

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRMA PERKO

**DIPLOMSKA NALOGA**

Visokošolski strokovni program  
laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IRMA PERKO

**Primerjava dveh encimsko imunskih testov za dokaz topnega  
antigena legionele v urinu bolnika**

**Comparison of two enzyme immune tests for the detection of  
soluble antigen in urine of legionella patients**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala v laboratoriju za diagnostiko okužb s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami (KLM) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med. in somentorici doc. dr. Darji Keše, univ. dipl. biol. za vodenje, strokovno pomoč in svetovanje pri izdelavi diplomske naloge.

Še posebno se zahvaljujem družini za podporo v času študija ter vsem, ki so mi pomagali pri izdelavi diplomskega dela.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca, dr. med. in somentorstvom doc. dr. Darje Keše, univ. dipl. biol.

Ljubljana, 2010

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc

Član diplomske komisije: dr. Aleš Jerin

# VSEBINA

1. UVOD .....	1
2. TEORETIČNI DEL .....	2
2.1. BIOLOŠKE LASTNOSTI LEGIONEL .....	2
2.2. TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV LEGIONEL .....	3
2.3. EPIDEMIOLOGIJA .....	5
2.3.1. Epidemija legionarske bolezni v Sloveniji .....	6
2.4. PATOGENEZA .....	7
2.4.1. Razmnoževanje legionel v vodi .....	8
2.4.2. Razmnoževalni krog legionel v makrofagih .....	9
2.5. VIR IN PRENOS OKUŽBE .....	11
2.5.1. Ugodni pogoji za obstoj in razmnoževanje legionel .....	12
2.5.2. Ukrepi za preprečevanje razmnoževanja legionel v vodovodnem sistemu .....	13
2.6. KLINIČNA SLIKA .....	13
2.6.1. Legionarska bolezen .....	13
2.6.2. Pontiaška vročica .....	14
2.7. ZDRAVLJENJE .....	15
2.8. MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA .....	15
2.8.1. Odvzem kužnine .....	16
2.8.2. Preiskave .....	16
3. NAMEN DELA .....	20
4. MATERIALI IN METODE .....	21
4.1. MATERIALI .....	21
4.2. METODE .....	22
4.2.1. Test za dokazovanje antigenov legionel: <i>Legionella Urine Antigen EIA</i> (Biotest, Nemčija) .....	23
4.2.2. Test za dokazovanje antigenov legionel: <i>Legionella Urine Antigen EIA</i> (Binax, ZDA) .....	25
5. REZULTATI .....	30
6. RAZPRAVA .....	34
7. ZAKLJUČKI .....	35
8. LITERATURA .....	36

## POVZETEK

Bakterija *Legionella pneumophila* je lahko povzročiteljica težke zunajbolnišnične kot tudi bolnišnične pljučnice. Bolnik se okuži z vdihavanjem aerosolov iz okuženega vodovodnega vira (klimatske naprave, vodovod). Klinična slika je neznačilna. Na to okužbo posumimo pri bolniku s težko obliko pljučnice, ki jo spremlja istočasna prizadetost drugih organskih sistemov. Prenos s človeka na človeka ni dokazan. Za dokaz okužbe je na voljo več diagnostičnih testov. Dokaz *L. pneumophila* v kulturi (gojišče BCYE) je zlati standard in najbolj specifičen diagnostični postopek. Žal je omenjeni postopek dolgotrajen, njegova občutljivost pa nizka. V diagnostiki zato največ uporabljamo serološki test imunofluorescence, s katerim dokazujemo protitelesa proti legioneli. Pomanjkljivost testa se kaže v tem, da moramo testirati parne serume, zato ima test večji pomen le za epidemiološke študije.

Okužbo lahko hitro ugotovimo z dokazom DNA legionele v kužnini iz dihal ali z dokazom prisotnega topnega legionelnega antigena v urinu bolnika. Urin je idealen vzorec za zbiranje, kot tudi za transport v laboratorij. V nalogi smo primerjali dva kompleta komercialno dostopnih reagentov, Biotest Legionella Urine Antigen EIA in Binax Legionella Urinary Antigen EIA, ki omogočata dokazovanje topnega antigena v urinu pacientov okuženih z *Legionella pneumophila* serološke skupine 1 (sg. 1). V naši raziskavi smo želeli ugotoviti kateri izmed uporabljenih testov za dokaz legionele je bolj občutljiv. V ta namen smo v raziskavo vključili 36 vzorcev urina bolnikov z legionelozo. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da je test Biotest bolj občutljiv, ker zazna prisotnost vseh vrst legionel v urinu in ne samo ene, kot test Binax. Pomanjkljivost Biotestovih reagentov pa se kaže v tem, da z njimi ne zaznamo vseh podtipov *L. pneumophila* sg. 1.

## ABSTRACT

*Legionella pneumophila* is a potential agent of severe community acquired pneumonia and nosocomial pneumonia. The patient is infected through inhaling the aerosol from a contaminated source (air-conditioning, water pipeline). The clinical picture is atypical. We suspect such an infection in patients with severe forms pneumonia with other organs also being affected. Human-to-human transmission of the infection has not been proven. There are several diagnostic tests available for confirming the infection. The most specific diagnostic procedure for the identification of *L. pneumophila* is a culture (BCYE agar) which is the gold standard. Unfortunately, this procedure is time-consuming and of low sensitivity. The most commonly used test is the serological test of immunofluorescence which detects Legionella-specific antibodies. The drawback of the test is that paired serum samples are necessary and it is therefore only really valuable for epidemiological purpose.

Infection can quickly be confirmed through detection of legionella DNA in respiratory samples and through detection of soluble Legionella antigen in a urine sample. Urine samples are ideal both from the aspect of collection as well as its transportation to a lab. In this paper two sets of commercially available reagents are compared: namely the Biotest Legionella Urine Antigen EIA and the Binax Legionella Urinary Antigen EIA, both enabling detection of the soluble antigen in the urine of patients infected by *Legionella pneumophila* serogroup 1 (sg. 1). In the research we try to determine which of the two Legionella-detection tests is more sensitive. To this end, 36 urine samples of patients suffering from legionellosis have been analysed. The obtained results indicate that the Biotest is the more sensitive of the tests as it has detected all Legionella types in the urine, compared to only one such type, which was the case with the Binax test. The drawback of the Biotest reagents is, however, that they do not allow for the detection of all *L. pneumophila* sg. 1 subtypes.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>ELISA</b>	ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay – encimskoimunski test
<b>EWGLI</b>	ang. European Working Group for Legionella Investigation
<b>HRP</b>	hrenova peroksidaza
<b>TMB</b>	tetrametilbenzidin

## 1. UVOD

Legionarska bolezen, ki je poimenovana po izbruhu okužbe med veterani in člani Ameriške legije v Filadelfiji leta 1976, je posledica okužbe z bakterijo *Legionella pneumophila*. Okužba z legionelo se lahko izraža kot blaga pljučnica pa vse do življenjsko ogrožajočega stanja (1). Legionarska bolezen je v veliki meri posledica razmer v okolju, ki jih je spremenil človek. Ko je poskrbel za svoje ugodje, je poskrbel tudi za ugodje nekaterih spremljevalcev, npr. bakterij. Ena od teh je legionela, za katero vladajo optimalni pogoji v umetnih vodnih okoljih (vodovodno omrežje, kopalni bazeni, ipd.) (2). Da povzročijo okužbo in bolezen, morajo biti bakterije prisotne v zadostnem številu in zadosti časa (3). Znano je, da se bolezen pojavi v obliki epidemije in v endemični obliki. Sporadični primeri se po kliničnih simptomih le težko razlikujejo od drugih okužb dihal (1). Sporadični primeri bolnikov z legionelozo se pojavljajo vse leto, nekoliko pogosteje poleti. Vzrokov zato je več. Vodovodna voda se ogreva do temperatur, ki pospešujejo rast legionel, več ljudi potuje in se zadržuje v hotelih ter termalnih kopališčih, kjer je tveganje večje. Manjše epidemije se pojavljajo v bolnišnicah, hotelih in domovih za starejše občane. Do okužbe in izbruha bolezní običajno pride le ob vdihavanju večje količine razpršenih delcev. Pitje okužene vode običajno ne povzroča težav, ker bakterijo uniči želodčni sok (3).



## 2. TEORETIČNI DEL

### 2.1. BIOLOŠKE LASTNOSTI LEGIONEL

Legionele uvrščamo v družino *Legionellaceae*, rod *Legionella*. So po Gramu negativni, aerobni bacili, veliki od 0,3 do 0,9  $\mu\text{m}$  x 2 - 20  $\mu\text{m}$  ali daljši, gibljivi, imajo biček in piluse (slika 1), (4, 5, 6). Njihovo glavno bivalno okolje je voda (4).



Slika 1: Elektronski posnetek legionele (7).

V laboratoriju gojimo legionele na posebnih gojiščih. Za njihovo optimalno rast in razmnoževanje potrebujejo železove soli in L - cistein (5).

Sposobne so rasti pri temperaturi 25 do 43 °C na umetnih gojiščih in v naravi celo pri višjih temperaturah, zato jim pravimo termotolerantne bakterije (4).

Njihova značilnost je, da parazitirajo v praživalih (protozojih), predvsem v amebah. Razvoj industrije in povečanje števila ljudi z imunsko oslabelelostjo vodi v povečevanje dovzetnosti za okužbe z legionelami. Naprave, kot so ventilatorji, klimatske naprave in tuši omogočajo prenos aerosolov z legionelami do primerne gostitelja (4).

## 2.2. TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV LEGIONEL

Rod *Legionella* uvrščamo v družino *Legionellaceae*, ki pripada razredu  $\gamma$ -Proteobacteria (preglednica I), (8). Najbližji genetski sorodnik družine *Legionellaceae* je družina *Coxiellaceae* (9).

Preglednica I: Taksonomska razvrstitev legionel (8).

DRUŽINA	ROD	VRSTE
<i>Legionellaceae</i>	<i>Legionella</i>	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. dumoffii</i> , <i>L. brunensi</i> , <i>L. longbeachae</i> , in druge

Rod *Legionella* vsebuje 52 vrst in 72 serološko različnih skupin, ki so bile osamljene iz naravnih in kliničnih vzorcev (preglednica II). Serološke skupine (sg.) se med seboj razlikujejo po lipopolisaharidnih antigenih na površini celice (6, 8).

Glede na sorodnost molekule DNA lahko vrsto *L. pneumophila* razdelimo v tri podvrste: *L. pneumophila* subsp. *fraseri*, *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* in *L. pneumophila* subsp. *pascullei*. Zadnje so doslej našli le v naravnem okolju (10).

