

Infekcije vrstom *Legionella pneumophila* u Primorsko-goranskoj županiji

Legionella pneumophila infections in Primorsko-goranska county

Brigita Tićac^{1,2*}, Igor Žižić², Palmira Kesovija¹, Maja Farkaš¹, Đana Pahor^{3,4}, Tomislav Rukavina^{1,4}

¹ Mikrobiološki odjel,
Nastavni zavod za javno zdravstvo
Primorsko-goranske županije

² Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

³ Epidemiološki odjel,
Nastavni zavod za javno zdravstvo
Primorsko-goranske županije

⁴ Katedra za epidemiologiju i socijalnu
medicinu, Medicinski fakultet
Sveučilišta u Rijeci

Prispjelo: 26. 11. 2008.

Prihvaćeno: 20. 1. 2009.

Adresa za dopisivanje:

* **Doc. dr. sc. Brigita Tićac, dr. med.,**
Mikrobiološki odjel,
Nastavni zavod za javno zdravstvo
Primorsko-goranske županije,
Krešimirova 52a, 51 000 Rijeka
e-mail: brigita.ticac@zjzjzpgz.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

SAŽETAK. Cilj: Bakterije roda *Legionella* značajni su uzročnici nozokomijalnih pneumonija, kao i pneumonija koje se javljaju u zajednici. U većini slučajeva klinički nije moguće razlikovati pneumonije uzrokovane legionelama od onih nastalih ostalim atipičnim uzročnicima. Etiološka dijagnoza zasniva se prije svega na kultivaciji, detekciji antigena, serodijagnostici i molekularnim testovima. **Metode:** U radu smo retrospektivno analizirali rezultate pretraga izvršenih na Mikrobiološkom odjelu Nastavnog zavoda za javno zdravstvo u Rijeci od 2003. do 2008. godine. U našim laboratorijima u većini slučajeva legioneloza je dijagnostificirana detekcijom *Legionella* antigena u urinu i/ili imunoenzimskim (EIA) anti *Legionella* IgM pretragama kao najranijim serološkim pokazateljem infekcije. **Rezultati:** Sveukupno je obrađeno 97 uzoraka urina i 112 seruma prikupljenih od bolesnika s područja Primorsko-goranske županije. *L. pneumophila* O1 antigen otkriven je u 5 (5 %) od 97 uzoraka urina. Serološki je EIA metodom utvrđena prisutnost IgM protutijela u ukupno 13 obrađenih uzoraka (12 %). Samo IgM detektiran je u 4 (21 %), IgM plus IgA i IgG u 5 (26 %), IgM i IgA u 3 (16 %), IgM i IgG u 1 (5 %), i samo IgG protutijela u 6 (32 %) od 19 pozitivnih uzoraka seruma. U konačnici, u razdoblju od 2003. do 2008. godine pozitivni nalazi na bakteriju *L. pneumophila* utvrđeni su u uzorcima od ukupno 8 bolesnika. **Rasprava i zaključci:** Detekcija IgM protutijela primjenom osjetljive metode kao što je imunoenzimski test – EIA pokazala se pogodnom u kombinaciji s detekcijom antigena u urinu za dijagnostiku legioneloza. EIA za otkrivanje *L. pneumophila* seroskupine O1 antigena u urinu predstavlja specifičnu metodu koja je osobito značajna za brzu dijagnostiku legionarske bolesti.

Ključne riječi: anti *Legionella* protutijela, dijagnostika, *Legionella* O1 antigen, *Legionella pneumophila*

ABSTRACT. Aim: Bacteria of the genus *Legionella* are important causes of both community-acquired and nosocomial pneumonia. However, the majority of cases are clinically indistinguishable from other causes of pneumonia and it cannot be reliably diagnosed on clinical grounds alone. The etiological diagnosis depends mostly on culture, antigen detection, serological or molecular tests. **Methods:** Present paper represents the results of retrospective analysis of tests performed at the Department of Microbiology the Teaching Institute of Public Health in Rijeka between 2003 to 2008. In our laboratories most of the cases were diagnosed by the detection of *Legionella* antigen in urine and/or serological determination with enzyme immunoassay (EIA) test of the anti-*Legionella* IgM fraction as the most recent answer to infection. **Results:** Overall 97 urine samples and 112 sera of patients from Primorsko-Goranska County were analysed. *L. pneumophila* O1 antigen in urine was detected in 5 (5 %) of 97 samples. Serologically EIA detected IgM in overall 13 (12 %) of all samples tested. IgM only was found in 4 (21 %) samples, IgM plus IgA and IgG in 5 (26 %), IgM plus IgA in 3 (16 %), IgM plus IgG in 1 (5 %), and IgG alone was found in 6 (32 %) of 19 positive samples. Overall, from 2003 to 2008 *L. pneumophila* positive results were found in samples from 8 patients. **Discussion and Conclusions:** Detection of IgM using a sensitive technique such as EIA seems to be a suitable complement to antigenuria detection for the diagnosis of legionellosis. EIA for the detection of *L. pneumophila* serogroup O1 antigen in urine specimens is a specific assay which is of great importance in providing a rapid diagnosis of Legionnaires' disease.

