

Natalia Rokosz, Waldemar Rastawicki, Aleksandra Anna Zasada, Milena Baczevska-Rej

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego — Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. M. Jagielski

Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń układu oddechowego wywoływanych przez pałeczki *Legionella pneumophila*

Microbiological diagnosis of respiratory infections caused by *Legionella pneumophila*

Abstract

Legionella pneumophila is an important causative agent of pneumonia in humans which is difficult to diagnose because the signs and symptoms are nonspecific and do not distinguish *Legionella* infection from other common causes of pneumonia. Currently, the diagnosis of Legionnaires' disease is based on phenotyping (culture, antibody detection in human sera, antigen detection in urine) and genotyping methods such as PCR (polymerase chain reaction). This review focuses on current diagnostic tests for surveillance of *Legionella pneumophila* infections in Poland.

Key words: *Legionella pneumophila*, Legionnaires' disease, legionellosis, laboratory evidence of *Legionella* infection, pulmonary infection

Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 1: 54–59

Streszczenie

Pałeczki *Legionella pneumophila* są jednym z czynników wywołujących zapalenie płuc u ludzi, które ze względu na niecharakterystyczne objawy kliniczne trudno jest odróżnić od innych zakażeń dróg oddechowych. Obecnie diagnostyka legionelozy opiera się na badaniach fenotypowych (hodowla, poszukiwanie swoistych przeciwciał w surowicy ludzkiej, antygeny w próbkach materiału klinicznego) oraz badaniach genotypowych, takich jak metoda PCR (reakcja łańcuchowej polimerazy). W niniejszym artykule przedstawiono krótki opis metod diagnostycznych stosowanych w identyfikacji i zapobieganiu potencjalnym zakażeniom wywoływanych przez pałeczki *L. pneumophila* na terenie Polski.

Słowa kluczowe: *Legionella pneumophila*, choroba legionistów, legioneloza, laboratoryjne potwierdzanie legionelozy, infekcje płuc

Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 1: 54–59

Wstęp

Legioneloza jest zakaźną chorobą wywołaną przez bakterie z rodzaju *Legionella*, głównie przez szczepy *Legionella pneumophila* serogrupy 1 (60–80% przypadków) i może przebiegać w postaci dwóch klinicznie odrębnych zespołów, czyli choroby legionistów i tak zwanej gorączki Pontiac

[1, 2]. Chorobę legionistów po raz pierwszy opisano w 1977 roku i od tamtego czasu w wielu krajach istnieje obowiązek jej rejestracji [1, 3–5]. Może ona przebiegać w postaci ostrego zapalenia płuc (3–8% wszystkich zachorowań na pozaszpitalne zapalenie płuc), a czas jej inkubacji szacuje się na 2–10 dni, najczęściej 5–6 dni, rzadko 20 dni [3–5]. W zdiagnozowaniu legionelozy decydującą rolę

Adres do korespondencji: mgr Natalia Rokosz, Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu — Państwowego Zakładu Higieny, ul. Chocimska 24, 00–791 Warszawa, tel.: (22) 542 13 25, faks: (22) 542 13 07, e-mail: nrokosz@pzh.gov.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 25.03.2009 r.
Copyright © 2010 Via Medica
ISSN 0867–7077

może odegrać wywiad uzyskany od pacjenta. Do najczęściej opisywanych klinicznych objawów w przebiegu legionelozy należy zaliczyć: osłabienie, suchy kaszel, wysoką gorączkę, bóle głowy, bóle mięśni, zaburzenia w oddychaniu [1, 3–6]. Objawy ogólnoustrojowe mogą dotyczyć zaburzeń czynności nerek (proteinuria, azotemia, hematuria), czynności jelit (biegunka u 25–50% przypadków oraz nudności i wymioty występujące u 10–30% chorych), niewydolności wątroby, zaburzeń w ośrodkowym układzie nerwowym (zaburzenia świadomości, dezorientacja i majaczenie) oraz zapalenia osierdzia [3, 6, 7]. W płwocinie, płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF, *broncho-alveolar lavage fluid*), aspiracie z tchawicy, płynie opłucnowym, tkance płucnej lub krwi można stwierdzić obecność pałeczek *Legionella sp.* przy użyciu metod bakteriologicznych [2–4]. Obraz radiologiczny w przypadku legionelozy jest podobny do obrazu obserwowanego w innych przypadkach zapalenia płuc. U pacjentów z obniżoną odpornością podczas zakażenia pałeczkami *L. pneumophila* mogą się rozwinąć ropnie płuca, ropniaki lub przetoki oskrzelowe [8, 9]. Potwierdzenie zachorowania opiera się wyłącznie na wynikach badań bakteriologicznych.