Najpogostejši povzročitelj legioneloz je *L. pneumophila*, in sicer sg. 1, ki povzroča približno 80 – 90% vseh primerov legioneloz (4). Ostale vrste legionel so manj virulentne in jih pogosto osamimo pri imunsko oslabljenih bolnikih:

- *L. micdadei*
- *L. bozemanii*
- *L. dumoffii*
- *L. longbeachae* (9).

Preglednica II: Nekatere vrste bakterij iz rodu *Legionella*, ki so bile osamljene iz kužnin bolnikov in iz okolja (4).

<b>Osamitev iz kliničnih vzorcev</b>	<b>Osamitev iz okolja</b>
<i>L. pneumophila</i>	<i>L. moravica</i>
<i>L. micdadei</i>	<i>L. cherrii</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. dumofii</i>	<i>L. nautarum</i>
<i>L. longbeachae</i>	<i>L. brunensis</i>
<i>L. jordanis</i>	<i>L. erythra</i>
<i>L. gormanii</i>	<i>L. israelensis</i>
<i>L. feeleii</i>	<i>L. jamestowniensis</i>
<i>L. hackeliae</i>	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. maceachernii</i>	<i>L. donaldsonii</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. spiritensis</i>
<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. steigerwaltii</i>
<i>L. wadsworthii</i>	<i>L. fairfieldensis</i>
<i>L. tucsonensis</i>	<i>L. adelaidensis</i>
<i>L. anisa</i>	<i>L. geestiana</i>
<i>L. lansingensis</i>	<i>L. gratiana</i>
<i>L. parisiensis</i>	<i>L. londiniensis</i>
<i>L. sainthelensi</i>	<i>L. quinlivanii</i>
	<i>L. quateirensis</i>
	<i>L. worsleiensis</i>

### 2.3. EPIDEMIOLOGIJA

Legionelo so odkrili leta 1976, ko je v Filadelfiji za pljučnico zbolelo 182 udeležencev zbora ameriške legije, od katerih jih je 34 umrlo (18,7%) (9). Zato so to obliko pljučnice poimenovali legionarska bolezen, bakterijo, ki so jo januarja leta 1977 prvič osamili iz pljuč umrlih legionarjev, pa *L. pneumophila* (4). Pljučnica povzročena z legionelami se kot edina akutna bakterijska pljučnica pojavlja v izbruhih, in sicer zaradi širjenja bakterije z vodnimi kapljicami (aerosolom), včasih tudi do dva kilometra daleč od izvora okužbe. Okužen aerosol navadno izvira iz tople vode (4, 10).

Vir okužbe so vodovodne napeljave, kjer je bakterija naseljena, prhe, klimatske naprave ter bazeni, ki vrtinčijo vodo in razpršujejo aerosol z legionelami po prostoru. Legionele se prenašajo z vdihavanjem vodnih hlapov in aerosolov (4). Izvor okužbe z legionelo v Filadelfiji je bil vodovodni sistem za ogrevanje in hlajenje (10).

Legionele se v amebah, podobno kot v makrofagih, živahno množijo in pomenijo nevarnost za nastanek epidemije, kadar je takšni kontaminirani vodi izpostavljeno večje število ljudi (10). Izbruhi bolezni se lahko pojavijo sporadično ali v večjem obsegu kot epidemija (4). O sporadičnih primerih so poročali skozi vse leto, vendar se večina primerov okužbe pojavi poleti in jeseni, verjetno zato, ker toplejše vreme spodbuja razmnoževanje bakterij v vodi (5).

Značilni primeri, ko je bila bolezen epidemična so naslednji:

- bolniki so se okužili z vodo iz bazenov,
- pogoste epidemije v hotelih in bolnišnicah so navadno zajele manjše skupine ljudi,
- epidemije, ki so nastale zaradi okužene vode v bazenih za podvodno masažo, pogost izvor okužbe pa so bile prhe (10).

### 2.3.1. Epidemija legionarske bolezni v Sloveniji

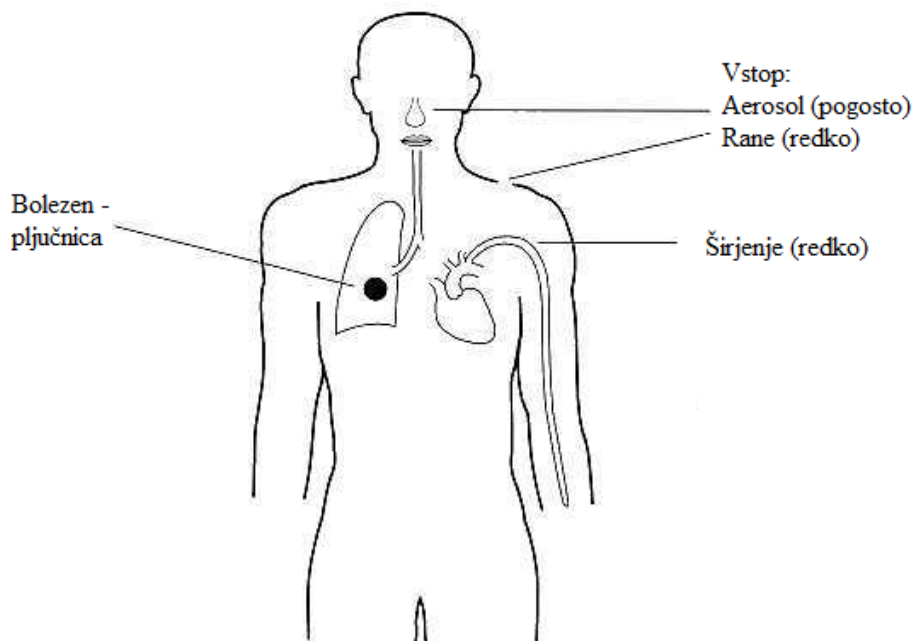
Čeprav je bila prva epidemija legionarske bolezni že leta 1976, smo v Sloveniji prvič prepoznali to bolezen leta 1991, ko je v bolnišnici na Jesenicah zbolelo 17 zdravstvenih delavcev (10). V Sloveniji je prijava legioneloze obvezna. Od leta 1999 do leta 2006 je bilo skupaj prijavljenih približno 130 bolnikov, tri četrtine je bilo moških, med prijavami skoraj ni otrok, večina bolnikov je starejših od 50 let, 14% bolnikov je navajalo, da so se v obdobju inkubacije nahajali v termalnih kopališčih ali zdraviliščih (3). V letih 1996 in 1997 so po podatkih Inštituta za varovanje zdravja zabeležili tri smrtne primere legionarske bolezni (tabela 1), (10).

Tabela 1: Število prijavljenih primerov legioneloze v Sloveniji po podatkih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije (11).

LETO	ŠTEVILO PRIJAVLJENIH PRIMEROV LEGIONELOZE V SLOVENIJI
1996	5
1997	8
1998	9
1999	18
2000	6
2001	12
2002	19
2003	24
2004	13
2005	22
2006	39
2007	31
2008	48

## 2.4. PATOGENEZA

Okužba z legionelo nastane z vdihavanjem drobnih vodnih delcev, ki jo vsebujejo (slika 2). V zgornjih dihalnih poteh jo verjetno odstranijo celice mukociliarnega sistema. Kadar se izmakne ciliarnemu odstranjevanju, pride lahko do alveolov. Ali bo izbruhnila bolezen je odvisno od gostiteljevega imunskega odziva in virulence bakterije. Prva gostiteljeva obramba so alveolarni makrofagi, ki fagocitirajo bakterijo. Vendar legionela znotraj makrofaga zavira fagolizosomsko zlitje, s čimer prepreči mikrobicidno delovanje makrofaga. Glavna gostiteljeva obramba proti legionelam je celično posredovana imunost. Zato je legionarska bolezen pogostejša pri ljudeh, ki imajo oslABLJENO celično posredovano imunost. Specifična celično posredovana imunost se razvije v 2 tednih po okužbi. Serološke skupine legionel se razlikujejo po virulenci. *L. pneumophila* izdeluje proteaze, ki lahko okvarijo tkivo (4).

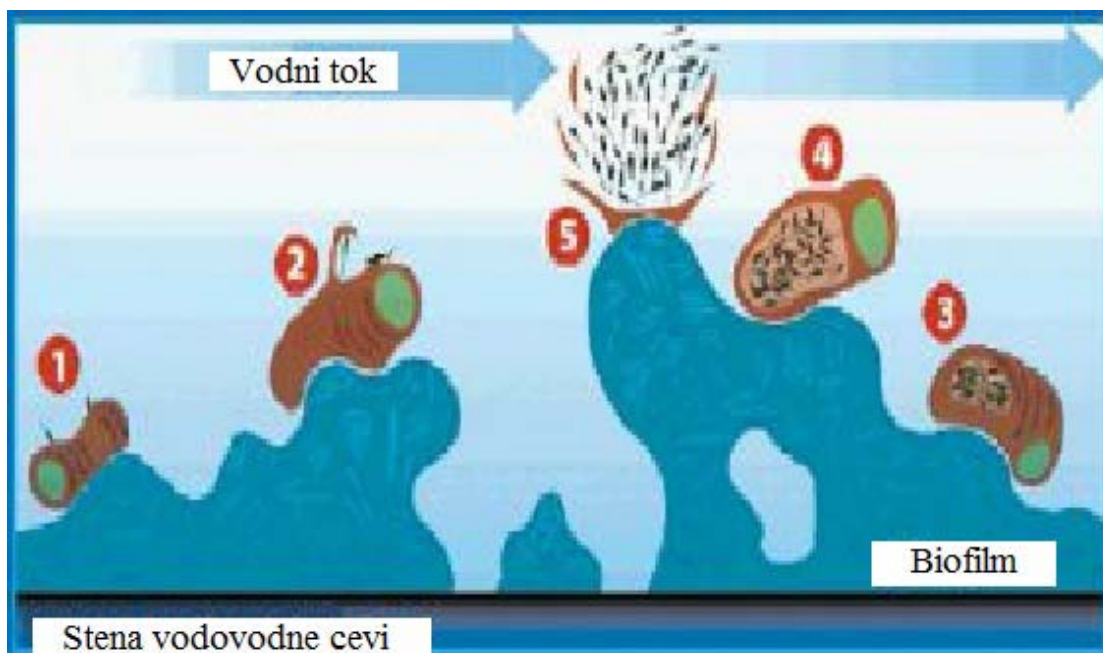


Slika 2: Mesta vstopa in možnosti širjenja pri okužbi z legionelo (12).

