



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διευθυντής: Καθηγητής Χρήστος ΧΑΤΖΗΧΡΗΣΤΟΔΟΥΛΟΥ**



**Διδακτορική Διατριβή**

**«ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑΣ ΠΝΕΥΜΟΡΗΙΑ  
ΟΡΟΤΥΠΩΝ 2-14 ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ»**

υπό

**ΑΝΝΑΣ Ε. ΚΑΤΣΙΑΦΛΑΚΑ**

Ιατρού Βιοπαθολόγου, Msc στη Δημόσια Υγεία

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2018

*Στην μητέρα μου,*

*Στο Στέφανο, τη Βάλια και το Σωτήρη.*

© 2018 ANNA ΚΑΤΣΙΑΦΛΑΚΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής ( ):**

- |                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>1ος Εξεταστής<br/>(Επιβλέπων)</b> | <b>Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου</b><br>Καθηγητής Υγιεινής κι Επιδημιολογίας,<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας         |
| <b>2ος Εξεταστής</b>                 | <b>Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας</b><br>Καθηγητής Μικροβιολογίας,<br>Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών          |
| <b>3ος Εξεταστής</b>                 | <b>Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης</b><br>Καθηγητής Πνευμονολογίας,<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                    |
| <b>4ος Εξεταστής</b>                 | <b>Δρ. Ηλίας Ζιντζαράς</b><br>Καθηγητής Βιομαθηματικών - Βιομετρίας,<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                  |
| <b>5ος Εξεταστής</b>                 | <b>Δρ. Ζήσης Μαμούρης</b><br>Καθηγητής Γενετικής Ζωϊκών Πληθυσμών,<br>Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| <b>6ος Εξεταστής</b>                 | <b>Δρ. Ασπασία Τσέζου</b><br>Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο<br>Θεσσαλίας                           |
| <b>7ος Εξεταστής</b>                 | <b>Δρ. Γεώργιος Ραχιώτης</b><br>Επίκουρος Καθηγητής Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,<br>Πανεπιστήμιο Πατρών                      |

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Επιδημιολογίας κο Χατζηχριστοδούλου Χρήστο και πρώην διευθυντή μου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω αυτή τη διατριβή καθώς και για τη στήριξή του και την επιστημονική του καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της καθώς και για την εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπό μου, να τεθώ επικεφαλής του μικροβιολογικού τμήματος από το 2009 και για επτά συναπτά έτη. Πορευόμενη δίπλα του είχα την τύχη να αποκτήσω πολύτιμη και σπάνια εμπειρία στον επαγγελματικό στίβο της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας, της επιδημιολογίας και της άσκησης διοίκησης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στους καθηγητές που συνθέτουν την τριμελή επιτροπή και συγκεκριμένα τον καθηγητή Μικροβιολογίας κο Πουρνάρα Σπύρο, ο οποίος είναι ένας από τους κυρίους δασκάλους μου στην κλινική Μικροβιολογία και πάντα αβίαστα μου προσέφερε την ηθική του συμπαράσταση κι επιστημονική του κατάρτιση καθώς και τον καθηγητή Πνευμονολογίας κο Γουργουλιάνη Κων/νο, που με στήριξε και με καθοδήγησε επιστημονικά μέσα από το πρίσμα του αντικειμένου του.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω από αυτές μου τις ευχαριστίες, τον καθηγητή Μικροβιολογίας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας, κο Βατόπουλο Άλκη, ο οποίος πρώτα πίστεψε σε μένα και μου εμπιστευτήκε στελέχη Λεγεωνέλλας από τη συλλογή του εργαστηρίου του και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπαιδευτώ στην περιβαλλοντική και μοριακή μικροβιολογία και να εκπονήσω μέρος των πειραμάτων στο εργαστήριο της έδρας του στην ΕΣΔΥ.

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει και στο εργαστήριο «Institute of Medical Microbiology and Hygiene», του τμήματος Ιατρικής, στη Δρέσδη της Γερμανίας και τον καθηγητή J.H.Helbig για την πραγματοποίηση της τυποποίησης κατά Mab, αφιλοκερδώς.

Επίσης ευχαριστώ την εταιρεία Applied Maths Info για την άδεια που μου έδωσε να δημοσιεύσω αυτά τα δεδομένα, μιας και το Gelcompare II χρησιμοποιήθηκε σε δωρεάν δοκιμή.

Πολλά ευχαριστώ στο προσωπικό των εργαστηρίων όπου πραγματοποιήθηκε η εκτέλεση των πειραμάτων της διατριβής αυτής. Αρχικά ευχαριστίες στο προσωπικό του μικροβιολογικού εργαστηρίου της ΕΣΔΥ και κυρίως στην Βιολόγο, κα Βουρλή Σοφία

καθώς και τον ιατρό Μικροβιολόγο, κο Βελονάκη Μανώλη για την καίρια συμβολή τους στην τεχνική εκτέλεση των πειραμάτων. Τέλος θερμές ευχαριστίες στο προσωπικό του εργαστηρίου Υγιεινής κι Επιδημιολογίας του Ιατρικού τμήματος Λάρισας για την βοήθεια, ανοχή και συμπαράστασή του όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στους Βαρβάρα Μουχτούρη, Γιούλη Κρίστο, Αντώνη Κατσιούλη, Φωτεινή Κολοκυθοπούλου, Πέρσα Τσερκέζου, Κώστα Δασκαλόπουλο και Αφροδίτη Λεοντίση για την έμπρακτη βοήθειά τους.

Η διατριβή στηρίχθηκε οικονομικά σε πόρους της ΕΣΔΥ για την εκπόνηση του πρώτου μέρους των πειραμάτων καθώς και σε πόρους του Εργαστηρίου Υγιεινής κι Επιδημιολογίας του Ιατρικού τμήματος Λάρισας για την ολοκλήρωση αυτών.

Κατσιαφλάκα Άννα

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ** : **Κατσιαφλάκα Άννα**

**ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ** : Ευριπίδης

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ** : 1/9/1973

**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ** : Κωλέττη 2, Λάρισα. ΤΚ: 41222

**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ** : 2410-623508, ΚΙΝ: 6974018020  
e-mail : akatsaf@med.uth.gr

**ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ** : Έγγαμη με 2 παιδιά

**ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ** : ΑΓΓΛΙΚΑ, Άριστη γνώση  
(Proficiency Michigan)

### ΣΠΟΥΔΕΣ

- 6/2009 : **ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**  
Εργαστήρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Π.Π.Γ.Ν. Λάρισας
- 5/2005 : **ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΔΙΔΑΚΤΩΡ**  
Ιατρικού τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΘΕΜΑ: «Τυποποίηση στελεχών Legionella pneumophila ομάδας οροτύπων 2-14 και ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας»

- 2001-2002 : **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
**ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ** με Γενικό Βαθμό : ΑΡΙΣΤΑ  
Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας (Ε.Σ.Δ.Υ.)
- 1993-2000 : **ΠΤΥΧΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
Ιατρικό Τμήμα της Σχολής Επαγγελματιών Υγείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 11/2017 έως σήμερα: Επιμελήτρια Β' (ΕΣΥ) στο μικροβιολογικό εργαστήριο του ΓΝ Λάρισας.
- 11/2015 - 11/2016: Επικουρική ιατρός ΠΕΔΥ –ΜΥ Λάρισας, με μερική απόσπαση στο εργαστήριο Υγιεινής κι Επιδημιολογίας του ΠΓΝ Λάρισας

- 11/2015 - 11/2016: Επικουρική ιατρός ΠΕΔΥ –ΜΥ Λάρισας, με μερική απόσπαση στο εργαστήριο Υγιεινής κι Επιδημιολογίας του ΠΓΝ Λάρισας
- 10/2010 - 10/2015:Τεχνική υπεύθυνη Μικροβιολογικού Τομέα στο Περιφερειακό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας Θεσσαλίας (Συλλειτουργία με εργαστήριο Υγιεινής κι Επιδημιολογίας)
- 8/2009 - 8/2010 : Επικουρική επιμελήτρια Β΄ στο εργαστήριο Υγιεινής κι Επιδημιολογίας του Π.Π.Γ.Ν. Λάρισας
- 9/2002 - 16/2009 :Απόκτηση της ιατρικής ειδικότητας της Ιατρικής Βιοπαθολογίας
- 5/2000 - 8/2001 : Άσκηση Υπαίθρου (Αγροτικό) στο Π.Ι. Δελερείων (Αργυροπούλι) του Κ.Υ. Τυρνάβου

### **ΣΥΝΕΔΡΙΑ/ΗΜΕΡΙΔΕΣ – ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ/ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΕΙΣ**

Παρακολούθηση πολλών συνεδρίων και ημερίδων σχετικά με την Περιβαλλοντική, Κλινική Μικροβιολογία και τη Δημόσια Υγεία σε Ελλάδα και εξωτερικό. Επίσης έχω κάνει αρκετές διαλέξεις σε συνέδρια και ημερίδες καθώς και προφορικές ανακοινώσεις και πόστερ.

Παρακολούθηση αρκετών σεμιναρίων, ΚΕΚ, κλινικών φροντιστηρίων σε Ελλάδα και Εξωτερικό.

### **ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ**

- Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Μεταπτυχιακό πρόγραμμα εφαρμοσμένης δημόσιας υγείας και περιβαλλοντικής υγιεινής.  
Από 5/2009 – 10/2016: Υπεύθυνη για την οργάνωση και Εκπαιδύτρια σε εργαστήρια του προγράμματος σπουδών των μεταπτυχιακών φοιτητών στο μάθημα Γενική Μικροβιολογία, Περιβαλλοντική Μικροβιολογία και εργαστηριακός έλεγχος τροφίμων και υδάτων.
- Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Ιατρικό τμήμα Λάρισας.  
Από 5/2009 – 10/2016: Υπεύθυνη για την οργάνωση και Εκπαιδύτρια σε εργαστήρια του προγράμματος σπουδών του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο μάθημα «Κοινωνική και Προληπτική Ιατρική» που διδάσκεται στο 8<sup>ο</sup> εξάμηνο.
- ΤΕΙ Θεσσαλίας. Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστημιακή υπότροφος.  
Μάθημα: 1. Μυκητολογία-Παρασιτολογία 2. Γενική Μικροβιολογία.

### **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ**

Συμμετοχή σε 11 Δημοσιεύσεις σε ξενόγλωσσα περιοδικά, 2 σε ελληνικά και σε 1 κεφάλαιο ενός ξενόγλωσσου βιβλίου.

**«ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑΣ ΡΝΕΥΜΟΡΗΙΛΑ  
ΟΡΟΤΥΠΩΝ 2-14 ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΝΑ ΚΑΤΣΙΑΦΛΑΚΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου,** *Καθηγητής Υγιεινής κι Επιδημιολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
(Επιβλέπων)*
- 2. Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας,** *Καθηγητής Μικροβιολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών*
- 3. Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης,** *Καθηγητής Πνευμονολογίας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*



## Περίληψη

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να εξερευνήσει την διασπορά, την κλωνικότητα και τη λοιμογονικότητα της *Legionella pneumophila* (*L.pneumophila*) οροτύπων 2-14 στο Ελληνικό περιβάλλον. Ογδόντα στελέχη *L.pneumophila* οροτύπων 2-14 που απομονώθηκαν από το δίκτυο πόσιμου νερού των ξενοδοχείων, νοσοκομείων, αθλητικών εγκαταστάσεων και φέρυ στην Ελλάδα οροτυπήθηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα (Mabs) και αναλύθηκαν με μοριακή ανάλυση με amplified fragment length polymorphism (AFLP) για γενετική διάκριση. Πενήντα έξι από τα ογδόντα στελέχη τυποποιήθηκαν επίσης με τη μέθοδο της διαδοχικής αλληλούχισης SBT. Όλα τα στελέχη αναλύθηκαν περαιτέρω για την ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας: *Legionella vir homologue* (*lvh*) και repeats in structural toxin (*rtxA*). Τριάντα επτά στελέχη (46,2%) ανήκαν στον ορότυπο 6, 26 στελέχη (32,5%) στον ορότυπο 3, και 7 (8,8%) σε άλλους οροτύπους (4,5,8, και 10). Δέκα στελέχη (12,5%) ήταν μη τυποποίησιμα στους γνωστούς οροτύπους (NT). Τριανταεννέα διαφορετικοί AFLP τύποι βρέθηκαν ανάμεσα στα 80 στελέχη *L.pneumophila* οροτύπων 2-14 και 24 διαφορετικοί SBT τύποι βρέθηκαν στα 56 στελέχη που δοκιμάστηκαν. Ανάμεσα στα 80 στελέχη, ο γενετικός τύπος *lvh* βρέθηκε σε 75 (93,8%), ο γενετικός τύπος *rtxA* βρέθηκε σε 76 (95%), και οι δύο γενετικοί τύποι βρέθηκαν σε 73 (91,3%) στελέχη. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η γενετική ποικιλότητα της *L.pneumophila* οροτύπων 2-14 στο ελληνικό περιβάλλον καθώς και το υψηλό ποσοστό των γενετικών τύπων παθογονικότητας. Η εισαγωγή ενός αποτελεσματικού διαγνωστικού τεστ για την *L.pneumophila* οροτύπων 2 - 14 σε ούρα και η προώθηση της εξέτασης δειγμάτων του αναπνευστικού για τους νοσηλευόμενους ασθενείς για πνευμονία στα ελληνικά νοσοκομεία είναι απαραίτητη.

## Πίνακας Περιεχομένων

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	18
2.1 Ταξινόμηση .....	18
2.2 Μορφολογία – Βιοχημικά χαρακτηριστικά .....	23
2.3 Διαγνωστικές μέθοδοι Λεγεωνελλώσεων .....	25
2.3.1 Καλλιέργεια της Λεγεωνέλλας .....	25
2.3.2 Ανίχνευση της Λεγεωνέλλας με DFA .....	27
2.3.3 Ορολογική διάγνωση.....	29
2.3.4 Ανίχνευση αντιγόνου στα ούρα.....	32
2.3.5 Μοριακές τεχνικές.....	39
2.4 Τυποποίηση της <i>Legionella</i> spp. ....	44
2.4.1 Ανάλυση πλασμιδιακού DNA .....	45
2.4.2 Πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (Restriction Fragment Length Polymorphism- RFLPs).....	45
2.4.3 PCR με τυχαίες αφετηρίες.....	46
2.4.4 Ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου σε πήκτη αгарόζης (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE).....	47
2.4.5 Whole-genome sequencing (WGS): Αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος.....	49
2.4.6 Τυποποίηση με MALDI-TOF MS.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ .....	52
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ .....	52
3.1 Πηγές μετάδοσης της Λεγεωνέλλας.....	53
3.2 Οδηγίες για έλεγχο και πρόληψη της νόσου των Λεγεωναρίων .....	54
3.3 Σχέση με την αμοιβάδα.....	54
3.4 Σχέση με τις βιομεμβράνες .....	55
3.5 Παθογένεση.....	57
3.5.1 Ο ενδοκυττάριος κύκλος .....	57
3.5.2 Παράγοντες λοιμογονικότητας .....	63
4.1 Κλινικές μορφές της Λεγεωνέλλωσης .....	68
4.1.1 Πυρετός Pontiac.....	68
4.1.2 Νόσος των Λεγεωναρίων .....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ .....	76

5.1 Η έκταση της νόσου .....	76
5.2 Κατανομή και Επιδημιολογικοί Δείκτες της Λεγεωνέλλωσης .....	76
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>97</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>98</b>
6.1 Συλλογή δειγμάτων.....	98
6.1.1 Γενικά .....	98
6.1.2 Συχνότητα δειγματοληψίας.....	99
6.1.3 Επιλογή θέσης και λήψη δειγμάτων.....	99
6.1.4 Χειρισμός δειγμάτων .....	103
6.2 Εκτέλεση πειραματικού μέρους.....	105
6.2.1 Ανίχνευση και καταμέτρηση Λεγεωνέλλας σε δείγματα νερού.....	106
6.2.2 Ορολογική τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας .....	113
6.2.3 Μοριακή τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας .....	117
6.2.4 Ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας .....	135
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>141</b>
7.1 Ανίχνευση και καταμέτρηση Λεγεωνέλλας σε δείγματα νερού .....	141
7.2 Ορολογική τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας .....	142
7.3 Μοριακή τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας .....	142
7.4 Ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας .....	158
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>162</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>170</b>

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το βακτήριο της Λεγεωνέλλας ανακαλύφθηκε πρώτη φορά το **1976**. Αφορμή στάθηκε μία μεγάλη έξαρση κρουσμάτων άτυπης πνευμονίας σε μέλη της Αμερικανικής Λεγεώνας που συμμετείχαν στην 58η ετήσια συνέλευση αυτών στο Bellevue Stratford Hotel της Φιλαδέλφεια, στην Πενσυλβάνια των Η.Π.Α. Το όνομα «Λεγεωνέλλα» δόθηκε εξαιτίας των προσβληθέντων μελών της Λεγεώνας και η νόσος ονομάστηκε «Νόσος των Λεγεωναρίων».

Η συγκεκριμένη έξαρση κρουσμάτων ξεκίνησε στις 21 Ιουλίου του **1976** και διήρκησε 3 ημέρες. Πάνω από 2000 άτομα, κυρίως άντρες, παρακολούθησαν το συνέδριο. Η ημερομηνία και ο τόπος διεξαγωγής είχε επιλεγθεί για να συμπίπτει με τη 200<sup>η</sup> επέτειο της Αμερικής για τη διακήρυξη της ανεξαρτησίας στη Φιλαδέλφεια το 1776. Ο πρώτος θάνατος εμφανίστηκε τρεις ημέρες μετά τη λήξη του συνεδρίου και αποδόθηκε σε καρδιακή προσβολή. Ακολούθησαν κι άλλοι 4 οι οποίοι αποδόθηκαν επίσης σε καρδιακή προσβολή. Όλοι είχαν παραπονεθεί για αίσθημα κούρασης, πόνο στο στήθος, πνευμονική συμφόρηση και πυρετό.

Τρεις από τους Λεγεωνάριους υπήρξαν ασθενείς του ίδιου γιατρού του Ernest Campbell, ενός γιατρού στο Bloomsburg της Πελσυνβάνια, ο οποίος παρατήρησε ότι και οι τρεις άνδρες βρέθηκαν στο συνέδριο. Τότε επικοινωνήσε με το αντίστοιχο τμήμα Υγείας στην Πενσυλβάνια και ξεκίνησαν οι διαδικασίες επιδημιολογικής έρευνας. Το ξενοδοχείο έκλεισε τελικά το Νοέμβριο του 1976, τέσσερις μήνες μετά την έναρξη της έξαρσης κρουσμάτων.

Τα κρούσματα τελικά ήταν 221 με συμπτώματα άτυπης πνευμονίας. Από αυτά 34 άτομα πέθαναν (Brenner et al.,1979; Fraser et al, 1977).



**Εικόνα 1:** Το ξενοδοχείο Bellevue-Stratford το 1976, όπου έγινε η πρώτη γνωστή έξαρση κρουσμάτων της νόσου των Λεγεωναρίων.

(Πηγή: [http://en.wikipedia.org/wiki/1976\\_Philadelphia\\_Legionnaires'\\_disease\\_outbreak](http://en.wikipedia.org/wiki/1976_Philadelphia_Legionnaires'_disease_outbreak))

Το CDC αναγνώρισε το μικροοργανισμό ένα χρόνο αργότερα το **1977**. Ο Joseph McDade έκανε την ανακάλυψη ότι ένα βακτήριο που είχε ανακαλυφθεί νωρίτερα ήταν η αιτία της έξαρσης. Δεν το είχαν σκεφτεί νωρίτερα διότι θεωρούσαν ότι το συγκεκριμένο βακτήριο μόλυνε μόνο ζώα. Συγκεκριμένα στον Ιανουάριο του 1977, απομονώθηκε και προσδιορίστηκε το βακτήριο της Λεγεωνέλλας και βρέθηκε ότι φώλιαζε και αναπτυσσόταν στον πύργο ψύξης του συστήματος κλιματισμού του ξενοδοχείου, όπου διασκορπίστηκε σε όλο το κτίριο. Αυτό το εύρημα οδήγησε σε νέους κανονισμούς παγκοσμίως για τον έλεγχο των συστημάτων κλιματισμού.



**Εικόνα 2:** C.D.C. οι τεχνολόγοι George Gorman (αριστερά) και Jim Feeley, εξετάζοντας τρυβλία όπου τα πρώτα απομονωθέντα περιβαλλοντικά στελέχη *Legionella pneumophila* έχουν αναπτυχθεί.

(Πηγή: [http://en.wikipedia.org/wiki/1976\\_Philadelphia\\_Legionnaires'\\_disease\\_outbreak](http://en.wikipedia.org/wiki/1976_Philadelphia_Legionnaires'_disease_outbreak))

Το **1979** το γένος *Legionella* επικράτησε μετά από την μεγάλη έξαρση κρουσμάτων πνευμονίας μεταξύ μελών της Αμερικανικής Λεγεώνας που συνέβη 3 χρόνια νωρίτερα (Brenner et al., 1979; Fraser et al., 1977) και η κατάλληλη ιχνηλάτηση κατέληξε σε ένα μη αναγνωρισμένο ως τότε βακτήριο, τη *Legionella pneumophila* (McDade et al., 1977).

Αν και η Λεγεωνέλλα έγινε ευρέως γνωστή από την έξαρση κρουσμάτων στη Φιλαδέλφεια το 1976, δεν ήταν τότε η πρώτη φορά που απομονώθηκε. Τα πρώτα στελέχη Λεγεωνέλλας απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια πειραμάτων. Αρχικά από τον Tatlock το **1943** σε ινδικά χοιρίδια χρησιμοποιώντας μεθόδους για την απομόνωση της *Rickettsia* (Tatlock, 1944). Στη συνέχεια το **1947** ένα άλλο στέλεχος απομονώθηκε από τον Jackson και την ομάδα του (Jackson et al., 1952), ενώ ο Drozanski το **1954** απομόνωσε ένα βακτήριο που μόλυνε ελεύθερες αμοιβάδες από το χώμα στην Πολωνία (Drozanski, 1956).

Η πρώτη γνωστή έξαρση κρουσμάτων της νόσου των Λεγεωναρίων συνέβη στο Ώστιν της Μινεσότα, το καλοκαίρι του **1957**, είκοσι σχεδόν χρόνια πριν από το έτος – ορόσημο 1976 (Osterholm et al.,1983). Εβδομήντα οχτώ άνθρωποι από αυτή την πόλη των 30.000 κατοίκων ανέπτυξαν πνευμονία μεταξύ Ιουνίου και Αυγούστου. Ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ασθένεια ήταν το να δουλεύει κάποιος στις εγκαταστάσεις συσκευασίας κρέατος της πόλης, αν και 40% των κρουσμάτων δεν δούλευε εκεί. Η θεραπεία με αντιβιοτικά δεν οδηγούσε σε εμφανή βελτίωση, αλλά το 97% των ανθρώπων ανάρρωσε σε 2-14 ημέρες από την έναρξη της ασθένειας. Η πηγή της επιδημίας δε βρέθηκε ποτέ και η πνευμονία δεν εμφανίσθη ξανά στα επόμενα χρόνια. Το μυστήριο του αιτίου της επιδημίας λύθηκε 22 χρόνια μετά, από έρευνα στους επιζήσαντες. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι επιζήσαντες είχαν σημαντικά υψηλές συγκεντρώσεις σε αντισώματα έναντι της *L.pneumophila* σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Επειδή και οι εργαζόμενοι στο εργοστάσιο συσκευασίας αλλά και άτομα που δεν εργάζονταν εκεί αρρώστησαν, πιστεύεται ότι η αιτία πρέπει να προήλθε από κάποιο πύργο ψύξης.

Μία ακόμη έξαρση κρουσμάτων καταγράφηκε το **1965** στο ψυχιατρικό νοσοκομείο St. Elizabeth's, στην Ουάσιγκτον, DC (Thacker et al, 1978). Καταμετρήθηκαν 81 ασθενείς με πνευμονία, από τους οποίους οι 14 πέθαναν. Ο ύπνος κοντά σε ανοιχτά παράθυρα και το να έχει κάποιος άδεια να περπατήσει σε εξωτερικούς χώρους βρέθηκαν να είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντας κινδύνου για την απόκτηση της πνευμονίας. Η εκσκαφή χώματος για ένα ψεκαστικό σύστημα γκαζόν προκαλούσε πολύ σκόνη. Μία δυνατή ανεμοθύελλα και καλοκαιρινές βροχές σημειώθηκαν παράλληλα με την έξαρση, η οποία τελείωσε απότομα και ταυτόχρονα με την παύση των εργασιών εκσκαφής.