Gorączka Pontiac to podobne do grypy stany gorączkowe, którym towarzyszą bóle głowy i mięśni oraz kaszel występujący u około połowy chorych [3–6, 9]. Objawy utrzymują się 2–6 dni, po czym następuje samowyleczenie [3–5, 10]. W przypadku gorączki Pontiac nie wykazano obecności bakterii w płynach ustrojowych i w tkankach, natomiast o trwałym zakażeniu może świadczyć tylko podwyższone miano swoistych przeciwciał [5]. W przypadku zakażeń pałeczkami *L. pneumophila* nie stwierdzono przenoszenia tych bakterii między ludźmi [1].

Pacjenci z chorobą legionistów wymagają szybkiej interwencji medycznej. Obecnie antybiotykami z wyboru w leczeniu legionelozy są makrolidy nowej generacji, takie jak klarytromycyna czy azytromycyna. Skuteczne w leczeniu legionelozy są również leki z grupy fluorochinolonów, na przykład lewofloksacyna i ciprofloksacyna [9, 11]. W ciężkich przypadkach zaleca się stosowanie jednocześnie makrolidów i fluorochinolonów [9, 12]. Ze względu na fakt, że pałeczki *Legionella sp.* są wewnątrzkomórkowymi patogenami wytwarzającymi dodatkowo β -laktamazy, antybiotyki β -laktamowe są nieskuteczne w leczeniu zakażeń przez nie wywoływanych [1, 9, 13].

Zgodnie z ustawą o chorobach zakaźnych i zakażeniach (DzU. nr 126 poz. 1384.) w Polsce od 2001 roku legioneloza podlega rejestracji w Głównym Inspektoracie Sanitarnym [8]. Według oficjal-

nych danych zamieszczanych w biuletynie *Choroby Zakaźne i Zatrucia w Polsce*, opracowywanym co roku przez Zakład Epidemiologii NIZP-PZH w Warszawie, pierwsze 3 rozpoznane przypadki legionelozy odnotowano w 2003 roku. W kolejnych 2 latach liczba zakażeń pałeczkami *Legionella sp.* wzrosła do 21. W 2006 roku zgłoszono oficjalnie 89 przypadków, a w 2007 roku jedynie 28 przypadków legionelozy, co daje odpowiednio zapadalność na poziomie 0,233 i 0,073 na 100 000 mieszkańców. Uwzględniając fakt, że w tym samym czasie średnia zapadalność na legionelozę w pozostałych państwach Unii Europejskiej była znacznie wyższa (5,4 na 100 000 mieszkańców), wydaje się, że dane te są mocno zaniżone [1, 9].

Na podstawie danych epidemiologicznych zebranych przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) wyodrębniono kilka czynników predysponujących do rozwoju choroby legionistów. Należą do nich: wiek powyżej 50 lat, palenie tytoniu, alkoholizm oraz płeć. Legionelozowe zapalenie płuc trzy razy częściej dotyczy mężczyzn niż kobiet [3–5, 9].

Przypadki zachorowań na legionelozę stwierdza się także u dzieci. Opisane w literaturze przypadki dotyczą zazwyczaj dzieci długotrwale leczonych na choroby nowotworowe [7]. W ostatnich latach odnotowano również przypadki zachorowań na legionelozę wśród noworodków [14, 15].

Wysokie niebezpieczeństwo zakażenia pałeczkami *Legionella sp.* występuje u chorych z przewlekłymi chorobami układu oddechowego, nerek, serca oraz z cukrzycą. Innym czynnikiem ryzyka jest obniżona odporność wrodzona lub nabyta [9].