### 2.4.1. Razmnoževanje legionel v vodi

Legionele se razmnožujejo pri temperaturi od 20 °C do 45 °C, optimalna rast je pri 37 °C. So znotrajcelični paraziti v algah, amebah in drugih bakterijah. Usedline, sluz in organski materiali prav tako omogočajo dobre pogoje za razmnoževanje legionel. Železov oksid pospešuje rast legionel v vodohramih in vodovodu, biofilm pa jih ščiti pred učinki snovi, ki zavirajo njihovo rast (slika 3), (13).

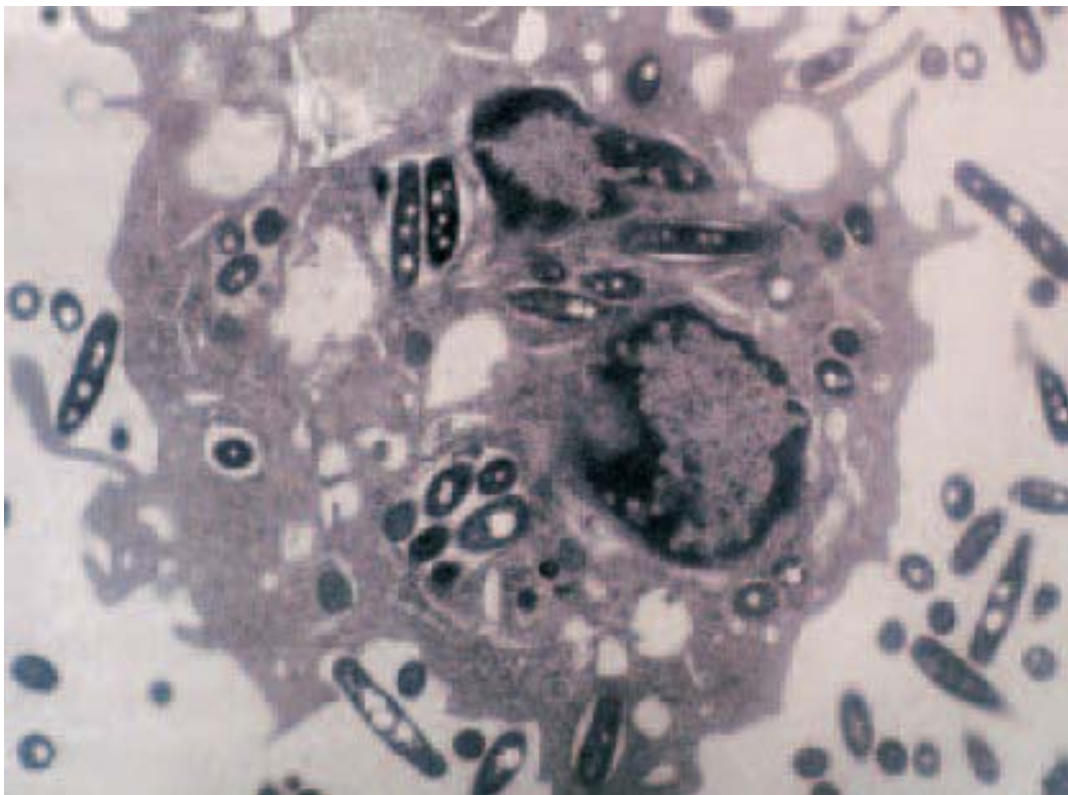
Življenjski krog legionele v vodovodnih sistemih zgradb: [1] ameba se utrdi v biofilmu, kjer se prehranjuje z bakterijami, ki pa so [2] okužene z legionelami. Te [3] se v njihovi zaščiti razmnožujejo in rastejo znotraj celice. [4] Ameba [5] počni in v okolje se sprostijo legionele (14).



Slika 3: Življenjski krog legionele v vodovodnih sistemih (14).

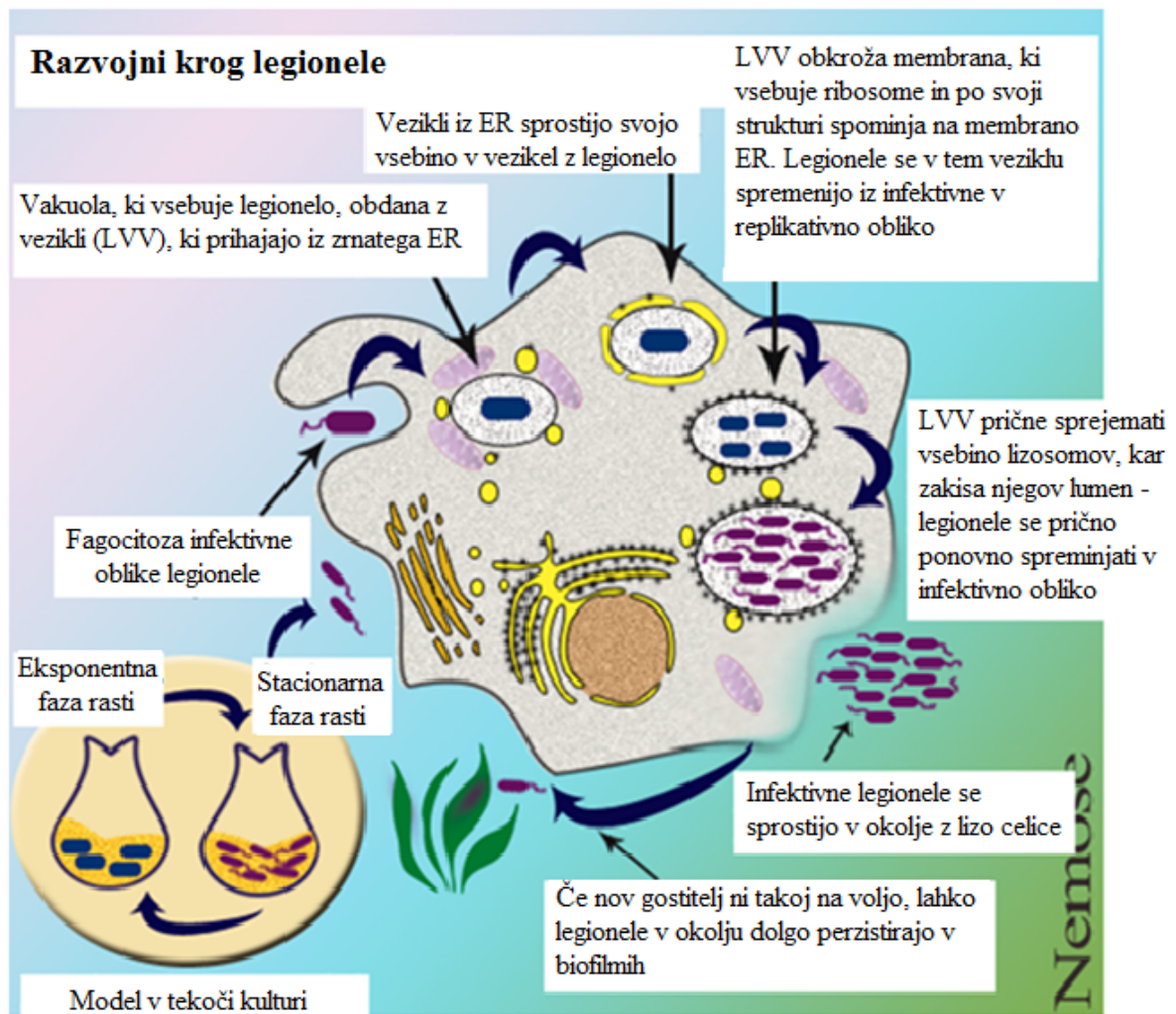
### 2.4.2. Razmnoževalni krog legionel v makrofagih

*L. pneumophila* vstopi in se razmnožuje v humanih alveolarnih makrofagih in monocitih (slika 4). Levkociti legionele le slabo uničujejo. Videti je, da se bakterije ovijejo s sestavinami serumske beljakovine, komplemента in se nato pritrdijo na površino celic. V celice vstopajo s fagocitozo. Kadar so navzoča specifična protitelesa, je vstopanje legionel v celice nekoliko bolj zapleteno. Ko legionele pridejo v celico, jih najdejo v posameznih fagosomih (slika 5). Na tej točki se varstveni mehanizmi makrofagnih celic pretrgajo in fagosomne vakuole se ne zlivajo z lizosomi. Ribosomi, mitohondriji in drobni mešički se zbirajo okrog vakuol z legionelami. Bakterija se v vakuolah razmnožuje. Ko se število bakterij poveča, uničijo celico, se sprostijo in okužijo nove makrofage. Za dogajanje je bistvena navzočnost železa (10).



Slika 4: Mikroskopska slika makrofaga z legionelami (15).





Legenda: ER – endoplazmatski retikulum, LVV – legionele vsebujoči vezikel

Slika 5: Razvojni krog legionele (16).

## 2.5. VIR IN PRENOS OKUŽBE

Legionele so sposobne preživeti v sladkih vodah in v zemlji, ter so prisotne povsod v naravnih okoljih. Za njihovo razmnoževanje in širjenje je pomembna povišana temperatura vode, prisotnost nekaterih organskih in anorganskih komponent v vodi (npr. železo) in prisotnost drugih organizmov. Preživetje v naravnem okolju jim omogoča parazitski način življenja. Legionele namreč parazitirajo v algah, bakterijah in pogosto v protozojih. Ta način življenja jim zagotavlja hranilne snovi in zaščito v težkih okoljskih pogojih (8).

Bakterije najdemo v:

- biofilmu;
- umetno narejenih vodovodnih sistemih, kot so: pipe, prhe, klimatski sistemi, zdravilišča, fontane, zobozdravstvene naprave;
- hladilnih stolpov velikih poslopij in v napravah za ogrevanje in hlajenje;
- naravnih vodnih okoljih (potoki, reke, jezera, ribniki in termalni bazeni), v vlažnih tleh in v blatu (5, 8, 17).

Posebno rizične dejavnike za povečano razmnoževanje legionel predstavljajo naprave v hladilnih stolpovih in kondenzatorji za vodno paro. Nadvse pomembne so tudi vodovodne cevi, ki jih dalj časa ne uporabljajo ali se slepo končajo (10).

Zgoraj omenjeni sistemi za generiranje aerosolov so v pomoč pri prenosu legionele iz vode v zrak. Vdihavanje okuženih aerosolov povzroča pri ljudeh okužbo z legionelo (8).