Key words: anti-*Legionella* antibodies, diagnosis, *Legionella* O1 antigen, *Legionella pneumophila*

UVOD

Rodu *Legionella* pripadaju fakultativno unutarstanične bakterije. Zbog svojih fenotipskih i genetskih osobitosti izdvojene su u zasebnu porodicu 1979. godine. Taksonomija porodice *Legionellaceae* neprestano se mijenja zbog otkrića novih vrsta i serotipova¹. Do danas je otkriveno preko četrdeset vrsta s više od šezdeset serotipova legionela. *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) podijeljena je na temelju antigene građe u 14 seroskupina. Infekcije ljudi najčešće uzrokuje *L. pneumophila* seroskupine O1. Legionele su široko rasprostranjene u prirodi, osobito u vodenim sredinama, ali i u vlažnoj zemlji. Prisutnost organskog sedimenta i komenzalne mikroflore pomaže njihovu proliferaciju, a poznata je i sposobnost razmnožavanja legionela u protozoima. Humane legioneloze javljaju se kao posljedica infekcije legionelama iz okoliša. Najčešće se kao izvor infekcije spominju sustavi i uređaji u kojima se nalazi voda. Kolonizaciju bakterijama u pravilu uzrokuje komunikacija uređaja s nepročišćenim vodama ili kontaminacija s nečistoćom iz okoline. Kako legionele nisu osjetljive na uobičajene koncentracije klora u vodovodnoj vodi, nalaze se i u sustavima za opskrbu stanovništva pitkom vodom. Uz prisutnost organskog i anorganskog onečišćenja, rastu i razmnožavanju legionela pogoduje stagnacija vode u slijepim završecima vodoopskrbnih sustava, rezervoarima, bojlerima, bazenima i aparatima za kondicioniranje zraka^{2,3}.

PUTEVI I NAČIN PRIJENOSA

Načini na koji se *Legionella* iz okoliša prenosi na ljude su raznovrsni. Najčešće dospijevaju u dišni sustav iz kontaminiranog okoliša u vidu aerosola. Također su evidentirani slučajevi infekcije uslijed aspiracije i terapijskih manipulacija u respiratornom sustavu. Kontaminirani aerosol najčešće se stvara u okolini vodenih tornjeva, iznad bazena s pjenu i u ovlaživačima zraka. Ljudi se mogu zaraziti tijekom kupanja, boravka u blizini vodenih tornjeva ili aparata za kondicioniranje zraka, odnosno za komprimirani zrak, ako je u sustave zrakolovki ušao kontaminirani aerosol iz obližnjeg vodenog tornja. Kako je *L. pneumophila* izolirana s tuševa, pretpostavlja se da bi i aerosol koji nastaje

tijekom tuširanja mogao biti odgovoran za infekciju. Infektivna doza i imuni status domaćina presudni su za pojavu kliničkih znakova bolesti. Za razliku od pontijačke groznice, koja se u epidemijskom obliku javlja bez sezonski uočljive distribucije, legionarska bolest češće se javlja u proljeće i ljeto⁴.

PREDISPONIRAJUĆI ČIMBENICI

Osobe koje obolijevaju od legionarske bolesti obično su srednje ili starije životne dobi, ali bolest se može javiti u svim dobnim skupinama, uključujući

Infekcije u ljudi može uzrokovati najmanje 20 vrsta *Legionella*, a najučestaliji uzročnik je *Legionella pneumophila* seroskupine O1. Pneumonije uzrokovane legionelama mogu biti teške i povezane s multiorganskim oštećenjima te visokim mortalitetom. Legionele rjeđe uzrokuju izvanplućne infekcije kao što su endokarditis, perikarditis i infekcije rana, a mogu također izazvati blagu samolimitirajuću respiratornu bolest s epidemijskim potencijalom – pontijačku groznicu.

jući djecu. Većinom obolijevaju imunokompromitirani te pacijenti s kroničnim bolestima kao što su diabetes mellitus, kronična opstruktivna bolest pluća, kardiovaskularne bolesti, a kao čimbenici rizika navode se alkoholizam i pušenje. Često se bolest javlja i letalno završava kod pacijenata s transplantiranim bubregom ili onih na hemodijalizi⁵.

KLINIČKA SLIKA

Inkubacija traje dva do deset dana, a rani klinički znaci oboljenja jesu slaba glavobolja i bolovi u mišićima. Već prvog dana bolesti javlja se visoka temperatura i suhi kašalj. Većina pacijenata žali se na bol u abdomenu, a katkad je bolest praćena bubrežnim smetnjama uz proteinuriju, azotemiju i hematuriju. Moguća su oštećenja funkcije jetre i središnjeg živčanog sustava. Najznačajniji patološki nalaz je akutna pneumonija razvijena u razli-

čitom opsegu, sve do multilobarne konsolidacije plućnog parenhima. Konsolidacija inicijalno zahvaća susjedne lobuluse i širi se do lobarnog srastanja. Obično je bilateralna, bez predilekcijskog mjesta razvoja oštećenja. U oko 20 % slučajeva pneumonija je nodularna, praćena ograničenim oštećenjima, a rjeđe se u plućima stvaraju apscesi. Proces se može proširiti na pleuru, te dolazi do fibrinoznog pleuritisa. Iako patološki nalaz može upućivati na legionarsku bolest, bez specifičnih pretraga nije moguće postaviti konačnu etiološku dijagnozu. Najčešći atipični uzročnici pneumonija, uz viruse, jesu unutarstanične bakterije, uključujući vrste *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae* i *Legionella pneumophila*².

LABORATORIJSKI NALAZI

Najčešće se u oboljelih zamjećuju promjene broja leukocita sa skretanjem krvne slike ulijevo, proteinurija, hiponatremija, azotemija, povećane vrijednosti serumske glutamat oksalacetat transaminaze (SGOT) i visoka sedimentacija eritrocita.