W przypadku rozpoznania legionelozy i zastosowania prawidłowego leczenia śmiertelność sięga 15–20%, a w przypadku niezastosowania odpowiedniego leczenia aż 50% [5, 8].

Ze względu na brak charakterystycznych objawów klinicznych trudno odróżnić legionelozę od innych infekcji płucnych. Europejska Grupa Pracująca nad Zakażeniami *Legionella* (EWGLI, *European Working Group for Legionella Infections*) podała definicję przypadku legionelozy. Choroba legionistów to „zachorowanie z klinicznymi objawami zapalenia płuc, z charakterystycznym obrazem radiologicznym i dodatnimi wynikami badań laboratoryjnych”. Zakażenie potwierdza się, gdy jest spełniony co najmniej jeden z poniższych warunków:

- izolacja bakterii z rodzaju *Legionella* z posiewu próbek materiału klinicznego pobranego od chorego;
- wykrycie antygeny pałeczek z rodzaju *Legionella* w moczu chorego;

- stwierdzenie serokonwersji, czyli znamienne- go przyrostu miana przeciwciał w dwóch próbkach surowicy uzyskanych w odstępie co najmniej tygodnia [2, 4, 8].

Mimo że do rodzaju *Legionella* zalicza się obecnie 48 gatunków drobnoustrojów, w obrębie których wyróżniono 70 różnych grup serologicznych, większość obecnie dostępnych metod diagnostycznych jest ukierunkowana na wykrywanie zakażeń wywoływanych przez pałeczki *L. pneumophila* serogrupy 1 — najczęstszy czynnik etiologiczny legionelozy w Europie i Stanach Zjednoczonych [3, 4, 6, 9]. Metody służące do diagnozowania i rozpoznawania innych serogrup *L. pneumophila* oraz innych patogennych gatunków z rodzaju *Legionella*, czyli *L. longbeachae*, *L. micdadei*, *L. bozemanae* i *L. dumoffi*, odznaczają się znacznie niższą czułością i swoistością [7].

Obecnie w diagnostyce legionelozy stosuje się następujące metody mikrobiologiczne:

- izolacja i hodowla bakterii z rodzaju *Legionella* z próbek materiału klinicznego,
- wykrywanie bakteryjnego DNA przy użyciu metody PCR (*polymerase chain reaction*),
- oznaczanie obecności antygeny *Legionella* w moczu metodą immunoenzymatyczną i immunochromatograficzną,
- wykrywanie obecności bakterii w tkankach i płynach ustrojowych metodą bezpośredniej (DFA, *direct fluorescent antibody*) lub pośredniej (IFA, *indirect fluorescent antibody*) immunofluorescencji,
- oznaczanie stężenia swoistych przeciwciał dla antygenów pałeczek *Legionella sp.* w próbkach surowicy [4, 8].

Izolacja i hodowla drobnoustrojów

Według danych *Centers for Disease Control and Prevention* tylko około 30% zidentyfikowanych przypadków legionelozy potwierdzono metodą hodowli [5]. Izolacja i hodowla bakterii umożliwiają określenie czynników zjadliwości danego szczepu i jego molekularną charakterystykę oraz wykrywanie coraz częściej występujących nowych gatunków i serogrup bakterii należących do rodzaju *Legionella*. Dane takie wykorzystuje się później w dochodzeniu epidemiologicznym [8].

Próbkę materiału klinicznego przeznaczoną do diagnostyki bakteriologicznej należy pobrać od pacjenta przed zastosowaniem antybiotykoterapii. Materiałem klinicznym, z którego w badaniach bakteriologicznych można wyhodować pałeczki *Legionella sp.*, jest płwocina, BALF, aspirat z biopsji przełotnej, fragment tkanki płucnej po biopsji lub

z materiału sekcyjnego oraz krew, punktat czy ropa [1]. Dostępność odpowiednich, wybiórczych dla pałeczek *Legionella*, podłoży hodowlanych umożliwia dokonanie posiewu płwociny nawet wtedy, gdy zawiera ropę. Mimo że pobranie tkanki płucnej, płynu opłucnowego lub BALF u niektórych chorych może stwarzać problemy, ze względów diagnostycznych jest to najlepszy materiał kliniczny do poszukiwania obecności żywych pałeczek *Legionella sp.* [16].

