne počítačové vybavenie pre analýzu obrázku [49, 50]. Metóda AFLP je

proLékaře.cz | 4.5.2024

jednou zo štandardizovaných metód študijnej skupiny pre legionelové infekcie (ESGLI, predtým EWGLI) patriacej od roku 2012 do ESCMID (Európska spoločnosť klinickej mikrobiológie a infekčných chorôb) [49].

Ďalšie typizačné možnosti predstavujú metódy sekvenačnej subtypizácie – SBT (sequence-based typing), ktoré sú založené na porovnávaní sekvencií niekoľkých fragmentov PCR – amplifikovanej DNA [51]. SBT využíva sekvenáciu amplikónov fragmentov siedmych génov *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* a *neuA* [49], najčastejšie amplifikáciu a obojstrannú sekvenáciu fragmentu génu *mip*. Druh legionel je určený na základe percentuálnej zhody sekvenácie *mip* analyzovaného kmeňa so sekvenáciami génu *mip* všetkých druhov a kmeňov legionel v databáze. Zistenie sekvenačného typu (ST) *Legionella pneumophila* sa označuje číselným kódom podľa typu alel v sledovaných génoch. Niekoľko nezávislých štúdií preukázalo, že väčšinu kultivačne potvrdených prípadov LCH vo svete spôsobilo len niekoľko genotypov (napr. ST1, ST23, ST37, ST40, ST47, ST62...), čo potvrdili aj štúdie skupiny EWGLI (The European Working Group for Legionella Infections) v západnej [49] a severnej [6] Európe. Na porovnanie sekvenačných typov vyvolávateľa infekcie a izolátov z vody a potvrdenie epidemiologickej súvislosti infekcie slúži od roku 2003 databáza SBT pre *L. pneumophila* [51], ktorá prispieva k mapovaniu výskytu legionel v životnom prostredí, etiologického spektra LCH a na analýzu cestovných legionelóz. Od roku 2007 je táto metóda považovaná skupinou EWGLI, resp. ESGLI za zlatý štandard v typizácii kmeňov *Legionella pneumophila* [51]. V marci 2016 SBT databáza obsahovala 10 792 záznamov zo 60 krajín reprezentujúcich 2 156 sekvenačných typov [52]. Na zvýšenie citlivosti SBT ako metódy založenej na PCR na dôkaz genómovej DNA *Legionella pneumophila* v klinických vzorkách slúži metóda nested SBT PCR, ktorá dokazuje prítomnosť DNA L. p. aj vo vzorkách s nízkym obsahom extrahovanej DNA bez predchádzajúcej izolácie *L. pneumophila* [49]. Tento postup spresňuje dôkaz a typizáciu *L. pneumophila* pomocou PCR a nested PCR bez nutnosti kultivácie. ELDSNET dokonca navrhuje túto metódu zaradiť ako konfirmačnú na dôkaz legionelovej infekcie. Optimalizovaný protokol nested SBT PCR je k dispozícii na stránkach EWGLI [49].

V ostatnom čase sa doplnila typizácia aj o mapovanie celého genómu (WGS) *L. pneumophila* a o metódy založené na sekvenovaní celého genómu baktérie [49]. WGS analýza preukázala vyššiu diskriminačnú silu tejto metódy v porovnaní s metódou SBT, najmä pre typizáciu endemických klonov ako je ST1 [49].

Podstatou novej vysoko špecifickej rýchlej metódy MALDI-TOF (hmotnostná spektrometria s laserovou desorpciou a ionizáciou za účasti matrice s prieletovým analyzátorom) je detekcia mikrobiálnych proteínových profilov, ktoré sú porovnávané s databázou referenčných spektier. Identifikácia druhov legionel pomocou tejto metódy je vhodná pre vyšetrenie veľkého počtu kolónií v krátkom čase [3, 53, 54]. Viacerí autori dokázali výhody MALDI-TOF v rýchlosti, jednoduchosti a citlivosti metódy na úrovni druhu oproti iným identifikačným metódam [53, 54, 55, 56]. Fujinami et al. rozlíšili 23 kmeňov *L. pneumophila* pomocou MALDI-TOF za niekoľko hodín, zatiaľ čo výsledky z PFGE si vyžiadali niekoľko dní [56]. Gaia et al. rozpoznali 38 rôznych Legionella spp. skôr v MALDI-TOF ako v PCR a pomocou konvenčnej sérotypizácie [54]. Moliner et al. pri identifikácii 21 druhov legionel uvádzajú vysokú citlivosť tejto metódy (89,9 %) [53]. MALDI-TOF umožňuje súčasne identifikovať viaceré patogény dýchacích ciest z tej istej vzorky, čo v praxi prispieva k rýchlej a efektívnej liečbe respiračných infekcií a adekvátnej starostlivosti o pacienta [57].

ZÁVER

Diagnostika legionelóz sa na Slovensku nevykonáva rutinne. Vyžaduje si využitie rôznych špecifických laboratórnych metód podľa fáz ochorenia, klinickú skúsenosť a cielenú epidemiologickú anamnézu (údaje o expozícii vode, pôde, kompostu, pobyt v kolonizovanej nemocnici, zubolekárske ošetrenie, cestovanie a iné).