Izravna mikrobiološka dijagnostika provodi se kultivacijom legionela i testom direktne fluorescencije - DFA. Kultivacija je specifična metoda dijagnostike koja omogućuje detekciju svih vrsta i seroskupina legionela. Na mikrobiološku pretragu dostavljaju se uglavnom uzorci iz respiratornog sustava: iskašljaj, bronhoskopski uzorci, pleuralni punktati i uzorci biopsija tkiva. Legionele su zahtjevne u pogledu *in vitro* uzgoja, a većina sojeva poraste na posebnim umjetnim hranilštima (BCYE - *Buffered Charcoal Yeast Extract*) tijekom inkubacije od dva do tri dana. Direktnom fluorescencijom u kliničkim se uzorcima detektira prisutnost antigena. Iako rezultati ove pretrage mogu biti relativno brzo dostupni, ona ima ograničen dijagnostički značaj, osobito u područjima s niskom prevalencijom bolesti, zbog relativno slabe osjetljivosti (20 - 70 %) i mogućnosti unakrižnog – lažnog pozitiviteta s drugim bakterijama. Kako bi se detektirali antigeni vrste *L. pneumophila* seroskupine O1 u urinu, danas se često koriste brzi te visoko specifični (>99 %) i osjetljivi (70 - 90 %) testovi kao što su enzimski imunoesej – EIA, imunokromatografski test ili lateks aglutinacija. Nalaz antigena u urinu bolesnika može ostati pozitivan

tjednima ili mjesecima, te ne mora nužno ukazivati na akutnu infekciju. Također treba imati na umu da se ova metoda ne može primijeniti u dijagnostici infekcija koje su uzrokovane ostalim vrstama legionela i drugim seroskupinama vrste *L. pneumophila*. Za izravnu detekciju legionela na tržištu su komercijalno dostupni visoko specifični i osjetljivi testovi lančane reakcije polimeraze (PCR - *Polymerase Chain Reaction*)^{6,7}.

Neizravna mikrobiološka dijagnostika provodi se detekcijom specifičnih protutijela u serumu bolesnika pomoću testa indirektno fluorescencije – ITFA i indirektnog enzimskeg imunoeseja - IEIA. Ove metode mogu biti visoko osjetljive (70 - 80 %) i specifične (>95), osobito u dijagnostici infekcija koje uzrokuje *L. pneumophila* seroskupine O1. Postoji, međutim, mogućnost lažno pozitivnog nalaza, odnosno unakrižnog pozitiviteta zbog prisutnosti bakterija kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides spp.*, *Campylobacter jejuni* i *Bordetella pertussis*. Prisutnost protutijela na legionele u serumu ljudi u populaciji nije rijetka kao pokazatelj prethodnog, najčešće asimptomatskog izlaganja antigenu. Stoga je, pretragom parnih uzoraka seruma istog bolesnika u razmaku od četiri do šest tjedana, potrebno dokazati značajnu dinamiku IgG titra odnosno serokonverziju koncentracije protutijela⁸⁻¹⁰.

Osjetljivosti legionela na antibiotike, odnosno klinički odgovor na primijenjenu terapiju nije u korelaciji s rezultatima *in vitro* ispitivanja i stoga se ona u praksi ne primjenjuje. Legionele proizvode β-laktamaze i zato se u terapiji legionarske bolesti ne primjenjuju penicilinski i cefalosporinski pripravci. Na legionele ne djeluju aminoglikozidni vankomicin. Specifična terapija uključuje primjenu antibiotika koji dostižu visoke koncentracije unutar stanica (makrolidi, kinoloni, tetraciklini, rifampin). Primjena azitromicina i eritromicina smanjuje postotak smrtnih slučajeva i oni su lijekovi izbora u terapiji legioneloza. Rifampicin ima *in vitro* vrlo snažan antimikrobni učinak i može se primjenjivati u kombinaciji s eritromicinom kod težih slučajeva oboljenja ili ukoliko liječenje eritromicinom nije dalo željene rezultate. Prema podacima iz literature izvjesni uspjesi postignuti su i s trimetoprimom u kombinaciji sa sulfametoksazo-

lom. Neki autori opisuju dobar odgovor na liječenje fluorokinolonima kao što su levofloksacin i ciprofloksacin^{11,12}.

MATERIJALI I METODE

Retrospektivno smo analizirali rezultate testiranja uzoraka koji su obrađeni u laboratorijima Mikrobiološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije u razdoblju od 1. siječnja 2003. do 31. prosinca 2008. godine. Uzorci bolesnika sa sumnjom na infekciju uzrokovanu legionelom dostavljani su na pretrage iz ordinacija primarne zdravstvene zaštite i specijalističkih ordinacija te Kliničkog bolničkog centra Rijeka i drugih zdravstvenih ustanova s područja županije. U radu smo prikazali ukupan broj uzoraka dostavljenih na izravnu imunoenzimsku pretragu urina i serološke IgM, IgA i IgG pretrage na legionelu. Analizirana je zastupljenost pozitivnih laboratorijskih nalaza u korelaciji s brojem prijavljenih bolesnika, te njihova spolna i dobna distribucija.

Za uzgoj - primoizolaciju *Legionella* spp. koristili smo umjetnu BCYE – Buffered Charcoal Yeast Extract podlogu (bioMérieux, Francuska) spravljenju prema preporukama proizvođača. Uzorci za kultivaciju su, unutar dva do četiri sata po uzimanju, dostavljani na Mikrobiološki odjel u laboratorij za respiratorne infekcije gdje je izvršeno nacjepljivanje i potom inkubacija uzoraka na temperaturi od 35°C uz 3 do 5 % CO₂ u atmosferi, kroz sedam do petnaest dana.

Testovi direktne fluorescencije – DFA izvođeni su korištenjem Monofluo *L. pneumophila* FA kita (Bio Rad, Francuska).