Θεωρήθηκε ότι το αίτιο προερχόταν από χώμα ή σκόνη. Εκτεταμένες μικροβιολογικές αναλύσεις των πνευμόνων των νεκρών ασθενών και του περιβάλλοντος του νοσοκομείου δεν οδήγησαν σε αποκάλυψη του αιτιολογικού παράγοντα. Παρόλ' αυτά ανάλυση αποθηκευμένων ορών το 1977 έδειξε ότι 19 από τους 26 ασθενείς που εξετάστηκαν είχαν αντισώματα έναντι της *L.pneumophila* οροτύπου 1. Οι επιδημιολογικές έρευνες που ακολούθησαν υπέδειξαν ως σπάνια αιτία την εκσκαφή χώματος, ενώ οι διακοπές της παροχής νερού και μόλυνση των δικτύων ύδρευσης κατά τη διάρκεια της κατασκευής δόθηκαν ως εναλλακτικές ερμηνείες (Mermel et al, 1995).

Ένας πρόλογος της επιδημίας του 1976 υπήρξε μία προηγούμενη που συνέβη στη Φιλαδέλφεια το **1974** (Terranova et al, 1977). Περίπου 1500 μέλη του «Independent Order of Odd Fellows» παρακολούθησε ένα συνέδριο στο Bellevue Stratford Hotel, το ίδιο στο οποίο εξελίχθηκε η ιστορική επιδημία του 1976. «The Independent Order of Odd Fellows» είναι μία αδελφότητα της Αγγλίας που χρονολογείται από τον 18<sup>ο</sup> αιώνα. Είκοσι μέλη ανέπτυξαν πνευμονία σε μία έως εννέα ημέρες μετά από την παρακολούθηση του συνεδρίου τους στις 16 Σεπτεμβρίου στην μεγάλη αίθουσα χορού του ξενοδοχείου. Δύο άνθρωποι από αυτούς απεβίωσαν. Ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου για την πνευμονία ήταν η παρακολούθηση του συνεδρίου. Ορολογικές μελέτες των επιζώντων και των αντίστοιχων μαρτύρων το 1977 έδειξαν ότι 4 από 11 κρούσματα αλλά όχι οι μάρτυρες είχαν ανεβασμένες συγκεντρώσεις τίτλων αντισωμάτων έναντι της *L.pneumophila* οροτύπου 1.

Εντωμεταξύ στην Ισπανία μία μη αναγνωρισμένη επιδημία πνευμονίας συνέβαινε μεταξύ Βρετανών τουριστών στο Rio Park Hotel στο Benidorm, ένα παραλιακό θέρετρο στη Costa Blanca (Grist et al, 1979; Bartlett et al, 1984). Από το **1973 έως το 1980**, τουλάχιστον 150 Βρετανοί τουρίστες νόσησαν με τη νόσο των Λεγεωναρίων στο ξενοδοχείο ενδεχομένως στα πλαίσια πολλών ξεχωριστών μικροεπιδημιών. Το 1973, 3 χρόνια πριν από την επιδημία της Φιλαδέλφεια, τουλάχιστο 89 ένοικοι του ξενοδοχείου είχαν εμπύρετη νόσο του αναπνευστικού, τρεις από τους οποίους πέθαναν από πνευμονία, ο ένας εν πτήση από την Ισπανία στη Μ. Βρετανία (Grist et al, 1979). Ορολογικές δοκιμές αποθηκευμένων δειγμάτων ορού έδειξαν ότι η ασθένεια αυτών ήταν η νόσος των Λεγεωναρίων.

Μία διερεύνηση που διεξήχθη το 1980 έδειξε ότι η πηγή της επιδημίας ήταν το σύστημα ύδρευσης του ξενοδοχείου. Το ξενοδοχείο δεν είχε κεντρικό σύστημα κλιματισμού αλλά και οι άλλοι πύργοι ψύξης πλησίον αυτού αποκλείστηκαν ως πιθανές πηγές λόγω επιδημιολογικών δεδομένων. Μηχανολογικές αλλαγές στο σύστημα ύδρευσης του ξενοδοχείου, υπερχλωρίωση και διατήρηση της θερμοκρασίας του θερμού νερού μεταξύ 50 – 60 °C, σταμάτησε την επιδημία.

Το 1968 ανακαλύφθηκε μία άλλη μορφή Λεγεωνέλλωσης, ο **Πυρετός Pontiac**. Τον Ιούλιο του **1968** επισκέπτες και εργαζόμενοι στο τμήμα υγείας του Pontiac στο



Μίσιγκαν ανέπτυξαν μία σχετικά ήπια αυτοπεριοριζόμενη νόσο που ονομάστηκε πυρετός Pontiac (Glick et al, 1978).

Τα κρούσματα νόσησαν σε μία περίοδο αρκετών ημερών όπου τουλάχιστο 144 άτομα προσβλήθηκαν. Νόσησαν 95% από τους εργαζόμενους στο κτίριο και 29% από τους επισκέπτες του κτιρίου. Ο μόνος παράγοντας κινδύνου για την ασθένεια ήταν το να βρίσκεται κάποιος στο κτίριο, με ένα πιο αυξημένο κίνδυνο τη διάρκεια παραμονής στο κτίριο. Μετά από μία περίοδο επώασης των 5-66 ωρών, πυρετός και άλλα συμπτώματα αναπτύχθηκαν. Η ασθένεια διήρκησε για 2-5 ημέρες και παρουσίασε πυρετό, πονοκέφαλο, μυαλγία και κόπωση. Οι περισσότερες περιπτώσεις ανάρρωσαν ομαλά χωρίς επιπλοκές αν και για ένα μικρό ποσοστό των θυμάτων της νόσου απαιτήθηκαν μήνες προκειμένου να αναρρώσουν από συνοδά νευροψυχιατρικά συμπτώματα. Καμία περίπτωση δε παρουσίασε πνευμονία. Επανείσοδος στο κτίριο μετά την ανάρρωση από τη νόσο οδήγησε σε μικρότερο ρυθμό προσβολής, γύρω στο 10-45% και συσχετίστηκαν με ηπιότερα συμπτώματα σε σχέση με την πρώτη προσβολή. Οι έρευνες ήταν αρνητικές για αλλεργικές αντιδράσεις σε γνωστά αλλεργιογόνα, για γνωστές τοξίνες και ιογενείς λοιμώξεις. Ως πηγή της ασθένειας θεωρήθηκε ότι ήταν μία διαρροή στο σύστημα κλιματισμού του κτιρίου που επέτρεπε στο νερό από το σύστημα του εξατμιστικού συμπυκνωτή να εισέλθει στον κυκλοφορούντα αέρα. Η διακοπή της λειτουργίας του συστήματος κλιματισμού εξαφάνιζε τον κίνδυνο της νόσου, ενώ επαναλειτουργία αυτού προκαλούσε ξανά την νόσο.

Ινδικά χοιρίδια που τοποθετήθηκαν στο κτίριο κατά τη διάρκεια της έξαρσης κρουσμάτων ανέπτυξαν πνευμονικά οζίδια (Kaufmann et al., 1981).

Στο CDC, περαιτέρω πειράματα σε ινδικά χοιρίδια με αερόλυμα νερού από τον εξατμιστικό συμπυκνωτή προκάλεσε πνευμονία στα ζώα, αλλά δεν πάθαιναν τίποτε όταν το νερό είχε φιλτραριστεί ή αποστειρωθεί. Εκτεταμένες μικροβιολογικές μελέτες στους πνεύμονες ινδικών χοιριδίων δεν κατάφερε να αποκαλύψει ένα αιτιολογικό παράγοντα. Ο υπάλληλος του CDC που δημιουργούσε τις μελέτες με τα αερολύματα, αρρώστησε με τη νόσο που στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι επρόκειτο για τη νόσο των Λεγεωναρίων (US Department of Health, 1993).

*L.pneumophila* ορότυπος 1 απομονώθηκε με καλλιέργεια από ορισμένους πνεύμονες νοσούντων ινδικών χοιριδίων που φυλάσσονταν υπό κατάψυξη, αφού είχε γίνει γνωστή

η νόσος των Λεγεωναρίων (Kaufmann et al., 1981). Ένα από αυτά τα στελέχη, Pontiac 1 αποτελεί τον τύπο Pontiac σύμφωνα με τους τύπους μονοκλωνικών αντισωμάτων. Επιπρόσθετα, ορός των ασθενών από τον πυρετό Pontiac περιείχαν αντισώματα έναντι της *L.pneumophila*.

Το **1986** ιδρύθηκε η Ευρωπαϊκή ομάδα εργασίας για τις λοιμώξεις από Λεγεωνέλλα (The European Working Group for Legionella Infections- EWGLI). Μέλη του είναι επιστήμονες με ενδιαφέρον στο να βελτιώνουν τη γνώση και την ενημέρωση σε επιδημιολογικά και μικροβιολογικά θέματα της νόσου των Λεγεωναρίων. Αυτό επιτεύχθηκε με την διεθνή επιτήρηση της νόσου καθώς και με τις εξελίξεις στη διάγνωση, διαχείριση και μεθόδους θεραπείας (European working group for *Legionella* infections, 2002).

Το **1996** αυτός ο μικροοργανισμός ταξινομήθηκε σε είδη του γένους *Legionella* (Hookey et al., 1996).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

### 2.1 Ταξινόμηση

Η οικογένεια των *Legionellaceae* αποτελείται από ένα μόνο γένος, αυτό της *Legionella*.

Άλλα δύο γένη έχουν προταθεί αλλά δεν έχουν τύχει γενικότερης αποδοχής (Garrity, Brown&Vickers, 1980): Το *Fluoribacter* για το μπλε – άσπρο φθορίζον είδος όπως τα είδη *L.bozemanii* και *L.dumoffii*, καθώς και το όνομα *Tatlockia* για το είδος *L.micdadei*.

Μελέτες που χρησιμοποίησαν την 16Sr RNA ανάλυση επιβεβαιώνουν ότι η οικογένεια *Legionellaceae* είναι μία μονήρης μονοφυλετική υποομάδα μέσα στην υποδιαίρεση γάμμα-2 των *Proteobacteria* (Benson et al, 1998; Fry et al, 1991). Φυλογενετικά ο πλησιέστερος συγγενής της οικογένειας *Legionellaceae* είναι η *Coxiella burnettii*, ο αιτιολογικός παράγοντας του πυρετού Q (Adeleke et al, 1996; Swanson et al, 2000). Αυτοί οι οργανισμοί έχουν παρόμοια ενδοκυττάρια ζωή και μπορούν να χρησιμοποιήσουν κοινά γονίδια για να μολύνουν τον ξενιστή τους.

Ο αριθμός των ειδών και οροτύπων διαρκώς αυξάνεται.

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως υπάρχουν 52 είδη που αποτελούνται πάνω από 70 διακριτούς οροτύπους για το γένος της Λεγεωνέλλας (Πίνακας 1). Υπάρχουν τρία υποείδη της *L.pneumophila* τα οποία είναι:

- *Legionella pneumophila* subspecies *fraseri*,
- *Legionella pneumophila* subspecies *pascullei* and
- *Legionella pneumophila* subspecies *pneumophila* (Fraser et al, 1977; Centers for Disease and Control, 2011)

Υπάρχουν 16 ορότυποι *L.pneumophila* και δύο για κάθε ένα από τα είδη: *L.bozemanii*, *L.longbeachae*, *L.feelii*, *L.hackeliae*, *L.sainthelensi*, *L.spiritensis*, *L.erythra*, and *L.quinlivanii* και ένας ορότυπος για κάθε άλλο είδος (Benson et al, 1998). Είδη μέσα στις *Legionellaceae* μπορούν να διακριθούν με βιοχημική ανάλυση, προφίλ λιπαρών οξέων,

πρωτεϊνικά προφίλ με ζωνώσεις, ορολογικά και με ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (Benson et al, 1998).

Βιοχημικά δεδομένα για τις Λεγεωνέλλες εκτός της *L.pneumophila* είναι περιορισμένα.

Αρκετά εργαστήρια έχουν περιγράψει μεθόδους για τον προσδιορισμό των στελεχών Λεγεωνέλλας σε επίπεδο γένους και σε ορισμένες περιπτώσεις σε επίπεδο είδους χρησιμοποιώντας κυρίως φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Fox et al, 1979; Harrison and Taylor, 1988; Vesey et al, 1988). Όλες οι Λεγεωνέλλες περιέχουν μεγάλη συγκέντρωση αλύσων λιπαρών οξέων και περιέχουν συνένζυμα Q (ubiquinone) με πλευρικές αλύσους 9 έως 14 μονάδων ισοπροπενίου (Moss et al, 1988). Η χρήση των προφίλ των λιπαρών οξέων και των συνενζύμων Q επιτρέπουν σε όλα τα μέλη της οικογένειας *Legionellaceae* να επιβεβαιωθούν σε επίπεδο γένους. Αν και όλα τα στελέχη δε μπορούν να προσδιοριστούν με αξιοπιστία σε επίπεδο είδους, η ομαδοποίηση αυτών διευκολύνει την εφαρμογή περαιτέρω ορολογικών και επιπρόσθετων επιβεβαιωτικών δοκιμών.

Οι *Legionellae* έχουν ταξινομηθεί βάσει των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διαλυτών πεπτιδίων με την ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) και του πρωτεϊνικού προφίλ των αυτόχθονων (native) πρωτεϊνών με την PAGE με προφίλ ζωνώσεων διαλυτών κυτοπλασματικών πρωτεϊνών (Ferguson et al., 1983; Lema et al., 1987). Αυτή η μέθοδος φαίνεται να είναι συμπληρωματική στην ανάλυση με φθορίζον αντίσωμα, την ανάλυση λιπαρών οξέων και συνενζύμου Q (ubiquinone) για τον προσδιορισμό των *Legionella* spp πριν τον υβριδισμό του DNA.

**Πίνακας 1.** Τα είδη και οι ορότυποι της *Legionella*<sup>(a)</sup>

Αύξων Αριθμός	Είδη	Αριθμός οροτύπων	Αριθμός οροτύπων που σχετίζονται με νόσο στον άνθρωπο
1	<i>L.pneumophila</i>	16	15
2	<i>L.bozemanii</i>	2	2
3	<i>L.dumoffii</i>	1	1

Αύξων Αριθμός	Είδη	Αριθμός οροτύπων	Αριθμός οροτύπων που σχετίζονται με νόσο στον άνθρωπο
4	<i>L.micdadei</i>	1	1
5	<i>L.longbeachae</i>	2	2
6	<i>L.jordanis</i>	1	1
7	<i>L.wadsworthii</i>	1	1
8	<i>L.hackeliae</i>	2	2
9	<i>L.feeleii</i>	2	2
10	<i>L.maceachernii</i>	1	1
11	<i>L.birminghamensis</i>	1	1
12	<i>L.cincinnatiensis</i>	1	1
13	<i>L.gormanii</i>	1	1
14	<i>L.sainthelensi</i>	2	2
15	<i>L.tucsonensis</i>	1	1
16	<i>L.anisa</i>	1	1
17	<i>L.lansingensis</i>	1	1
18	<i>L.erythra</i>	2	1 <sup>(β)</sup>
19	<i>L.parisiensis</i>	1	1
20	<i>L.oakridgensis</i>	1	1
21	<i>L.spiritensis</i>	1	0
22	<i>L.jamestowniensis</i>	1	0
23	<i>L.santicrucis</i>	1	0

Αύξων Αριθμός	Είδη	Αριθμός οροτύπων	Αριθμός οροτύπων που σχετίζονται με νόσο στον άνθρωπο
24	<i>L. cherrii</i>	1	0
25	<i>L. steigerwaltii</i>	1	0
26	<i>L. rubrilucens</i>	1	0
27	<i>L. israelensis</i>	1	0
28	<i>L. quinlivanii</i>	2	0
29	<i>L. brunensis</i>	1	0
30	<i>L. moravica</i>	1	0
31	<i>L. gratiana</i>	1	0
32	<i>L. adelaidensis</i>	1	0
33	<i>L. fairfieldensis</i>	1	0
34	<i>L. shakespearei</i>	1	0
35	<i>L. waltersii</i>	1	0
36	<i>L. genomospecies</i>	1	0
37	<i>L. quateirensis</i>	1	0
38	<i>L. worsleiensis</i>	1	0
39	<i>L. geestiana</i>	1	0
40	<i>L. natarum</i>	1	0
41	<i>L. londoniensis</i>	1	0
42	<i>L. taurinensis</i>	1	0
43	<i>L. lytica</i>	1	0

Αύξων Αριθμός	Είδη	Αριθμός οροτύπων	Αριθμός οροτύπων που σχετίζονται με νόσο στον άνθρωπο
44	<i>L. drozanskii</i>	1	0
45	<i>L. rowbothamii</i>	1	0
46	<i>L. fallonii</i>	1	0
47	<i>L. gresilensis</i>	1	0
48	<i>L. beliardensis</i>	1	0

(α) Τα είδη παρουσιάζονται με χρονολογική σειρά βάσει της ημερομηνίας απομόνωσης ή ταυτοποίησης.

(β) Ο ορότυπος 2 της *L. erythra* έχει σχετιστεί με νόσο στον άνθρωπο.

(Πηγή: [Fields BS](#), \* [Benson RF](#), and [Besser RE](#). “*Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation”, [Clin Microbiol Rev](#). 2002 Jul; 15(3): 506–526).

Προσδιορισμός των ειδών της Λεγεωνέλλας με ορολογικές μεθόδους είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική. Αντιοροί που παράγονται από κουνέλια έχουν ετοιμασθεί έναντι όλων των ειδών και οροτύπων και έχουν χρησιμοποιηθεί από το εργαστήριο του Centers for Disease Control and Prevention (CDC) προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα περισσότερα στελέχη Λεγεωνέλλας με ένα τεστ οροσυγκόλλησης (Benson, and Fields, 1998; Thacker et al,1985). Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτοί οι αντιοροί βρέθηκαν να παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με νέους οροτύπους και είδη που δεν είχαν προσδιοριστεί προηγουμένως. Διασταυρούμενη αντίδραση με μη *Legionella* βακτήρια έχουν αναφερθεί για αρκετούς από αυτούς τους αντιορούς. (Benson et al,1987; Edelstein et al, 1980; Jimenez-Lucho et al, 1994). Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι αντιγόνων του γένους έχουν παραχθεί για να διευκολύνουν τον προσδιορισμό των ειδών. Αρκετοί ερευνητές έχουν παράξει μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της *Legionella* heatshock πρωτεΐνης με ποικίλλου βαθμού ειδικότητα (Sampson et al, 1991; Steinmetz et al,1991). Οι Helbig et al παρήγαγαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης *mip* τα οποία αντέδρασαν με 82 στελέχη *Legionella* που αντιπροσώπευαν 34 είδη (Helbig et al, 1995). Ένα ευρύ αντίσωμα γένους έναντι του μαστιγίου παράχθηκε από τον Bornstein et al. (Bornstein et al, 1991). Στην εργαστηριακή ρουτίνα δε

χρησιμοποιούνται όλοι οι μεμονωμένοι αντιροοί για τον προσδιορισμό όλων των λεγεωνελλών.

Παλαιότερα ο υβριδισμός DNA-DNA θεωρούνταν η καλύτερη διαδικασία για την ταυτοποίηση ενός στελέχους λεγεωνέλλας ή ενός νέου είδους. Αυτή η διαδικασία απαιτεί DNA του υπό εξέταση στελέχους να υβριδισθεί με DNA από όλα τα είδη της *Legionella*. Γι' αυτό μόνο ένας πολύ περιορισμένος αριθμός εργαστηρίων εκτελούσαν αυτή τη διεργασία.

Η αλληλούχιση συγκεκριμένων γονιδίων έχει εφαρμοσθεί για την ταξινομική ανάλυση των Λεγεωνελλών. Η ανάλυση των 16S rRNA γονιδίων οδήγησε στην κατάταξη της *Legionella* μέσα στη γάμμα-2 υποδιαίρεση της τάξης των *Proteobacteria* και χρησιμοποιήθηκε για την φυλογενετική σχέση νεών ειδών του γένους (Fry et al, 1991).

Τα τελευταία χρόνια ένα σχήμα ταξινόμησης βασισμένο στην αλληλούχιση του γονιδίου *mip* έχει αναπτυχθεί (Ratcliff et al, 1998). Αυτή η μέθοδος μπορεί αδιαμφισβήτητα να διακρίνει τα 39 είδη μεταξύ τους. Αναπτύχθηκε από τους επιστήμονες που συμμετέχουν στο ESGLI και υπάρχει διαθέσιμη εφαρμογή στην αντίστοιχη ιστοσελίδα.

Κάποιες Λεγεωνέλλες δεν μπορούν να αναπτυχθούν στα συνήθη θρεπτικά υποστρώματα για τη λεγεωνέλλα και ονομάζονται *Legionella-like amoebal pathogens* (LLAPs) (Rowbotham, 1993). Αυτοί οι οργανισμοί έχουν απομονωθεί και συντηρηθεί με συνκαλλιέργεια του βακτηρίου με το πρωτόζωο ξενιστή τους. Ένα LLAP στέλεχος απομονώθηκε από πτύελα ενός ασθενούς με πνευμονία με εμπλουτισμό σε αμοιβάδες και θεωρήθηκε ανθρώπινο παθογόνο (Rowbotham, 1993). Επιπλέον LLAP στελέχη μπορεί να είναι ανθρώπινα παθογόνα, αλλά δεν μπορεί αυτό εύκολα να αποδειχθεί αφού είναι δύσκολο να ανιχνευθούν με τις συμβατικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη Λεγεωνέλλα (Adeleke et al, 2001).

## **2.2 Μορφολογία – Βιοχημικά χαρακτηριστικά**

Τα είδη του γένους της Λεγεωνέλλας είναι Gram-αρνητικά, μη σπορογόνα, αερόβια πλειομορφικά βακτηρίδια. Γενικά απεικονίζονται ως κοκκοβακτηρίδια σε ιστούς ή εκκρίσεις, αλλά μπορούν να πάρουν και νηματοειδή μορφή στις καλλιέργειες. Οι ελεύθερες ζώσες Λεγεωνέλλες έχουν σχήμα βακτήρου, 0,3-0,9 μm πλάτος και σχεδόν



1,3μm μήκος. Μεγαλώνουν μέχρι 2–6μm in vitro, αλλά μπορούν να σχηματίσουν νηματοειδείς μορφές 2μm ή περισσότερο σε μήκος. Οι Λεγεωνέλλες είναι συνήθως κινητές δεδομένου ότι έχουν ένα ή περισσότερα πολικά ή υποπολικά μαστίγια.

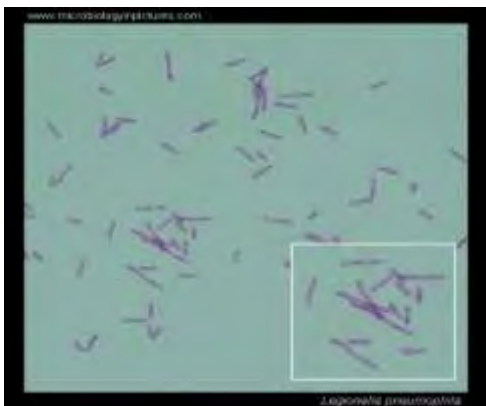
Περιέχουν διακλαδισμένες αλυσίδες λιπαρών οξέων, είναι αζυμωτικά και διατροφικά απαιτητικά μικρόβια. Απαιτείται κυστεΐνη και άλατα σιδήρου για να αναπτυχθούν. Τα μέλη του γένους της Λεγεωνέλλας είναι κυρίως βιοχημικά αδρανή. Είναι καταλάση θετικές, η αντίδραση τη οξειδάσης ποικίλλει και οι αντιδράσεις για την αναγωγή των νιτρικών, της ουρεάσης και η χρήση των υδατανθράκων είναι αρνητικές. Τα αμινοξέα είναι η πηγή άνθρακα για τις Λεγεωνέλλες (Pine et al, 1979), (Benson and Fields, 1998). Τα περισσότερα είδη παράγουν μία β-λακταμάση και υγροποιούν τη ζελατίνη. Τα στελέχη που ανήκουν σε όλους τους οροτύπους της *L. pneumophila* εκτός από τους οροτύπους 4 και 15 υδρολύουν έντονα το ιππουρικό οξύ (Hebert, 1981). Κάποια είδη εκτός της *L. pneumophila* φθορίζουν κάτω από λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) (360nm ± 20nm) δίνοντας μπλε – άσπρο φθορισμό ενώ άλλες δίνουν χρώμα φθορισμού θαμπό κίτρινο ή κεραμιδί.

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από μία κυτταροπλασματική μεμβράνη στην εσωτερική στοιβάδα, ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και μία εξωτερική μεμβράνη που περιέχει τους θερμο-ανθεκτικούς λιποπολυσακχαρίτες (LPS) με ειδικά για το είδος ή για τον ορότυπο αντιγόνα O. Δεν υπάρχει κάποιο αποδεικτικό στοιχείο της ύπαρξης καψιδίου.