Rýchla diagnostika Legionárskej choroby je pre život pacienta rozhodujúca, nakoľko klinický obraz LCH je veľmi pestrý, atypická pneumónia nemusí zo začiatku dominovať a príznaky ako aj bežné laboratórne nálezy môžu nešpecificky imitovať alteráciu iných systémov. K dispozícii sú testy priamej a nepriamej diagnostiky s rôznou senzitivitou a špecificitou. V akútnej fáze LCH sa môže diagnostika opierať o skorší dôkaz legionelového antigénu v moči a DNA legionel v PCR/real-time PCR/multiplex PCR, ale súčasne s nevyhnutnosťou kultivácie vzoriek, izolácie a typizácie legionel. Sérologické testy sú vhodné pre diagnostiku v neskoršom štádiu LCH a majú veľký epidemiologický význam pri prevalenčných štúdiách. Značným prínosom pre poznanie epidemiológie legionelóz sú pokroky v identifikácii legionel (RFLP, PFGE, AFLP, SBT, MALDI-TOF a iné).

LITERATÚRA

1. Diederen BMW. Legionella spp. and Legionnaires' disease. *J Infect*, 2008;56: 1–12.
2. Salavec M, Boštíková V, Prášil P, Sleha R, Špliňo M, Boštík P. Legionelové infekce – opomíjený problém. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2014;63(1): 43–49.
3.Trnková K, Kotrbancová M, Šimonyiová D, et al. Výskyt *Legionella pneumophila* a jej hostiteľov – voľne žijúcich meňaviek v distribučných systémoch vybraných nemocníc na Slovensku. In: Zborník prednášok a posterov, Mikrobiológia vody a životného prostredia 2015, Nový Smokovec, 2015: 55–63.
4. Bartram J, Chartier Y, Lee VJ, et al. Legionella and the prevention of legionellosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization Press, 2007.
5. Currie SL, Beattie TK, Knapp CW, et al. *Legionella* spp. in UK composts – a potential public health issue? *Clin Microbiol Infect*, 2014;20: 224–229.
6. Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires´ disease. *Lancet*, 2016;387: 376–385.
7. Bajrai LH, Azhar EI, Yasir M, et al. *Legionella saoudiensis* sp. nov., isolated from a sewage water sample. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016;6(11): 4367–4371.
8. Campocasso A, Boughalmi M, Fournous G, et al. *Legionella tunisiensis* sp. nov. and *Legionella massiliensis* sp. nov., isolated from enironmental water samples. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012;62: 3003–3006.
9. Sakamoto R. Legionnaire´s disease, weather and climate. *Bull World Health Organ*, 2015;93: 435–436.