Prisutnost **antigena *L. pneumophila* seroskupine O1 u urinu** određivana je komercijalnim imunoenzimskim testom **Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA** (Biotest, Njemačka). **Na pretragu su dostavljani uzorci prvog jutarnjeg urina.** Uzorci su transportirani na +4°C i testirani neposredno po dostavljanju, odnosno unutar 24 sata uz čuvanje na +4°C, ili na -20°C prilikom pohranjivanja dužeg od 24 sata. Testiranje je obavljano prema uputama proizvođača. Od svakog bolesnika testirano je po 100 µl urina u triplikatu uz istovremeno izvođenje pozitivne, dviju negativnih kontrola i slijepe probe. Nakon fotometriiranja na 420 nm, rezultati

testa određeni su usporedbom dobivenih ekstinkcija uzoraka s graničnom vrijednošću testa. Granična vrijednost (*cut-off*) je određena izračunom srednje vrijednosti apsorbancija negativnih kontrola uvećanih za 0,200. Uzorci s ekstinkcijom jednakom ili većom od granične vrijednosti proglašeni su pozitivnim.

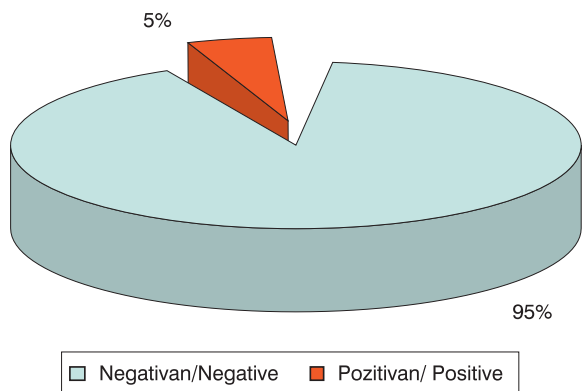
Za određivanje prisutnosti **anti *L. pneumophila* IgM, IgA i IgG protutijela** u serumu korišten je komercijalni imunoenzimski test (Euroimmun, Njemačka). Prisutnost protutijela određivana je uspoređivanjem dobivenih rezultata testiranih seruma s graničnom vrijednošću utvrđenom računskom kalibracijom, a izražena je kao S/CO omjer (S/CO – sample rate/cut-off rate). Uzorak se smatra pozitivnim ukoliko mu je vrijednost S/CO veća od 1,00. Uzorci krvi prikupljeni su venepunkcijom pomoću komercijalnih sistema (Vacutainer SST II Advance, BD, USA). Serumi su od-

Infekcije uzrokovane legionelama na području Primorsko-goranske županije nisu česte, iako, s obzirom na to da se rijetko postavlja indikacija za izvršavanje kompletne palete dijagnostičkih pretraga na legionele, prava i etiološki potvrđena incidencija sa sigurnošću nije poznata.

vajani centrifugiranjem i analizirani 24 do 48 sati po zaprimanju uz čuvanje na +4°C. Inicijalno pozitivni uzorci su retestirani u duplikatu. Svi ispitivani uzorci pohranjeni su na -20°C.

REZULTATI

Od 1. siječnja 2003. do 31. prosinca 2008. godine na Mikrobiološkom odjelu Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije u Rijeci obrađeno je ukupno 97 uzoraka s ciljem da se detektira *L. pneumophila* O1 antigen u urinu. *L. pneumophila* antigenurija ustanovljena je u 5 (5 %) uzoraka, dok su ostali nalazi (92 ili 95 %) bili negativni (slika 1). Najviše imunoenzimskih pretraga urina izvršeno je 2007. godine (24 ili 25 %), a pozitivni nalazi dobiveni su pretragama obavljenim tijekom 2006. godine (dva pozitivna uzorka),

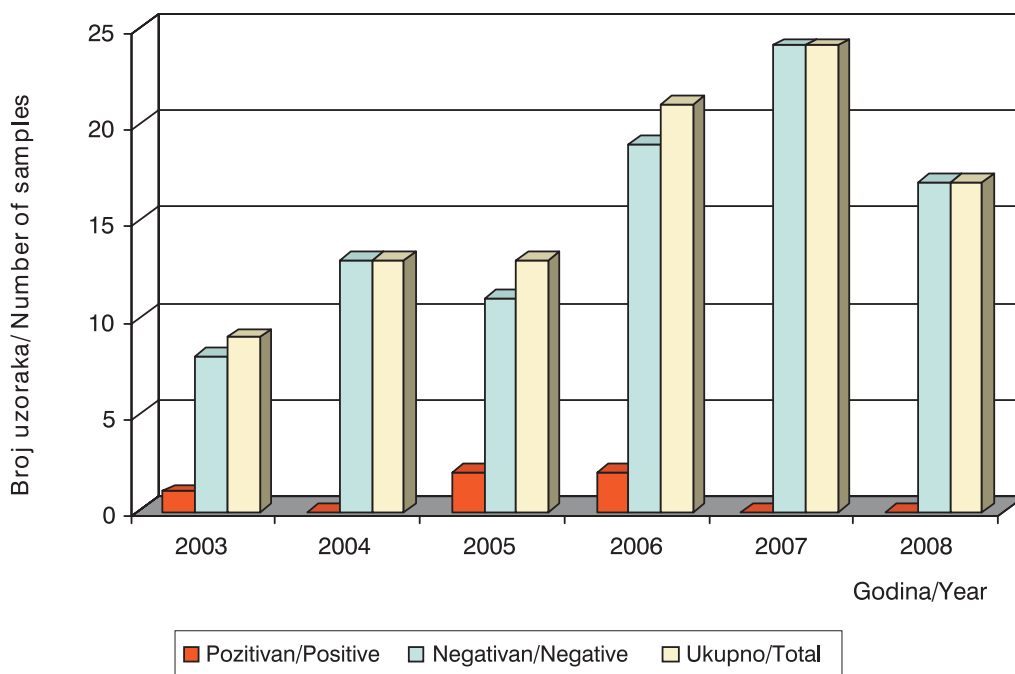


Slika 1. Prikaz pozitivnih i negativnih nalaza EIA testiranja na *L. pneumophila* serogrupe O1 antigen u urinu tijekom analiziranog razdoblja (N=97)

Figure 1 Positive and negative EIA test results for detection of *L. pneumophila* serogroup O1 antigen in urine during analysed period (N=97)

2005. godine (dva pozitivna uzorka) i 2003. godine kada je zabilježen jedan nalaz *L. pneumophila* O1 antigena u urinu (slika 2).