**Θερμοκρασία ανάπτυξης:** Η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξή της in-vitro είναι 36°C (όρια 15–43°C), με χρόνο πολλαπλασιασμού 99 λεπτά κάτω από ιδανικές συνθήκες (Brenner, Fealey & Weaver, 1984; Brenner, 1986; Fallon, 1990; States et al, 1993). Στο φυσικό περιβάλλον της στα φρέσκα νερά και στο χώμα για να αναπτυχθεί απαιτεί την παρουσία άλλων βακτηρίων ή πρωτοζώων, τα οποία πιστεύεται ότι είναι τα φυσικά υπόδοχα των Λεγεωνελλών. (Rowbotham, 1980; Tison et al, 1980; Wadowsky & Lee, 1985; Fields et al, 1993)

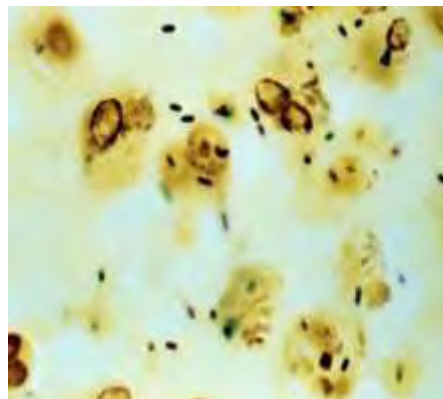
**Χρώσεις:** Παρόλο που οι Λεγεωνέλλες είναι Gram-αρνητικοί μικροοργανισμοί, στην πραγματικότητα χρωματίζονται φτωχά κατά τη διάρκεια της χρώσης Gram όσο και με άλλες παρόμοιες χρωστικές, ιδιαίτερος σε μολυσμένους ιστούς. Αυτό έχει αποδοθεί στην παρουσία των αλυσίδων λιπαρών οξέων που είναι κύριο συστατικό του

κυτταρικού τοιχώματος. Άλλες μέθοδοι έχουν περιγραφεί όπως η μέθοδος εμποτισμού σε άργυρο του Dieterle. (Dieterle, 1927); Οι πιο αποτελεσματικές μέθοδοι περιλαμβάνουν φθορίζουσες χρώσεις με επικάλυψη αντισώματος και χρωστική ανοσοϋπεροξειδάσης.



**Εικόνα3:** *Legionella* Gram Χρώση

(Πηγή: [www.microbiologyinpictures.com](http://www.microbiologyinpictures.com))



**Εικόνα4:** *Legionella* Χρώση Αργύρου

(Πηγή: commons.wikimedia.org, File: Legionella Silver Stain)

## 2.3 Διαγνωστικές μέθοδοι Λεγεωνελλώσεων

### 2.3.1 Καλλιέργεια της Λεγεωνέλλας

*H. L. pneumophila* πρωτο απομονώθηκε με τη χρήση του υποστρώματος Mueller-Hinton με προσθήκη αιμογλοβίνης και IsoVitaleX (MH-IH)(Feeley,1978). Το απαραίτητο συστατικό της αιμογλοβίνης βρέθηκε ότι ήταν μία διαλυτή μορφή σιδήρου και η L-cysteine είναι απαραίτητο αμινοξύ το οποίο παρέχεται από το IsoVitaleX. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε το άγαρ Feeley-Gorman, που παρείχε καλύτερη ανάκτηση του μικροοργανισμού από ιστούς (Feeley,1978). Αργότερα το άμυλο αντικαταστάθηκε με τον άνθρακα ώστε να αποτοξινωθεί το θρεπτικό υπόστρωμα και η πηγή των αμινοξέων άλλαξε σε εκχύλισμα μαγιάς, οδηγώντας στο ανθρακούχο άγαρ με εκχύλισμα μαγιάς (charcoal yeast extract agar) (Feeley, 1979). Το Charcoal yeast extract agar είναι η βάση για τα περισσότερα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη της λεγεωνέλλας. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια της Λεγεωνέλλας έχει βελτιωθεί πολλές φορές, καταλήγοντας σε αυτό που χρησιμοποιείται

τόρα, το ρυθμιστικό ανθρακούχο άγαρ με εκχύλισμα μαγιάς (buffered charcoal-yeast extract - BCYE) εμπλουτισμένο με το α - κετογλουταρικό με και χωρίς εκλεκτικούς παράγοντες να έχουν προστεθεί (Edelstein, 1982; Edelstein, 1981; Pasculle et al, 1980). Οι καλλιέργειες απαιτούν τη χρήση εκλεκτικών και μη εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Αυτά τα θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να ετοιμασθούν με ή χωρίς χρωμογόνους δείκτες που προσδίδουν ένα συγκεκριμένο χρώμα για συγκεκριμένο είδος λεγεωνέλλας (Vickers, 1981). Αν και η πλειονότητα των *Legionella* spp. αναπτύσσονται σε BCYE άγαρ, κάποια απαιτούν την προσθήκη συμπληρώματος με αλβουμίνη ορού βοδιού για να βελτιωθεί η ανάπτυξη του μικροβίου (Morrill et al, 1990). Η καλλιέργεια παραμένει η “gold standard” μέθοδος για τη διάγνωση της Λεγεωνέλλωσης και είναι η πιο ειδική διαγνωστική μέθοδος. Βασιζόμενοι σε καλλιέργειες οροθετικών ασθενών (τετραπλάσια αύξηση τίτλου αντισωμάτων) η ευαισθησία ήταν κοντά στο 60% και ειδικότητα κοντά στο 100% (Edelstein, 1987; Maiwald, Helbig and Luck, 1998). Παρόλ’ αυτά ένας αριθμός παραγόντων περιορίζουν την ευαισθησία της καλλιέργειας. Πρώτα, εργαστήρια έμπειρα στην απομόνωση των λεγεωνελλών είναι πιο πιθανό να ανακτήσουν τον μικροοργανισμό. Μία έρευνα από το κολλέγιο των Αμερικάνων Ιστοπαθολόγων έδειξε ότι τα δύο τρίτα των μικροβιολογικών εργαστηρίων στις Η.Π.Α. δεν είναι σε θέση να καλλιεργήσουν μία καθαρή και άφθονη καλλιέργεια *L. pneumophila* (Edelstein, 1993). Επιπλέον, για τη βελτίωση της ειδικότητας της διάγνωσης της πνευμονίας που προκαλούνται από πυογόνα βακτήρια, τα εργαστήρια των νοσοκομείων συχνά απορρίπτουν δείγματα πτυέλων που περιέχουν πολλά επιθηλιακά κύτταρα ή λίγα πολυμορφοπύρηνα. Παρόλ’ αυτά μερικοί ασθενείς παράγουν μικρή ή καθόλου ποσότητα πτυέλων τα οποία θα αποκλείονταν από την καλλιέργεια ενώ θα μπορούσαν να περιέχουν καλλιεργήσιμη Λεγεωνέλλα (Ingram and Plouffe, 1994). Η αναφερόμενη ευαισθησία της απομόνωσης της Λεγεωνέλλας από την καλλιέργεια ποικίλλει από 20-80% αντανακλώντας τη λιτή φύση αυτών των δειγμάτων και την εμπειρία που απαιτείται (Roig, Domingo and Morera, 1994). Οι Λεγεωνέλλες μπορούν να απομονωθούν από ένα αριθμό δειγμάτων που περιλαμβάνουν το αίμα, πνευμονικό ιστό, βιοψία πνευμονικού ιστού, αναπνευστικές εκκρίσεις (πτυέλα, βρογχοκυψελιδικό έκκριμα και βρογχικό έκπλυμα) και κόπρανα (Edelstein, 1987; Rowbotham, 1994). Οι αναπνευστικές εκκρίσεις θεωρούνται το δείγμα εκλογής (Edelstein, 1987). Σε μία πρόσφατη ανασκόπηση, οι

Maiwald et al πρότειναν ότι το πτύελο ήταν λιγότερο καλό από τις άλλες αναπνευστικές εκκρίσεις ειδικά στην έναρξη της νόσου όπου λίγοι ασθενείς έχουν παραγωγικό βήχα (Maiwald, Helbig and Luck, 1998). Όταν καλλιεργούνται δείγματα πτυέλων είναι προτιμότερο να προεπεξεργαστεί το πτύελο με οξίνιση ή θερμική επεξεργασία (Buesching, Brust and Ayers, 1983; Edelstein, Snitzer and Bridge, 1982). Η Λεγεωνέλλα έχει επίσης καλλιεργηθεί κι από εξωπνευμονικές εστίες όπως μυελό των οστών, προσθετικές βαλβίδες καρδιάς και τραύματα στέρνου (Dournon, 1988; Edelstein, 1993). Αρκετές οδηγίες δίνουν λεπτομερείς μεθόδους για την απομόνωση της *Legionella* spp για κλινικά δείγματα (Dournon, 1988; Stout et al, 1988; Vickers et al, 1987; Wilkinson, 1987).



**Εικόνα 5:** Καλλιέργεια *L.pneumophila* σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα BCYE.

(Πηγή : Αρχείο Εργαστηρίου Υγιεινής κι Επιδημιολογίας, Ιατρικού τμήματος Λάρισας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

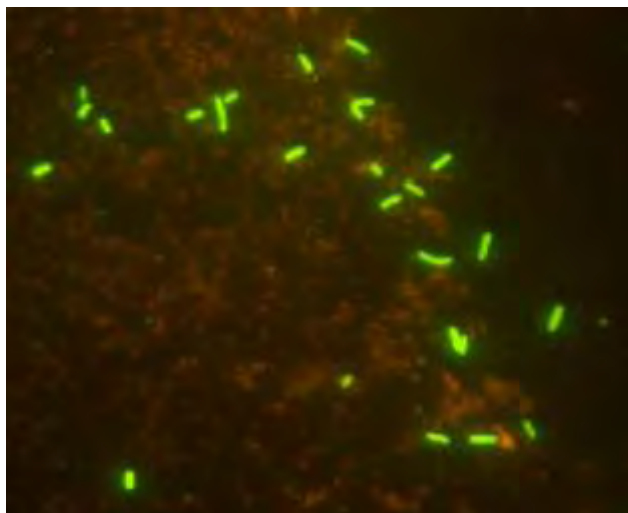
### 2.3.2 Ανίχνευση της Λεγεωνέλλας με DFA

Μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας τη χρώση του άμεσου φθορίζοντος αντισώματος ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της Λεγεωνέλλας σε δείγματα πνευμονικού ιστού (Βιοψία) και σε αναπνευστικές εκκρίσεις. Οι Λεγεωνέλλες μπορούν να ανιχνευθούν στις αναπνευστικές εκκρίσεις με DFA για αρκετές ημέρες μετά την έναρξη της αντιμικροβιακής θεραπείας. DFA χρώση έχει χρησιμοποιηθεί για τον ορολογικό προσδιορισμό των στελεχών

Λεγεωνέλλας όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ένας περιορισμένος αριθμός πολυκλωνικών αντιορών με σύζευξη φλουροσκεΐνης είναι διαθέσιμα για τους οροτύπους της *L. pneumophila* και τα μη-*L. pneumophila* είδη. Η ειδικότητα κι η ευαισθησία των αντιδραστηρίων αυτών δεν έχει εκτιμηθεί και διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα μικρόβια έχουν αναφερθεί. (Benson et al, 1987; Edelstein and Edelstein, 1989; Jimenez-Lucho et al, 1994; Orrison et al, 1983). Υπάρχει η σύσταση ότι οι αντιοροί για τα μη - *L. pneumophila* είδη τα οποία δεν χρησιμοποιούνται στην εργαστηριακή ρουτίνα κλινικών δειγμάτων εκτός κι αν υπάρχει υψηλή υποψία ότι η νόσος οφείλεται σε μη - *L. pneumophila* είδη ή διερευνήσεις επιδημιών (Maiwald, Helbig and Luck, 1998).

Η ευαισθησία του τεστ DFA για τις αναπνευστικές εκκρίσεις για τη διάγνωση της νόσου των Λεγεωναρίων κυμαίνεται από 25 – 75% και η ειδικότητα είναι 95% (Edelstein, 1987). Ενώ ο DFA παρέχει μία σύντομη μέθοδο για τον προσδιορισμό των ειδών Λεγεωνέλλας, το μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού είναι τεχνικά πιο απαιτητικό και πρέπει να εκτελείται από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό. Η ειδικότητα των πολυκλωνικών DFA αντιδραστηρίων είναι πιθανώς μικρότερη από αυτή των μονοκλωνικών αντισωμάτων, οδηγώντας μερικούς κλινικούς μικροβιολόγους να συστήνουν τη χρήση των τελευταίων έναντι στη χρήση των πολυκλωνικών (Edelstein, 1993). Ένα εμπορικά διαθέσιμο μονοκλωνικό αντίσωμα (Genetic Systems, Seattle, Wash) το οποίο αντιδρά με πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης και ανιχνεύει όλους τους οροτύπους της *L.pneumophila* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της Λεγεωνέλλας σε κλινικά δείγματα (Gosting et al, 1984). Αυτό το αντιδραστήριο είναι υψηλής συνάφειας για τα στελέχη της *L.pneumophila*, κάνοντας δυνατή την επιβεβαίωση είδους για τα υπό εξέταση στελέχη. Πρέπει να σημειωθεί ότι διασταυρούμενη αντίδραση με σπόρους *Bacillus cereus* από ένα απομονωθέν στέλεχος που απομονώθηκε από το νερό έχει αναφερθεί (Flournoy et al, 1988). Παρόλ αυτά αυτός ο μικροοργανισμός είναι εύκολο να διαφοροποιηθεί από τη Λεγεωνέλλα σε ένα καθαρό καλλιέργημα. Η χρησιμότητα των αντιδραστηρίων στην ανίχνευση της Λεγεωνέλλας σε κλινικά δείγματα έχει εκτιμηθεί και έχει βρεθεί ότι είναι συγκρίσιμη με τους πολυδύναμους αντιορούς (Edelstein et al, 1985). Μονοκλωνικά αντισώματα για το γένος έχουν παραχθεί για να ανιχνεύουν είτε την *heat shock* πρωτεΐνη ή την *mip* πρωτεΐνη, αλλά δε φαίνεται να είναι χρήσιμα για την ανίχνευση της Λεγεωνέλλας σε

κλινικά δείγματα ( Helbig et al, 1995;Helsel et al,1988;Sampson et al., 1991; Steinmetz et al.,1991).



**Εικόνα 6:** *Legionella* όπως φαίνεται με DFA

(Πηγή: [http://med4you.at/laborbefundl/lbef\\_legionaerskrankheit.htm](http://med4you.at/laborbefundl/lbef_legionaerskrankheit.htm))

### 2.3.3 Ορολογική διάγνωση

Ένας αριθμός ορολογικών δοκιμών έχει αναπτυχθεί για να ανιχνεύουν αντισώματα έναντι της *Legionella* spp. Η χρήση του έμμεσου ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αντισωμάτων σε ασθενείς λόγω της εξάρσης κρουσμάτων της Φιλαδέλφια και ήταν κομβική για τον καθορισμό του αιτίου της νόσου. Η ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzymeimmunoassay - EIA) και η μικροσυγκόλληση έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της Λεγεωνέλλας (Farshy et al,1979; Farshy et al,1978; Klein et al, 1979).

Μία μέθοδος έμμεσης αιμοσυγκόλλησης έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση της νόσου των Λεγεωναρίων που οφείλεται στους οροτύπους 1-14 της *L.pneumophila* (Yonke et al, 1981). Επιπρόσθετα εκτός από τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, ένα ταχύ τεστ μικροσυγκόλλησης χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στην Ευρώπη για τη διάγνωση (Harrison and Taylor, 1982). Το ταχύ τεστ μικροσυγκόλλησης έχει μερικά προτερήματα σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό όπως η δυνατότητα του τεστ που επιτρέπει τη δοκιμή πολλών δειγμάτων και την πρόωπη εμφάνιση των αντισωμάτων συγκόλλησης. Η

ειδικότητα κυμαίνεται από 97 έως 99%, και η ευαισθησία είναι 80% (Harrison and Taylor, 1988). Διασταυρούμενες αντιδράσεις με το αντίσωμα έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση έχουν αναφερθεί καθώς και μεταξύ της *Legionella* και *Campylobacter* spp. (Boswell and Kudesia, 1996; Collins et al, 1984). Ο Klein ανέφερε διασταυρούμενες αντιδράσεις σε ορούς με ανεβασμένους τίτλους της *Pseudomonas pseudomallei* (Klein, 1986).

Από όλα αυτά τα τεστ, ο IFA έχει αξιολογηθεί εκτενώς και είναι διαθέσιμος εμπορικά. Ο IFA αρχικά αναπτύχθηκε από το CDC με αντιγόνα από ζωντανά βακτήρια (*L. pneumophila* serogroup 1, Philadelphia 1) που αναπτύχθηκαν σε μολυσμένους σάκους με hen yolk sacs to ether-killed antigen που αναπτύχθηκε σε εμπλουτισμένο Mueller-Hinton άγαρ και τελικά σε ένα εναιώρημα θερμοευαίσθητων αντιγόνων (heat-killed) ανεπτυγμένα σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα (McDade et al, 1977; Wilkinson, 1979). Επικύρωση αυτού του θερμοευαίσθητου (heat-killed) αντιγόνου με ορούς προερχόμενους από επιδημία έδειξε ευαισθησία από 78 έως 91% και μία ειδικότητα 99% (Wilkinson, 1981).

Ακόλουθες μελέτες του CDC έδειξαν ότι τα θερμοευαίσθητα αντιγόνα (heat-killed) που αναπτύσσονται σε BCYE υπόστρωμα έδωσαν το ίδιο επίπεδο ευαισθησίας και ειδικότητας με τα αντιγόνα ευαίσθητα στη φορμαλίνη (formalin-killed) από το ίδιο υπόστρωμα αν χρησιμοποιείται ένα υψηλότερο όριο (cut-off) για τα θετικά αποτελέσματα (Wilkinson, 1982). Επιπρόσθετοι παράγοντες που πρέπει να αναφερθούν στη ορολογική διάγνωση της Λεγεωνέλλωσης είναι η χρήση μίας αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης που αναγνωρίζει την ανοσοσφαιρίνη G (IgG), IgM, και IgA (Bangsberg et al, 1994; Wilkinson et al, 1979). Αυτές οι αποκρίσεις των αντισωμάτων μπορεί να είναι ειδικές για οροτύπους ή μπορούν να αντιδράσουν με ένα αντιγόνο κοινό στη *L. pneumophila*. Γι' αυτό δεν είναι πιθανό να καθορισθεί ασφαλώς ο ορότυπος ή το είδος που προκαλεί τη λοίμωξη (Wilkinson et al, 1983). Οι Harrison et al εκτίμησαν τον IFA και την ταχεία μικροσυγκόλληση για τη διάγνωση της νόσου των Λεγεωναρίων (Harrison et al, 1987). Η ευαισθησία και των δύο μεθόδων ήταν 80%, και επιπροσθέτως 40% των ασθενών είχε τίτλους μέσα στην πρώτη εβδομάδα της νοσηλείας τους. Η αξιολόγηση της ειδικότητας του IFA με ορούς ασθενών με *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetti*, influenzaA ιό, και αδενοϊούς δεν έδειξαν

διασταυρούμενες αντιδράσεις με το αντιγόνο «formalin yolk sac» (Taylor and Harrison,1983).

Ασθενείς με πνευμονία που δεν οφείλεται σε λεγεωνέλλα και βακτηριαμία βρέθηκαν να έχουν ψευδώς θετικούς τίτλους για τη *Legionella* spp. Αυτές οι λοιμώξεις περιελάμβαναν *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia psittaci*, και *Pseudomonas aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση, καθώς και μυκοβακτηρίδια, μυκοπλάσματα, καμπυλοβακτηρίδια, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Haemophilus influenzae*, *Coxiella burnetti*, *Rickettsia typhi*, and *Proteus vulgaris*. (Bornstein,1986; Boswell and Kudesia, 1996; Collins et al, 1984; Dwyer et al, 1988; Edelstein et al, 1980; Grady et al, 1971; Gray et al, 1991; Marshall, Boswell and Kudesia,1994; Klein,1980; McIntyre, Kurtz and Selkon, 1990; Musso and Raoult, 1997; Ormsbee, 1978; Edelstein, 1997; Wilkinson et al, 1979). Διασταυρούμενες αντιδράσεις συμβαίνουν πιο συχνά με τα μη-*L. pneumophila* είδη.

Παρόλη την προφανή χρηστικότητα της ορολογικής διάγνωσης, αυτά τα τεστ έχουν ένα αριθμό περιορισμών. Ακόμα και στην περίπτωση κρουσμάτων που έχουν επιβεβαιωθεί με απομόνωση του στελέχους σε καλλιέργεια, μία τετραπλάσια αύξηση των αντισωμάτων με IFA μπορεί να παρατηρηθεί μόνο στο 70 με 80% των ασθενών και ορομεταστροφή που ακολουθεί τη Λεγεωνέλλωση μπορεί να μη συμβεί μέχρι και δύο μήνες μετά από την έναρξη της νόσου (Edelstein, 1997). Προηγούμενοι ορισμοί της νόσου περιελάμβαναν μία πιθανή διάγνωση βασισμένη σε ανεβασμένο τίτλο αντισωμάτων της τάξης 1:256. Πρόσφατες μελέτες από νοσηλευόμενους ασθενείς με πνευμονία της κοινότητας έδειξε ότι ένας μόνο τίτλος 1:256 δεν μπορούσε να διακρίνει μεταξύ της νόσου των Λεγεωναρίων και της πνευμονίας που οφείλεται σε άλλα αίτια. Μόνο το 10% από 68 ασθενείς με νόσο των Λεγεωναρίων επιβεβαιωμένοι με καλλιέργεια ή μία τετραπλάσια αύξηση τίτλου των αντισωμάτων είχαν τίτλο επιπέδου 1:256 στην οξεία φάση, συγκρινόμενο με το 6% από 636 ασθενείς με πνευμονία από άλλα αίτια (Plouffe et al,1995). Είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια που ανιχνεύουν όλες τις κύριες τάξεις των ανοσοσφαιρινών (IgG, IgM, και IgA) για να αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου (Wilkinson, 1979). Παρολ' αυτά εμπορικά κιτ για την καταμέτρηση της απόκρισης των αντισωμάτων δε χρησιμοποιούν ένα δευτερογενές αντίσωμα που αντιδρά με το IgM και IgA (Edelstein, 1997). Οι μελέτες έδειξαν ότι πολλοί ασθενείς παράγουν πρώιμα αντισώματα IgM και αυτά είναι χρήσιμα για την



πρώιμη διάγνωση της νόσου των Λεγεωναρίων (de Ory, 2000; Nagington, 1979; Zimmerman et al, 1982). Παρόλ' αυτά το IgM μπορεί να παρουσιαστεί αργότερα σε κάποιες επιβεβαιωμένες περιπτώσεις, περιορίζοντας τη χρησιμότητα της μεθόδου για πρώιμη διάγνωση σε όλους τους ασθενείς.

Η ορολογική διάγνωση της νόσου των Λεγεωναρίων ήταν κάποτε η πιο συχνή διαγνωστική μέθοδος. Η ανάγκη ελέγχου διπλών δειγμάτων που συλλέγονται με 3 έως 6 εβδομάδες διαφορά έχει μειώσει τη χρήση της ορολογικής μεθόδου. (Benin and Besser, 2001).

Αν και κάποτε ήταν πολύ δημοφιλείς, ο αριθμός και ο σκοπός των ορολογικών δοκιμών που εκτελούνται στα σύγχρονα μικροβιολογικά εργαστήρια έχει μειωθεί σημαντικά με την αύξηση των προτυποποιημένων θεραπευτικών υποστρωμάτων και τεχνικών και ταχύτερων και περισσότερης ακρίβειας δοκιμών όπως το τεστ ανίχνευσης αντιγόνου στα ούρα καθώς και μοριακών μεθόδων. Σύμφωνα με το ECDC και την ΠΟΥ, η χρήση του ορολογικού ελέγχου στη νόσο των Λεγεωναρίων στην Ευρώπη μειώθηκε από 61% σε 6% κατά μέσο όρο την περίοδο από το 1995 μέχρι το 2010 και αντικαταστάθηκε από το ταχύτερο και λιγότερο απαιτητικό τεχνικά τεστ ανίχνευσης αντιγόνου (Horwitz,1984; Steele,1989).