Materiał w postaci płwociny powinno się pobierać rano na czczo, przed spożyciem posiłku lub płynów, po dokładnym wypłukaniu jamy ustnej jałowym roztworem soli fizjologicznej. Pacjent musi wyksztusić jak najwięcej wydzieliny z oskrzeli do jałowego pojemniczka. Czynność tę może powtarzać. Pojemnik należy szczelnie zamknąć, oznakować. Pobrany materiał można przechowywać w temperaturze 2–8°C do 3 dni, przez dłuższy okres w temperaturze od –20 do –70°C. Płwocinę należy transportować w takiej temperaturze, w jakiej była przechowywana. Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego powinno się pobrać po znieczuleniu miejscowym jamy nosowo-gardłowej. W celu pobrania BALF u pacjenta nieintubowanego wprowadza się bronchoskop przez jamę nosową lub gardłową, natomiast u pacjenta zaintubowanego wprowadza się bronchoskop przez rurkę wewnątrz tchawicy. Następnie jałowy roztwór 0,85-procentowego NaCl w ilości 5–20 ml podaje się za pomocą strzykawki przez kanał biopsyjny bronchoskopu. Próbkę BALF pobiera się przez ostrożne wklonowanie końca bronchoskopu w światło drogi oddechowej i podanie dużej objętości jałowej soli fizjologicznej (140–200 ml) o temperaturze 37°C. Roztwór należy podawać w równych porcjach po 50 ml. Po podaniu każdej części materiał należy odessać i umieścić w jałowym pojemniku.

Pojemnik z materiałem klinicznym należy szczelnie zamknąć i oznakować. Pobrany materiał można przechowywać w temperaturze 2–8°C do 3 dni, przez dłuższy okres w temperaturze od –20 do –70°C. Próbkę BALF należy transportować w takiej temperaturze, w jakiej był przechowywany. Transport próbek powinien się odbywać w sterylnych, zabezpieczonych przed wylaniem pojemnikach. W celu zapewnienia odpowiednio niskiej temperatury podczas transportu można użyć torby termicznej lub odpowiednich pojemników z lodem [17].

Obecnie w hodowli pałeczek *Legionella sp.* wykorzystuje się podłoże agarowe z dodatkiem L-cysteiny, na przykład podłoże BCYE (*buffered charcoal yeast extract agar*), podłoże BCYE z dodatkiem antybiotyków GVPC (glicyna, wankomycyna, polimyksyna B, cykloheksamid) lub podłoże BMPA zawierające antybiotyki, takie jak: anizomycyna,

cefamandol, polimiksyna B [18]. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 36 \pm 1°C w atmosferze o zwiększonej zawartości CO₂ i wilgotności powyżej 50% przez 10–14 dni [6]. Wzrost kolonii bakteryjnych ocenia się makroskopowo co 2–3 dni. Potwierdzeniem wzrostu jest obecność jednej lub kilku kolonii pałeczek *Legionella sp.* na płycie. Ujemny wynik hodowli może mieć miejsce w przypadku, gdy pacjent był wcześniej leczony antybiotykami lub pobrany do posiewu materiał był niewłaściwie przechowywany [19].

Wyizolowanie pałeczek *Legionella sp.* z próbek materiału klinicznego uznaje się za najbardziej wiarygodną metodę rozpoznania legionelozy [3, 4, 9, 13]. Wpływ na czułość metod hodowlanych w rozpoznawaniu tej choroby mają odpowiednie pobranie i transport próbek materiału klinicznego oraz użycie odpowiednich podłoży hodowlanych.