U razdoblju obuhvaćenom retrospektivnom analizom s područja Primorsko-goranske županije zaprimljeno je 112 seruma prikupljenih od bolesnika sa sumnjom na infekciju uzrokovanu legionelom (slika 3.). Imunoenzimskim testiranjem potvrđen je nalaz *L. pneumophila* O1 IgM protutijela u 13 (12 % obrađenih uzoraka), IgG protutijela u 12 (11 % obrađenih uzoraka), a IgA protutijela u 11 (10 % obrađenih uzoraka). Samo IgM protutijela pronađena su u 4 (21 % serološki pozitivnih uzoraka), IgM plus IgA i IgG u 5 (26 % serološki pozitivnih uzoraka), IgM i IgA u 3 (16 % serološki pozitivnih uzoraka), IgM i IgG u 1 (5 % serološki pozitivnih uzoraka) i samo IgG u 6 (32 % serološki pozitivnih uzoraka) od 19 serološki pozitivnih nalaza (slika 4). Prema rezultatima pretraga izvršenih u laboratorijima Mikrobiološkog odjela Nastavnog zavoda u razdoblju od 2003. do 2008. godine nalaz *L. pneumophila* potvrđen je u uzorcima osmero bolesnika.

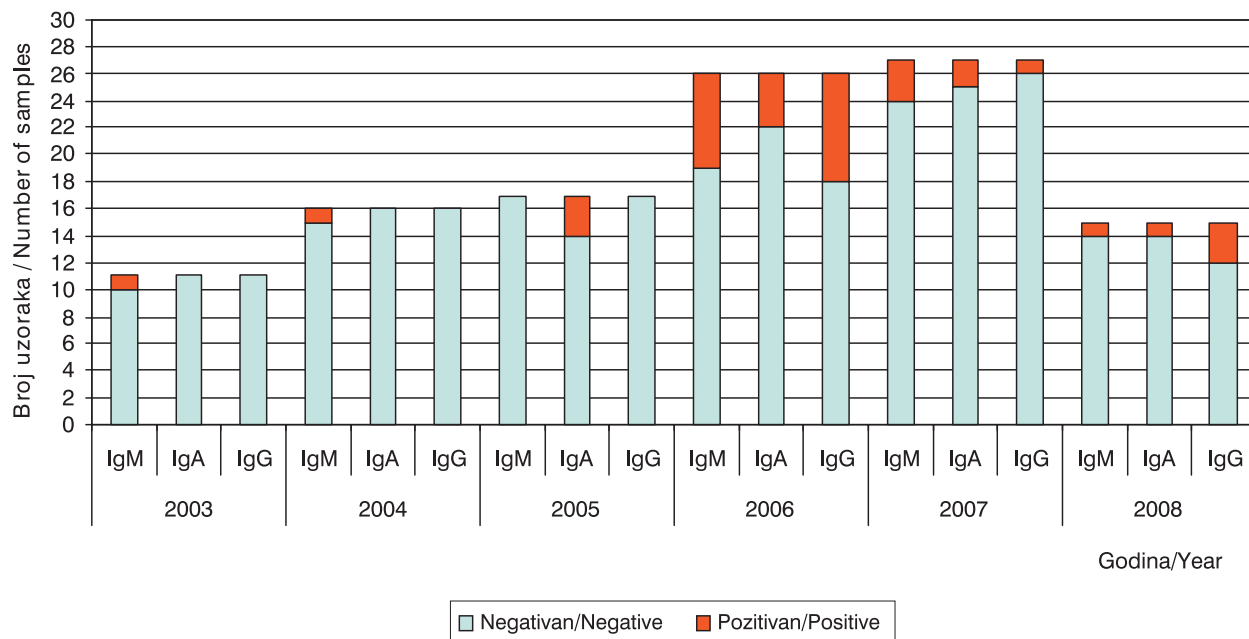


Slika 2. Rezultati EIA testiranja na *L. pneumophila* serogrupe O1 antigen u urinu tijekom analiziranog razdoblja (N=97)

Figure 2 Test results obtained by the EIA for detection of *L. pneumophila* serogroup O1 antigen in urine during analysed period (N=97)