proLékaře.cz | 4.5.2024

10. Brandsema PS, Euser SM, Karagiannis I, Den Boer JW. Summer increase of Legionnaires' disease 2010 in The Netherlands associated with weather conditions and implications for source finding. *Epidemiol Infect*, 2014;142(11): 2360–2371.
11. Hicks LA, Rose CE, Fields BS, et al. Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. *Epidemiol Infect*, 2007;135: 811–817.
12. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires´ disease. *Lancet Infect Dis*, 2014;14: 1011–1021.
13. Correia AM, Ferreira JS, Borges V, et al. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N Engl J Med*, 2016;374: 497–498.
14. Tossa P, Deloge-Abarkan M, Zmirou-Navier D, et al. Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Publ Health*, 2006;6(112): 1–10.
15. Diederen BMW, De Jong CMA, et al. Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of the literature. *J Medical Microbiol*, 2006;55: 639–642.
16. Fields BS et al. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin Microbiol Rev*, 2002;15:506-520.
17. Špaleková M. Legionelózy – klinický obraz, epidemiológia, diagnostika a liečba. *Via practica,* 2010;7:155-158.
18. Pedro-Botet ML, Yu VL. Treatment strategies for Legionella infection. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10(7):1109-1121
19. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease in Europe, 2014. Stockholm: ECDC, 2016
20. Špaleková M. Výskyt a problematika legionelových infekcií v nemocničnom prostredí, *Antibiotiká a rezistencia,* 2011;10(1):24-28.
21. Dusserre E, Ginevra Ch, Hallier-Soulier S, et al. A PCR-Based Method for Monitoring *Legionella pneumophila* in Water Samples Detects Viable but Noncultivable Legionellae That Can Recover Their Cultivability. *App Environ Microbiol,* 2008;74(15):4817-4824.
22. Cunha BA. Legionnaires' Disease: Clinical Differentiation from Typical and Other Atypical Pneumonias. *Infect Dis Clin N Am*, 2010;24: 73–105.
23. Descours G, Cassier P, Forey F, et al. Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of Legionella species from respiratory samples. *Journal of Microbiological Methods*, 2014;98: 119–121.
24. Waterer GW, Baselski VS, Wunderink RG. Legionella and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *Am J Med*, 2001;110: 41–48.
25. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, et al. Pan-European study on culture proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis,* 2002;21: 710–716.
26. Murdoch DR. Diagnosis of Legionella infection. *Clin Infect Dis*, 2003;36(1): 64–69.
27. Cunha BA. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin Microbiol Infect*, 2006;12: 12–24.
28. Lück PC. Diagnostics and Clinical Disease Treatment. In: Legionella: Molecular Microbiology, Caister Academic Press, 2008: 19–34.
29. Higa F, Fujita J, Koide M. Clinical features of two cases of legionnaires´disease with persistence of legionella urinary antigen excretion. *Intern Med*, 2008;47(3): 173–178.
30. Jiang L, Chen Y, Xia S, et al. The clinical value of urinary antigen detection of Legionella pneumonia. *Zhongua Jie He He Hu Xi Za Zhi,* 2015;38(1): 29–33.
31. Yzerman EP, Den Boer JW, Lettinga KD, et al. Sensitivity of three serum antibody tests in a large outbreak of legionnaires' disease in the Netherlands. *J Med Microbio*, 2006;55: 561–566.
32. Blazquez RM, Espinosa FJ, Martinez-Toldos CM, et al. Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large outbreak of *Legionella* pneumonia in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005;24: 488–491.
33. Lück PC, Von Baum H, Helbig JH, Marre R. The usefulness of microbiological diagnostic methods for the detection of Legionella infections. In Legionella – State of the art 30 years of its recognition. Washington DC:ASM Press, 2006: 15–21.
34. Ballard AL, Fry NK, Chan L, et al. Detection of *Legionella pneumophila* Using a Real-Time PCR Hybridization Assay. *J Clin Microbiol,* 2000;38(11): 4215–4218.
35. Yong SF, Tan SH, Wee J, et al. Molecular Detection of Legionella: Moving on From mip. *Cellular and Infection Microbiology*, 2010;1: 1–5.
36. Ratcliff RM. Rapid sequencing and analysis for pathogen confirmation. *Microbiology Australia*, 2010: 103–106.
37. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, et al. Detection of Legionella Species in Respiratory Specimens Using PCR with Sequencing Confirmation. *J Clin Microbiol,* 2000;38(5): 1709–1712.
38. Lindsay DSJ, Abraham WH, Findlay W, et al. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1, comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol*, 2004;53: 183–187.
39. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylors A, et al. Design and implementation of a protocol for the detection of Legionella in clinical and environmental samples. *Diagn Microbiol Dis,* 2008;62(2): 125–132.
40. Lindsay DSJ, Abraham WH, Fallon RJ. Detection of *mip* Gene by PCR for Diagnosis of Legionnaires´Disease. *J Clin Microbiol*, 1994;32(12): 3068–3069.
41. Yang G, Benson R, Pelish T, et al. Dual detection of *Legionella pneumophila* and Legionella species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. *Clin Microbiol Infect*, 2010;16 (3): 255–261.
42. Hayden RT, Uhl JR, Qian X, et al. Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol*, 2001; 39(7): 2618–2626.
43. Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, et al. Detection of legionella spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. *J Clin Microbiol*, 1992;30: 920–924.
44. Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of Legionella DNA in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 2001;39(8): 2904–2910.
45. Matsiota-Bernard P, Waser S, Vrioni G. Detection of *Legionella pneumophila* in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin Microb Infec,* 2000;6: 223–225.
46. Bazovská S, Špaleková M. Problém špecificity sérologických diagnostických testov pri legionelóze. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 1998;47(4): 141–144.
47. Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, et al. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol*, 1997;35(11): 2841–2845.
48. Jarraud S, Descours G, Ginevra C, et al. Identification of Legionella in clinical samples. *Methods Mol Biol*, 2013;954: 27–56.
49. Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Legionella. *Infection Genetics and Evolution*, 2016;43: 108–122.
50. Orsini M, Amore R, et al. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Legionella pneumophila* typing. *JPH*, 2008;5(2): 143–148.
51. Gaia V, Fry NK, Afshar B, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*, 2005;43: 2047–2052.
52. http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php
53. Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, et al. Rapid identification of Legionella species by mass spectrometry. *J Med Microbiol*, 2010;59: 273–284.
54. Gaia V, Casati S, Tonolla M. Rapid identification of Legionella

proLékaře.cz | 4.5.2024

spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Syst Appl Microbiol*, 2011;34: 40–44.
55. Dilger T, Melzl H, Gessner A. Rapid and reliable identification of waterborne Legionella species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 2016;127: 154–159.
56. Fujinami Y, Kikkawa HS, Kurosaki Y, et al. Rapid discrimination of Legionella by matrix-assisted laser desorption ionization time-of--flight mass spectrometry. *Microbiol Res*, 2011;166: 77–86.
57. Wang YFW, Fu J. Rapid laboratory diagnosis for respiratory infectious diseases by using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Thorac Dis,* 2014;6(5): 507–511.

Do redakce došlo dne 28. 9. 2016.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Martina Kotrbancová
Ústav epidemiológie LFUK
Špitálska 24
813 72 Bratislava
Slovenská republika
e-mail: martina.kotrbancova@fmed.uniba.sk