#### **2.3.4 Ανίχνευση αντιγόνου στα ούρα**

Η ανίχνευση των αντιγόνων Λεγεωνέλλας στα ούρα έχει οδηγήσει στην αναγνώριση εξάρσεων κρουσμάτων της νόσου των Λεγεωναρίων και επέτρεψε την ταχεία απόκριση των λειτουργών της δημόσιας υγείας (Fiore et al,1998; Formica et al, 2000; Lepine et al, 1998). Επιπρόσθετα, αυτή η μέθοδος επιτρέπει την πρώιμη διάγνωση και έναρξη της κατάλληλης θεραπείας και βελτίωση της κλινικής έκβασης του περιστατικού (Kashuba and Ballow, 1996). Το αντίσωμα δέσμευσης που χρησιμοποιείται στην πλειονότητα αυτών των τεστ θεωρείται ότι είναι ειδικό για την *L.pneumophila* οροτύπου 1. Γι' αυτό αν και η πλειονότητα των κρουσμάτων στους ανθρώπους σχετίζεται με την *L.pneumophila* οροτύπου 1, η αποκλειστική στήριξη σε αυτό το τεστ για τη διάγνωση της Λεγεωνέλλας μπορεί να χάσει μέχρι και 40% των κρουσμάτων της Λεγεωνέλλωσης. (Benin and Besser, 2001). Το αντιγόνο της Λεγεωνέλλας που βρίσκεται στα ούρα φαίνεται να αποδομείται μετά από παρατεταμένη αποθήκευση (Rigby,1997).

Υπάρχει μία μόνο αναφορά για ψευδώς θετικό τεστ αντιγόνου στα ούρα σε δείγμα από ασθενή που ήταν μεταμοσχευμένος για νεφρό και είχε λάβει αντισώματα που είχαν παραχθεί σε κουνέλια για τα θυμοκύτταρα (DeForges, Legrand and Tankovic, et al, 1999).

Αλλαγές στη χρήση των διαγνωστικών τεστ για τη νόσο των Λεγεωναρίων θα είχαν επίδραση στον αριθμό των αναφερόμενων κρουσμάτων, την αναφερόμενη θνησιμότητα και την κατανομή των οροτύπων. Στις Η.Π.Α. κρούσματα που διαγιγνώσκονται με καλλιέργεια έχουν μειωθεί, ενώ τα κρούσματα που διαγιγνώσκονται με το τεστ ανίχνευσης αντιγόνου στα ούρα έχουν αυξηθεί.

Λίγο μετά από την έξαρση κρουσμάτων στη Φιλαδέλφεια, δύο ερευνητές ανέφεραν την ικανότητα να ανιχνεύουν αντιγόνο στα ούρα ορολογικά θετικών ασθενών για τη νόσο των Λεγεωναρίων με ELISA (Berdal, Farshy and Feeley, 1979; Tilton, 1979). Αυτές οι μελέτες ακολουθήθηκαν από πειράματα με ραδιο-ανοσολογικές μεθόδους για την ανίχνευση του αντιγόνου σε επιβεβαιωμένα κρούσματα. Η ευαισθησία ήταν 100% και η ειδικότητα επίσης 100% (Kohler et al, 1981). Το αντιγόνο που ανιχνεύεται στο συγκεκριμένο τεστ είναι ένα πολυσακχαριδικό μέρος του κυτταρικού τοιχώματος της λεγεωνέλλας και είναι θερμοανθεκτικό (Kohler et al, 1981; Williams and Lever, 1995). Αντιγόνα είναι γενικά ανιχνεύσιμα στα ούρα εντός λίγων ημερών από την έναρξη της νόσου και μπορούν να παραμείνουν εκεί για αρκετές εβδομάδες μετά και την έναρξη της κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας (Kohler, Winn and Wheat, 1984). Μελέτες έχουν δείξει ότι το αντιγόνο εκκρίνεται 3 ημέρες μετά την έναρξη της νόσου και μπορούν να παραμείνουν για 300 ημέρες (Kohler, Winn and Wheat, 1984). Μία μελέτη που αφορούσε την έναρξη των συμπτωμάτων και την ανίχνευση του αντιγόνου έδειξε ότι τη χρονική στιγμή όπου αντιστοιχεί σε 1-3 ημέρες από την έναρξη της νόσου ανιχνεύθηκαν το 88% των ασθενών που εξετάστηκαν, 80% κατά τη διάρκεια των ημερών 4-7, 89% από την 8η-14<sup>η</sup> ημέρα και 100% μετά τη δέκατη τέταρτη ημέρα (Kohler, Winn and Wheat, 1984). Σε άλλη μελέτη δείγματα ούρων από 23 ασθενείς αναλύθηκαν μετά την έναρξη της θεραπείας ώστε να προσδιοριστεί για πόσο χρονικό διάστημα συνεχίζεται να εκκρίνεται.

Σε μερικούς ασθενείς το αντιγόνο δεν ανιχνευόταν μετά από 4 ημέρες θεραπείας ενώ σε ένα ασθενή παρέμεινε για 300 ημέρες. Η διάρκεια της έκκρισης του αντιγόνου είχε

επιπλοκές στη διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με υποτροπιάζουσες πνευμονίες εντός των πρώτων μηνών μετά την νόσηση. Επίσης, η συμπίκνωση των ούρων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ευαισθησία για το τεστ ανίχνευσης αντιγόνου στα ούρα αν και η ειδικότητα δεν επηρεάζεται (Domínguez et al, 1996; Kohler et al, 1985). Αυτές οι πρώτες μελέτες οδήγησαν στην ανάπτυξη ενός εμπορικού ραδιο-ανοσολογικού τεστ για δείγματα ούρων, όπου στη συνέχεια κατασκευαζόταν και διανεμόταν από την (RIA) (DuPont, Wilmington, Del.) Binx, Inc. (Portland, Maine). Μία αξιολόγηση αυτού του τεστ έδειξε ότι έχει ευαισθησία 93% και ειδικότητα 100% για τη διάγνωση της *L.pneumophila* οροτύπου1 (Aguero-Rosenfeld and Edelstein, 1988). Σε μελέτες όπου γίνεται σύγκριση της δοκιμής ανίχνευσης αντιγόνου της Λεγεωνέλλας στα ούρα με το DFA και την καλλιέργεια οι συγγραφείς κατέληξαν ότι η πιο χρήσιμη δοκιμή είναι το τεστ στα ούρα (Ramírez and Summersgill, 1994). Αρκετές μελέτες εκτίμησαν τη συνολική ευαισθησία (για όλες τις λοιμώξεις από Λεγεωνέλλα) και στο κιτ Binx Equate Legionella Urinary Antigen kit προσδιορίστηκε ότι είναι από 53 έως 56% (Bernander,1994; Plouffe et al, 1995). Ένα σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου RIA είναι η δυσκολία χειρισμού και διάθεσης των ραδιοϊσοτόπων που απαιτείται. Γι' αυτό το λόγο το RIA test αντικαταστάθηκε από την ELISA στα μέσα του 1980 (Binx, Inc.). Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των δύο αυτών μεθόδων έδειξαν ότι η ELISA ήταν θετική για 67 έως 88% των δειγμάτων που ήταν θετικά με το κιτ της RIA (Domínguez et al, 1996; Hackman et al, 1996; Kazandjian et al, 1997). Άλλη μελέτη έδειξε ότι η ευαισθησία της EIA ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της RIA, και αν το cutoff χαμηλωνόταν στο 2.5, η ευαισθησία αυξάνεται στο 90% ενώ η ειδικότητα παρέμεινε στο 100%. (Chang et al, 1996).

- Παλαιότερα υπήρχαν 3 εμπορικά διαθέσιμα τεστ για ανίχνευση αντιγόνων με ELISA: Wampole (προηγούμενα διανεμόταν από τη Binx,Inc.),
- Cranbury, N.J., Trinity Biotech, Bray, Ιρλανδία, και
- Biotest AG, Dreieich, Γερμανία.

Δύο από αυτά τα τεστς (Wampole και Trinity Biotech) προορίζονται ειδικά για τη *L.pneumophila* οροτύπου 1 και δεν είναι σε θέση να ανιχνεύσουν άλλου είδους Λεγεωνέλλα ή άλλο ορότυπο της *L. pneumophila* (Marston et al, 1994).

Το Biotest ELISA προορίζεται να ανιχνεύει αντιγόνα όλων των οροτύπων της *L. pneumophila* και ειδών *Legionella*. Οι Domínguez et al (Dominguez et al, 1998) συνέκριναν το Binox (Wampole) και το Biotest EIA κιτς με συμπυκνωμένα και μη συμπυκνωμένα ούρα. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην ευαισθησία των δύο τεστ και τα συμπυκνωμένα ούρα βελτιώναν την ευαισθησία και στα δύο τεστ. Και τα δύο τεστ ανίχνευαν αντιγόνα των 14 οροτύπων της *L. pneumophila* και τη *L. bozemanii*, ενώ και τα δύο τεστ ήταν αρνητικά για την *L. longbeachae* οροτύπου 1. Η πιο σύγχρονη μέθοδος για την ανίχνευση της αντιγονουρίας είναι η ανοσοχρωματογραφία (ICT). Η μέθοδος ICT είναι παρόμοια με ένα τεστ εγκυμοσύνης για το σπίτι και είναι εμπορικά διαθέσιμη (NOW *Legionella* urinary antigen test; Binox, Inc.). Το τεστ είναι απλό στη χρήση του και δεν απαιτεί εξειδικευμένα εργαστήρια και εξοπλισμό ενώ τα αποτελέσματα μπορούν να βγουν μέσα σε 15 λεπτά. Μία σύγκριση του Binox NOW με το Binox EIA έδειξε 98% συνολικά συμφωνία μεταξύ των δύο τεστ και μία ειδικότητα της τάξης του 100% (Dominguez et al, 1999). Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι τα συμπυκνωμένα ούρα αυξάνουν την ευαισθησία.

Μία άλλη μελέτη προσδιόριζε ότι η ευαισθησία της μεθόδου ICT για τη *L. pneumophila* οροτύπου 1 είναι 80% και η ειδικότητα 97% (Helbig et al, 2001). Υπάρχει ακόμη η ανάγκη να αναπτυχθούν μέθοδοι με ανίχνευση αντιγόνων που θα μπορούν να διαγιγνώσκουν όλα τα είδη και τους οροτύπους της Λεγεωνέλλας. Ανάπτυξη ενός τεστ που θα διαχώριζε το γένος της Λεγεωνέλλας φαίνεται να είναι εφικτό και θα μπορούσε να παρέχει μία διαγνωστική υπεροχή (Tang and Krishnan, 1993; Tang and Toma, 1986). Οι Tang και Toma (Tang and Toma, 1986) ανέπτυξαν μία ευρέως φάσματος ELISA που μπορούσε να ανιχνεύσει διαλυτά αντιγόνα από πολλούς οροτύπους της *L. pneumophila* και είδη χρησιμοποιώντας αντιορούς από κουνέλι μετά από συνδυασμό διαδερμικής ενδομυϊκής και ενδοφλέβιας έγχυσης για μία περίοδο 8 μηνών. Το φάσμα των οροτύπων και των ειδών που ανιχνεύονται με αυτήν την ELISA περιλαμβάνει τα παρακάτω είδη και οροτύπους μέχρι στιγμής: *L. pneumophila* οροτύπος 12, *L. sainthelensi*, *L. bozemanii*, *L. cinцинnatiensis*, *L. hackeliae*, *L. maceachernii*, και *L. parisiensis* (Benson et al, 2000; Garcia et al, 1993; Tang and Krishnan, 1993; Tang, Toma and Rajkumar, 1989).

Μία άλλη πρόσφατη περίληψη της επίδρασης του τεστ ανίχνευσης αντιγόνων στα ούρα στη διάγνωση και θεραπεία και μία πιο βαθιά θεώρηση αυτού γράφτηκε από τους Kashuba and Ballow (Plouffe et al, 1995).

Σήμερα διαθέσιμα για την ανίχνευση της *L.pneumophila* οροτύπων 1- 15 είναι τα εξής κιτ:

### **1. Bio-Rad Legionella urine Antigen EIA (Bio-Test)**

Αν και η *L. pneumophila* sg1 είναι η πιο κοινή αιτία της νόσου των Λεγεωναρίων, Παρόλ αυτά υπάρχουν άλλοι 14 ορότυποι. Από το 1979, η ανίχνευση συγκεκριμένου αντιγόνου στα ούρα έχει περιγραφεί ως αξιόπιστη κι απλή μέθοδος αλλά μέχρι τώρα αυτό περιορίζεται στην ανίχνευση του οροτύπου 1.

Η Bio-rad παρήγαγε ένα τεστ με ανοσοενζυμική μέθοδο Enzyme – Immunoassay (EIA) που μπορεί να ανιχνεύσει συγκεκριμένα αντιγόνα της Λεγεωνέλλας και μπορεί να αναγνωρίζει όλους τους οροτύπους της *L.pneumophila* με ένα σχετικά πλατύ εύρος διασταυρούμενων αντιδράσεων καθώς και άλλα είδη Λεγεωνέλλας. Το όνομά τους είναι “Biotest Legionella Urine Antigen EIA”.

Το τεστ αυτό έχει επικυρωθεί μόνο για δείγματα ούρων.

**Χαρακτηριστικά Απόδοσης:** Η κατασκευαστική εταιρεία Bio-rad αναφέρει Ειδικότητα: 99.8%, Ευαισθησία: 100%.

Σύμφωνα με έρευνα του CDC αναμένεται ότι η απόλυτη ευαισθησία του *Legionella* Urine Antigen EIA σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη Λεγεωνέλλωση είναι 50-70 %. (Plouffe et al, 1995)

The European Multicenter Study of the European Working Group on *Legionella* infections (EWGLI) έδειξε μία ευαισθησία 94.6% για τη *Legionella pneumophila* οροτύπου 1 και μία ευαισθησία 86% συμπεριλαμβάνοντας δείγματα με οροτύπους 2, 3, 4, 6, 10. (Harisson et al 1998)

**Περιορισμοί της μεθόδου:** Παρόλη την ευρεία αντίδραση με διάφορα είδη λεγεωνέλλας, το συγκεκριμένο κιτ δεν μπορεί να ανιχνεύσει όλα τα 39 είδη με ισοδύναμη ευαισθησία.

### **2. X-pect Legionella Test (Thermoscientific / Oxoid)**

Το X-pect Legionella είναι μία ταχεία δοκιμή ανοσοχρωματογραφίας σχεδιασμένο για την ποιοτική ανίχνευση των οροτύπων 1 και 6 της *L.pneumophila* σε ανθρώπινα ούρα. Αυτή η δοκιμή αναπτύχθηκε βασισμένη στο γεγονός ότι η *L.pneumophila* οροτύπου 1 είναι η πιο συχνή στα κλινικά στελέχη και η *L.pneumophila* οροτύπου 6 η δεύτερη πιο συχνή.

**Χαρακτηριστικά Απόδοσης :** Ειδικότητα: 100%, Ευαισθησία: 94.1%

### Περιορισμοί του τεστ

- Ένα αρνητικό τεστ δεν αποκλείει την πιθανότητα μόλυνσης από *L.pneumophila* οροτύπων 1 και 6 γιατί η συγκέντρωση του αντιγόνου μπορεί να πέσει κάτω από το ανιχνεύσιμο όριο της δοκιμής. Συνιστάται η καλλιέργεια να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με υποψία πνευμονίας ώστε να προσδιοριστούν κι άλλοι τυχόν αιτιολογικοί παράγοντες πλην των *L.pneumophila* οροτύπων 1 και 6.
- Η απέκκριση του αντιγόνου της *Legionella* μπορεί να ξεκινήσει το νωρίτερο τρεις ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και μπορεί να συνεχίσει μέχρι ένα έτος μετά. Ένα θετικό αποτέλεσμα μπορεί να υποδεικνύει την τρέχουσα ή προηγούμενη λοίμωξη. Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας, οι ορολογικές εξετάσεις και οι μέθοδοι ανίχνευσης αντιγόνου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με κλινικά ευρήματα για να γίνει μία ακριβή διάγνωση.

Στον **πίνακα 2** παρασιάζονται τα διαθέσιμα εμπορικά κιτ για την ανίχνευση του αντιγόνου της Λεγεωνέλλας στα ούρα.

**Πίνακας 2:** Εμπορικά κιτ για την ανίχνευση αντιγόνου Λεγεωνέλλας στα ούρα

Εταιρεία	Όνομα προϊόντος	Μέθοδος δοκιμής <sup>a</sup>	Έγκριση από FDAα	Εμπορική διαθεσιμότητα	Παρατήρηση
Alere	BinaxNOW <i>Legionella</i> urinary antigen card	ICT	Ναι	Η.Π.Α.	Έγκριση μόνο για τον ορότυπο 1
Alere	BinaxNOW <i>Legionella</i> urinary antigen EIA	EIA/ELISA	Ναι	Η.Π.Α.	Έγκριση μόνο για τον ορότυπο 1

Εταιρεία	Όνομα προϊόντος	Μέθοδος δοκιμής <sup>α</sup>	Έγκριση από FDAα	Εμπορική διαθεσιμότητα	Παρατήρηση
Meridian Bioscience, Inc.	Tru <i>Legionella</i>	ICT	Ναι	Η.Π.Α.	Έγκριση μόνο για τον ορότυπο 1
SAScientific	SAS <i>Legionella</i> test	ICT	Ναι	Η.Π.Α.	Έγκριση μόνο για τον ορότυπο 1. Βασίζεται σε πάνω από 1 πολυκλωνικά αντισώματα.
Trinity Biotech	Bartels <i>Legionella</i> UAT	EIA/ELISA	Ναι	Η.Π.Α.	Έγκριση μόνο για τον ορότυπο 1
Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH <sup>β</sup>	<i>Legionella</i> urine antigen EIA	EIA/ELISA	Όχι	Άγνωστο	Αναφέρεται ότι μπορεί να ανιχνεύσει όλους τους οροτύπους της <i>L.pneumophila</i> και άλλα είδη. Αλλά δεν είναι επαληθευμένο.
ThermoFisher Scientific/Oxoid	Xpect <i>Legionella</i> UAT	ICT	Όχι	Άγνωστο	Αναφέρεται να ανιχνεύει τους οροτύπους 1 και 6.
Coris/Bio	<i>Legionella</i> V-Test	ICT	Όχι	Άγνωστο	Αναφέρεται ότι ανιχνεύει τον ορότυπο 1.
Trinity Biotech	Uni-Gold <i>Legionella</i> Urinary Antigen Plus	ICT	Όχι	Άγνωστο	Αναφέρεται ότι ανιχνεύει τον ορότυπο 1.
Diamondial <sup>β</sup>	Rapid U <i>Legionella</i> Plus	Άγνωστος	Όχι	Άγνωστο	Αναφέρεται ότι ανιχνεύει τον ορότυπο 1.
Standard Diagnostics <sup>β</sup>	SD Bioline <i>Legionella</i>	ICT	Όχι	Άγνωστο	Αναφέρεται ότι ανιχνεύει τον ορότυπο 1.

(α): ICT: Τεστ Ανοσοχρωματογραφίας, EIA: Ανοσοενζυμική μέθοδος, ELISA: Δοκιμή ανοσοαπορρόφησης μέσω σύνδεσης με ένζυμο, UAT: τεστ ανίχνευσης αντιγόνου στα ούρα, FDA: Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής.

(β) : Πολύ λίγες πληροφορίες διαθέσιμες

(Πηγή: **Mercante JW** and **Winchell JM**. “Current and Emerging *Legionella* Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations”, Clin. Microbiol. Rev., January 2015 :vol. 28 no. 1 95-133.)

## 2.3.5 Μοριακές τεχνικές

### 2.3.5.1 Ανίχνευση του Νουκλεϊκού οξέος της Λεγεωνέλλας

Η πρώτη μέθοδος που σχεδιάστηκε για την ανίχνευση του DNA της *L. pneumophila* ήταν ένας ραδιοσημασμένος ριβοσωμικός ανιχνευτής (probe) ειδικός για όλα τα στελέχη της *Legionella* spp (Gen-Probe, SanDiego, Calif.). Το τεστ αποσύρθηκε μετά από την εμφάνιση μίας ψευδοεπιδημίας σε ένα νοσοκομείο με 13 ψευδώς θετικά δείγματα (Laussucq et al, 1988). Η PCR αντιπροσωπεύει ένα από τις λίγες διαγνωστικές δοκιμές με τη δυνατότητα να ανιχνεύει λοιμώξεις που προκαλούνται από όλα τα γνωστά στελέχη της *Legionella*. Ποικίλλες PCR έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση της Λεγεωνέλλας χρησιμοποιώντας ποικίλλους στόχους όπως τυχαίες αλληλουχίες DNA για τη *L. pneumophila* (Starnbach, Falkow and Tompkins, 1989), το 5SrRNA γονίδιο (MacDonell et al,1987; Mahbubani et al, 1990), το 16SrRNA (Jonas,et al,1995; Lisby and Dessau,1994; Miyamoto et al, 1997), ή το γονίδιο *mip* (Engleberg et al,1989; Mahbubani et al, 1990;Ramirez et al,1996). Το πιο διαδεδομένο εμπορικό κιτ χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της Λεγεωνέλλας σε περιβαλλοντικά δείγματα (EnviroAmpkit; Perkin-Elmer, Inc., Norwalk, Conn.). Αυτό το τεστ αποσύρθηκε από την αγορά το 1997. Αυτό πολλαπλασίαζε ταυτόχρονα δύο στόχους ένα στόχο 5SrRNA ειδικό για το γένος της Λεγεωνέλλα και ένα τμήμα του γονιδίου *mip* ειδικό για τη *L.pneumophila*. Αν και οι κατασκευαστές τους δεν επιχείρησαν να πάρουν έγκριση και για τη χρήση σε κλινικά δείγματα αυτό έχει χρησιμοποιηθεί και σε κλινικά δείγματα με επιτυχία σε διάφορες έρευνες (Kessler et al, 1993; Matsiota-Bernard et al,1998;Weir et al, 1998). Πολύ λίγα εργαστήρια εφαρμόζουν PCR για την ανίχνευση της Λεγεωνέλλας προς το παρόν. Οι λίγες μελέτες που έχουν γίνει αποδεικνύουν ότι η ανίχνευση με PCR της Λεγεωνέλλας έχει μία μέτρια ευαισθησία και μία υψηλά ειδικότητα. Το DNA της Λεγεωνέλλας έχει ανιχνευθεί σε αναπνευστικές εκκρίσεις όπως το BAL, σε φαρυγγικό επίχρισμα σε ρινοφαρυγγικό επίχρισμα, σε περιφερειακά μονοκύτταρα του αίματος, ούρα και πτύελα. (Helbig et al,1999; Jaulhac et al,1992; Jonas et al, 1995; Maiwald et al, 1995; Matsiota-Bernard et al, 2000; Murdoch and Chambers, 2000; Murdoch et al,1996; Ramirez et al, 1996; Socan, Kese and Marinic-Fisher, 2000). Οι διαδικασίες



PCR έχουν χρησιμοποιήσει ως χρώση για την απεικόνιση των προϊόντων τους το βρωμιούχο αιθίδιο σε γέλη αγαρόζης ή ανάστροφο υβριδισμό dot blot με ανιχνευτές (probes) ακινητοποιημένους σε νάιλον μεμβράνες με βιοτυνιλωμένους εκκινητές. Άλλες μέθοδοι με PCR που έχουν ως στόχο το 16SrDNA γονίδιο έχουν αναφέρει ότι έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (Cloud et al, 2000).

### 2.3.5.2 Real time PCR

Σχετικά πρόσφατα αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει τη χρήση της real-time PCR σε συνδυασμό με τη χρήση ενός ανιχνευτή (probe) υβριδισμού για την ταχεία ταυτοποίηση των Λεγεωνελλών σε κλινικά δείγματα (Ballard et al, 2000; Hayden et al, 2001). Αυτή η μέθοδος μειώνει τον κίνδυνο για διασταυρούμενη αντίδραση, μειώνει το χρόνο που απαιτείται για την επεξεργασία των δειγμάτων και εξαφανίζει την ανάγκη για περαιτέρω ανάλυση του δείγματος μετά την PCR. Αυτές οι μέθοδοι υπόσχονται αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα, αν και περαιτέρω επικύρωση χρειάζεται.

Μία μέθοδος real-timePCR για την ανίχνευση του γονιδίου *mip* της *L.pneumophila* αναπτύχθηκε. Αποδείχθηκε ότι είχε ευαισθησία και ειδικότητα 100% για τη *L. pneumophila* (Wilson et al, 2003).