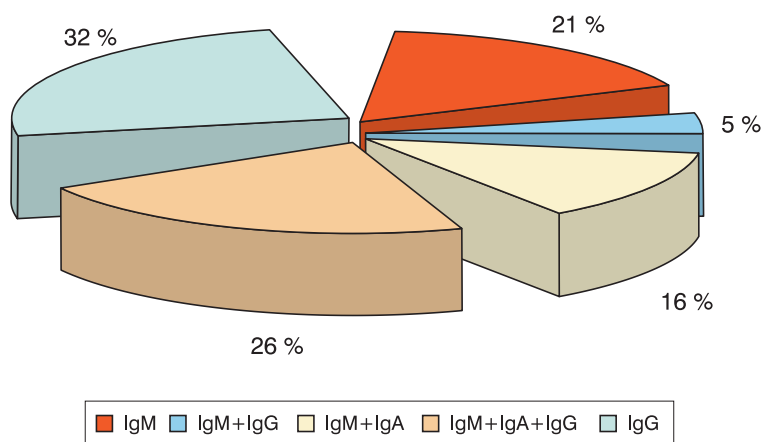
Jedan bolesnik s negativnom antigenurijom bio je serološkim EIA testiranjem IgM i IgA pozitivan. Pozitivni rezultati uglavnom su zabilježeni u muškaraca (6 ili 75 % bolesnika) (slika 5). Analiza dobne raspodjele bolesnika pokazala je da većina pri-

pada dobnim skupinama između 45 i 54, te 65 i 74 godine koje su zastupljene s po 3 (37 %) pozitivna bolesnika. Po jedan bolesnik nalazi se u dobnj skupini od 25 do 34 godine i iznad 75 godina (slika 6).



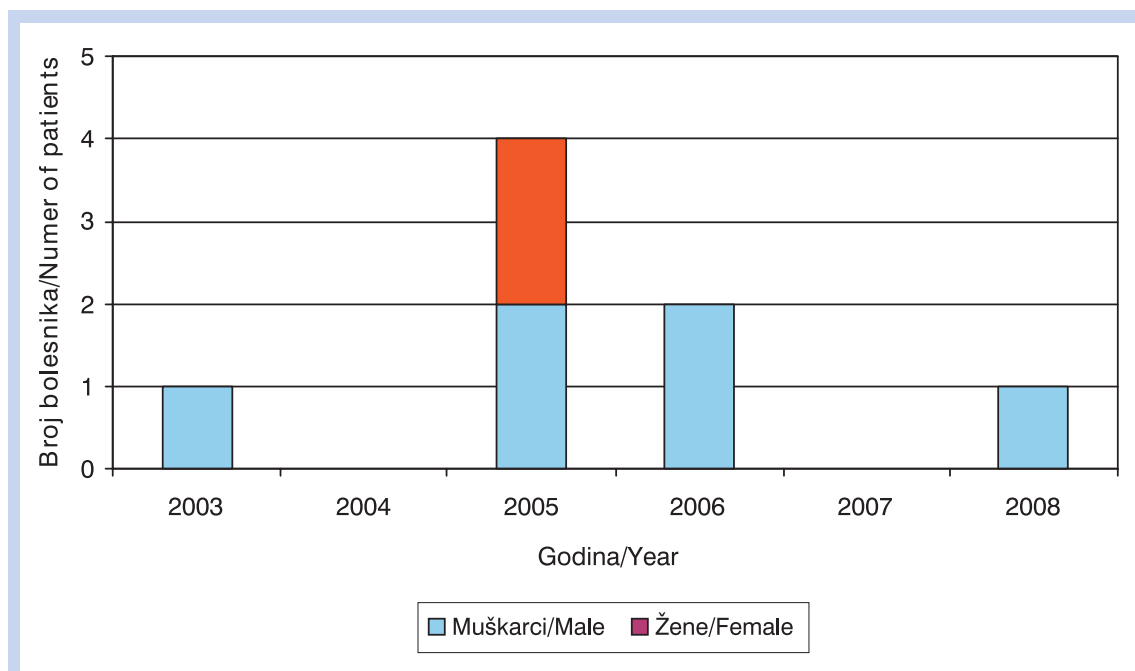
Slika 3. Rezultati EIA testiranja na *L. pneumophila* serogrupe 01 anti – IgM, IgG and IgA tijekom analiziranog razdoblja (N=112)

Figure 3 Test results obtained by the EIA for detection of *L. pneumophila* serogroup 01 anti - IgM, IgG and IgA during analysed period (N=112)

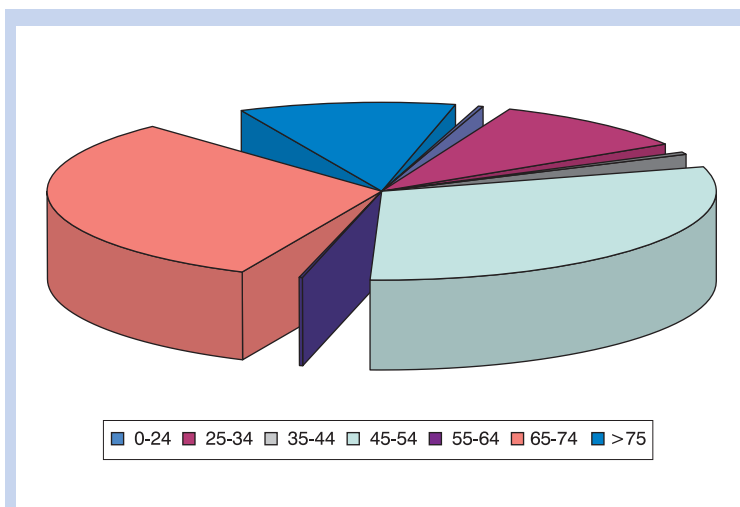


Slika 4. Rezultati EIA testiranja na *L. pneumophila* serogrupe 01 anti – IgM, IgG and IgA tijekom analiziranog razdoblja (N=112)

Figure 4 Test results obtained by the EIA for detection of *L. pneumophila* serogroup 01 anti - IgM, IgG and IgA during analysed period (N=112)



Slika 5. Dobna raspodjela bolesnika tijekom analiziranog razdoblja (N=8)
Figure 5 Age distribution of patients during analysed period (N=8)



Slika 6. Spolna raspodjela bolesnika tijekom analiziranog razdoblja (N=8)
Figure 6. Sex distribution of patients during analysed period (N=8)

RASPRAVA I ZAKLJUČCI

Pneumonije uzrokovane legionelama mogu biti teške i povezane s multiorganskim oštećenjima te visokim mortalitetom. Dostupnost novijih mikrobioloških pretraga i njihovo uvođenje u rutinski rad laboratorija olakšava etiološki pristup i diferencijalnu dijagnostiku, kako bolničkih, tako i pneumonija koje se javljaju u zajednici^{13,14}.