Prenos okužbe ne poteka s človeka na človeka. To dokazujejo primeri, ko se okužba ni prenesla kljub tesnemu stiku z bolnikom (18).

### 2.5.1. Ugodni pogoji za obstoj in razmnoževanje legionel.

Na razmnoževanje legionel v vodovodnih sistemih vpliva več dejavnikov:

- temperatura vode v omrežju med 20 °C in 50 °C,
- zastoji vode v omrežju zaradi odsotnosti uporabnikov, motnje v oskrbi vode, zmanjšana uporaba pip in tušev,
- možnost nastanka aerosola,
- mrtvi rokavi v vodovodnem omrežju (nastanejo po adaptacijah oz. spreminjanju internega vodovodnega omrežja, če se odstranijo samo izlivke ali deli cevi),
- ugodni mikrobiološki in fizikalno kemijski pogoji za razmnoževanje legionel: prisotnost ameb, nekaterih alg in praživali, biofilmi, kotlovec, železo (rja), guma, les, nekatere plastike – organske snovi, ki se sproščajo iz napeljave (slika 6),
- prenizka vsebnost dezinfekcijskega sredstva, kjer ga je potrebno uporabljati,
- posegi v vodovodni sistem in prekinitev dobave,
- dotrajana instalacija in nekontrolirani adaptacijski posegi (6, 13).



Slika 6: Sliki prikazujeta notranjost različnih toplovodnih zbiralnikov (19).

### **2.5.2. Ukrepi za preprečevanje razmnoževanja legionel v vodovodnem sistemu.**

Preventivni ukrepi, ki zmanjšujejo možnost razmnoževanja legionel v vodovodnem sistemu so sledeči:

- temperatura hladne vode v vodovodnem omrežju mora biti pod 20 °C,
- temperatura tople vode v omrežju na vseh (tudi na najbolj oddaljenih) pipah in prhah mora dosežati več kot 50 °C,
- temperatura v grelcu mora biti več kot 60 °C (najmanj eno uro na dan naj bo taka temperatura tudi na dnu grelca),
- na mestih, kjer voda v vodovodnem omrežju zastaja, je potrebno izvajati tedensko spiranje do stabilizacije temperature vode,
- mrežice na pipah in glave tušev morajo biti redno čiščene (usedline, nesnaga, kamen),
- redno je treba pregledovati in po potrebi čistiti grelce,
- potreben je pregled rezervoarjev za mrzlo vodo,
- treba je izvajati potrebna popravila,
- čiščenje in klorni šok (dezinfekcija) po posegih v interni vodovodni sistem
- vodenje evidence (6,13).

## **2.6. KLINIČNA SLIKA**

Legionele pogosto povzročijo okužbo brez bolezenskih znamenj pri vseh starostnih skupinah ljudi, kar lahko ugotovimo z dokazom specifičnih protiteles pri ljudeh, ki niso preboleli klinično zaznavne bolezni. Bolezen je klinično očitna najpogosteje pri moških, starih nad 55 let (10).

Za legionelo je značilno, da povzroča dve obliki bolezni: legionarsko bolezen in pontiaško vročico (preglednica III).

### **2.6.1. Legionarska bolezen**

Legionarska bolezen je pljučnica, ki brez zdravljenja z antibiotiki hitro napreduje. Smrtnost je velika tudi pri ljudeh, ki so bili pred legionarsko boleznijo povsem zdravi. Smrtnost znaša približno 10% in je večja pri bolnišničnih okužbah (10).

## 2.6.2. Pontiaška vročica

Pontiaška vročica je milejša oblika legioneloze, ki se kaže kot gripi podobna okužba, ki ne povzroča pljučnice (4, 18). Po epidemioloških posebnostih je podobna legionarski bolezni. Okužba se širi po enakih poteh kakor pri legionarski bolezni in tudi izvori so enaki. Razlika pa je v številu okuženih, ki je pri pontiaški vročici večje kakor pri legionarski bolezni, saj se okužijo skoraj vsi, ki pridejo v stik z bakterijo (10). Povzročajo jo različne vrste legionel (*L. anisa*, *L. feeleii*, *L. micdadei*) ter manj virulentni sevi *L. pneumophilla*. Pojavlja se v vseh starostnih skupinah, tudi pri otrocih (4).

Preglednica III : Glavne značilnosti legionarske bolezni in pontiaške vročice (9).

Značilnosti	Legionarska bolezen	Pontiaška vročica
<b>Inkubacijska doba</b>	2 - 10 dni, le redko do 20 dni	5 ur - 3 dni (najbolj običajno 24 - 48 ur)
<b>Trajanje</b>	Tedne	2 - 5 dni
<b>Smrtni primeri</b>	Različno; odvisno od dovzetnosti za okužbo v bolnišnici, kjer je lahko okuženih od 40 do 80% pacientov	ni
<b>Stopnja obolenja</b>	0.1 – 5% prebivalstva; 0.4 – 14% v bolnišnicah	do 95%
<b>Simptomi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* pogosto nespecifični</li> <li>* splošna oslabelost</li> <li>* visoka vročina</li> <li>* glavobol</li> <li>* neproduktiven, suh kašelj</li> <li>* včasih izkašljevanje krvi</li> <li>* mrazenje</li> <li>* bolečine v mišicah</li> <li>* težave pri dihanju, bolečine v prsih</li> <li>* driska (v 25 - 50% primerih)</li> <li>* odpoved ledvic</li> <li>* hiponatriemija</li> <li>* okvara osrednjega živčevja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* gripi podobna bolezen</li> <li>* utrujenost</li> <li>* visoka telesna temperatura in mrzlica</li> <li>* bolečine v mišicah</li> <li>* glavobol</li> <li>* bolečine</li> <li>* driska</li> <li>* slabost, bruhanje</li> <li>* težko dihanje</li> <li>* suh kašelj</li> </ul>

Dejavniki tveganja za legionelozo so:

- zdravljenje s steroidi ali drugimi sredstvi, ki oslabijo imunski odziv (npr. bolniki po presaditvi organov, bolniki z rakom),
- kronična ledvična odpoved,
- sladkorna bolezen,

- srčno popuščanje,
- kronična obstruktivna pljučna bolezen,
- kajenje, alkoholizem,
- starost (nad 65 let) (10, 2).

Kadar bolniki v bolnišnici zbolijo za pljučnico, je potrebno vedno opraviti preiskavo glede okužbe z legionelo. Rentgenska preiskava pljuč bolnika z legionarsko boleznijo odkrije lisaste sence v pljučnih režnjih. Bolniku pogosto odpovedujejo ledvica, jetra ne delujejo pravilno. Smrtnost je bila med nekaterimi epidemijami kar 10% ali celo več. Serološki testi, opravljeni na začetku bolezni, pogosto niso v veliko pomoč pri diagnozi, ker so običajno negativni (10), zato za hitro in zgodnjo laboratorijsko diagnostiko priporočajo test za dokaz topnega antigena legionele v urinu in dokazovanje DNA legionel z molekularnim testom PCR.

## **2.7. ZDRAVLJENJE**

Zgodnji začetek ustreznega zdravljenja je ključnega pomena za uspešen izid legionarske bolezni. Za napoved izida bolezni je pomemben čas od pojava prvih bolezenskih znamenj do ustreznega zdravljenja z antibiotiki. V več raziskavah so potrdili, da je smrtnost zaradi legionarske bolezni večja, kadar jo začno ustrezno zdraviti po več kot šestih dneh po prvih bolezenskih znamenjih. Zgodnje zdravljenje zmanjšuje smrtnost za 2 – 6-krat. Legionele so znotrajcelične bakterije; zato so za zdravljenje okužb v tem primeru učinkovitejši makrolidi, fluorokinoloni, tetraciklini, rifamicin in ketolidi. Legionarsko bolezen uspešno zdravijo zlasti z eritromicinom in azitromicinom. Klinične študije kažejo, da imajo fluorokinoloni in novejši makrolidi večjo aktivnost in boljše znotrajcelično prodiranje kot eritromicin. Odziv na zdravljenje je odvisen tudi od starosti bolnika, stanja njegovega imunskega sistema in časa zdravljenja (8, 10).

## **2.8. MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA**

Okužbo, ki jo povzroča legionela, najprepričljivejše dokažemo z osamitvijo in identifikacijo bakterije iz bolnikove kužnine. S testom neposredne imunofluorescence z uporabo monoklonskih protiteles lahko legionelo hitro dokažemo v bolnikovi kužnini. Vse bolj se uveljavlja dokazovanje z uporabo metode PCR. Okužbo z legionelo dokazujemo tudi

posredno z dokazom specifičnih protiteles (s testom posredne imunofluorescence ali s testom ELISA), ter z dokazom topnega antigena v urinu bolnika (4).

### **2.8.1. Odvzem kužnine**

Za neposredno dokazovanje okužbe z legionelo preiskujemo različne kužnine, in sicer so to izmeček, aspirat traheje, bronhialni izpirek, plevralna tekočina, tkivo iz pljuč ali traheje, kri, serum in seč. Pri pljučnicah dokazujemo legionelo iz kužnin spodnjih dihal: sputuma, endotrahealnega aspirata, bronhoalvearnega izpirka ali plevralne tekočine. Pri bakteriemiji izoliramo legionelo iz krvi, pljučnih abscesov, redko iz ran, kožnih in perirektalnih abscesov, po smrti pa iz pljuč, jeter, vranice, srca ledvic, perikardialne tekočine ali peritonealnega eksudata. Najboljša kužnina je vzorec, ki ga odvezamemo z bronhoskopijo. Za dokaz legionele je priporočljivo odvzeti več vzorcev. Kužnine moramo odvzeti aseptično in jih čim hitreje prinesiti v laboratorij. Kadar to ni mogoče, jih za 24 ur lahko shranimo v hladilnik pri 4 °C (4, 20).

### **2.8.2. Preiskave**

#### Osamitev in identifikacija

Najbolj zanesljiv dokaz legioneloze je osamitev bakterije. Izvedemo jo iz bolnikove kužnine iz spodnjih dihal. Legionele lažje osamimo iz kužnine tako, da le-to segrevamo 30 minut pri 50 °C, kar uniči druge bakterije, legionele pa to temperaturo preživijo. Legionele kultiviramo na posebnem selektivnem gojišču BCYE– agar z ekstraktom oglja in kvasa, ki spodbujajo rast legionel, poleg tega pa vsebuje tudi antibiotike za oviranje rasti drugih bakterij (slika 7). Gojimo jih v ozračju s 5% ogljikovim dioksidom, pri temperaturi 35 – 36 °C, pH 6,9 in pri 90% vlažnosti. Inkubiramo jih najmanj 2 do 5 dni, ker gre za počasti rastoče bakterije. Legionele tvorijo na tem gojišču okrogle, konveksne kolonije, ki imajo značilen videz razbitega stekla, če jih pogledamo pod mikroskopom. Legionele imajo na površini različne lipopolisaharidne antigene, zato temelji nadaljnja prepoznavna na testiranju z direktno imunofluorescenčno metodo z uporabo monoklonskih protiteles, z aglutinacijo s specifičnim antiserumom ali na molekularnih metodah (slika 8),(4, 21).