Wykrywanie bakteryjnego DNA przy użyciu metody PCR

W diagnostyce legionelozy wykorzystuje się również badanie polegające na wykrywaniu metodą PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy) specyficznego fragmentu DNA w próbce materiału klinicznego [3–5, 9]. DNA pałeczek *Legionella sp.* można wykrywać zarówno w materiale uzyskanym z dróg oddechowych, jak i w próbkach moczu i krwi. Czułość tej metody jest zróżnicowana i może się wahać 10–86% [13]. W badaniach w kierunku zakażeń *L. pneumophila*, wykonywanych techniką PCR, wykorzystuje się sekwencje dla genów: *5S rRNA*, *16S rRNA*, *mip*, kodujących białko DnaJ i kodujących podjednostkę β polimerazy RNA (*rpoB*) [3, 4, 20].

Dostępne na rynku komercyjne testy są przeznaczone głównie do wykrywania obecności DNA pałeczek *Legionella sp.* w środowisku, jednak ostatnio pojawiły się również testy do wykrywania DNA w próbkach materiału klinicznego przy zastosowaniu techniki *Real-Time PCR* [3, 12]. Zaletą tej metody jest krótki czas oczekiwania na wynik badania. Obecnie metoda ta nie jest na tyle dobrze wystandaryzowana, by można ją było powszechnie stosować w rutynowej diagnostyce legionelozy [3, 4, 9, 18].

Oznaczanie poziomu antygeny pałeczek *Legionella* w próbkach moczu

Ze względu na długi czas oczekiwania na wynik hodowli, czyli 3–10 dni od posiewu próbki na odpowiednie podłoże, dość wysoki koszt badania oraz trudności w odpowiednim uzyskaniu próbki materiału klinicznego do badań w diagno-

stycie zakażeń bakteriami *Legionella sp.* serogrupy 1 bardziej powszechne są badania serologiczne, w tym przede wszystkim poszukiwanie antygeny pałeczek *Legionella* w próbkach moczu [1].

Mocz do badania serologicznego powinien być pozyskiwany od osób badanych na czczo z pierwszej porannej mikcji, przy zachowaniu dotychczasowej diety. Próbkę moczu, w objętości nie mniejszej niż 2 ml, należy dostarczyć w jałowych, szczelnie zamykanych plastikowych probówkach lub pojemnikach w temperaturze otoczenia w czasie nie dłuższym niż 4 godziny od pozyskania lub w temperaturze 5°C (\pm 3°C) w czasie nie dłuższym niż 24 godziny. Jeśli próbka moczu będzie przechowywana lub transportowana w czasie dłuższym niż 24 godziny, należy ją zamrozić w temperaturze co najmniej –20°C i przechowywać lub transportować w stanie uniemożliwiającym jej rozmrożenie. W przypadku braku możliwości zamrożenia próbkę moczu po pobraniu należy ogrzewać przez 10–15 minut we wrzącej łaźni wodnej i przechowywać w temperaturze 5°C (\pm 3°C).

Wykrywanie antygeny w moczu dotyczy zazwyczaj pałeczek *L. pneumophila* serogrupy 1. Przyjmuje się, że około 80–90% chorych z objawami zapalenia płuc już od pierwszego dnia wystąpienia objawów klinicznych wydalą w moczu antygen *L. pneumophila*. Wiadomo również, że obecność antygeny w próbkach moczu z reguły można stwierdzić w ciągu pierwszych 2–3 tygodni trwania choroby [4, 17, 21, 22].

Najczęściej do poszukiwania obecności antygeny w próbkach moczu wykorzystuje się odczyn immunoenzymatyczny lub szybkie testy oparte na technice immunochromatografii [22].

Czułość metody immunoenzymatycznej (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) w wykrywaniu antygeny w moczu szacuje się na 80–90%, a swoistość na 99%. Czas oczekiwania na uzyskanie wyniku wynosi około 4 godzin [7, 9, 13, 18].