U Hrvatskoj se godišnje registrira petnaestak oboljelih od legionarske bolesti. Bolest se javlja sporadično tijekom čitave godine ili u epidemijama koje se češće javljaju u kasno proljeće i rano ljeto. Zvanični podaci Registra oboljelih od legionarske bolesti Službe za epidemiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo pokazuju kako je preventivnim aktivnostima učinkovito smanjena učestalost epidemija legionarske bolesti u našoj zemlji. Prema rezultatima pretraga koje su izvršene u laboratorijima Mikrobiološkog odjela Nastavnog zavoda, kao i epidemiološkim prijavama zaraznih bolesti, u razdoblju od 2003. do 2008. godine legioneloza je dijagnosticirana u 8 bolesnika. I u našoj županiji od legioneloza rjeđe obolijevaju žene (2 ili 25 %) u odnosu na muškarce (6 ili 75 % bolesnika), što je u korelaciji s podacima u literaturi. Bolesnici većim dijelom (6 ili 75 % bolesnika) pripadaju dobnim skupinama iznad 45 godina, a u ispitivanom razdoblju infekcije vrstom *L. pneumophila* nisu zabilježene u dobnim skupinama djece predškolskog i školskog uzrasta.

Aktualni postupci mikrobiološke dijagnostike legioneloza uključuju kultivaciju, izravnu detekciju bakterijskih antigena u kliničkim uzorcima pomoću imunofluorescencije, imunoenzimskih, kromatografskih i aglutinacijskih metoda te serodija-

gnostičke pretrage. U nekim laboratorijima u dijagnostici se primjenjuje i lančana reakcija polimeraze^{2,4,15}.

Zbog svoje specifičnosti i osjetljivosti kultivacija predstavlja zlatni standard dijagnostike legioneloza pod uvjetom da se na mikrobiološku pretragu pravovremeno dostavi kvalitetan uzorak iz respiratornog sustava⁷. Direktna detekcija antigena u kliničkim uzorcima je, s obzirom na posebne zahtjeve legionela u pogledu uzgoja, dostupnija i brža metoda. Detekcija antigena legionela direktnom imunofluorescencijom, međutim, nije pokazala zadovoljavajuću osjetljivost i specifičnost za opću uporabu, posebice u područjima s niskom prevalencijom bolesti^{13,14}. U laboratorij za respiratorne infekcije Mikrobiološkog odjela sporadično se na kultivaciju za legionele i direktnu imunofluorescenciju – DFA dostavljaju uzorci sputuma, BAL-a i aspirata traheje. U razdoblju obuhvaćenom analizom rezultati kultivacije i DFA pretraga bili su negativni. Na kultivaciju i DFA nisu dostavljeni uzorci bolesnika kod kojih je u istom razdoblju utvrđena *L. pneumophila* antigenurija i/ili *Legionella* seropozitivitet (rezultati nisu prikazani).

Detekcija *L. pneumophila* antigena u urinu bolesnika jedna je od metoda izbora u dijagnostici infekcija koje uzrokuje *L. pneumophila* seroskupine O1. Ova metoda se u praksi pokazala vrlo osjetljivom¹⁶⁻¹⁸. Nalaz antigenurije može se detektirati u najranijim fazama bolesti i najčešće je u korelaciji s težim kliničkim manifestacijama. Nalaz antigena u urinu bolesnika, međutim, može ostati pozitivan tjednima ili mjesecima, te ne mora nužno ukazivati na akutnu infekciju¹⁹⁻²¹. Prema nekim ispitivanjima, zbog blažih kliničkih oblika bolesti, zastupljenost antigenurije u izvanbolničkoj populaciji značajno je niža u odnosu na hospitalizirane bolesnike^{22,23}. Primjena antibiotika, prema nekim autorima, može utjecati na rezultate testiranja⁶. U našem laboratoriju je od 2003. do 2008. godine izvršeno 97 pretraga urina s ciljem da se detektira *L. pneumophila* O1 antigen. Pozitivan nalaz ustanovljen je u 5 (5 %) obrađenih uzoraka.

Nalaz protutijela na legionele u serumu ljudi ukazuje na prethodnu, najčešće asimptomatsku, izloženost antigenu. Neizravna dijagnostika legioneloza provodi se detekcijom specifičnih protutijela (IgM, IgG, IgA) u serumu bolesnika pomoću testa

indirektno fluorescencije – ITFA ili indirektnog enzimoskog imunoeseja - IEIA. Ove metode mogu biti visoko osjetljive i specifične, a primjenjive su i u dijagnostici blagih ili čak asimptomatskih infekcija u populaciji^{9,24}. Za dijagnostiku infekcije obavezno je pretraživanje seruma u akutnoj fazi te fazi oporavka bolesnika, odnosno pretrage parnih uzoraka seruma u razmaku od četiri do šest tjedana, kako bi se zapazila značajna promjena u koncentraciji IgG protutijela u serumu. Nalaz IgM protutijela je serološki pokazatelj akutne bolesti²⁵.