Metoda osamitve legionele v kulturi je zlati standard in najbolj specifičen diagnostičen postopek. Žal je postopek dolgotrajen, občutljivost pa nizka (22).



Slika 7: Legionela na gojišču BCYE (23).



Slika 8 : Dokazovanje legionele s testom direktne imunofluorescence v kulturi (24).

#### Neposredna imunofluorescenca

Najhitrejša laboratorijska metoda za dokaz okužbe z legionelami je neposredna imunofluorescenca z uporabo monoklonskih protiteles. Kužnino naneseemo na objektno stekelce, jo posušimo, pritrdimo z 10-odstotnim formalinom in nato barvamo s specifičnimi monoklonskimi protitelesi, ki so označena s fluoresceinom (4).

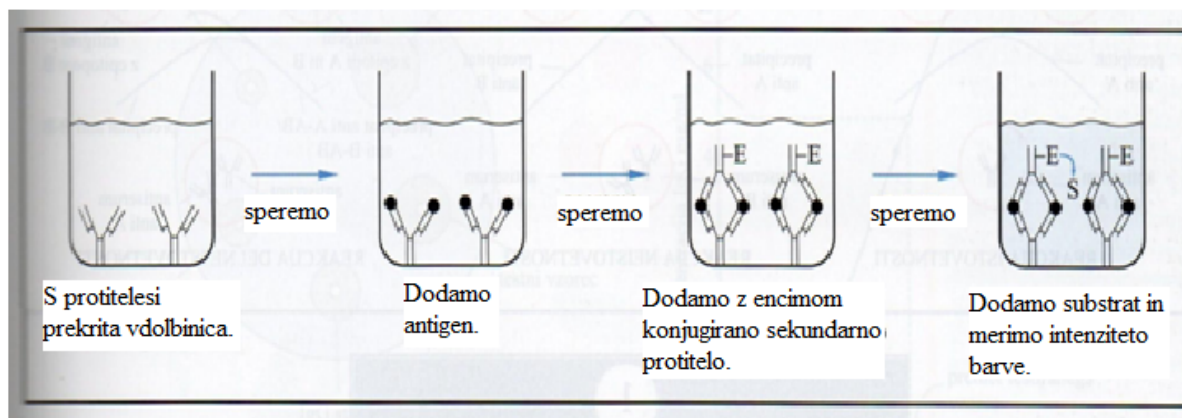


### Dokaz antigena legionel v urinu bolnika

Leta 1979 so prvič dokazali v bolnikovem seču toplotno obstojen specifičen topni antigen bakterije *L. pneumophila*. Kasneje so ugotovili, da gre za topni lipopolisaharidni antigen, ki ga lahko dokažemo s testom ELISA. Izločanje topnega antigena legionel ni enakomerno in je odvisno tudi od zdravljenja, zato priporočajo ponovitev testiranja. Test ima velik diagnostični pomen za zgodnjo diagnostiko legioneloze, saj lahko antigen v seču dokažemo že 3. do 5. dan po izbruhu bolezni (4).

Pri testu ELISA so v mikrotiterski ploščici vezana protitelesa proti antigenom legionele. Nato dodamo seč bolnika. Če seč vsebuje legionelni antigen, le-ta reagira z vezanimi protitelesi. Ko speremo ploščico, dodamo sekundarno, z encimom vezano protitelo, specifično za drug epitop na antigenu, in pustimo, da reagira z vezanim antigenom. Ko s spiranjem odstranimo prosto sekundarno protitelo, dodamo substrat in izmerimo obarvan produkt reakcije (slika 9), (25).

Antigen se ob dolgotrajnem ali napačnem shranjevanju vzorca lahko razgradi in dobimo lažno negativen rezultat. Dokaz antigena *L. pneumophila* v urinu je hiter, visoko specifičen test, a občutljiv le za dokazovanje *L. pneumophilla* iz serološke skupine 1 (22).



Slika 9: Kvantitativno določevanje antigena z metodo sendvič ELISA (25).

Danes je na tržišču na voljo več kompletov reagentov za dokaz topnega legionelnega antigena: Legionella Urine Antigen EIA, Binax Inc. (ZDA); Legionella Urine Antigen EIA, Biotest, (Nemčija); Legionella Urinary Antigen EIA, Bartels Inc., (ZDA), Uni-Gold LUA test, Trinity Biotech Company, (Irska); SAS<sup>TM</sup> Legionella test, SA Scientific, Inc., (ZDA), itd.

### Dokazovanje nukleinske kisline

Test PCR je hitra diagnostična metoda za dokaz legioneloze. DNK legionele dokazujemo v bronhoalveolarnih izpirkih, izmečku in trahealnih aspiratih; dokazali pa so jo tudi v seču in serumu bolnikov (4).

### Dokaz specifičnih protiteles

Okužbo z legionelami dokazujemo tudi s serološkimi testi, npr. s testom indirektna imunofluorescence in s testom ELISA. Protitelesa proti legionelam lahko dokažemo v bolnikovem serumu 8 do 10 dni po začetku bolezni, večinoma pa se razvijejo pozneje. Titer protiteles nato narašča, zato moramo parne serume odvzeti v časovnem razmiku od 4 do 8 tednov (4). Serološke metode imajo visoko specifičnost in občutljivost. Tudi za izvedbo so razmeroma enostavne.

### **3. NAMEN DELA**

V naši nalogi smo želeli primerjati kompleta reagentov dveh proizvajalcev, in sicer BIOTEST Legionella Urine Antigen EIA (Biotest, Nemčija) in BINAX Legionella Urinary Antigen EIA (Binax Inc., ZDA), za dokaz topnega antigena legionele v urinu bolnikov zbolelih za legionelozo. Testa sta v laboratorijih pogosto uporabljana. Predvsem nas je zanimala občutljivost testov.

## 4. MATERIALI IN METODE

### 4.1. MATERIALI

Za izvedbo naše naloge smo izbrali urine 36 bolnikov z dokazanim topnim antigenom legionele s kompleti reagentov BIOTEST. Urinske vzorce, ki so imeli pozitiven rezultat pri testu ELISA, smo razdelili v tri skupine glede na izmerjene vrednosti OD, in sicer 11 normalno pozitivnih (OD vzorca je večji od OD mejne vrednosti za vsaj 0,060), 16 šibko pozitivnih (OD vzorca je večji od OD mejne vrednosti za največ 0,060) in 9 vzorcev, ki so imeli vrednost OD v sivi coni. V testiranje smo vključili tudi 3 pozitivne vzorce zunanjih kontrol (EWGLI, ang. European Working Group for Legionella Investigation, Švedska) in 3 vzorce urina bolnikov v katerih predhodno niso dokazali antigenov legionele (tabela 2). Urinski vzorci bolnikov so bili zbrani od leta 2001 pa do leta 2009 in so bili shranjeni v zamrzovalni skrinji pri temperaturi -70 °C.

Tabela 2: Urinski vzorci bolnikov s pljučnico, ki so bili testirani s kompletom reagentov *Legionella Ag Biotest*, Nemčija.

Legenda: P pozitiven; ŠP šibko pozitiven; SC siva cona (pozitiven); N negativen; KK zunanja kontrola.

Bolniki					Skupine
Zap. št.	Spol	Starost	OD vzorca	OD mejna vrednosti	P/ŠP/SC/N
5	M	50	0,395	0,275	P
6	M	70	0,395	0,287	P
8	M	30	0,363	0,291	P
12	M	54	0,411	0,297	P
14	M	58	0,339	0,279	P
15	Ž	82	0,409	0,284	P
22	M	50	0,395	0,288	P
27	M	59	0,371	0,247	P
32	M	78	0,388	0,265	P
36	M	55	0,410	0,293	P
1	M	44	0,372	0,306	P
3	M	49	0,281	0,253	ŠP
4	M	50	0,298	0,260	ŠP
7	M	53	0,293	0,281	ŠP

9	M	48	0,300	0,257	ŠP
10	Ž	56	0,298	0,283	ŠP
11	M	34	0,307	0,283	ŠP
13	Ž	56	0,303	0,294	ŠP
16	M	53	0,339	0,304	ŠP
18	M	28	0,292	0,278	ŠP
20	Ž	71	0,319	0,275	ŠP
21	M	74	0,314	0,284	ŠP
23	M	77	0,274	0,266	ŠP
24	Ž	81	0,318	0,271	ŠP
25	M	44	0,320	0,285	ŠP
29	M	68	0,313	0,258	ŠP
30	M	37	0,304	0,259	ŠP
2	M	51	0,283	0,284	SC
17	M	69	0,236	0,28	SC
19	M	78	0,203	0,261	SC
26	M	48	0,265	0,295	SC
28	M	71	0,198	0,262	SC
31	M	65	0,195	0,269	SC
33	M	41	0,189	0,257	SC
34	Ž	79	0,202	0,298	SC
37	Ž	87	0,288	0,2995	SC
38	M	36	0,115	0,2995	N
39	M	72	0,129	0,2995	N
35	Ž	75	0,139	0,291	N
40	/	2008	0,162	0,280	N
41	/	2008	0,552	0,280	P
42	/	2009	0,555	0,264	P

## 4.2. METODE

V naši nalogi smo skušali topni antigen legionele dokazovati v 42 vzorcih s kompletom reagentov proizvajalca Binax, ZDA. Vzorci so bili predhodno testirani z reagenti proizvajalca Biotest (Nemčija) v laboratoriju za diagnostiko okužb s klamidijami in drugimi znotrajceličnimi bakterijami (KLM) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

#### 4.2.1. Test za dokazovanje antigenov legionel: *Legionella Urine Antigen EIA* (Biotest, Nemčija)

Za izvedbo tega testa potrebujemo komplet reagentov, ki vsebuje (slika 12):

- 1 mikrotitersko ploščico s 96 vdolbinicami, ki so prevlečene s poliklonskimi zajčjimi protitelesi, ki reagirajo z antigenom legionele (koncentracija: > 0.5 µg/ml);
- 2 krat po 1.5 ml negativne kontrole;
- 1.5 ml pozitivne kontrole, *Legionella pneumophila* antigen;
- 15 ml kunčjih anti-*Legionella* protiteles označenih s hrenovo peroksidazo (HRP), v puferski raztopini z beljakovinskim stabilizatorjem;
- 6 ml koncentriranega spiralnega pufra, 0.08 M fosfatni pufer pH 7.2;
- 2 krat po 13 ml raztopine substrata (TMB - tetrametilbenzidin, ki vsebuje 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);
- 15 ml raztopine stop (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>);
- 1 vrečko iz polietilena za shranjevanje neporabljenih delov mikrotiterske ploščice.