Ποσοτικές PCR για τη Λεγεωνέλλα στοχεύοντας στο γονίδιο 16SrRNA (ειδικό για το γένος της Λεγεωνέλλας) και στο γονίδιο *mip* (ειδικό για τη *L.pneumophila*) εφαρμόστηκαν σε σύνολο 223 δείγματα ζεστού νερού και 37 πύργους ψύξης. Τα αποτελέσματα της PCR συγκρίθηκαν με αυτά της συμβατικής καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα της PCR για το γονίδιο 16SrRNA ήταν μη μετρήσιμα για 2,8% των δειγμάτων από πύργους ψύξης και έως 39,1% για τα δείγματα ζεστού νερού και αυτό ήταν υψηλά προβλέψιμο για τις μετρήσεις Λεγεωνέλλας σε cfu κάτω από 250 cfu/λίτρο. Οι τιμές του cutoff για την PCR για τον προσδιορισμό των δειγμάτων ζεστού νερού που περιείχαν  $>10^3$  cfu/liter Λεγεωνέλλες καθορίστηκε ξεχωριστά για κάθε εργαστήριο που συμμετείχε. Τα cutoffs διέφεραν ευρέως μεταξύ των εργαστηρίων και είχαν ευαισθησίες από 87,7% έως 92,9% και ειδικότητες από 77,3 σε 96,5%. Η καλύτερη ειδικότητα επιτεύχθηκε για την PCR που στόχευε το γονίδιο *mip*. Τα cutoffs των PCR δεν μπορούσαν να προσδιορισθούν για τα δείγματα των πύργων ψύξης λόγω υψηλής ποικιλομορφίας των αποτελεσμάτων και του συχνά υψηλού αριθμού δειγμάτων με αρνητικές καλλιέργειες. Έτσι, ποσοτική PCR για τη *Legionella* φαίνεται να μπορεί

να εφαρμοστεί για δείγματα ζεστού νερού, αλλά τα όρια θετικοποίησης θα πρέπει να προσδιορίζονται σε κάθε εργαστήριο (Joly et al, 2006).

Μία real-time PCR μέθοδος υβριδισμού για τη *L.pneumophila* περιγράφεται. Η μέθοδος χρησιμοποίησε τη μεθοδολογία του Light Cycler (IdahoTechnology) προκειμένου να ανιχνεύσει 2,5 cfu/αντίδραση, ισοδύναμα με 1.000 cfu/liter του αρχικού δείγματος νερού. Η μέθοδος, συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης του DNA και επιβεβαίωση της ταυτότητας του προϊόντος, συμπληρώνεται σε 90 λεπτά από την παραλαβή του δείγματος (Ballard et al, 2000).

### **2.3.5.3 LAMP, NASBA**

Είναι δύο μέθοδοι ισοθερμικού πολλαπλασιασμού νουκλεϊκού οξέος. Η αρχή της μεθόδου είναι ο πολλαπλασιασμός του DNA ή του RNA σε σταθερή θερμοκρασία με τον ελάχιστο αριθμό κύκλων ή καθόλου κύκλους όπως απαιτείται στην PCR. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι η ταχεία ανίχνευση των στόχων (μέσα σε 15 έως 60 λεπτά) χωρίς την ανάγκη για ακριβούς, πολύπλοκους και απαιτητικούς σε ενέργεια κύκλους θερμοκρασίας. Ανάμεσα στις υπάρχουσες μεθοδολογίες δύο έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της Λεγεωνέλλας σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα: η NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) και η LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) (Sakamoto et al, 2009; Loens et al, 2006; Loens et al, 2008; Chen et al, 2010; Lu et al, 2011; Annaka et al, 2003).

### **2.3.5.4 Microfluid TaqMan low-density microarray cards (TAC)**

Οι κάρτες αυτές οι οποίες αναπτύχθηκαν στα μέσα της δεκαετίας από τη Life Technologies, μπορούν πολύ γρήγορα να ανιχνεύσουν έκφραση γονιδίων σε διάφορα στάδια μιας νόσου. Ερευνητές στο CDC ανέπτυξαν TACs για την ταυτόχρονη ανίχνευση > 20 αναπνευστικών παθογόνων, συμπεριλαμβανομένου της Λεγεωνέλλας (Diaz et al, 2013; Kodani and Winchell, 2012). Αυτή η κάρτα είναι το επικρατές εργαλείο για τον προσδιορισμό του αιτίου σε εξάρσεις κρουσμάτων αγνώστου αιτιολογίας και έχει μπει σε πιλοτικό πρόγραμμα για επιδημιολογική επιτήρηση του πληθυσμού σε αρκετές πολιτείες των ΗΠΑ και άλλα μέρη για τον προσδιορισμό του αιτίου και του φορτίου αυτού στα αναπνευστικά νοσήματα. Οι TACs προσφέρουν αυξημένη παραγωγικότητα για τη real time PCR σε μία ταχεία αναπαραγωγίμη και

απλή διαδικασία που περιλαμβάνει προτοποθετημένους συνδυασμούς εκκινητών και ανιχνευτών (probes).

#### **2.3.5.5 Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (IMS)**

Ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός συνδυάζει ειδική αναγνώριση ολόκληρου του κυττάρου από αντίσωμα με ειδικά μαγνητικά σφαιρίδια για καθαρισμό και βακτηριακή συμπύκνωση. Δημοσιευμένα δεδομένα που αφορούν στον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό δείχνουν ευαισθησία για τη λεγεωνέλλα σε περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα με ή χωρίς συμπύκνωση μέσω μεμβράνης ή DFA στα ίδια ή μεγαλύτερα επίπεδα ανίχνευσης με την καλλιέργεια και τον ανοσοφθορισμό (Yanez et al, 2005; Sethi, Gore and Sethi, 2007; Fuchslin et al, 2010; Allegra et al, 2011; Reidt et al, 2011; Keserue et al, 2012; Albalat et al, 2012; Bedrina et al, 2013). Περαιτέρω εξέλιξη του IMS μπορεί να είναι χρήσιμη για ταχεία εργαστηριακή μέθοδο πεδίου αν και οι περιορισμοί στην ειδικότητα της μεθόδου απομόνωσης βακτηρίων μέσω σύνδεσης αντισώματος πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη.

#### **2.3.5.6 MALDI-TOF**

Matrix-assisted laser desorption ionization followed by time of flight detection mass spectrometry: Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υπόστρωμα που ακολουθείται από το χρόνο ανίχνευσης πτήσης της φασματομετρίας μάζας (MALDI-TOF MS). Μία πρόσφατη μέθοδος ταυτοποίησης των Λεγεωνελλών κι άλλων βακτηρίων και μυκήτων, η μέθοδος φασματογραφίας μάζας με MALDI-TOF – MS. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι η διάσπαση του βακτηριακού κυττάρου, η απελευθέρωση των πρωτεϊνών του και η δημιουργία ενός φάσματος πρωτεϊνών που είναι μοναδικό για κάθε είδος. Αυτό συγκρίνεται με τα φάσματα της βιβλιοθήκης του φασματογράφου μάζας και αποδίδεται κατ' αυτόν τον τρόπο η ταυτοποίηση. Ο χρόνος που απαιτείται είναι λιγότερος από 5 λεπτά. Για τη Λεγεωνέλλα συγκεκριμένα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που οδηγούν σε απόλυτα ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την ταυτοποίηση αυτής μέσω της νέας τεχνολογίας. Έτσι σε μία από αυτές αξιολογήθηκε η ταυτοποίηση μέσω MALDI-TOF με την ταυτοποίηση που στηρίζεται στην αλληλούχιση του γονιδίου *mip*.

Μια σειρά από στελέχη αναφοράς που αντιπροσώπευαν 38 διαφορετικά είδη *Legionella* υποβλήθηκαν σε Φασματομετρία Μάζας ακέραιων κυττάρων (WCMS) με MALDI-TOF. Το δενδρόγραμμα που προέκυψε από τα φάσματα μάζας που λαμβάνονται με WCMS δημιούργησε μοτίβα που συγκρίθηκαν με φυλογενετικό δέντρο που λαμβάνεται από τις αλληλουχίες του γονιδίου *mip*. Τα δέντρα που συνάχθηκαν από τις δύο αυτές μεθόδους αποκάλυψαν σημαντικές ομολογίες. Χρησιμοποιώντας 453 απομονωμένα στελέχη *Legionella* που είχαν προηγουμένως ταυτοποιηθεί γονοτυπικά, ήταν δυνατό να δημιουργηθούν συγκεκριμένα ειδικά φάσματα για κάθε είδος (Super Spectra), χρησιμοποιώντας κατάλληλα σύνολα φασμάτων μαζών, επιτρέποντας σαφή διαφοροποίηση και αναγνώριση των πιο συχνά απομονωμένων ειδών της *Legionella*. Αυτά τα Super Spectra φάσματα ελέγχθηκαν για το αν είναι κατάλληλα για την ταυτοποίηση στελεχών *Legionella* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, πύργους ψύξης, χόμα από γλάστρες και από δείγματα των ασθενών που είχαν φυλαχθεί στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς της Ελβετίας για *Legionella* και προηγουμένως είχαν προσδιοριστεί με μοριακές μεθόδους, όπως η αλληλούχιση του γονιδίου *mip*. 99,1% των εξετασθέντων στελεχών που απομονώνονται από το περιβάλλον για το αν θα μπορούσε να ταυτοποιηθεί σωστά με τα νέα φάσματα Super Spectra. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο προσδιορισμός της *Legionella* spp. με MALDI-TOF MS είναι ταχεία, εύκολη στην εκτέλεση και έχει το πλεονέκτημα στο γεγονός πως εξοικονομεί χρόνο και κόστος, σε σύγκριση με την ταυτοποίηση που βασίζεται στην αλληλούχιση (Gaia et al, 2011).

Σε μία άλλη μελέτη προτείνεται η ταυτοποίηση μέσω MALDI-TOF να εισαχθεί επίσημα ως τροποποίηση στο ISO 11731-2. Έτσι οι συγγραφείς αναφέρονται στην ταχεία ταυτοποίηση των βακτηρίων με υψηλή αξιοπιστία και μείωση των δαπανών μέσω του MALDI-TOF MS. Η μελέτη έδειξε ότι τα αποτελέσματα των ταυτοποιημένων στελεχών με φασματομετρία μάζας είναι σε πλήρη συμφωνία με αυτά που προκύπτουν από την ανίχνευση και τη διαφοροποίηση με βάση την καλλιέργεια και τις βιοχημικές ιδιότητες και πως επιπρόσθετα πολύτιμες πληροφορίες μπορούν να αποκτηθούν, ακόμη και αν ο κανονισμός ISO απαιτεί μια εκτεταμένη περίοδο επώασης για τις βακτηριακές καλλιέργειες που είναι πραγματικά σε αντίθεση με τις προϋποθέσεις του συστήματος MALDI Biotyper. Επιπλέον, ο καθιερωμένος αλγόριθμος αναγνώρισης είναι πολύ οικονομικός και βελτιώνει τον χρόνο που

απαιτείται στο να εξαχθεί το αποτέλεσμα. Καταλήγουν στο συμπέρασμα που προαναφέρθηκε ότι με βάση τα ευρήματα αυτά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η εισαγωγή τροποποίησης στο ISO11731-2 που θα περιλαμβάνει το MALDI-TOF MS ως μία εναλλακτική μέθοδο ταυτοποίησης της Λεγεωνέλλας. (Dilger et al, 2016)

#### **2.4 Τυποποίηση της *Legionella* spp.**

Η *L.pneumophila* οροτύπου 1 περιλαμβάνει μια αρκετά ετερογενή ομάδα οργανισμών που ευθύνονται για τις περισσότερες από τις περιπτώσεις της νόσου των Λεγεωναρίων. Η *L.pneumophila* οροτύπου 1 μπορεί να διααιρεθεί σε έναν αριθμό υποτύπων με διάφορες τεχνικές. Αυτές οι διαδικασίες χρησιμοποιούνται για να μπορούν να συνταιριαχθούν τα περιβαλλοντικά στελέχη με τα κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια επιδημιολογικής διερεύνησης έξαρσης κρουσμάτων Λεγεωνέλλωσης. Εξαιτίας της διαφορετικότητας των διάφορων στελεχών της *L.pneumophila* οροτύπου 1, κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη πρέπει να συνδυαστούν με μοριακές τεχνικές για την κατάλληλη αναγνώριση των περιβαλλοντικών πηγών μετάδοσης της νόσου. Αρχικά, οι *Legionellae* ταυτοποιούνταν μέχρι το επίπεδο της ορολογικής ομάδας κατά τη διάρκεια των διερευνήσεων της νόσου των Λεγεωναρίων. Αυτή η μορφή της ορολογικής τυποποίησης χρησιμοποιεί πολυδύναμους ή μονοδύναμους αντιορούς και μπορεί να είναι επαρκής για τον εντοπισμό των δεξαμενών, μερικών από τις πιο ασυνήθιστες Λεγεωνέλλες που προκαλούν νόσο.

Η ποικιλία των στελεχών και η εξάπλωση της *L.pneumophila* οροτύπου 1 κάνει επιτακτική την ανάγκη για περαιτέρω τυποποιητικές διεργασίες προκειμένου να υπάρξει καλύτερη διακριτική ικανότητα μεταξύ αυτών των βακτηρίων. Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει μονοκλωνικά αντισώματα γι' αυτό το σκοπό (Lee et al, 1993; Olsen et al, 2009; Dirven et al, 2005). Ένα διεθνές πάνελ από επτά μονοκλωνικά αντισώματα προτάθηκε το 1986 (Lee et al, 2008). Μονοκλωνικά αντισώματα έχουν παραχθεί από τους Helbig et al. Και ονομάστηκε «Dresden *Legionella* LPS MAb», μαζί με το MAb 3 που περιέγραψε ο Joly et al, επιτρέπουν την τυποποίηση της *L.pneumophila* σε υποομάδες από το 1 έως το 15 (Granados et al, 1989; Lee et al, 2008). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορεί να είναι ανεπαρκής για τη σαφή διάκριση των στελεχών που έχουν προκαλέσει νόσο και των αντίστοιχων περιβαλλοντικών στελεχών της *L.*

*pneumophila* οροτύπου 1 (Gomez-Lus et al, 1993). Ο προσδιορισμός των οροτύπων μπορεί να γίνει ταχέως στο εργαστήριο με τη χρήση κιτ μικροσυγκόλλησης λάτεξ.

Μεταγενέστερες μοριακές τεχνικές όπως η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου σε πήκτωμα (PFGE) και η PCR τυχαίων εκκινητών (AP-PCR) είναι ικανές να διακρίνουν τους υπότυπους της *L.pneumophila* οροτύπου1 και να προσδιορίζουν τις πηγές που προκαλούν τα κρούσματα (Arnold et al, 2007). Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά με τη μέθοδο των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Adeleke et al, 1996). Η μέθοδος πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (Restriction fragment length polymorphism (RFLP) έχει χρησιμοποιηθεί για την τυποποίηση της Λεγεωνέλλας ή σε συνδυασμό με ριβοτυπία rRNA ή DNA (ribotyping) (Berk et al, 1998; Arnold et al, 2007, Thacker et al,1989; Wilkinson,1990; Chang et al, 1996).

#### **2.4.1 Ανάλυση πλασμιδιακού DNA**

Πρόκειται για μία από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση της Λεγεωνέλλας. (Brownetal.,1982). Η ανάλυση πλασμιδιακού DNA συνίσταται στην απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και στην μετέπειτα ηλεκτροφόρηση αυτού σε πήκτη αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή τελικά δεν αποδείχθηκε κατάλληλο επιδημιολογικό εργαλείο, αφού σε μία μελέτη βρέθηκε ότι τα κλινικά στελέχη δεν είχαν πλασμίδιο ενώ τα περιβαλλοντικά είχαν. (Brown et al,1985; Maher et al,1987; Maher et al,1983; Stout et al, 1988).

#### **2.4.2 Πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (Restriction Fragment Length Polymorphism- RFLPs)**

Είναι μία τεχνική με την οποία μπορούν να ανιχνευτούν διαφορές σε ομόλογες αλληλουχίες DNA, με την παρουσία θραυσμάτων διαφορετικών μηκών μετά από πέψη του DNA με ειδικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ο διαχωρισμός των θραυσμάτων ανάλογα με το μέγεθος τους πραγματοποιείται με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης. Η απεικόνιση των μοντέλων πραγματοποιείται μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία αφού έχει προηγηθεί χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Όπως σε όλες τις παρόμοιες μοριακές τεχνικές κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ειδικός μάρτυρας μοριακών βαρών έτσι ώστε να καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των θραυσμάτων (Owen, 1989). Η RFLP έχει χρησιμοποιηθεί για

την τυποποίηση της Λεγεωνέλλας είτε ως έχει, είτε σε συνδυασμό με rRNA ή DNA σήμανση του πεπθέντος DNA, η οποία λέγεται ριβοτυπία (ribotyping) (Berk et al, 1998; Arnold et al, 2007; Thacker et al, 1989; Wilkinson, 1990; Chang et al; 1996). Στη συνέχεια τροποποιήθηκε έτσι ώστε να χρησιμοποιεί ως στόχο ένα ειδικό γενετικό τόπο που θα πολλαπλασιαζόταν έτσι ώστε να αυξηθεί η αρχική συγκέντρωση του γενετικού υλικού, όπως η περιοχή 16S-23S, ακολουθούμενη από πέψη με περιοριστικό ένζυμο, με τα τελικά προϊόντα να διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε γέλη (πηκτική) αγαρόζης ή να ακολουθεί υβριδισμός κατά Southern (Saunders et al, 1988a; Saunders et al, 1988b).

#### **2.4.3 PCR με τυχαίες αφετηρίες**

Η μέθοδος της PCR με τυχαίες αφετηρίες απαντάται είτε ως Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) είτε ως Arbitrarily primed PCR (AP-PCR). Είναι μία τεχνική που στηρίζεται στη δημιουργία θραυσμάτων DNA μετά από πολλαπλασιασμό με PCR τυχαίων τμημάτων του γενομικού DNA, με μονό εκκινητή της αυθαίρετης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Σε αντίθεση με την παραδοσιακή PCR, η RAPD δεν απαιτεί κάποια εξειδικευμένη γνώση της αλληλουχίας DNA του μικροοργανισμού στόχου. Οι πανομοιότυποι δεκαμερείς εκκινητές θα πολλαπλασιάσουν ή δε θα πολλαπλασιάσουν ένα τμήμα DNA, ανάλογα με τις θέσεις που είναι συμπληρωματικές για την αλληλουχία τους. Για παράδειγμα δε θα παραχθεί κανένα θραύσμα αν οι εκκινητές προσδεθούν πολύ μακριά ή τα 3' άκρα τους δεν είναι αντικριστά. Γι' αυτό, εάν μία μετάλλαξη συμβεί στο αρχικό DNA στο σημείο που προηγουμένως ήταν συμπληρωματικό για τον εκκινητή, δε θα παραχθεί ένα προϊόν PCR, οδηγώντας στο σχηματισμό ένα διαφορετικού προτύπου του πολλαπλασιασθέντος DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (Alexiou-Daniel et al, 1996; Lawrence et al, 1999). Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου, όπως η σήμανση των εκκινητών με φθορίζουσα χρωστική Cy5 και ακολουθεί αλληλούχιση βάσεων στα τελικά προϊόντα της PCR (Sequencing) (Jonas et al, 2000). Σε μία άλλη εκδοχή της μεθόδου (rep-PCR), χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών που προσδέονται με αλληλουχίες του DNA των λεγεωνελλών οι οποίες επαναλαμβάνονται μεταξύ των γονιδίων (Georghiou et al, 1994).

#### **2.4.4. Ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου σε πήκτη αγαρόζης (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)**

Η PFGE είναι μία μέθοδος τυποποίησης κατά την οποία όλοι οι χειρισμοί που αφορούν την εκχύλιση και επεξεργασία του DNA του μικροοργανισμού πραγματοποιούνται μέσα σε αγαρόζη. Συγκεκριμένα, αρχικά τοποθετείται ο μικροοργανισμός εντός της αγαρόζης, στη συνέχεια λύεται εκεί, γίνεται η πέψη του χρωμοσωμικού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που κόβουν όχι πολύ συχνά. Κομμάτια της αγαρόζης που περιέχουν τμήματα του χρωμοσωμικού DNA τοποθετούνται μέσα σε πηγαδάκια γέλης αγαρόζης και τα θραύσματα σχηματίζουν ένα πρότυπο (pattern) από διακριτές ζωνώσεις μέσα στην πηκτή αγαρόζης από μία συσκευή που αλλάζει την κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης σύμφωνα με ένα προκαθορισμένο τρόπο. Συγκεκριμένα, ορθογώνια ηλεκτρικά πεδία εναλλασσόμενου ρεύματος με συγκεκριμένο παλμό εφαρμόζονται στην πηκτή αγαρόζης. Έτσι τα μεγάλα θραύσματα DNA καθυστερούν στην κίνησή τους κάθε φορά που αλλάζει η κατεύθυνση προκειμένου να επαναπροσανατολιστούν. Έτσι όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος ενός θραύσματος τόσο μεγαλύτερος ο χρόνος που απαιτείται για τον επαναπροσανατολισμό του DNA. Τα πρότυπα ζωνώσεων που παράγονται με αυτόν τον τύπο ηλεκτροφόρησης στη συνέχεια συγκρίνονται μεταξύ τους για να βρεθεί τυχόν γενετική σχέση μεταξύ τους. Η PFGE διαφέρει από τις συμβατικές ηλεκτροφορήσεις DNA επειδή η PFGE μπορεί να ξεχωρίσει πολύ μεγάλα θραύσματα για τη δημιουργία του προτύπου με το να αλλάζει συνεχώς την κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου. Το 1995 ο Tenover et al, δημοσίευσαν κριτήρια αξιολόγησης των προϊόντων της PFGE προκειμένου να υπάρχει μία αντικειμενική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών ερευνητών και εργαστηρίων (Tenover et al, 1995).

Σύγκριση της AP-PCR και της PFGE με στελέχη από επτά συρροές κρουσμάτων Λεγεωνελλώσεων έδειξε ότι η PFGE παρείχε ελαφρώς καλύτερη διακριτική ικανότητα (Gomez-Luz et al, 1993). Και οι δύο τεχνικές προσφέρουν καλύτερη διάκριση και είναι λιγότερο εργώδεις από άλλες τεχνικές όπως οι SDS-PAGE, η ριβοτυπία, και η ηλεκτροφόρηση πολυτοπικών ενζύμων. Η διακριτική ικανότητα βελτιώνεται όταν η AP-PCR και η PFGE χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με την τυποποίηση με μονοκλωνικά αντισώματα. Ακόμη κι έτσι, προσοχή απαιτείται κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της τυποποίησης για τον προσδιορισμό της πηγής μιας συρροής



κρουσμάτων. Μία μελέτη προσδιόρισε ότι στελέχη που απομονώθηκαν από πηγές μη σχετιζόμενες με συρροή κρουσμάτων ήταν πανομοιότυπα με κλινικά στελέχη, με τέσσερις τυποποιητικές μεθόδους. (AP-PCR, PFGE, monoclonal antibody, and multilocus enzyme electrophoresis) (Moran-Gilad et al, 2014).

#### **2.4.5 Τυποποίηση με την διαδοχική αλληλούχιση του ολικού γενόματος (Whole Genomic Sequence)**

Προσπάθειες ερευνητικές γίνονται προκειμένου να βρεθεί η καταλληλότερη τυποποιητική μέθοδος για την *L.pneumophila*. Τυποποίηση με διαδοχική αλληλούχιση βάσεων (SBT), ανάλογη με την τυποποίηση αλληλούχισης πολλαπλών γενετικών τόπων (MLST), είναι η τρέχουσα «gold standard» μέθοδος τυποποίησης για τη διερεύνηση των εξάρσεων κρουσμάτων της νόσου των Λεγεωναρίων που προκαλείται από τη *L.pneumophila*. Ωστόσο, όπως οι κοινοί τύποι αλληλούχισης (STs) προκαλούν πολλές μολύνσεις, μερικές διερευνήσεις παραμένουν άλυτες. Σε μία από αυτές, διάφορες μέθοδοι αλληλούχισης ολόκληρου γονιδιώματος (WGS) αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τις δημοσιευμένες κατευθυντήριες γραμμές, συμπεριλαμβανομένων (i) τον πολυμορφισμό ενός μοναδικού νουκλεοτιδίου (SNP), (ii) επεκταθείσα MLST χρησιμοποιώντας διαφορετικούς αριθμούς γονιδίων, (iii) προσδιορισμό της παρουσίας ή απουσίας γονιδίου, και (iv) μια μέθοδο που βασίζεται στα kmer.

Τα στελέχη της *L. pneumophila* ορομάδας 1 (n = 106) από το σταθερό «πάνελ τυποποίησης», που χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν από την Ομάδα μελέτης για τις λοιμώξεις από *Legionella* της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Κλινικής Μικροβιολογίας (ESGLI), ελέγχθηκαν μαζί με άλλα 229 απομονωθέντα στελέχη. Πάνω από το 98% των στελεχών θεωρήθηκαν τυποποιήσιμοι χρησιμοποιώντας τις μεθόδους που βασίζονται SNP και kmer.

Ποσοστά των στελεχών με πλήρη προφίλ εκτεταμένης MLST κυμάνθηκε από 99,1% (50 γονίδια) σε 86,8% (1.455 γονίδια), ενώ μόνο το 41,5% παρήγαγε ένα πλήρες προφίλ με το σχήμα παρουσία / απουσία γονιδίου. Επαναλήψεις απέδειξαν ότι όλες οι μέθοδοι προσφέρουν 100% επαναληψιμότητα. Δείκτες της διακριτικής ικανότητας κυμαίνονταν από 0,972 (ριβωσωμική MLST) σε 0,999 (βασισμένο στα SNP), και όλες οι τιμές ήταν υψηλότερες από εκείνη που επιτυγχάνεται με SBT (0,940).