U razdoblju obuhvaćenom analizom na Odjelu mikrobiologije Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije indirektnom EIA metodom obrađeno je 112 seruma s ciljem detektiranja anti *Legionella* IgM, IgG i IgA. Imunoenzimskim testiranjem potvrđen je nalaz *L. pneumophila* IgM protutijela u 13 (12 %), IgG protutijela u 12 (11 %), a IgA u 11 (10 %) analiziranih uzoraka. Samo u slučaju jednog bolesnika legioneloza je dokazana jedino detekcijom antigena legionele u urinu. U svim prvim uzorcima seruma koje je na pretragu dostavilo ostalih sedam bolesnika utvrđena je prisutnost specifičnih IgM protutijela. Kod dva bolesnika je u serumu uz IgM detektiran i IgA, a kod dva bolesnika su u serumu dokazana istovremeno sva tri protutijela. Kako na pretragu nije dostavljen uzorak urina niti respiratorni uzorci za kultivaciju, kod jednog bolesnika legioneloza je dijagnosticirana serološkim nalazom IgM i IgA protutijela. Zbog mogućnosti unakrižnih reakcija i lažno pozitivnih rezultata EIA nalaz anti *Legionella* IgM protutijela dodatno je potrebno potvrditi istovremenim izvođenjem ostalih specifičnih dijagnostičkih metoda kao što su detekcija antigena u urinu i kultivacija, odnosno dokazom serokonverzije pretragom parnog uzorka seruma^{8,24}.

U zaključku možemo reći da kultivacija legionela na BCYE podlozi, brze metode detekcije antigena iz urina i respiratornih uzoraka, a u novije vrijeme i mogućnost primjene komercijalnih molekularnih PCR metoda predstavljaju aktualne metode za etiološku dijagnostiku pneumonija uzrokovanih legionelama. Detekcija *L. pneumophila* antigena u urinu je brza i specifična metoda, osobito korisna u dijagnostici teških oblika legionarske bolesti. Zbog jednostavnog načina prikupljanja

uzoraka te specifičnosti i osjetljivosti imunoenzimske serološke pretrage, posebice detekcija specifičnih IgM protutijela, mogu biti značajne u rutinskoj dijagnostici legioneloza^{13,17,26}. Kultivacija i izolacija bakterijskog soja neophodna je za identifikaciju ostalih seroskupina i vrsta legionela kao i za provođenje epidemioloških studija.

LITERATURA

- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997;473-89.
- Stout JE, Rihs JD, Yu VL. Legionella. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition. Washington: ASM Press, 2003;809-23.
- Muder RR, Yun VL. Infection due to Legionella species other than *L. pneumophila*. Clin Infect Dis 2002;35: 990-8.
- Stout JE, Yu VL. Legionellosis. N Engl J Med 1997; 337: 682-7.
- Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. MMWR Recomm Rep 2004;53(RR-3):1-36.
- Bartlett JG. Diagnostic test for etiologic agents of community-acquired pneumonia. Infect Dis Clin North Am 2004;18:809-27.
- Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23:871-8.
- Zimmerman SE, French ML, Allen SD, Wilson E, Kohler RB. Immunoglobulin M antibody titers in the diagnosis of Legionnaires disease. J Clin Microbiol 1982;16:1007-11.
- Wilkinson HW, Cruce DD, Broome CV. Validation of Legionella pneumophila indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. J Clin Microbiol 1981;13:139-46.
- Edelstein PH. Detection of antibodies to Legionella spp. In: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. (eds). Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th Edition. Washington: ASM Press, 2002;468-76.
- Stout JE, Sens K, Mietzner S, Obman A, Yu VL. Comparative activity of quinolones, macrolides and ketolides against Legionella species using in vitro broth dilution and intracellular susceptibility testing. Int J Antimicrob Agents 2005;25:302-7.
- Edelstein PH. Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: time for a change. Ann Intern Med 1998;129: 328-30.
- Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GF. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J Med Microbiol 2004;53:183-7.
- Murdoch DR. Diagnosis of Legionella infection. Clin Infect Dis 2003;36:64-9.
- Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23:871-8.
- Harrison TG, Doshi N. Evaluation of the Bartels Legionella urinary antigen enzyme immunoassay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:738-40.
- Helbig JH, Uldum SA, Lück PC, Harrison TG. Detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA. J Med Microbiol 2001;50:509-16.
- Kohler RB, Winn WC Jr, Wheat LJ. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. J Clin Microbiol 1984;20:605-7.
- Yzerman EP, den Boer JW, Lettinga KD, Schellekens J, Dankert J, Peeters M. Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands. J Clin Microbiol 2002;40:3232-6.
- Domínguez JA, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, Padilla E et al. Detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. J Clin Microbiol 1996;34:2334-6.
- Domínguez JA, Matas L, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ et al. Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. J Clin Microbiol 1997;35:1627-9.
- Rojas A, Navarro MD, Fornés FE, Serra E, Simarro E, Rojas J et al. Value of serological testing for diagnosis of legionellosis in outbreak patients. J Clin Microbiol 2005;43:4022-5.
- Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, Lück PC, Wewalka G, Abraham B et al. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial Legionnaires' disease. J Clin Microbiol 2003;41:838-40.
- Bangsberg JM, Shand GH, Hansen K, Wright JB. Performance of four different indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to detect specific IgG, IgA, and IgM in Legionnaires' disease. APMIS 1994;102:501-8.
- De Ory F, Echevarría JM, Pelaz C, Téllez A, Mateo MÁ, López J. Detection of specific IgM antibody in the investigation of an outbreak of pneumonia due to Legionella pneumophila serogroup 1. Clin Microbiol Infect 2000;6:64-9.
- Guerrero C, Toldos CM, Yagüe G, Ramírez C, Rodríguez T, Segovia M. Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine. J Clin Microbiol 2004;42:467-8.