Slika 12: Komplet reagentov Biotest za dokazovanje topnega antigena *Legionella* v urinu bolnika.

**Za izvedbo testa potrebujemo še:**

- vzorce urinov, pred uporabo segreth pri sobni temperaturi,
- komplet reagentov Biotest (Nemčija),
- multikanalno pipeto,
- rokavice za enkratno uporabo,
- spektrofotometer Sunrise (Tecan, 450/630nm),
- inkubator (37 °C).

### Postopek testa

- Vrstice mikrotitrne ploščice so prevlečene s poliklonskimi zajčjimi protitelesi, ki so specifična za antigen bakterije *Legionella pneumophila*.
- V ustrezne vdolbinice pipetiramo po 100 µl vzorcev in po 100 µl kontrol (ena pozitivna in dve negativni kontroli).
- Po pipetiranju ploščico inkubiramo  $60 \pm 2$  min pri  $37 \pm 1$  °C.
- Po končani inkubaciji, ploščico 5-krat spiramo, tako da v vdolbinice pipetiramo po 250 µl spiralnega pufra, rahlo potresemo ploščico 10 sekund in s hitrim gibom izpraznimo vdolbinice. Pozorni moramo biti, da so vse vdolbinice zapolnjene s pufrom in da vso tekočino nato tudi odstranimo. Ploščico nežno potolčemo na staničevini. Postopek spiranja je zelo pomemben, saj nepravilno spiranje lahko privede do nespecifične reakcije.
- Nato v vsako vdolbinico pipetiramo po 100 µl konjugata anti-*Legionella* HRP.
- Mikrotitrsko ploščico zopet inkubiramo  $60 \pm 2$  min pri  $37 \pm 1$  °C.
- Po končani inkubaciji, ploščico 5-krat spiramo s spiralnim pufrom.
- Dodamo po 100 µl substrata TMB v vsako vdolbinico.
- Po pipetiranju substrata ploščico pokrijemo z alu-folijo in inkubiramo v temi  $10 \pm 1$  min pri sobni temperaturi.
- V vsako vdolbinico dodamo po 100 µl Stop-reagenta. Modra barva pozitivne kontrole mora postati rumena.
- V 1 minuti odčitamo ekstinkcijo s spektrofotometrom pri 450 nm, referenčna valovna dolžina je 615 – 690 nm.

### Nadzor kakovosti

Pozitivne in negativne kontrole morajo biti vključene v vsak test za ocenjevanje (vrednotenje) bolnikovega vzorca in spremljanje testa uspešnosti. Znan pozitiven ali negativen vzorec urina, se lahko vključi kot dodatni nadzor. Povprečna vrednost negativnih kontrol mora biti manjša od 0,100. OD vrednost pozitivne kontrole mora biti večji od 0,600. Če ti pogoji niso izpolnjeni, so rezultati testov neveljavni in je treba test ponoviti.

### Izračun mejne vrednosti

Vrednost v vdolbinici »Blank« se odšteje od vseh izmerjenih vrednosti kontrol in vzorcev. Mejna vrednost se izračuna iz povprečne vrednosti OD negativnih kontrol z dodano vrednostjo 0,200 ( $NCx + 0.200$ ). Siva cona je v območju med povprečno vrednostjo OD

negativne kontrole, ki ji prištejemo 0,100 in povprečno vrednostjo OD negativne kontrole, ki ji prištejemo 0,200.

*Npr. povprečna neg vrednost OD = 0,023; siva cona je od 0,123 do 0,223*

### **Razlaga rezultatov**

Vzorci urina, ki imajo vrednost OD manjši od OD mejne vrednosti so negativni. Vzorec urina z meritvijo, ki je enaka ali večja od mejne vrednosti se šteje, da je pozitiven. Vzorec urina, katerega meritev je v sivi coni, je potrebno ponovno testirati. Če je meritev vzorca ponovno v sivi coni, ga obravnavamo kot pozitivnega. Negativen rezultat testa ne izključuje možnosti okužbe z legionelo.

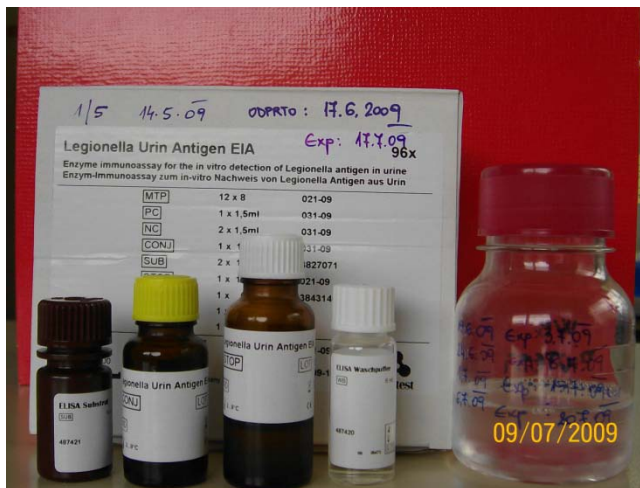
#### **4.2.2. Test za dokazovanje antigenov legionel: *Legionella Urine Antigen EIA (Binax, ZDA)*.**

Gre za encimsko - imunski test za dokazovanje topnega antigena legionel v urinu bolnika s sumom na legionelozo.

Komplet reagentov za dokazovanje topnega antigena *Legionella pneumophila* serološke skupine 1 v urinu vsebuje (slika 13):

- mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami, ki so prevlečene z zajčjimi protitelesi IgG proti antigenu *Legionella pneumophila* serološke skupine 1,
- koncentriran spiralni pufer: 40 ml 0,1 M fosfatni pufer z detergentom in konzervansom; razredčite vsebino do 400 ml z destilirano ali deionizirano vodo za uporabo; shranjen pri temp. 2 – 30 °C,
- negativno kontrolo, pripravljeno za uporabo; shranjevanje pri temperaturi 2 – 8 °C ali zamrznjenje pri -10 do -20 °C,
- pozitivno kontrolo, pripravljeno za uporabo. Shranjevanje pri temperaturi 2 – 8 °C ali zamrznjenje pri -10 do -20 °C,
- HRP konjugat: 15 ml prečiščenih kunčjih anti-*Legionella pneumophila* IgG konjugiranih s hrenovo peroksidazo (HRP) v puferski raztopini z beljakovinskim stabilizatorjem,
- barvni razvijalec: 25 ml raztopine kromogenenega substrata (snov v organskih tekočinah, ki ob oksidaciji tvori obarvane spojine), ki vsebuje tetrametilbenzidin (TMB) in vodikovo peroksidazo; pripravljen za uporabo; shranjen pri temp. 2 - 8 °C.,
- raztopino stop: 10ml 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Žveplove (VI) kislina); shranjeno pri temp. 2 - 8 °C.





Slika 13: Komplet reagentov Binax za dokazovanje topnega antigena Legionella v urinu bolnika.

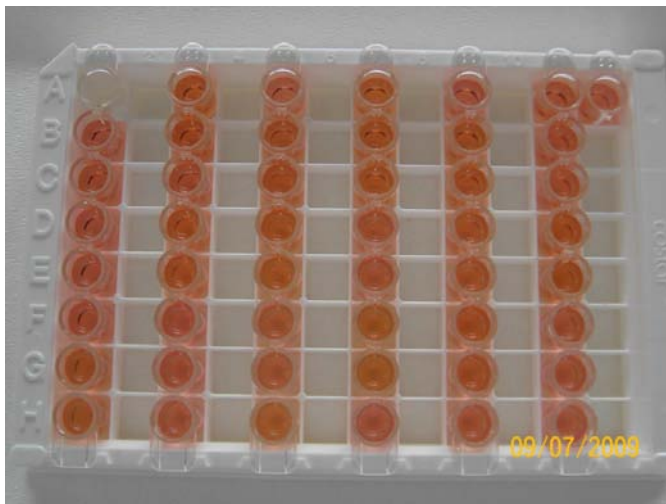
#### Za izvedbo testa potrebujemo:

- vzorce urinov, pred uporabo segrelih pri sobni temperaturi,
- komplet reagentov Binax (ZDA),
- multikanalno pipeto,
- rokavice za enkratno uporabo,
- spektrofotometer Sunrise (Tecan, 450/630nm),
- inkubator (37 °C).

#### Postopek testa

- V vdolbinico, ki je označena z oznako A1 (BLANK), ne pipetiramo.
- V ostale ustrezne vdolbinice pipetiramo po 100 µl vzorcev v paralelki in nato kontrole (dve pozitivni kontroli in dve negativni kontroli). Pred pipetiranjem vzorce in kontrole dobro premešamo.
- Pipetiramo po 100 µl konjugata anti-Legionella HRP v vsako luknjico, razen v vdolbinico z oznako A1 (slika 14).
- Rahlo potresamo ploščico in pri tem pazimo, da ne polijemo ali kontaminiramo vdolbinice.
- Mikrotitersko ploščico inkubiramo 2 uri pri sobni temperaturi (20 – 25 °C).
- Po inkubaciji odlijemo mešanico konjugata in vzorcev. Ploščico nežno potolčemo na staničevini.