Η επιδημιολογική αντιστοιχία είναι γενικά αντιστρόφως ανάλογη με τη διακριτική ικανότητα. Προτείνουμε ότι ένα σύστημα επεκταθείσας MLST με περίπου 50 γονίδια

παρέχει τη βέλτιστη επιδημιολογική συμφωνία, ενώ ουσιαστική βελτίωση της διακριτικής ικανότητας προσφέρονται από την SBT και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέρος ενός ιεραρχικού συστήματος τυποποίησης που θα πρέπει να διατηρεί την προς τα πίσω συμβατότητα και την αύξηση της διακριτικής ικανότητας, όπου είναι απαραίτητο. Η ανάλυση αυτή θα είναι χρήσιμη για το ESGLI να σχεδιάσει ένα σύστημα που θα έχει τη δυνατότητα να γίνει η νέα “gold standard” μέθοδος τυποποίησης για τη *L.pneumophila*.

#### **2.4.5 Whole-genome sequencing (WGS): Αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος**

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος διαδραματίζει έναν όλο και πιο σημαντικό ρόλο στην μικροβιολογία της δημόσιας υγείας και έχει εφαρμογές τόσο στις διερευνήσεις συρροής κρουσμάτων όσο και στην επιδημιολογική επιτήρηση παθογόνων (Didelot, Bowden, Wilson, et al 2012; Kwong et al, 2015).

Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της WGS σε σχέση με προηγούμενες και τρέχουσες τεχνικές τυποποίησης είναι το εξαιρετικά υψηλό επίπεδο της διακριτικής ικανότητας που μπορεί να επιτευχθεί. Κυρίως, η εμφάνιση των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει σε απότομη μείωση τόσο του κόστους και του χρόνου, καθιστώντας WGS μια βιώσιμη επιλογή σε εργαστήρια αναφοράς για τη δημόσια υγεία (Bertelli and Greub, 2013). Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει πλέον, τη δυνατότητα χρησιμοποίησης WGS ως εργαλείο για τη διερεύνηση των τοπικών εστιών σημειακής πηγής της νόσου των λεγεωναρίων (Reuter et al, 2013; Lévesque et al, 2014; Graham, Doyle and Jennison AV, 2014; Moran-Gilad et al, 2015; Sánchez-Busó, 2016). Όλες εκτός από μία από αυτές τις μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει μία προσέγγιση βασισμένη σε μονό πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (SNP) για την ανάλυση των δεδομένων WGS, η οποία περιλαμβάνει αναγνώσεις της χαρτογράφησης αλληλούχισης σε ένα κατάλληλο γονιδίωμα αναφοράς και την ανίχνευση SNPs στα στελέχη που μας ενδιαφέρουν. Η εξαίρεση αποτελεί η μελέτη, όπου περιγράφεται η ανάπτυξη και εφαρμογή μίας εκτεταμένης έκδοσης σχήματος MLST / SBT, χρησιμοποιώντας 1.521 γονίδια, και συνέκρινε τα στελέχη χρησιμοποιώντας τον αριθμό των διαφορών αλληλόμορφων, παρά τον αριθμό των SNPs (Moran-Gilad et al, 2015). Και οι δύο τύποι προσέγγισης έχουν καταδείξει ότι τα στελέχη από συρροές κρουσμάτων είναι πολύ παρόμοια, με μία μελέτη βασισμένη στο ένα SNP που

περιγράφει τις διαφορές 15 SNPs μεταξύ κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών από μία έξαρση κρουσμάτων σημειακής πηγής (Reuter et al, 2013). Έχουν αποδείξει επίσης ότι στελέχη από εξάρσεις κρουσμάτων συνήθως μπορούν να διακριθούν από στελέχη που είναι χρονικά και χωροταξικά μη συνδεδεμένα με τις εξάρσεις κρουσμάτων.

Επιπλέον, με την εφαρμογή του WGS σε μία συρροή κρουσμάτων της νόσου των λεγεωναριών στο Εδιμβούργο, στο Ηνωμένο Βασίλειο, το 2012 (στην οποία δε βρέθηκε καμία περιβαλλοντική πηγή) έδειξαν ότι τα κλινικά στελέχη αποτελούνταν από πολλούς υποτύπους, παρά το γεγονός ανήκαν στον ίδιο ασυνήθιστο ST, τον ST191, σύμφωνα με τη μέθοδο SBT (McAdam et al, 2014). Οι συγγραφείς πρότειναν ότι αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει μια πιο σύνθετη έξαρση κρουσμάτων που περιλαμβάνει πολλαπλές πηγές και η εξέλιξη των στελεχών της επιδημίας για μεγάλο χρονικό διάστημα, ένα συμπέρασμα που δεν θα είχε συναχθεί χωρίς την αυξημένη της ψηφιακής ανάλυσης WGS. Εκτός από το εκτεταμένο MLST σχήμα που αναπτύχθηκε από τον Moran Gilad και τους συνεργάτες του (Moran-Gilad et al, 2015), ένα άλλο σχήμα έχει δημιουργηθεί χρησιμοποιώντας 1.896 γονίδια σε μια πρόσφατη μελέτη και φαίνεται να παρέχει υψηλή ανάλυση σε προϊόντα απομόνωσης υποτύπου ST1 (Qin et al, 2016). Ωστόσο, καμία μελέτη δεν έχει ακόμη αξιολογήσει τη λειτουργικότητα της κάθε μεθόδου (εκτεταμένη MLST ή οποιαδήποτε άλλη) ως ένα τυποποιημένο και φορητό εργαλείο τυποποίησης για την *L. pneumophila*.

Η ανάπτυξη ενός νέου σχήματος τυποποίησης θέτει μια σειρά από πρόσθετες προκλήσεις. Πρώτον, θα πρέπει να είναι δυνατόν να ληφθούν αποτελέσματα (δηλαδή, ενός τύπου) για όλα ή σχεδόν όλα, τα στελέχη. Δεύτερον, η μεθοδολογία πρέπει να παράγει επαναλήψιμα αποτελέσματα όταν πραγματοποιείται σε διαφορετικούς χρόνους ή από διαφορετικά εργαστήρια. Τρίτον, η εξαιρετικά υψηλή διάκριση που προσφέρεται από τη WGS επιτρέπει τον προσδιορισμό ενός σχεδόν απεριόριστου αριθμού τύπων. Η μεθοδολογία που επιλέχθηκε ως εκ τούτου, πρέπει να διασφαλίσει τη διατήρηση ενός κατάλληλου επιπέδου επιδημιολογικής αντιστοιχίας και ο αριθμός των τύπων παραμένει μέσα σε ένα πρακτικό και χρήσιμο εύρος. Επιπλέον, οι ονομασίες τυποποίησης θα πρέπει να παραμείνουν σταθερές για κάθε στέλεχος και να μην αλλάξουν γρήγορα κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής αποθήκευσης και της ανακαλλιέργειας. Τέλος, τα αποτελέσματα θα πρέπει να είναι σε μορφή που μπορούν να τυποποιηθούν εύκολα, να ανταλλάσσονται μεταξύ των εργαστηρίων, και να

αποθηκεύονται σε κεντρική βάση δεδομένων, όπως συμβαίνει με το ισχύον σύστημα SBT. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τη χρήση του WGS για την επιδημιολογική τυποποίηση της *L.pneumophila*. Έχουμε προσδιορίσει την ικανότητα τυποποίησης (T), αναπαραγωγιμότητα (R), επιδημιολογική συμφωνία (είναι σωστή η μετάφραση?) (E), διακριτική ικανότητα (D), και σταθερότητα (S) από διάφορες μεθόδους WGS, συμπεριλαμβανομένων (i) μία μέθοδος που στηρίζεται στη χαρτογράφηση με SNP, (ii) επεκταθείσα MLST χρησιμοποιώντας ποικίλους αριθμούς γονιδίων, (iii) την παρουσία ή απουσία γονιδίου, και (iv) μία μέθοδος που βασίζεται στα kmer. Χρησιμοποιώντας δημοσιευμένες κατευθυντήριες οδηγίες (van Belkum, 2007), έχουμε συγκρίνει τις επιδόσεις τους με εκείνη της τρέχουσας gold-standard μεθόδου (SBT), και μαζί ή χωρίς την τυποποίηση με τα μονοκλωνικά αντισώματα MAbs, και τελικά πρότεινε την πιο κατάλληλη και πρακτική μέθοδο τυποποίησης WGS για μελλοντική ανάπτυξη.

#### **2.4.6 Τυποποίηση με MALDI-TOF MS**

Η μοριακή τυποποίηση αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την επιδημιολογική επιτήρηση και τη διερεύνηση των ανθρώπινων κρουσμάτων λοίμωξης από *Legionella*. Σε αυτή τη μελέτη, δύο μέθοδοι μοριακής τυποποίησης, ηλεκτροφόρηση σε γέλη παλλόμενου πεδίου (PFGE) και φασματομετρίας μάζας (MALDI-TOF-MS), χρησιμοποιήθηκαν για τη διάκριση 23 στελεχών *L.pneumophila*. Η χρησιμότητα της MALDI-TOF-MS καταδείχθηκε. Η ανάκτηση αποτυπωμάτων MALDI-TOF-MS με φιλτραρισμένα μικρά, διαλυτά σε οξύ μόρια έδωσε διαφορετικά μοριακά προφίλ μεταξύ στελεχών και η ανάλυση clustal για το MALDI-TOF-MS έδειξε υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ των στελεχών, ίδια με εκείνη της PFGE. Επιπλέον, τα δεδομένα MALDI-TOF-MS θα μπορούσαν να αναπαραχθούν μέσα σε λίγες ώρες μετά την αρχική καλλιέργεια, ενώ οι PFGE αναλύσεις χρειάζονται αρκετές ημέρες για να ολοκληρωθούν. Έτσι, το MALDI-TOF-MS προσφέρει μια απλή και γρήγορη τεχνική που θα μπορούσε να βοηθήσει στην παρακολούθηση των ταχέως διασποράς εξάρσεων κρουσμάτων από *Legionella*. (Fujinami, et al, 2011).

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Το νερό είναι η βασική αποθήκη της Λεγεωνέλλας στη φύση και τα βακτήρια αυτά βρίσκονται σε φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα παγκοσμίως (Fliermans, C.B, 1981). Οι Λεγεωνέλλες έχουν ανιχνευτεί σε 40% των υδάτινων περιβαλλόντων με καλλιέργεια και σε ένα ποσοστό μέχρι 80% με PCR (Fields, B. S.,1997). Μοναδική εξαίρεση σε αυτήν την παρατήρηση είναι το είδος *Legionella longbeachae*, ένα συχνό στέλεχος που απομονώνεται από χώμα για γλάστρες (Steele, T.W., 1989). Αυτό το είδος είναι το κυρίαρχο αίτιο της Λεγεωνέλλωσης στην Αυστραλία και προσβάλλει τους κηπουρούς και εκείνους που εκτείνονται σε χώμα για γλάστρες (Ruehleman, S.A., and Crawford G.R.,1996). Τα πρώτα κρούσματα στις ΗΠΑ με λοίμωξη από *L. longbeachae* που σχετίζονται με χώμα κηπουρικής αναφέρθηκε το 2000 (Centers for Disease Control and Prevention, 2000). Η *L. pneumophila* πολλαπλασιάζεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 25°C και 42°C, με ιδανική θερμοκρασία για ανάπτυξη τους 35°C (Katz and Hammel, 1987). Οι περισσότερες περιπτώσεις της Λεγεωνέλλωσης μπορούν να ανιχνευθούν σε ανθρωπογενή συστήματα νερού όπου η θερμοκρασία του νερού είναι υψηλότερη από αυτή του περιβάλλοντος. Θερμικές αλλοιώσεις σε υδάτινα περιβάλλοντα μπορούν να τροποποιήσουν την ισορροπία μεταξύ των πρωτοζώων και των βακτηρίων, οδηγώντας σε απότομο πολλαπλασιασμό των Λεγεωνελλών, το οποίο μπορεί να μεταφραστεί σε ανθρώπινη νόσηση. Η λεγεωνέλλωση είναι μία νόσος που έχει αναδυθεί στο τελευταίο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα εξαιτίας της ανθρώπινης παρέμβασης στο περιβάλλον. Αν οι λεγεωνέλλες συνέχιζαν να διαβιούν αδιατάρακτες στα φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα τότε θα προκαλούσαν νόσο στον άνθρωπο εξαιρετικά σπάνια, καθώς τα φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα δεν έχουν εμπλακεί ποτέ σε εξάρσεις κρουσμάτων Λεγεωνέλλωσης. Κάποιες εξάρσεις κρουσμάτων Λεγεωνέλλωσης έχουν συσχετισθεί με τις κατασκευές και αρχικά θεωρήθηκε ότι τα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν και να μεταδοθούν στους ανθρώπους μέσω του χώματος. Παρόλα αυτά, η *L. pneumophila* δεν επιβιώνει σε ξηρά περιβάλλοντα και αυτές οι εξάρσεις είναι πιο πιθανό να οφείλονταν σε γενικευμένη φθορά των συστημάτων ύδρευσης λόγω αλλαγών στην πίεση του νερού κατά τη διάρκεια της κατασκευής (Katz et al, 1987; Mermel, et al, 1995).

### 3.1 Πηγές μετάδοσης της Λεγεωνέλλας

Περιβαλλοντικές πηγές μετάδοσης της Λεγεωνέλλας είναι τα δίκτυα του νερού τα οποία μπορούν να παράγουν αερολύματα. Αυτά γίνονται επικίνδυνα όταν περιέχουν βακτήρια της Λεγεωνέλλας που διαχέονται στην ατμόσφαιρα. Το νερό στα αερολύματα εξατμίζεται, αφήνοντας σωματίδια που περιέχουν Λεγεωνέλλα στον αέρα τα οποία μπορούν να εισπνευσθούν. Για να επέλθει η λοίμωξη πρέπει να υπάρχει σαφώς ένας ευαίσθητος ξενιστής, τα σωματίδια αυτά να είναι αρκετά μικρά ώστε να φθάσουν ως τις κυψελίδες ή τα βρογχιόλια του πνεύμονα αλλά αρκετά μεγάλα ώστε να περιέχουν τουλάχιστον ένα μικροβιακό κύτταρο.

Οι περιβαλλοντικές πηγές της λοίμωξης σχετίζονται κυρίως με βιομηχανικά μέρη όπου υπάρχουν μηχανές ψύξης με νερό, μεγάλα κτίρια με υδρόψυκτα συστήματα κλιματισμού, το δίκτυο του ζεστού και του κρύου νερού σε κτίρια όπως:

- ξενοδοχεία,
- νοσοκομεία,
- τουριστικά καταλύματα,
- κρουαζιερόπλοια,
- κτίρια με γραφεία,
- κολυμβητικές δεξαμενές με φυσαλίδες (τύπου σπα),
- εξοπλισμός κηπουρικής,
- σιντριβάνια και
- το οικιακό περιβάλλον.

Επίσης υγροποιητές για τη συντήρηση των φαγητών καθώς και ροόμετρα για την παροχή οξυγόνου σε ασθενείς επίσης έχουν αποδειχθεί ότι μπορεί να μεταδώσουν τη Λεγεωνέλλα. (Arnow et al,1982; Mastro et al,1991; Maloney et al 1992, Hahne et al 2002). Η εισρόφηση επίσης έχει αναφερθεί ότι μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη σε νοσηλεύόμενους ασθενείς (Yu, 2000; Blatt et al,1993).

### 3.2 Οδηγίες για έλεγχο και πρόληψη της νόσου των Λεγεωναρίων

Η πρόληψη της νόσου των Λεγεωναρίων εξαρτάται από την εφαρμογή μέτρων για την ελαχιστοποίηση της ανάπτυξης της Λεγεωνέλλας και την διάδοση των αερολυμάτων. Αυτά τα μέτρα περιλαμβάνουν καλή συντήρηση των συσκευών περιλαμβάνοντας τακτικό καθαρισμό και απολύμανση και εφαρμόζοντας άλλα φυσικά (θερμοκρασία) ή χημικά (απολυμαντικά) μέτρα για τη μείωση της ανάπτυξης της Λεγεωνέλλας. Κάποια παραδείγματα από αυτά είναι:

- Η τακτική συντήρηση, καθαρισμό και απολύμανση των πύργων ψύξης ταυτόχρονα με τη συχνή ή διαρκή προσθήκη απολυμαντικών.
- Συντήρηση ενός επαρκούς επιπέδου απολυμαντικού όπως το χλώριο σε δεξαμενή spa μαζί με μία ολοκληρωμένη εκκένωση και καθαρισμό όλου του συστήματος τουλάχιστο εβδομαδιαίως.
- Διατήρηση του ζεστού και του κρύου συστήματος ύδρευσης καθαρό και διατήρηση της θερμοκρασίας του ζεστού στους 60°C και του κρύου κάτω των 20°C .

Η εφαρμογή τέτοιων μέτρων μειώνει τον κίνδυνο της μόλυνσης από Λεγεωνέλλα και εμποδίζει την ανάπτυξη σποραδικών ή έξαρσης κρουσμάτων. Επιπλέον μέτρα χρειάζεται να ληφθούν στην περίπτωση ασθενών εντός των νοσοκομείων .

Αναλυτικές οδηγίες με όλες τις τεχνικές λεπτομέρειες για την εκτίμηση κινδύνου και τη λήψη μέτρων πρόληψης και ελέγχου στα διαφόρου τύπου συστήματα με νερό έχουν εκδοθεί από το ESGLI και είναι διαθέσιμες από τον ιστότοπό του.([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org))

### 3.3 Σχέση με την αμοιβάδα

Η παρουσία των βακτηρίων στα υδάτινα περιβάλλοντα και η ζεστή θερμοκρασία του νερού είναι δύο παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο στην εκδήλωση της νόσου των Λεγεωναρίων. Το τρίτο συστατικό είναι η παρουσία θρεπτικών παραγόντων που επιτρέπουν στη Λεγεωνέλλα να πολλαπλασιαστεί. Αυτά τα βακτήρια απαιτούν ένα μοναδικό συνδυασμό θρεπτικών συστατικών έτσι ώστε να αναπτύσσονται στο εργαστήριο. Αρχικά, αυτές οι ασυνήθεις θρεπτικές απαιτήσεις φάνηκε να έρχονται σε αντίθεση με τη παγκόσμια διασπορά του μικροοργανισμού στα φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα. Τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών που οι λεγεωνέλλες απαιτούν

σπάνια βρίσκονται στα φυσικά ύδατα και αν υπάρχουν θα αναλωνόταν από πιο ταχέως πολλαπλασιαζόμενα βακτήρια σε σχέση με τη Λεγεωνέλλα, τα οποία θα την ανταγωνίζονταν.

Παρόλ αυτά, τα συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά αντιπροσωπεύουν ένα ενδοκυττάριο περιβάλλον. Μη διαλυτά στοιχεία δε βρίσκονται συχνά στα φυσικά ύδατα. Οι λεγεωνέλλες επιβιώνουν σε υδάτινα και υγρά χωμάτινα περιβάλλοντα ως ενδοκυττάρια παράσιτα των ελεύθερων διαβιούντων πρωτοζώων (Fields, 1996; Rowbotham, 1980). Αυτά τα βακτήρια έχουν δείξει ότι πολλαπλασιάζονται μέσα σε 14 διαφορετικά είδη αμοιβάδας, ενώ ανάπτυξη της Λεγεωνέλλας επί απουσίας πρωτοζώων έχει αναφερθεί μόνο στο εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα (Fields, 1996; Hagele, et al, 2000; Solomon, et al, 2000). Τα πρωτόζωα που διαβιούν φυσικά στα περιβάλλοντα που εμπλέκονται ως πηγές μετάδοσης της νόσου των Λεγεωναρίων μπορούν να υποστηρίξουν την ενδοκυττάρια ανάπτυξη της Λεγεωνέλλας *in vitro* ( Barbaree, et al, 1986). Ενώ τα πρωτόζωα είναι οι φυσικοί ξενιστές της Λεγεωνέλλας, η μόλυνση των ανθρώπινων φαγοκυττάρων είναι ευκαιριακή. Πολλές πληροφορίες για την κατανόηση της παθογένεσης της Λεγεωνέλλας προήλθαν από έρευνες για τον τρόπο προσβολής τόσο σε πρωτόζωα όσο και σε ανθρώπινα κύτταρα ξενιστές. Έρευνες που έχουν ασχοληθεί με τους παράγοντες λοιμογονικότητας στους δύο αυτούς ξενιστές οδηγούν στην υπόθεση ότι με τη βοήθεια αυτών η Λεγεωνέλλα μετέβη από την αναγκαία για αυτή σχέση με τα πρωτόζωα στην ευκαιριακή σχέση με τους ανθρώπους.

### **3.4 Σχέση με τις βιομεμβράνες**

Οι Λεγεωνέλλες επιβιώνουν μέσα σε βιομεμβράνες στα δίκτυα ύδρευσης των κτιρίων. Τα βακτήρια ανιχνεύονται ευκολότερα σε δείγματα στυλεών από τις βιομεμβράνες από ότι από το τρεχούμενο νερό, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η πλειονότητα των Λεγεωνελλών σχετίζεται με τις βιομεμβράνες (Rogers, 1994). Ένας περιορισμένος αριθμός μελετών επιχείρησε να προσδιορίσει την αλληλεπίδραση του βακτηρίου μέσα σε αυτό το πολύπλοκο οικοσύστημα (Rogers, 1995; Rogers, 1997; Walker, et al, 1993). Αυτές οι μελέτες έχουν αξιολογήσει το αποτέλεσμα της θερμοκρασίας και των υλικών των επιφανειών στην ανάπτυξη της *L. pneumophila* καθώς και την επίδραση των βιοκτόνων στις μη ελεύθερες λεγεωνέλλες. Η χρήση των μοντέλων βιομεμβρανών για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας έναντι της *L. pneumophila* αντιπροσωπεύει



μία μεγάλη βελτίωση από τις προηγούμενες μελέτες, οι οποίες πρωταρχικά εκτιμούσαν την ευαισθησία των βακτηρίων που είχαν αναπτυχθεί στο άγαρ σε στείρο νερό (Green, and Pirrie, 1993; Kusnetsov et al, 1994). Η πλειονότητα των μελετών για τις βιομεμβράνες και τη λεγεωνέλλα που έχουν γίνει, διεξήχθησαν σε φυσικές μικροβιακές κοινότητες.

Τέτοιες μελέτες έχουν το πλεονέκτημα της αντιπροσώπευσης μιας πραγματικής και φυσικής μικροβιακής κοινότητας, αλλά όλοι οι οργανισμοί που είναι παρόντες δεν έχουν ταυτοποιηθεί κι έτσι η συνεισφορά τους στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των λεγεωνελλών παραμένει άγνωστη. Τα υποστρώματα όπου σχηματίζονται βιομεμβράνες παρέχουν καταφύγιο και θρεπτικά υλικά στις λεγεωνέλλες. Η πολυπλοκότητα των θρεπτικών στοιχείων που είναι διαθέσιμα στις βιομεμβράνες έχουν οδηγήσει ορισμένους ερευνητές να προτείνουν ότι οι βιομεμβράνες υποστηρίζουν την επιβίωση και πολλαπλασιασμό των Λεγεωνελλών έξω από το κύτταρο – ξενιστή (Rogers, and Keevil, 1992). Αυτή η θεώρηση είναι πολύ πιθανή. Τα περισσότερα ενδοκυττάρια βακτήρια είναι γνωστό ότι μπορούν να πολλαπλασιάζονται και εξωκυττάρια σε ορισμένα περιβάλλοντα. Αν οι Λεγεωνέλλες μπορούν να πολλαπλασιαστούν εξωκυττάρια μέσα στις βιομεμβράνες, ο χαρακτηρισμός αυτού του φαινομένου θα μπορούσε να έχει τεράστια επιρροή στις στρατηγικές ελέγχου και πρόληψης της Λεγεωνέλλωσης.