W ostatnich latach do wykrywania antygeny *L. pneumophila* serogrupy 1 w moczu wprowadzono również wiele testów opartych na metodzie immunochromatografii [3, 19, 23]. Z danych przedstawionych przez EWGLI wynika, że najwięcej przypadków zachorowań na legionelozę wykrywa się przy użyciu właśnie tych szybkich testów diagnostycznych. Zaletą metody jest łatwość wykonania badania i krótki czas oczekiwania na wynik wynoszący kilkanaście minut. Z tego powodu testy te zaleca się do rutynowej diagnostyki legionelozy wykonywanej u osób trafiających do szpitala z ciężkim zapaleniem płuc. Wadą szybkich testów jest ich niższa czułość w porównaniu z testami immunoenzymatycznymi [3, 4, 9, 19]. Na rycinie 1



Rycina 1. Wynik reakcji uzyskany podczas badania próbki moczu pobranej od osoby z zapaleniem płuc wywołanym przez pałeczki *L. pneumophila* serogrupy 1 dwoma immunochromatograficznymi testami. Po lewej stronie wynik badania wykonany przy użyciu testu Uni-Gold *Legionella* firmy Trinity Biotech, po prawej stronie — NOW *Legionella* firmy Binax

Figure 1. The results of two immunochromatographic tests of urine specimen from person with lung infection caused by *L. pneumophila* serogroup 1 in two immunochromatographic assays; in Trinity Biotech Uni-Gold *Legionella* antigen test on the left and Binax NOW *Legionella* antigen test on the right

przedstawiono przykładowe wyniki dodatnie uzyskane podczas badania próbki moczu osoby chorej na legionelozę przy użyciu dwóch zestawów komercyjnych testów immunochromatograficznych.

Oznaczenie pałeczek *Legionella* w tkankach metodą immunofluorescencji

Poza wykrywaniem antygeny pałeczek *Legionella sp.* w moczu można również stwierdzić jego obecność w tkankach ludzkich przy użyciu metody bezpośredniej immunofluorescencji (DFA, *direct fluorescent antibody*). Przy użyciu tej metody można wykryć pałeczki *Legionella* w wydzielinie z dróg układu oddechowego, tkance płuc i płynie opłucnowym [4]. Przyjmuje się, że czułość tych metod wynosi 25–70%, a swoistość powyżej 95% [4]. Zaletą tej metody jest możliwość określenia przynależności wykrytych pałeczek *Legionella sp.* do odpowiednich gatunków i serogrup, natomiast wadą jest możliwość wystąpienia nieswoistych reakcji krzyżowych z innymi antygenami bakteryjnymi [2–4].

Oznaczenie poziomu swoistych przeciwciał

W przypadku poszukiwania swoistych przeciwciał dla *L. pneumophila* serogrupy 1 w próbce surowicy metodą ELISA rozpoznanie aktualnego zakażenia wymaga wykazania serokonwersji w dwóch próbkach surowicy uzyskanych w odstępie co najmniej 10–14 dni. Zazwyczaj do badania uzyskuje się jednak pojedynczą próbkę surowicy uzyskaną w zaawansowanym stadium choroby. Wykazanie w niej podwyższonego stężenia przeciwciał może jedynie świadczyć o prawdopodobnym zakażeniu pałeczkami *Legionella sp.* [9, 13]. Czułość tej metody ELISA wynosi około 90%, a specyficzność 80–90% [13].

Przeciwciała dla antygenów *L. pneumophila* serogrupy 1 pojawiają się po upływie tygodnia od zachorowania i osiągają najwyższe stężenie w 3–4 tygodniu. Zaobserwowano również przypadki chorych na legionelozę, u których nie wystąpiła serokonwersja.

Jednym z czynników wpływających na odpowiedź humoralną jest wiek. Znamienne poziomy przeciwciał klasy IgM stwierdzono u dzieci powyżej 2. roku życia [7]. W grupie dzieci w wieku poniżej 2 lat zaobserwowano graniczne stężenie tej klasy przeciwciał [7]. Przeciwciała zanikają zazwyczaj po 2–3 miesiącach, jednak niekiedy można je wykryć w próbce surowicy nawet po upływie 12–18 miesięcy. Zarówno u osób dorosłych, jak i u dzieci wykazanie wysokiego stężenia przeciwciał klasy IgM w próbce surowicy krwi świadczy o aktualnym zakażeniu pałeczkami *Legionella sp.* [3, 7, 8, 15].