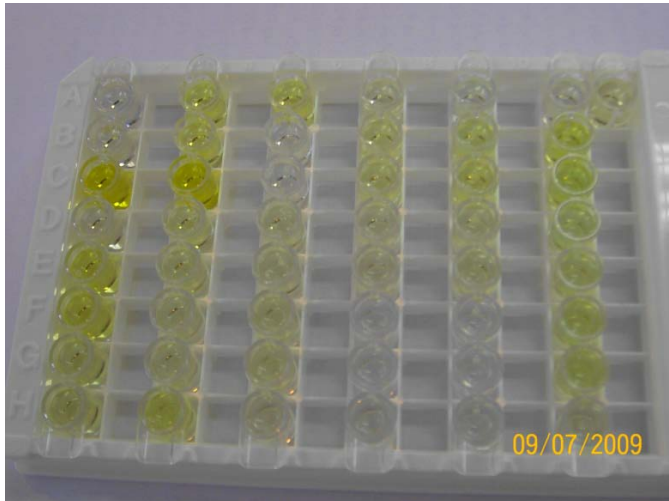
- Ploščico najmanj 3-krat spiramo, tako da v vdolbinice pipetiramo po 250  $\mu$ l spiralnega pufra, rahlo potresemo ploščico in s hitrim gibom izpraznimo vdolbinice. Pozorni moramo biti, da so vse vdolbinice zapolnjene s pufrom in da vso tekočino nato tudi odstranimo. Ploščico nežno potolčemo na staničevini.
- Dodamo po 200  $\mu$ l substrata TMB v vsako vdolbinico (slika 15).
- Po pipetiranju substrata stripe pokrijemo z alu-folijo in inkubiramo v temi 15 min pri sobni temperaturi (20 – 25 °C).
- Po inkubaciji damo v vsako vdolbinico po 50  $\mu$ l Stop-reagenta. Modra barva pozitivne kontrole mora postati rumena (slika 16).



Slika 14: Pozitivni kontroli, negativni kontroli in vzorci urina + konjugat.



Slika 15: Pozitivni kontroli, negativni kontroli in vzorci urina + konjugat + substrat.



Slika 16: Pozitivni kontroli, negativni kontroli in vzorci urina + konjugat + substrat + stop – reagent.

### **Izračun rezultatov**

Absorbanco vdolbinice A1, je potrebno odšteti od absorbance ostalih vdolbinic, da dobimo pravilne absorbance za uporabo pri izračunu rezultatov.

### Izračun povprečne absorbance

Računanje povprečne vrednosti dvojnih absorbanc pozitivne, negativne kontrole in vzorcev.

$$\text{Povprečna vrednost} = \frac{\text{Absorbanca (1)} + \text{Absorbanca (2)}}{2}$$

### Izračun razmerja

Računanje razmerja med pozitivno absorbanco kontrole urina in negativno absorbanco kontrole urina ali med absorbanco bolnikovega urina in negativno absorbanco kontrole urina na naslednji način:

$$\text{Razmerje} = \frac{\text{Povprečna vrednost pozitivne kontrole urina ali absorbanca bolnikovega urina}}{\text{Povprečna vrednost absorbance negativne kontrole}}$$

$$\text{V našem primeru: } \text{Razmerje} = \frac{\text{Absorbanca bolnikovega urina}}{\text{Povprečna vrednost absorbance negativne kontrole}}$$

Tipičen pozitiven rezultat je lahko:  $\frac{\text{Absorbanca } 0.300}{\text{Absorbanca } 0.040} = 7.5$  razmerje

V našem primeru:  $\frac{X}{\text{Povprečna vrednost negativne kontrole}} = 3$

### Razlaga rezultatov

Vzorci urina, ki imajo razmerje večje ali enako 3, se štejejo za pozitivne, dokaz topnega antigena *L. pneumophila* serološke skupine 1. Pozitivne vzorce lahko ponovno testiramo za potrditev rezultatov.

Vzorci urina, ki imajo razmerje manjše od 3 se štejejo za negativne. Negativen rezultat testa ne izključuje možnosti okužbe z *Legionella* drugih seroloških skupin, oziroma vrst *Legionella*.

### Poročanje rezultatov

<i>Razmerje</i>	<i>Priporočeno poročilo</i>
$\geq 3.0$	Pozitivni rezultati za dokaz navzočnosti antigena <i>L. pneumophila</i> sg 1 v urinu, kažejo na sedanjo ali nedavno okužbo
$< 3.0$	Negativni rezultati za antigen <i>L. pneumophila</i> sg 1 v urinu, ne potrjujejo okužbe.

Legionarske bolezni ni mogoče izključiti, saj lahko druge serološke skupine ali vrste povzročajo okužbo.

## 5. REZULTATI

V naši nalogi smo izvedli primerjavo dveh encimsko imunskih testov ELISA za dokaz topnega antigena legionele v urinu bolnika, in sicer ELISA test proizvajalca Biotest (Nemčija) in ELISA test proizvajalca Binax (ZDA). V laboratoriju KLM, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, so urinske vzorce, ki so bili zbrani od leta 2001 pa do leta 2009, testirali s kompletom reagenta proizvajalca Biotest (Nemčija). V diplomski nalogi pa smo testirali izbrane vzorce s kompletom reagentov Binax (ZDA). V ta namen smo zbrali 36 vzorcev urinov, in sicer kužnine 29 moških bolnikov in kužnine 7 pacientk, ki so imeli pozitiven rezultat testa Biotest. Poleg tega smo v raziskavo vključili še 3 pozitivne vzorce zunanje kontrole (EWGLI) in 3 negativne vzorce.

S testom proizvajalca Biotest smo dokazali legionelni antigen v vseh 36 vzorcih bolnikov in v dveh vzorcih zunanjih kontrol. S testom Binax pa smo uspeli dokazati legionelni antigen v 25-ih vzorcih bolnikov in v vseh treh vzorcih zunanjih kontrol (tabela 3).

Tabela 3: Rezultati in primerjava dveh testov za dokaz topnega antigena legionele v urinu bolnika.

Legenda: SC siva cona (pozitiven); ŠP šibko pozitiven, P pozitiven; N negativen; KK zunanja kontrola; NK negativna kontrola; A absorbanca; OD mejna vrednost.

vzorec	BIOTEST			BINAX			
	OD pri valovni dolžini 450/630 nm			OD pri valovni dolžini 450/630 nm			
	OD vzorca	Mejna vrednost	P / SC / N	povp. A	povp. NK	razmerje	interpretacija
5	0,395	0,275	P	0,471	0,065	7,246	P
6	0,395	0,287	P	0,633	0,065	9,738	P
8	0,363	0,291	P	0,242	0,065	3,723	P
12	0,411	0,297	P	0,263	0,065	4,046	P
14	0,339	0,279	P	0,379	0,065	5,831	P
15	0,409	0,284	P	0,331	0,065	5,092	P
22	0,395	0,288	P	0,541	0,068	7,959	P
27	0,371	0,247	P	0,416	0,068	6,118	P
32	0,388	0,265	P	0,263	0,068	3,868	P
36	0,410	0,293	P	0,349	0,068	5,132	P

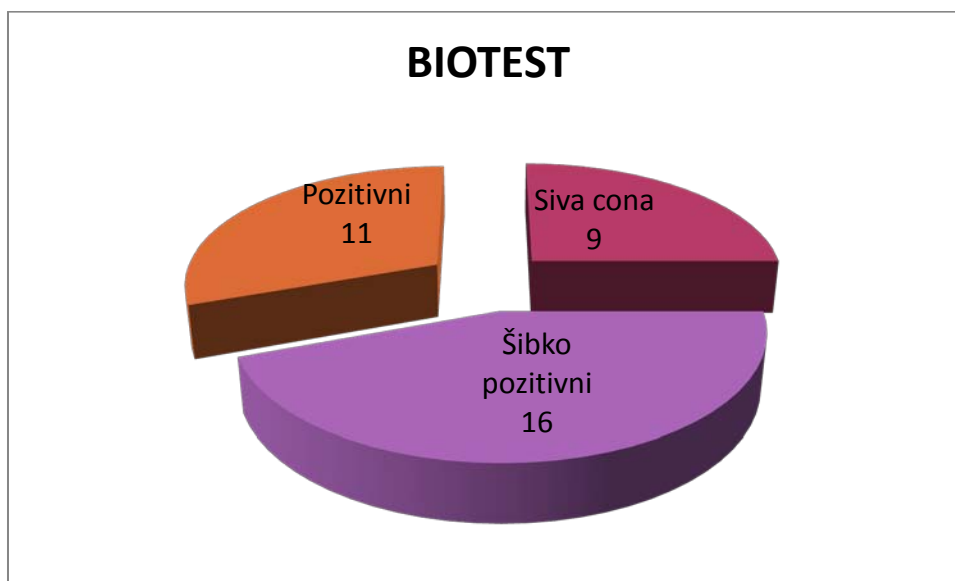
1	0,372	0,306	P	0,263	0,065	4,046	P	
3	0,281	0,253	ŠP	0,301	0,065	4,631	P	
4	0,298	0,260	ŠP	0,295	0,065	4,538	P	
7	0,293	0,281	ŠP	0,278	0,065	4,277	P	
9	0,300	0,257	ŠP	0,325	0,065	5	P	
10	0,298	0,283	ŠP	0,280	0,065	4,308	P	
11	0,307	0,283	ŠP	0,204	0,065	3,138	P	
13	0,303	0,294	ŠP	0,239	0,065	3,677	P	
16	0,339	0,304	ŠP	0,260	0,065	4	P	
18	0,292	0,278	ŠP	0,207	0,065	3,185	P	
20	0,319	0,275	ŠP	0,257	0,065	3,954	P	
21	0,314	0,284	ŠP	1,475	0,065	22,692	P	
23	0,274	0,266	ŠP	0,250	0,068	3,676	P	
24	0,318	0,271	ŠP	0,385	0,068	5,662	P	
25	0,320	0,285	ŠP	0,221	0,068	3,250	P	
29	0,313	0,258	ŠP	0,161	0,068	2,368	N	
30	0,304	0,259	ŠP	0,202	0,068	2,971	N	
2	0,283	0,284	SC	0,177	0,065	2,723	N	
17	0,236	0,280	SC	0,142	0,065	2,185	N	
19	0,203	0,261	SC	0,183	0,065	2,815	N	
26	0,265	0,295	SC	0,175	0,068	2,574	N	
28	0,198	0,262	SC	0,036	0,068	0,529	N	
31	0,195	0,269	SC	0,112	0,068	1,647	N	
33	0,189	0,257	SC	0,136	0,068	2	N	
34	0,202	0,298	SC	0,031	0,068	0,456	N	
37	0,288	0,2995	SC	0,182	0,068	2,676	N	
38	0,115	0,2995	N	0,035	0,068	0,515	N	
39	0,129	0,2995	N	0,052	0,068	0,765	N	
35	0,139	0,291	N	0,061	0,068	0,897	N	
40	0,162	0,280	N	0,522	0,068	7,676	P	
41	0,552	0,280	P	0,293	0,068	4,309	P	
42	0,555	0,264	P	0,352	0,068	5,176	P	

Z reagenti Biotest je bilo 11 kužnin normalno pozitivnih, ti vzorci so bili pozitivni tudi z reagenti Binax. Od 16 šibko pozitivnih z reagenti Biotest, je bilo 14 pozitivnih z reagenti Binax. Devet vzorcev, ki so bili z Biotestovimi reagenti pozitivni, vendar so imeli vrednosti OD v sivi coni, so bili negativni pri testiranju z reagenti Binax (tabela 4).