Ερευνητές έχουν προσπαθήσει να ανιχνεύσουν την εξωκυττάρια ανάπτυξη της *L.pneumophila* χρησιμοποιώντας ένα αντιδραστήριο για τη δημιουργία βιομεμβράνης (biofilmreactor) και μία καθορισμένη βιομεμβράνη που αναπτύχθηκε σε πόσιμο νερό χωρίς πρόσθετα (Murga, et al, 2001). Η βάση της βιομεμβράνης βρέθηκε ότι συντέθηκε από *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, και μικροοργανισμούς που μοιάζουν με το *Flavobacterium* σε νερό από το οποίο απομονώθηκε Λεγεωνέλλα. Η προσθήκη της αμοιβάδας *Hartmannella vermiformis* στο αντιδραστήριο (reactor) οδήγησε σε ένα παραγωγικό ισοζύγιο μεταξύ της αμοιβάδας και των ετερότροφων βακτηρίων. Η επιβίωση της *L.pneumophila* σχετίζεται με τέτοιες βιομεμβράνες με ή χωρίς *H. vermiformis*. Κύτταρα της *L.pneumophila* δεν εμφανίζονται να αναπτύσσονται μικροαποικίες και οι μελέτες μέτρησης της ανάπτυξης δείχνουν ότι η *L.pneumophila* δεν πολλαπλασιάζεται σε μία βιομεμβράνη όταν απουσιάζει η αμοιβάδα. Η *L.pneumophila* όντως πολλαπλασιάστηκε στη βιομεμβράνη επί παρουσίας

*H.vermiformis*, και η πλειονότητα αυτών των βακτηρίων φάνηκε να είχε μεταπέσει στην πλαγκτονική φάση.

Επιπρόσθετες μελέτες απαιτούνται για να καθορίσουν αν η Λεγεωνέλλα κατέχει τρόπους πολλαπλασιασμού ανεξάρτητα από τα κύτταρα ξενιστές μέσα στη βιομεμβράνη. Ο έλεγχος των λεγεωνελλών που σχετίζονται με τις βιομεμβράνες μπορεί να οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικά μέτρα ελέγχου για την πρόληψη της Λεγεωνέλλωσης.

### **3.5 Παθογένεση**

#### **3.5.1 Ο ενδοκυττάριος κύκλος**

Η μηχανισμός της παθογένεσης της Λεγεωνέλλας έγινε περισσότερο γνωστός τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια. Δύο βασικοί τομείς διερευνήθηκαν: ο προσδιορισμός του κύκλου της ενδοκυττάριας ζωής του μικροβίου και ο προσδιορισμός των παραγόντων λοιμογονικότητας με μοριακές τεχνικές. Το πρωταρχικό στοιχείο της παθογένεσης της Λεγεωνέλλας είναι η ικανότητά της να πολλαπλασιάζεται ενδοκυτταρίως. Ο κύκλος της ζωής της Λεγεωνέλλας έχει προσδιοριστεί και σε κύτταρα πρωτοζώων και στα κύτταρα θηλαστικών.

Ο κύκλος της Λεγεωνέλλωσης κατά τη διάρκεια προσβολής αυτής στο κύτταρο ξενιστή φαίνεται στην εικόνα 7. Μελέτες του κύκλου αυτού βασίζονται πρωταρχικά σε παρατήρηση με το μικροσκόπιο και σάρωση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και με μικροσκόπιο φθορισμού μετά από σήμανση ποικίλων βακτηριακών κυττάρων και συστατικών των κυττάρων του ξενιστή. Μία σειρά κλασσικών πειραμάτων πραγματοποιήθηκε από τον Horwitz και τους συνεργάτες αυτού στη δεκαετία του 1980 ανακαλύπτοντας τη βασική διαδρομή της *L.pneumophila* στα ανθρώπινα φαγοκύτταρα. Αυτές οι μελέτες καθόρισαν ότι τα βακτήρια εισέρχονται στα κύτταρα με περιελκτική (coiling) φαγοκύττωση και τα βακτήρια παραμένουν μέσα σε ένα φαγόσωμα που δε διαχέεται με τα λυσοσώματα ή γίνεται πολύ όξινο. (Horwitz, 1983; Horwitz & Maxfield, 1984; Horwitz & Silverstein, 1980). Η φαγοκυττάρωση στα ανθρώπινα μονοκύτταρα έχει δείξει να κωδικοποιείται μερικώς από ένα σύστημα τριών παραγόντων που αποτελείται από υποδοχείς του συμπληρώματος CR1 και CR3, ενώ ο ρόλος αυτών των υποδοχέων δεν έχει καθορισθεί (Bellinger-Kawahara, and Horwitz,

1990; Payne and Horwitz, 1987). Ο Horwitz επίσης περιέγραψε την αλληλεπίδραση του φαγοσώματος με τα μιτοχόνδρια και τα ενδοπλασματικό δίκτυο με τα ριβοσωμάτια. (Horwitz, 1983). Ο Rowbotham πρώτος έδειξε ότι η *L. pneumophila* μπορεί να μολύνει τις αμοιβάδες και στη συνέχεια αναγνώρισε τον κύκλο της ζωής του βακτηρίου στην αμοιβάδα στηριζόμενος εξ 'ολοκλήρου στις παρατηρήσεις που έγιναν από το μικροσκόπιο φωτεινής δέσμης (Rowbotham, 1986; Rowbotham, 1980). Παρατήρησε ότι τα βακτήρια προσκολλώνται στους εκτεινόμενους τροφοζώιτες και εισέρχονται στο κύτταρο της αμοιβάδας ως αρκετά βακτήρια ανά κυστιδίο. Τα βακτήρια ξεκίνησαν τον πολλαπλασιασμό και κινούνταν μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Ο Rowbotham επίσης παρατήρησε ότι τα βακτήρια μπορούσαν είτε να αφήσουν το κύτταρο ξενιστή μετά τη λύση ή να παραμείνουν εγκυτωμένα στην αμοιβάδα (Rowbotham, 1986). Δύο φάσεις ανάπτυξης έχουν περιγραφεί για το βακτήριο. Η μορφή που μπορεί να πολλαπλασιάζεται ήταν ακίνητη και περιείχε ένα μη ομαλά περιεγραμμένο κυτταρικό τοίχωμα με λίγο ή καθόλου υδροξυ-βουτυρικό οξύ. Η μορφή που δεν πολλαπλασιάζεται ή αυτή που μολύνει τους ξενιστές είναι μικρότερη με λείο κυτταρικό τοίχωμα, κινητή και περιέχει πολυάριθμα μόρια υδροξυβουτυρικού οξέος.

Πρόσφατα, αυτές οι φάσεις του κύκλου της *L. pneumophila* έχουν προσδιοριστεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια, συνδέοντας την έκφραση αρκετών γονιδίων με κάποιο συγκεκριμένο στάδιο του κύκλου. Οι Hammer και Swanson έχουν προτείνει ότι η ένδεια αμινοξέων στο κύτταρο του ξενιστή προκαλεί συσσώρευση των 3,5-διπυροφωσφορικού οξέος (ppGpp) (Hammer & Swanson 1999). Αυτό θα αύξανε το ποσό του παράγοντα RpoS της στατικής φάσης οδηγώντας στην έκφραση των γονιδίων της στατικής φάσης. Οι πρωτεΐνες της στατικής φάσης διευκολύνουν την προσβολή ενός νέου κυττάρου ξενιστή και περιλαμβάνουν ευαισθησία στο νάτριο, κυτταροτοξικότητα, αντίσταση στην ώσμωση, κινητικότητα και αποφυγή της ένωσης φαγοσώματος – λυσοσώματος (Swanson and Hammer, 2000). Επιπρόσθετα στοιχεία για ένα ακριβή κυτταρικό κύκλο έρχονται από την παρατήρηση ότι η έκφραση της βλεφαρίδας ρυθμίζεται ταυτοχρόνως με την ικανότητα του βακτηρίου να μολύνει τα κύτταρα του ξενιστή. Ο Pruckler et al έδειξαν μία σύνδεση μεταξύ της απώλειας της πρωτεΐνης της βλεφαρίδας (Fla<sub>1</sub>) και την απώλεια της ικανότητας να πολλαπλασιαστεί μέσα στην *H.vermiformis* και στα κύτταρα U937 (Pruckler, 1995). Παρόλ αυτά κάποια στελέχη με έλλειψη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης διατηρούν την ενδοκυττάρια ικανότητά τους

υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν αποτελεί παράγοντα λοιμογονικότητας. Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν μετά από εξέταση 30 στελεχών μέσα από εργαστηριακές συλλογές δείχνοντας ότι όλα τα στελέχη που είχαν ανέπαφη τη βλεφαρίδα ήταν ικανά να μολύνουν την *H. vermiformis*, ενώ στελέχη που δεν κατείχαν τη βλεφαριδική πρωτεΐνη ήταν ανίκανα να προσβάλουν την αμοιβάδα (Bosshardt, et al, 1997). Υπάρχουν πολλές ομοιότητες στις διαδικασίες με τις οποίες οι λεγεωνέλλες προσβάλλουν τα πρωτόζωα και τα φαγοκύτταρα των θηλαστικών. Μικροσκοπικά οι διαδικασίες είναι πανομοιότυπες, αν και σημαντικές διαφορές στο μηχανισμό εισόδου και εξόδου από το κύτταρο του ξενιστή υπάρχουν. Η μέθοδος εισόδου του βακτηρίου έχει περιγραφεί ως περιελκτική φαγοκυττάρωση και για τις αμοιβάδες και για τα ανθρώπινα κύτταρα (Bozue and Johnson, 1996; Horwitz, 1984). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η *L. pneumophila* μπορεί να εισέλθει στον ξενιστή και με συμβατική φαγοκυττάρωση (Cirillo, 1999). Η σημασία της περιελκτικής φαγοκυττάρωσης παραμένει ασαφής και αυτή η μορφή παρατηρήθηκε μόνο με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα κύτταρα της *L. pneumophila* προσκολλώνται τυχαία σε μικρές προβολές στα φιλαπόδια της αμοιβάδας *H.vermiformis* (Fields, 1993). Με το που θα προσκολληθούν στο κύτταρο της *Hartmannella*, τα βακτήρια εισέρχονται γρήγορα στο κύτταρο με μη φαγοκυτταρική διαδικασία. Μελέτες με τους μεταβολικούς αναστολείς μεθυλαμίνη και κυτοχλασίνη D έδειξαν ότι η *L. pneumophila* εισέρχεται στην *H. vermiformis* με μία φόρμα ενδοκύττωσης μέσω προσκόλλησης σε υποδοχέα (King, et al, 1991). Ο πολυμερισμός της ακτίνης, ενός αναγκαίου συστατικού για την φαγοκύττωση, δεν απαιτείται για την μόλυνση της *H. vermiformis* από τη *L. pneumophila*, αν και ο πολυμερισμός είναι απαραίτητος για τη λοίμωξη των ανθρώπινων μονοκυττάρων-U937. Η προσκόλληση της *L. pneumophila* στην *H.vermiformis* επάγει μία αποφωσφορυλίωση τυροσίνης που είναι χρονοεξαρτώμενη σε πολλές πρωτεΐνες του ξενιστή, περιλαμβάνοντας μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 170-kDa ομόλογη της galactose- και *N*-acetylgalactosamine (Gal/GalNAc)-inhibitable λεκτίνης της *Entamoeba histolytica* lectin Vankataraman et al, 1997). Αυτή η λεκτίνη είναι καθαρός υποδοχέας για την προσκόλληση της *L.pneumophila* στην *H. vermiformis*. Μία άλλη διαφορά μεταξύ της εισόδου της *L. pneumophila* σε ανθρώπινα φαγοκύτταρα και την *H. Vermiformis* είναι ο ρόλος της πρωτεϊνοσύνθεσης του ξενιστή. Η κυκλοεξαμίδη, ένας αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης των ευκαρυωτικών

κυττάρων, αναστέλλει την ικανότητα της *L. pneumophila* να εισέλθει στην *H. Vermiformis* με ένα δωσοεξαρτώμενο τρόπο (AbuKwaik, Fields, and Engleberg, 1994). Η *L. pneumophila* χρειάζεται πρωτεϊνοσύνθεση από τον ξενιστή για να μολύνει την *H.vermiformis* αλλά όχι για τα ανθρώπινα κύτταρα U937. Ο ρόλος της σύνθεσης των πρωτεϊνών κατά την είσοδο του βακτηρίου στον ξενιστή παραμένει άγνωστος. Όταν ένα κύτταρο της *L. pneumophila* εισέλθει στον ξενιστή, το βακτήριο καταλαμβάνει ένα μοναδικό φαγόσωμα που δεν ακολουθεί την ενδοπλασματική οδό. Ένας αριθμός μελετών έχουν δείξει ότι το φαγόσωμα με τη *L. pneumophila* δεν έχει δείκτες ή χαρακτηριστικά των συμβατικών φαγοσωμάτων. Οι Swanson και Hammer έχουν δημοσιεύσει μία εκτεταμένη περίληψη αυτών των μελετών (Swanson and Hammer, 2000). Εν συντομία, το νεαρό φαγόσωμα της *L. pneumophila* δεν έχει αλκαλική φωσφατάση, δείκτες του συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και II υποδοχείς τρανσφερίνης, Rab 7, LAMP-1, και καθεψίνη D. Επιπροσθέτως, αυτά τα κενοτόπια δε συσσωρεύουν ενδοκυττάρους ιχνηλάτες όπως ο Texas Red-ovalbumin, CM-DiI, ή Alexa Fluor-στρεπταβιδίνη. Η *L. pneumophila* καταλαμβάνει το κενοτόπιο που είναι ανεξάρτητο από την οδό του ενδοπλασματικού δικτύου. Σχεδόν 4 με 6 ώρες μετά την είσοδο στον ξενιστή, το φαγόσωμα της *L. pneumophila* σχετίζεται με τις μεμβράνες με ριβοσωμάτια που αποδुकνείται ότι είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο του ξενιστή. Μελέτες που χρησιμοποίησαν αντιορούς για να ανιχνεύσουν την πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου BiP, έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται μαζί με το φαγόσωμα της *L. pneumophila* και στα πρωτόζωα και στον άνθρωπο (Abu Kwaik, 1996; Swanson and Isberg, 1995). Αυτή την ικανότητα τη μοιράζεται και με τη *Brucella abortus*, που είναι ένα άλλο ενδοκυττάριο παθογόνο που πολλαπλασιάζεται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο του ξενιστή (Dettileux, Deyoe, and Cheville, 1990). Η *L. pneumophila* αποφεύγει τα λυσοσώματα και την παραδοσιακή ενδοκυττάρια οδό χρησιμοποιώντας ένα νέο μονοπάτι μέσα στον ξενιστή. Δεν είναι ξεκάθαρο τι ποσοστό αυτού του νέου τρόπου κατευθύνεται από την Λεγεωνέλλα και τι ποσοστό συμμετοχής στο μηχανισμό αυτό έχει ο ξενιστής. Το τελικό στάδιο του λοιμώδους κύκλου είναι ο θάνατος του κυττάρου ξενιστή και η απελευθέρωση του βακτηρίου. Η *L. pneumophila* σκοτώνει τον ξενιστή της είτε με απόπτωση ή νέκρωση που προκαλείται από το σχηματισμό πόρου είτε και με τους δύο τρόπους. Στα μακροφάγα και στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα η *L.pneumophila* προάγει την απόπτωση κατά τη διάρκεια των

πρώτων σταδίων της μόλυνσης (Gao, and AbuKwaik, 1999; Hagele, Hacker, and Brand, 1998). Μία δεύτερη φάση νέκρωσης επάγεται από δραστηριότητα σχηματισμού φαγοκυττάρων. Από την άλλη, ο θάνατος των αμοιβαδικών κυττάρων δεν έχει σχετιστεί με απόπτωση σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν οι αμοιβάδες *Acanthamoeba castellanii* και *Acanthamoeba polyphaga* (Gao, and Abu Kwaik, 2000; Hagele, Hacker and Brand, 1998). Ο σχηματισμός πόρου από τη *L. pneumophila* απαιτείται για το θάνατο και την έξοδο από την *A. polyphaga*. Αυτές οι μελέτες προτείνουν ότι ένας διαφορετικός μηχανισμός χρησιμοποιείται για το θάνατο και έξοδο από τα κύτταρα των πρωτοζώων και των θηλαστικών. Στον **πίνακα 3** φαίνονται οι ξενιστές της Λεγεωνέλλας.

**Πίνακας 3:** Ξενιστές της Λεγεωνέλλας

Class	Specie	Type	Reference
Unicellular organisms	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Amoeba	(Bozue and Johnson 1996)
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Amoeba	(Gao et al. 1997)
	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	Amoeba	(Breiman et al. 1990)
	<i>Naegleri fowleri</i>	Amoeba	(Newsome et al. 1985)
	<i>Comandonia operculata</i>	Amoeba	(Breiman et al. 1990)
	<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	Amoeba	(Breiman et al. 1990)
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	Amoeba	(King et al. 1991)
	<i>Paratetramitus jugosis</i>	Amoeba	(Breiman et al. 1990)
	<i>Vahlkampfia ustiana</i>	Amoeba	(Breiman et al. 1990)
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Social amoeba	(Solomon et al. 2000)

<b>Class</b>	<b>Specie</b>	<b>Type</b>	<b>Reference</b>
	Tetrahymena pyriformis	Ciliated protozoa	(Fields et al. 1986)
	Tetrahymena thermophila	Ciliated protozoa	(Kikuhara et al. 1994)
Experimental infection	Mus musculus	MouseA/J strain	(Fujio et al. 1992)
	Cavia porcellus	Guinea pig Hartley strain	(Fitzgeorge et al. 1983)
	Macaca mulatta	Rhesus monkey	(Fitzgeorge et al. 1983)
	Galleria mellonella	Honeycomb moth	(Harding CR et al. 2012)
	Caenorhabditis elegans	Roundworm	(Brassinga 2013)
Cell lines	Mus musculus	RAW 264.7 (Macrophage)	(Cirillo et al. 1994)
	Mus musculus	L929 (Fibroblast)	(Fernandez et al. 1989)
	Homo sapiens	THP-1 (Macrophage-like)	(Cirillo et al. 1994)
	Homo sapiens	U-937 (Macrophage-like)	(Fields 1996)
	Homo sapiens	HeLa (Epithelial)	(Garduno et al. 1998b)
	Homo sapiens	A549 (Epithelial)	(Gao et al. 1998)
Primary cells	Mus musculus	Bone Marrow- derived	(Kagan and Roy 2002)

Class	Specie	Type	Reference
		Macrophages (BMMs)	
	Homo sapiens	Monocyte-Derived Macrophages (MDMs)	(Hilbi et al. 2001)

(Πηγή: [Escoll P, et al.](#) “From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts”. [Curr Top Microbiol Immunol.](#), 2013;376:1-34)

### 3.5.2 Παράγοντες λοιμογονικότητας

Ένας αριθμός παραγόντων παθογονικότητας έχουν περιγραφεί για τη *L. pneumophila*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν τα γονίδια και τα αντίστοιχα προϊόντα τους που παίζουν ρόλο στη λοίμωξη των κυττάρων των θηλαστικών και των πρωτοζώων. Η μελέτη των παραγόντων λοιμογονικότητας σε τόσο διαφορετικούς ξενιστές έχει οδηγήσει στην θεωρία για την εξέλιξη των ενδοκυττάρων παθογόνων. Αυτό το συνεχώς αυξανόμενο σώμα των επιστημόνων προτείνει ότι κάποια ενδοκυττάρια παθογόνα των μεγαλύτερων σπονδυλωτών απέκτησαν την ικανότητα προκειμένου να αποφύγουν τη θήρευση από τα πρωτόζωα (Abu Kwaik, et al,1998; Fields, 1996; Swanson and Hammer, 2000). Αυτή η αλληλεπίδραση παρέχει μία εξαιρετική επιλεκτική πίεση για την απόκτηση των παραγόντων που διευκολύνουν την ενδοκυττάρια επιβίωση και ακολούθως τη λοίμωξη στην **εικόνα 7** απεικονίζεται ο κύκλος της λοίμωξης της Λεγεωνέλλας;. Το 1989, το πρώτο γονίδιο σχετιζόμενο με τη λοιμογονικότητα της *L. pneumophila* ανιχνεύτηκε από ειδική σημειακή μετάλλαξη. Αυτό το γονίδιο, ονομάστηκε *mip* από την έκφραση «macrophage infectivity potentiator», κωδικοποιεί μία επιφανειακή πρωτεΐνη 24-kDa (Mip) (Cianciotto, et al, 1989). Η πρωτεΐνη Mip είναι ένα προκαρυωτικό ομόλογο με τις FK506-δεσμευτικές πρωτεΐνες και παρουσιάζει δραστηριότητα πεπτιδυλπροπυλ-*cis/trans* ισομεράσης (Fischer, et al, 1992). Ακολούθως, γονίδια παρόμοια με το *mip* έχουν ανιχνευτεί σε άλλα είδη Λεγεωνέλλας και σε άλλα γένη βακτηρίων (Cianciotto,1989; Ratcliff, et al, 1997). Το *mip* απαιτείται για την αποτελεσματική



λοιμώξη των ινδικών χοιριδίων, των φαγοκυττάρων των θηλαστικών και των πρωτοζώων και αυτό ήταν το πρώτο γονίδιο που βρέθηκε να ενέχεται στην παθογένεση και των θηλαστικών και των πρωτοζώων (Cianciotto, and Fields, 1992). Ο μηχανισμός της δράσης του *mip* παραμένει άγνωστος. Γονίδια μέσα σε γενετικούς τόπους που κωδικοποιούν το σύστημα έκκρισης τύπου IV της *L. pneumophila* ήταν οι πρώτοι παράγοντες που ανιχνεύθηκαν και βρέθηκαν ότι είναι απαραίτητοι για τη λοίμωξη του κυττάρου ξενιστή. Αυτοί οι γενετικοί τόποι αποτελούνται από 24 γονίδια σε δύο ξεχωριστές περιοχές του χρωμοσώματος της Λεγεωνέλλας και έχουν ονομαστεί Dot/Icm (defective for organelle trafficking/ intracellular multiplication) (Berger, and Isberg, 1993; Marra, et al, 1992). Αυτό το σύστημα έκκρισης τύπου IV κωδικοποιεί παράγοντες οι οποίοι ενέχονται στη συνδεσμολογία και ενεργοποίηση της συζευκτικής μεταφοράς πλασμιδίου DNA (Swanson, and Hammer, 2000; Vogel, et al, 1998). Πιστεύεται ότι η *L. pneumophila* χρησιμοποιεί αυτά τα οπερόνια για να μεταφέρει λοιμογόνους παράγοντες που απαιτούνται για την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή με ένα τρόπο που να προκαλεί έναρξη της διαδικασίας λοίμωξης. Πιθανολογείται ότι το σύστημα μεταφέρει μία πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης που εκτρέπει το φαγόσωμα από την ενδοκυττάρια οδό. Το μόνο εκκρινόμενο υπόστρωμα που έχει αναγνωριστεί από το σύστημα Dot/Icm είναι η DotA, μία πολυτοπική πρωτεΐνη της μεμβράνης (Nagai and Roy, 2001). Ένα πεπτίδιο 19 αμινοξέων απομακρύνεται από την πρωτεΐνη DotA πριν την έκκριση. Γονίδια που κωδικοποιούν τα συστήματα έκκρισης τύπου II απαιτούνται για την χωρίς περιορισμό ενδοκυττάρια ανάπτυξη της *L.pneumophila*. Αυτό το σύστημα έκκρισης τύπου II είναι παρόμοιο με το PilBCD σύστημα μαστιγίων (pilus) στην *Pseudomonas aeruginosa* (Liles, Viswanathan, and Cianciotto, 1998). Αυτά τα γονίδια ανιχνεύθηκαν στην *L. pneumophila* με εξέταση μεταλλαγμένων στελεχών ανίκανων να σχηματίσουν το pilus στο σύστημα έκκρισης τύπου IV (Stone, and Abu Kwaik, 1998).

Τα δύο γονίδια που έχουν μελετηθεί πιο εκτενώς είναι το *pilE* (pilin protein) και το *pilD* (prepilin peptidase) (Liles, Viswanathan, and Cianciotto, 1998; Stone, and Abu Kwaik, 1999). Το *pilE* γονίδιο/pilin πρωτεΐνη δεν απαιτείται για την ενδοκυττάρια ανάπτυξη αλλά μπορεί να ενέχεται στην προσκόλληση στον ξενιστή. Το γονίδιο *pilD* κωδικοποιεί την πεπτιδάση της πρεπιλίνης και είναι απαραίτητη για την παραγωγή του μαστιγίου και τις πρωτεΐνες από σύστημα έκκρισης τύπου II. Η ικανότητα του

μεταλλαγμένου στελέχους για το *pilD* να πολλαπλασιαστεί μέσα στα κύτταρα U937, στη *H. vermiformis*, και στα ινδικά χοιρίδια χειροτερεύει σημαντικά (Liles, Edelstein, and Cianciotto, 1999). Επιπροσθέτως, αυτό το μεταλλαγμένο στέλεχος έδειξε μειωμένη έκκριση ενζυμικών δραστηριοτήτων (Aragon, Kurtz, and Cianciotto, 2011; Aragon, 2000). Η εκκρινόμενη πρωτεΐνη που διευκολύνει την ενδοκυττάρια επιβίωση της *L. pneumophila* δεν έχει προσδιοριστεί. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια της έκκρισης τύπου II εξηγεί το έλλειμα που παρατηρείται στην ενδοκυττάρια επιβίωση του μεταλλαγμένου στελέχους για το γονίδιο *pilD* μέσα στην αμοιβάδα, ενώ ένας νέος *pilD*-εξαρτώμενος μηχανισμός μπορεί να ενέχεται στη λοίμωξη από ανθρώπινα κύτταρα (Rossier, and Cianciotto, 2001).