W diagnostyce legionelozy stosuje się również test immunofluorescencji pośredniej (IFA, *indirect fluorescent antibody*). Służy on do wykrywania swoistych przeciwciał dla pałeczek *Legionella sp.* w surowicy chorego. Obecnie są dostępne testy wykrywające immunoglobuliny klas A, G i M lub zestawy do wykrywania tylko przeciwciał klasy IgG lub tylko IgM. Odczytu dokonuje się przy użyciu mikroskopu immunofluorescencyjnego, przy 400-krotnym powiększeniu. O zakażeniu pałeczkami *Legionella sp.* świadczy znamienne przyrost miana przeciwciał w dwóch próbkach surowicy uzyskanych w różnych okresach choroby [4, 16, 24].

Oznaczenia poziomu przeciwciał w surowicy ludzkiej można wykonać również za pomocą takich testów, jak aglutynacja lateksowa, hemaglutynacja i mikroaglutynacja [2].

Mimo wysokiej czułości i swoistości metod serologicznych mają one pewne ograniczenia. Do najważniejszych należy czas niezbędny na rozwinięcie odpowiedzi humoralnej chorego do poziomu wykrywalnego w testach serologicznych oraz

możliwość występowania reakcji krzyżowych w przypadku zakażeń bakteryjnych wywołanych przez *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus sp.*, *Bacteroides spp.* oraz pałeczki *Campylobacter* [3, 13].

Podsumowanie

W diagnostyce zakażeń pałeczkami *L. pneumophila* wykorzystuje się metody izolacji bakterii z próbek materiału klinicznego, techniki biologii molekularnej i metody serologiczne. Metodę izolacji i hodowli drobnoustrojów, ze względu na swoją 100-procentową swoistość, uważa się za złoty standard w badaniach mikrobiologicznych. W przypadku poszukiwania pałeczek *Legionella sp.* metoda ta ma jednak istotne ograniczenia, które wynikają z rodzaju badanego materiału klinicznego, długiego czasu potrzebnego na wzrost drobnoustrojów i jego ograniczonej czułości. Z badań przeprowadzonych przez EWGLI jednoznacznie wynika, że w celu zdiagnozowania legionelozy najczęściej poszukuje się antygeny pałeczek *Legionella sp.* w próbkach moczu. Badania te są szybkie, tanie, proste i za ich pomocą wykrywa się zakażenie w jego wczesnej fazie. Dodatkowymi ich zaletami są stosunkowo wysoka czułość (75–90%) i swoistość (> 99%) w porównaniu z metodami hodowlanymi [14]. Poszukiwanie antygeny w próbkach moczu powinno być więc metodą diagnostyczną z wyboru w ciągu pierwszych 2–3 tygodni trwania choroby. W przypadku dłuższej trwającej infekcji bardziej przydatne w diagnostyce legionelozy jest poszukiwanie swoistych przeciwciał w próbkach surowicy osób chorych za pomocą odczynu immunoenzymatycznego. Należy dodać, że mikrobiologiczne badania diagnostyczne w kierunku zakażenia pałeczkami z rodzaju *Legionella* wykonuje się w Polsce jedynie w nielicznych laboratoriach, między innymi w Zakładzie Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Z powodu niedostatecznego zaplecza laboratoryjnego liczba wykrytych przypadków tej choroby w Polsce jest znacznie niższa niż w innych krajach Unii Europejskiej. Wydaje się więc konieczne zwiększenie dostępności badań mikrobiologicznych, jak również badanie w kierunku legionelozy większej liczby chorych na zapalenie płuc.