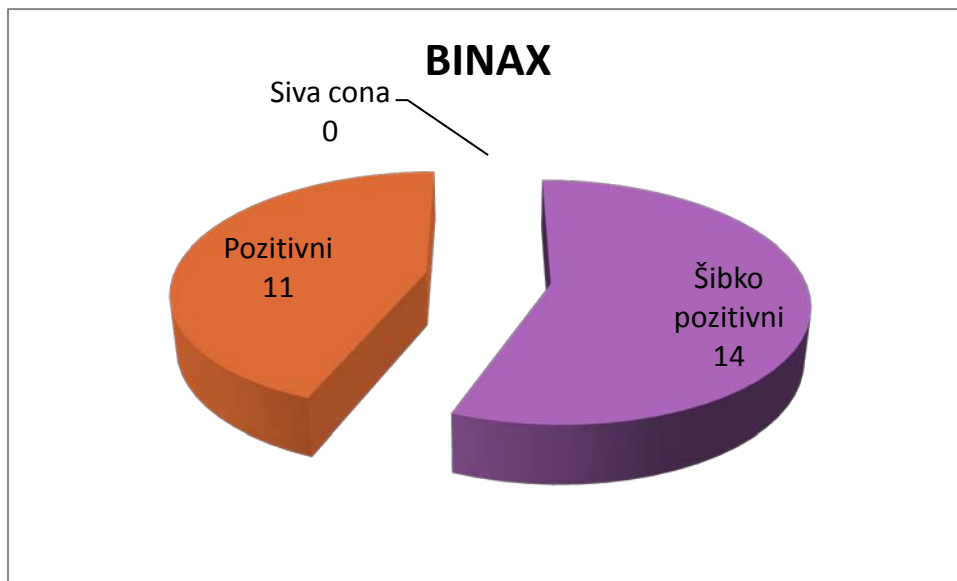
Tabela 4: Primerjava rezultatov testa Legionella Urinary Antigen test (Biotest) in (Binax)

VZORCI	ŠTEVILO	BIOTEST/POZITIVNI		BINAX/POZITIVNI
Negativna kontrola	3	0		0
Zunanja kontrola (pozitivni)	3	2		3
Pozitivni vzorci	36	Pozitivni	11	11
		Šibko pozitivni	16	14
		Siva cona	9	0
<b>SKUPAJ</b>	<b>42</b>	<b>38</b>		<b>28</b>

Graf 1: Grafičen prikaz rezultatov testa BIOTEST



Graf 2: Grafičen prikaz rezultatov testa BINAX



### Izračun občutljivosti

Formula za občutljivost:  $\text{občutljivost} = \frac{\text{število pozitivnih}}{\text{število pozitivnih} + \text{število negativnih}}$

*Izračun občutljivosti Biotesta na podlagi naših rezultatov:*

$$\text{Občutljivost testa Biotest} = \frac{38}{38+1} = 0,974 \times 100 = 97,4\%$$

*Izračun občutljivosti Binaxa na podlagi naših rezultatov:*

$$\text{Občutljivost testa Binax} = \frac{28}{28+11} = 0,718 \times 100 = 71,8\%$$



## 6. RAZPRAVA

Legioneloza je nalezljiva bolezen, ki jo povzročajo po Gramu negativne bakterije iz rodu *Legionella*. V okoli 85% primerov legioneloze je povzročitelj bakterija *Legionella pneumophila*. V naši nalogi smo dokazovali topni antigen, ki se sprošča v urin pri bolnikih z legionelozo. V ta namen smo primerjali dva komercialno dostopna kompleta reagentov. Testirali smo urine 36 bolnikov z legionelozo, od tega 29 moških in 7 žensk.

Test Biotest smo primerjali s testom Binax in ugotovili, da je bilo pri obeh testih 11 vzorcev urina bolnikov s pljučnico pozitivnih. Pri testu Biotest je bilo 16 vzorcev šibko pozitivnih, od teh je bilo s testom Binax pozitivnih 14 vzorcev. Nobeden od 9 vzorcev, ki so imeli vrednosti OD pri testu Biotest v sivi coni, niso bili pozitivni pri testu Binax.

Rezultat vzorca zunanje kontrole (EWGLI: KK 423/08 ) je bil s testom Biotest negativen, medtem ko smo z reagenti proizvajalca Binax dokazali legionelni antigen. Pri obrazložitvi dobljenih rezultatov sheme EWGLI smo za dani vzorec prejeli podatek, da so bili v tem primeru rezultati negativni v vseh laboratorijih, ki so uporabljali Biotestove reagente. S tem testom namreč ne moremo dokazovati ene podskupine *L. pneumophila* sg.1.

V naši nalogi na podlagi dobljenih rezultatov ugotavljamo, da je občutljivost testa Biotest 97,4% in testa Binax 71,8%. Na slabši rezultat testa Binax je morda vplivalo tudi dejstvo, da so bili urinski vzorci daljše obdobje zamrznjeni, kar je lahko vplivalo na razpad legionelnega antigena.

Na podlagi naših rezultatov, ki smo jih dobili lahko sklepamo, da je test Biotest bolj občutljiv, ker identificira vse vrste legionel, test Binax pa samo *Legionella pneumophila* sg.1. Pomanjkljivost Biotestovega testa pa je prav gotovo v tem, da ne zaznava vseh podtipov *L. pneumophila* sg.1.

## 7. ZAKLJUČKI

Na podlagi naših zbranih podatkov, ki smo jih statistično ovrednotili, lahko zaključimo, da se je test Biotest izkazal za bolj občutljivega. Pri testu Biotest se namreč uporabljajo poliklonska zajčja protitelesa, ki reagirajo z antigeni vseh prisotnih vrst legionel v vzorcu. Pri Binax testu pa se uporabljajo zajčja protitelesa IgG, ki reagirajo le z antigeni *L. pneumophila* serološke skupine 1. Pomanjkljivost kompleta reagentov proizvajalca Biotest pa je v tem, da z njim ne moremo dokazati okužbe z vsemi podskupinami *L. pneumophila* sg. 1.

## 8. LITERATURA

1. Frazer, D.W., T.R. Tsai, W. Orenstein, W.E. Parkin, H.J. Beecham, R.G. Sharrar, J. Harris, G.F. Mallison, S.M. Martin, J.E. McDade, C.C. Shepard, P.S. Bracham, and the Field Investigation Team. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N. Engl. J. Med. 1977. 297: 1189 – 1197.; Kohler, R.B. Antigen detection for the rapid diagnosis of Mycoplasma and *Legionella pneumoniae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1984; 4: 475 – 595.
2. Hojs A, Petrovič A, Furlan N: Preprečevanje legioneloz v javnih objektih. Zdrav Var 2002; 41: 299 – 304.
3. Štefančič M: Dinamika gibanja nalezljivih bolezní v maju 2008 na Dolenjskem. Zavod za zdravstveno varstvo Novo Mesto, junij 2008; št. 401 – 36/08: 5 – 8.
4. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002; 175 – 178.
5. Diederer B. M. W.: Legionella spp. and Legionnaires' disease. J Infect 2008; 56: 1-12.
6. Jaklič I: Primarna preventiva legionarske bolezní v Splošni bolnišnici Novo Mesto. Interno glasilo SB Novo Mesto, letnik VIII, maj 2008.
7. [http://www.emlab.com/s/services/legionella\\_testing\\_lab.html](http://www.emlab.com/s/services/legionella_testing_lab.html)
8. Palusińska-Szys M, Cendrowska-Pinkosz M: Pathogenicity of the family Legionellaceae. Wrocław, 2009; 57: 279–290.
9. Bartram J, Chartier Y, V Lee J, Pond K, Surman – Lee S: Legionella and the prevention of legionellosis. Švica, World Health Organization 2007.
10. Likar M: Legionarska bolezen. Ujma, 2002; št. 16, 191 – 194.
11. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (na našo prošnjo)
12. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Legionella>
13. Ahec L: Strokovni posvet "Obvladovanje legioneloz v zdravstvenih ustanovah v Sloveniji". Bolje – Glasilo Splošne bolnišnice Jesenice, junij 2009; št. 10.
14. [http://www.dnevnik.si/tiskane\\_izdaje/dnevnik/1042289566](http://www.dnevnik.si/tiskane_izdaje/dnevnik/1042289566)
15. [http://www.zzv-lj.si/nimages/static/zzv\\_static/316/files/E-novice%20marec%2007%20-%20Legionele.pdf](http://www.zzv-lj.si/nimages/static/zzv_static/316/files/E-novice%20marec%2007%20-%20Legionele.pdf)
16. <http://www.metapathogen.com/legionella/legionella-metapathogen-pdf.pdf>
17. Likar M: Mikrobiologija in imunologija II. del. Medicinska fakulteta Univerze E. Kardelja, Ljubljana, januar 1986; 45 – 46.

18. Levinson W, Jawetz E: Medical microbiology and immunology. 7<sup>th</sup> edition, Appleton & Lange, 1998; 136 – 137.
19. [http://www.ths.si/UserFiles/File/IDM\\_prospekti/IDM\\_Hygienik\\_v\\_slovenscini\\_prospekt.pdf](http://www.ths.si/UserFiles/File/IDM_prospekti/IDM_Hygienik_v_slovenscini_prospekt.pdf)
20. Hren-Vencelj H: Možnosti laboratorijske diagnostike mikrobnih povzročiteljev bolezni. Medicinska fakulteta v Ljubljani, 1992; 74 – 75.
21. Jawetz, Melnick, Adelberg's: Medical microbiology. 23<sup>th</sup> edition, Appleton & Lange, 2004; 312 – 314.
22. Eržen R, Korošec P, Šilar M, Košnik M: Vpliv protimikrobnega zdravljenja na občutljivost tehnike PCR pri okužbah z *Legionello pneumophila* – prikaz treh primerov. Zdravniški vestnik, 2007; 76: 95 – 100.
23. [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/BCYE\\_Agars.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/BCYE_Agars.pdf)
24. [http://www.textbookofbacteriology.net/nutgro\\_3.html](http://www.textbookofbacteriology.net/nutgro_3.html)
25. Vozelj M: Temelji imunologije. DZS, Ljubljana, 2000; 112 – 113.