Piśmiennictwo

1. Bartram J., Yves Ch., Lee J., Pond K., Surman-Lee S. Legionella and prevention of legionellosis. Publication of the World Health Organization 2007.
2. Jahnz-Różyk K., Targowski T., Jurkiewicz D., Zielnik-Jurkiewicz B. Bakterie atypowe w zakażeniach dróg oddechowych — patogenezą i diagnostyką. Pol. Merk. Lek. 2008; XXIV: 149, 412.
3. Dideren B., De Jong C., Marmouk F., Kluytmans J., Peeters M., Van der Zee A. Evaluation of real-time PCR for the early detection of Legionella pneumophila DNA in serum samples. J. Med. Microbiol. 2007; 56: 94–101.
4. Dideren B., Kluytmans J., Peeters M. Evaluation of Vircell enzyme — linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescent assay for detection of antibodies against Legionella pneumophila. Clin. Vacc. Immuno. 2006; 13: 361–364.
5. Dirven K., Ieven M., Peeters M., Van der Zee A., de Schrijver K., Goossens H. Comparison of three Legionella urinary antigen assays during an outbreak of legionellosis in Belgium. J. Med. Microbiol. 2005; 54: 1213–1216.
6. Molinos L. Detection of antigens in urine. Arch. Bronconeumol. 2006; 42: 101–103.
7. Fields B., Benson R., Besser R. Legionella and legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 2002;15: 506–526.
8. Jahnz-Różyk K., Targowski T. Zakażenia dróg oddechowych drobnoustrojami atypowymi a astma oskrzelowa. Pol. Merk. Lek. 2007; XXIII: 137, 325.
9. Palusińska-Szych M., Cendrowska-Pinkosz M. Występowanie i chorobotwórczość bakterii z rodziny Legionellaceae. Postępy Hig. Med. Dośw. 2008; 62: 337–353.
10. Kohler R., Winn W., Wheat J. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. J. Clin. Microbiol. 1984; 20: 605–607.
11. Stypułkowska-Misiurewicz H. Legioneloza (choroba legionistów). W: Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D. Zakażenia i zarażenia człowieka. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
12. Kołodyński J., Jankowski S. Legionella pneumophila — epidemiologia i chorobotwórczość. Adv. Clin. Exp. Med. 2004; 13: 645–649.
13. Pancer K., Pawińska A., Rabczenko D. i wsp. Odpowiedź odpornościowa w klasie IgM na zakażenie Legionella pneumophila u dzieci. Przegl. Epidemiol. 2007; 61: 401–407.
14. Maiwald M., Helbig J., Luck P. Laboratory methods for the diagnosis of Legionella infections. J. Microbiol. Meth. 1998; 33: 59–79.
15. Unit for Surveillance and Control of Communicable Diseases. Legionnaires' disease in a neonatal unit of a private hospital, Cyprus, December 2008: preliminary outbreak report. Euro Surveill. 2009; 14: 2–3.
16. Stypułkowska-Misiurewicz H., Pancer K. Legioneloza — nowe zagrożenie w Polsce. Przegl. Epidemiol. 2002; 56: 567–576.
17. Stypułkowska-Misiurewicz H., Krogulska B., Pancer K., Matyszewska R. Metodyka wykrywania i oznaczania bakterii z rodzaju Legionella w środowisku wodnym i w materiale klinicznym. Wyd. Met. PZH, Warszawa, 2001: 1–47.
18. Murdoch D. Diagnosis of Legionella infection. Med. Microbiol. 2003; 36: 64–69.
19. Pancer K., Rabczanko D., Krogulska B. i wsp. Mikrobiologiczna ocena zagrożenia legionelozą oraz zastosowanie metody eliminacji Legionella pneumophila z sieci wodnych budynków szpitalnych. Przegl. Epidemiol. 2008; 62: 439–446.
20. Stypułkowska-Misiurewicz H., Pancer K. Legioneloza w Polsce w latach 2001–2002 na tle sytuacji epidemiologicznej w Europie. Przegl. Epidemiol. 2003; 57: 599–606.
21. Pancer K., Stypułkowska-Misiurewicz H. Gorączka Pontiac — pozapłucna postać legionelozy. Przegl. Epidemiol. 2003; 57: 607–612.
22. Rojas A., Navarro M., Fornés F. i wsp. Value of serological testing for diagnosis of legionellosis in outbreak patients. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 4020–4025.
23. Wever P., Yzerman E., Kuijper E., Speelman P., Dankert J. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 2738–2739.
24. Kondrusik M., Daniluk J., Siwak E., Szpakowicz T. Zakażenia Legionella pneumophila. Pneumonol. Alergol. Pol. 1994; 62: 106–111.