Επίσης ένα νέο σύστημα έκκρισης τύπου IV το *lvh*, όπου τα προϊόντα του αλληλεπιδρούν με αυτά του *icm/dot* συστήματος (Segal, et al, 1999). Άλλα γονίδια που περιέχονται σε αυτή την περιοχή είναι το *prpA* (encoding a putative phage repressor) και το *Legionella vir region (lvr)* που περιέχει τα γονίδια *lvrA*, *lvrB*, *lvrE* and *lvrC* (Molofsky & Swanson, 2003).

Ακολουθώντας την επώαση του βακτηρίου της *L. pneumophila* στο νερό ή την εγκύστωσή του στην αμοιβάδα, η περιοχή *lvh* ήταν απαραίτητη να διασώσει το φορτίο του κυττάρου ξενιστή σε μεταλλάξεις του συστήματος Dot/Icm (Bandyopadhyay, et al 2007).

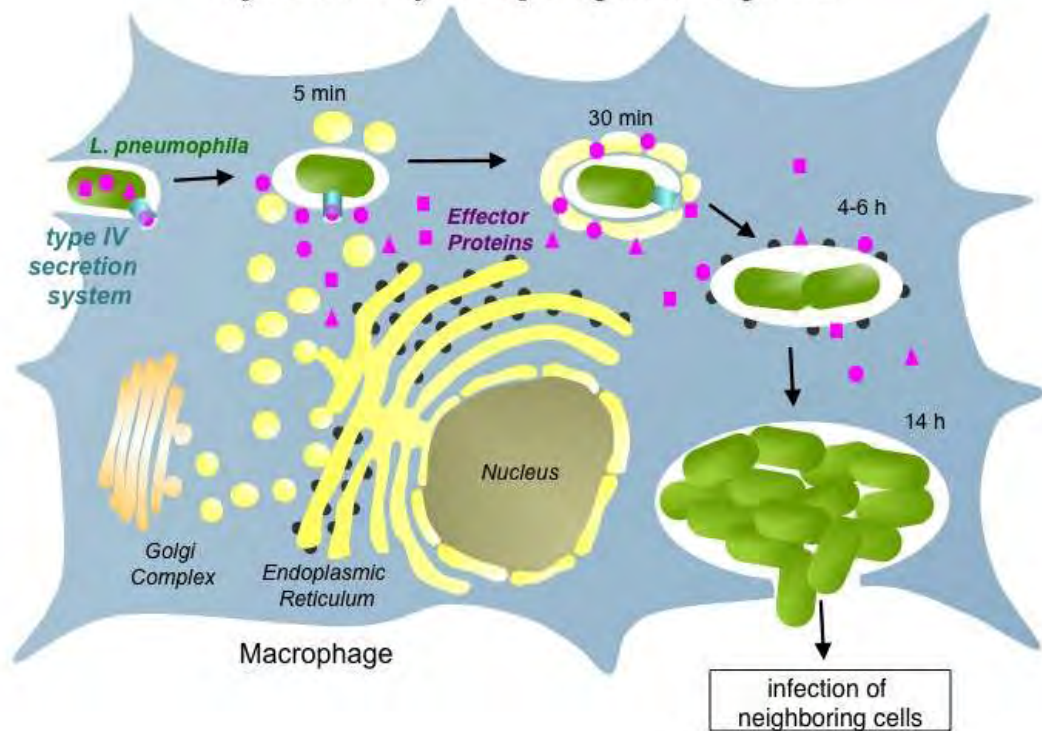
Φαίνεται λοιπόν ότι και τα δύο συστήματα, το *Dot/Icm* και το *lvh* απαιτούνται για συγκεκριμένη δράση στη λοιμογονικότητα όπως η εισβολή στο κύτταρο του ξενιστή. Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του συστήματος *lvh* είναι ότι ο γενετικός αυτός τύπος μπορεί να υπάρξει είτε ως ένα εξωχρωματικό πλασμίδιο είτε ως ένα ενσωματωμένο γενωμικό νησίδιο. Αυτός ο τύπος συστήματος έκκρισης τύπου IV περιέχει 11 γονίδια (*lvh*) ομόλογα με γονίδια άλλων συστημάτων έκκρισης τύπου IV, τοποθετημένα με παρόμοιο τρόπο. Τα γονίδια *lvh* βρέθηκαν να εντοπίζονται σε ένα νησίδιο DNA με περιεκτικότητα σε βάσεις GC υψηλότερες από αυτή του χρωμοσώματος της *L. pneumophila*. Σε αντίθεση με το σύστημα *icm/dot* που έχει δείχθει ότι είναι απαραίτητο για την ενδοκυττάρια ανάπτυξη στα ανθρώπινα μακροφάγα και στην αμοιβάδα, το σύστημα *lvh* βρέθηκε να είναι αναλώσιμο για την ενδοκυττάρια ανάπτυξη σε αυτούς τους δύο ξενιστές (Cazalet, et al, 2004).

Ένα από τα γονίδια που βρίσκονται στο γενετικό τόπο *enh*, είναι το *rtxA*, το οποίο είναι ομόλογο με άλλες επαναλήψεις γονιδίων για τη δόμηση τοξίνης που βρίσκονται και σε άλλα παθογόνα. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα γονίδια *rtx* στα άλλα είδη είναι συνήθως κυτοτοξικές και κάποιες από αυτές συνδέονται στους υποδοχείς της  $\beta_2$  ιντεγκρίνης. (Lally et al, 1997). Στην *L. pneumophila* το γονίδιο *rtxA* ενέχονται στην προσκόλληση, κυτοτοξικότητα και σχηματισμό πόρου καθώς και στην είσοδο της Λεγεωνέλλας στον ξενιστή. (Cirillo, et al, 2001).

Η πρωτεΐνη που παράγεται από το *rtxA* γονίδιο στη *L. pneumophila* είναι μία μεγάλη πρωτεΐνη (περί τα 7.000 αμινοξέα) με αρκετές επαναλαμβανόμενες συνθέσεις στην κατασκευή της και η οποία ανήκει σε τουλάχιστον 3 βασίλεια οικογενών πρωτεϊνών (Cazalet, et al, 2004).

Ένα από τα πρώτα γεγονότα της διαδικασίας παθογένεσης είναι ο σχηματισμός πόρου, ο οποίος φαίνεται να προκαλείται από μία τοξίνη που ανήκει την οικογένεια των *Rtx* (Cirillo, et al, 2001). Έχει δειχθεί ότι το γονίδιο *rtxA* στην *L. pneumophila* σχετίζεται αυστηρά με την παθογονικότητα και ο κύριος ρόλος του περιλαμβάνει προσκόλληση στην μεμβράνη του ξενιστή και διευκόλυνση όλη τη διαδικασία της πορείας μέσα στο κύτταρο του ξενιστή κατά τη διαδικασία της λοίμωξης (Samrakandi, et al, 2002). Σε άλλα βακτήρια όπως η *Bordetella pertussis*, η *Escherichia coli* ο ή ο *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια *Rtx*, περιγράφονται ως μόρια (effectors) λύσης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και η δράση τους πραγματοποιείται μέσω ειδικών υποδοχέων στην μεμβράνη του ξενιστή. (Lally, et al, 1997 & Martin, et al, 2004)

## Infection Cycle of *L. pneumophila*



**Εικόνα 7:** Ο κύκλος λοίμωξης της *L.pneumophila*

(Πηγή: [Escoll P, et al.](#) “From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts”. [Curr Top Microbiol Immunol.](#), 2013;376:1-34)

Αρκετοί άλλοι γενετικοί τόποι ενέχονται στην ενδοκυττάρια ανάπτυξη της Λεγεωνέλλας. Αυτοί περιλαμβάνουν τους *mak* (macrophage killing), *mil* (macrophage-specific infectivity loci), και *pmi* (protozoan and macrophage infectivity) (Gao, Harb, and AbuKwaik, 1997; Gao, 1998; Sadosky, Wiater, and Shuman, 1993). Βλάβες σε οποιαδήποτε από αυτούς τους γενετικούς τόπους οδηγεί στο μειωμένο ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό του οργανισμού ή πλήρη αναστολή της ενδοκυττάριας ανάπτυξης. Ο μηχανισμός της δράσης αυτών των γονιδίων δεν είναι ακόμη γνωστός. Επιπρόσθετοι λοιμογόνοι παράγοντες περιλαμβάνουν αρκετές κυτοτοξίνες, πρωτεΐνες heat shock, φωσφολιπάσες, λιποπολυσακχαρίτες, συμπλέγματα που σχετίζονται με την απόκτηση του σιδήρου και μεταλλοπρωτεάσες (Swanson, and Hammer, 2000).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ - ΘΕΡΑΠΕΙΑ

### 4.1 Κλινικές μορφές της Λεγεωνέλλωσης

Η οποιαδήποτε λοίμωξη από Λεγεωνέλλα ονομάζεται λεγεωνέλλωση. Οι λεγεωνελώσεις έχουν συνήθως δύο εκφάνσεις: τον πυρετό Pontiac και τη νόσο των Λεγεωναρίων.

#### 4.1.1 Πυρετός Pontiac

Ο πυρετός Pontiac είναι μία αυτοπεριοριζόμενη εμπύρετη νόσος του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, μικρής διάρκειας και μοιάζει με μορφή γρίπης (Centers for Disease Control and Prevention, 1995). Τα κύρια συμπτώματα του είναι ο πυρετός, ο πονοκέφαλος, η μυαλγία και η κούραση. Λιγότερο συχνά μπορεί να εμφανιστούν βήχας, δύσπνοια, ανορεξία, αρθραλγία και πονόκοιλος. Οι περισσότεροι ασθενείς αναρρώνουν μετά από 2-4 ημέρες, ενώ έχουν αναφερθεί και κρούσματα που ανάρρωσαν σε 7 ημέρες (Edelstein, 2008)

Οι ασθενείς με πυρετό Pontiac παρουσιάζουν ορομετατροπή σε σχέση με τη *Legionella*, παρόλ αυτά το μικρόβιο δεν έχει απομονωθεί (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Γι' αυτό έχει θεωρηθεί ότι προκαλείται από στελέχη Λεγεωνέλλας ζωντανά αλλά μη καλλιεργήσιμα VBNC (Bentham, R.H., and Broadbent C.R., 1993). Άλλες υποθέσεις εξηγούν ότι ο πυρετός Pontiac συμπεριλαμβάνει αλλαγές στους παράγοντες λοιμογονικότητας, τοξικές ή αντιδράσεις υπερευαισθησίας (Kaufmann, et al, 1981). Επίσης ο Edelstein εξέφρασε την άποψη ότι δεν μπορεί κάποιος με σιγουριά να πει ότι ο αιτιολογικός παράγοντας είναι η Λεγεωνέλλα διατυπώνοντας τη θεωρία ότι μπορεί να οφείλεται στην εισπνοή ενδοτοξινών που προέρχονται από βακτήρια διαφορετικά της Λεγεωνέλλας, ή στην εισπνοή νεκρών ή ζωντανών βακτηριακών κυττάρων της Λεγεωνέλλας ή στην εισπνοή μίγματος μικροοργανισμών και ενδοτοξινών όπου περιέχεται η λεγεωνέλλα μεταξύ αυτών (Edelstein, 2006b).

Ένας ορισμός έχει προταθεί για τον Πυρετό Pontiac από τον Tossa et al, το 2006 (Tossa, 2008). Ενώ η πλειονότητα της επιστημονικής κοινότητας καταλήγει ότι ο

ορισμός του πυρετού Pontiac πρέπει να στηρίζεται στα παρακάτω στοιχεία (Edelstein, 2007) και είναι ο εξής:

- Μία επιδημική εμπύρετη μικρής διάρκειας ασθένεια χωρίς πνευμονία ή σοβαρή ασθένεια.
- Απόδειξη έκθεσης σε αερόλυμα όπου ένα από τα συστατικά του θα πρέπει να είναι η Λεγεωνέλλα.
- Επίδειξη ανοσολογικής απόκρισης στο βακτήριο της Λεγεωνέλλας που βρέθηκε στην περιβαλλοντική πηγή σε κάποιους από τους ασθενείς και απόδειξη ότι μία ομάδα κοντρόλ που δεν εκτέθηκε έχει χαμηλούς τίτλους Λεγεωνέλλας.
- Έλλειψη άλλων σοβαρών ερμηνειών της ασθένειας.

Είναι άγνωστο το πώς μπορεί να διαγνωσθεί ένα μεμονωμένο κρούσμα πυρετού Pontiac κι όταν υπάρχουν αναφορές κρουσμάτων για σποραδικά κρούσματα πρέπει να αντιμετωπίζονται με σκεπτικισμό. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι η Λεγεωνέλλα είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση χωρίς να προκαλεί νόσο και επειδή 25-40% του πληθυσμού μπορεί να έχει ανιχνεύσιμο τίτλο αντισωμάτων έναντι της Λεγεωνέλλας και ιδιαίτερα σε είδη *Legionella non-pneumophila* (Edelstein 2006b).

Ο παγκόσμιος δείκτης επίπτωσης του πυρετού είναι 0,125 κρούσματα ανά ανθρωπόετος [95% διάστημα εμπιστοσύνης: 0,122–0,127] (Tossa, 2008).

Εξαιτίας των ασαφειών σχετικά με την παθογένεση και του ορισμού του πυρετού Pontiac το πλήρες κλινικό φάσμα της νόσου είναι ασαφές. Επίσης δεν καθορίζεται πού τελειώνει ο πυρετός Pontiac και πού αρχίζει η νόσος των Λεγεωναρίων, γι' αυτό άνθρωποι που διαγιγνώσκονται με πυρετό Pontiac μπορεί στην πραγματικότητα να διάγουν ήπια μορφή της νόσου των Λεγεωναρίων και το αντίστροφο (Edelstein, 2007).

#### **4.1.2 Νόσος των Λεγεωναρίων**

**Ορισμός:** Η νόσος των Λεγεωναρίων είναι μία πνευμονία που προκλήθηκε από τη *Legionella* spp. που μπορεί να συνοδεύεται ή όχι από εξωπνευμονικές εκδηλώσεις.

Υπάρχουν πολύ σπάνιες αναφορές κρουσμάτων από Λεγεωνέλλα με εξωπνευμονικές εκδηλώσεις χωρίς την παρουσία πνευμονίας, για τις οποίες ο καλύτερος περιγραφικός

όρος είναι είτε Λεγεωνέλλωση, είτε μία περιφραστική περιγραφή του μέρους της λοίμωξης και του είδους που προκάλεσε τη λοίμωξη, π.χ. πυάρθρωση από *L.longbeachae* (Edelstein, 2008 ).

### **Κλινικά ευρήματα**

Οι παρατηρούμενες διαφορές στην ευαισθησία του ξενιστή και στη λοιμογονικότητα του βακτηρίου δε διευκολύνει τον καθορισμό της μολυσματικής δόσης.

Η νόσος των Λεγεωναρίων ξεκινά με ήπιο βήχα, αδιαθεσία, μυϊκούς πόνους, χαμηλό πυρετό και γαστρεντερικά συμπτώματα. Οι όψιμες εκδηλώσεις της νόσου είναι ο υψηλός πυρετός, κυψελίτιδα και βρογχολίτιδα.

Η πλειονότητα των ασθενών έχουν πυρετό που είναι συνήθως ένα από τα πρώτα συμπτώματα. Συνοδά του πυρετού μπορεί να είναι η ανορεξία, η μυαλγία, τα φρίκια και ο πονοκέφαλος. Πόνος στο στήθος, επιφανειακή αναπνοή και βήχας μπορεί να είναι ή και όχι κύρια ευρήματα. Ο βήχας μπορεί ή όχι να είναι παραγωγικός. Όταν είναι παραγωγικός ο βήχας, τα πτύελα μπορεί να είναι αιματηρά, πυώδη, ή βλεννώδη.

Οι περιπτώσεις απουσίας πυρετών πτυέλων, πόνου στο στήθος και βήχα μπορεί να οδηγήσουν το κλινικό γιατρό μακριά από τη διάγνωση της πνευμονίας. Όταν υπάρχει αιμόπτυση και πόνος στο στήθος μπορεί να θεωρηθεί ότι ο ασθενής πάσχει από πνευμονική απόφραξη.

Κοιλιακός πόνος, διάρροια, ναυτία και έμετος μπορούν να συμβούν, συμπτώματα που μπορούν να οδηγήσουν στη θεώρηση της ενδοκοιλιακής λοίμωξης και φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως σκωληκοειδίτιδα, περιτονίτιδα, αποστήματα, φλεγμονώδεις νόσους των εντέρων και εκκολπωματίτιδα.

Επίσης στους ηλικιωμένους και τους ανοσοκατεσταλμένους μπορεί να μην έχει παρουσιαστεί πυρετός και ευρήματα που να εστιάζονται στους πνεύμονες.

Σύγχυση και απώλεια μνήμης είναι κοινές κλινικές εκδηλώσεις. Λιγότερο συχνές εκδηλώσεις είναι η εγκεφαλοπάθεια, εστιακά νευρολογικά ευρήματα, επιληψία και μηνιγγίτιδα.

Καθώς εξελίσσεται η νόσος που δεν θεραπεύεται τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν πυρετό ή την υποθερμία, διάχυτη πύκνωση των πνευμόνων και συχνά

αναπνευστική ανεπάρκεια. Η πλειονότητα (70%) των μη ανοσοκατεσταλμένων ασθενών χωρίς σοβαρές υποκείμενες νόσους αναρρώνουν χωρίς ειδική θεραπεία αφού είναι αρκετά άρρωστοι για 5-7 ημέρες. Ο θάνατος είναι συνήθως η κατάληξη της αναπνευστικής ανεπάρκειας, ενώ συχνά συνδυάζεται με σύνδρομο σήψης.

Μέχρι 10% των ασθενών με νόσο των Λεγεωναρίων μπορεί να έχουν συλοίμωξη με άλλα μικρόβια. Τέτοια μπορεί να είναι ο *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Cytomegalovirus*, *Pneumocystis jirovecii* και άλλοι (Meyer et al 1980, Ruutu et al 1987, Marrie et al 1992, Edelstein και Cianciotto 2005). Τέλος έχουν αναφερθεί συλοϊμώξεις από δύο διαφορετικούς οροτύπους *L.pneumophila*.

### **Μετάδοση από άτομο σε άτομο**

Έως τώρα συνηθιζόταν να λέγεται στη μετάδοση της νόσου ότι «Δεν έχει αναφερθεί ποτέ μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο». Παρόλ αυτά, πρόσφατα, τον Ιανουάριο του 2016 εστάλη ένα γράμμα προς τον εκδότη επιστημονικού περιοδικού για να ανακοινωθεί μία περίπτωση πιθανής μετάδοσης της Νόσου των Λεγεωναρίων από άτομο σε άτομο. Η μετάδοση αυτή αφορούσε μετάδοση από ένα κρούσμα σε ένα άλλο στα πλαίσια της έξαρσης κρουσμάτων στην Πορτογαλία το 2014 (Correia, Gonçaves, Gomes, et al, 2016).

### **Εργαστηριακά ευρήματα**

Υπονατριαιμία, λευκοπενία ή λευκοκυττάρωση, θρομβοκυττάρωση ή θρομβοκυτοπενία, ανεβασμένα επίπεδα κρεατινίνης στον ορό και ανεβασμένα ηπατικά ένζυμα. Όλα αυτά είναι μη ειδικά εργαστηριακά ευρήματα. Σε ασθενείς με σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια, θρομβοπενία και διάχυτη ενδιαγγειακή πήξη είναι κοινά ευρήματα. Εργαστηριακά ευρήματα παγκρεατίτιδας είναι ένα ευκαιριακό εύρημα καθώς είναι απόδειξη μυοκαρδίτιδας (Meyer, Edelstein, Kirby, et al, 1980).

### **Ακτινολογικά ευρήματα**

Σημαντική βλάβη στους πνεύμονες με διάχυτες διηθητικές περιοχές μπορούν να παρατηρηθούν με ακτινογραφία (Kirby, 1979). Σπήλαια πριν τη διάχυτη πλήρωση δημιουργούνται στο 10% των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών. Πλευρικές συλλογές παρουσιάζονται στο 40% των ασθενών, που συχνά έχουν άλλες ασθένειες όπως



συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και νεφρική ανεπάρκεια. Παρόλ αυτά, ένα μικρό ποσοστό ασθενών παρουσιάζουν μία μικρή πλευριτική συλλογή χωρίς εμφανείς διηθήσεις ως το μοναδικό ακτινολογικό εύρημα.

### **Ευρήματα φυσικής εξέτασης**

Είναι όμοια με αυτό της όποιας πνευμονίας, ταχύπνοια και ταχυκαρδία. Σύγχυση και απώλεια μνήμης επίσης είναι συχνά.

### **Ιστολογικά ευρήματα**

Ιστολογικά ευρήματα περιγράφουν ενδο- και εξωκυττάρια βακτήρια σε φαγοκύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα (Tan, 2000).

### **Εξωπνευμονικές εκδηλώσεις**

Οι εξωπνευμονικές εκδηλώσεις της νόσου των Λεγεωναρίων μπορεί να είναι δύο ειδών: οργανική ή ιστική νόσος χωρίς προφανή λοίμωξη και μεταστατική ή συνεχόμενη λοίμωξη. Παραδείγματα του πρώτου τύπου είναι το σύνδρομο σήψης, η ηπατίτιδα, η παγκρεατίτιδα, η μυοσίτιδα, η μυοπερικαρδίτιδα και η εγκεφαλίτιδα. Από αυτά τα πιο συχνά είναι η σήψη, η μυοσίτιδα και η παγκρεατίτιδα (Edelstein and Cianciotto, 2005; Edelstein, 2006a). Παραδείγματα του δεύτερου τύπου περιλαμβάνουν, πλευρικό εμπύημα, πυώδη περικαρδίτιδα, λοιμώξεις αγγειακών μοσχευμάτων, νεφρικά και εγκεφαλικά αποστήματα, πυώδη περιτονίτιδα, αποστήματα εντέρου, πυάρθρωση και άλλα. Από αυτές το πιο συχνό είναι το πλευριτικό εμπύημα (McClelland et al, 2004). Λοιμώξεις από Λεγεωνέλλες επί απουσία νόσου των Λεγεωναρίων είναι μη συνηθισμένες (McClelland et al, 2004). Οι περισσότερες έχουν σχέση με άμεση επαφή τραυματισμένων ιστών με μολυσμένο νερό με Λεγεωνέλλες. Ένα παράδειγμα περιλαμβάνει λοιμώξεις σε τραύμα στέρνου από *L.pneumophila* και *L.dumoffii* μετά από μπάνιο μετεγχειρητικών ασθενών στην καρδιά με μολυσμένο νερό (Lowry et al, 1991). Ένα άλλο παράδειγμα περιλαμβάνει λοίμωξη τραύματος μετά από πλύση με νερό αποικισμένο με *L.pneumophila* (Brabender et al, 1983).

### **Παράγοντες κινδύνου για την πνευμονία της κοινότητας και αυτής που σχετίζεται με ταξίδια είναι:**

- το κάπνισμα,
- ιστορικό αλκοολισμού,
- νόσος του αναπνευστικού,

- ανοσοκαταστολή, και
- χρόνια αναπνευστική ή νεφρική νόσος.

**Παράγοντες κινδύνου για την ενδονοσοκομειακή λεγεωνέλλωση είναι:**

- πρόσφατη χειρουργική επέμβαση,
- διασωλήνωση,
- μηχανικός αερισμός,
- αναρρόφηση,
- ρινογαστρικός σωλήνας και
- η χρήση των συσκευών παροχής οξυγόνου.

Οι πιο επιρρεπείς ασθενείς είναι οι ανοσοκατεσταλμένοι, στους οποίους περιλαμβάνονται οι μεταμοσχευθέντες ασθενείς, οι καρκινοπαθείς και αυτοί που λαμβάνουν θεραπεία με κορτικοστεροειδή.

**Θεραπεία**

Η αποτελεσματική θεραπεία της νόσου των Λεγεωναρίων απαιτεί αντιβιοτικά που θα είναι ενεργά έναντι της ενδοκυττάριας *Legionella* spp. Σε πρώτες έρευνες είχε δειχθεί ότι η ερυθρομυκίνη και η ριφαμπικίνη αναστέλλουν την ανάπτυξη της Λεγεωνέλλας αλλά με την απομάκρυνση αυτών αυτή επανέρχεται (Edelstein, 1998). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις νεότερες φλουροκινολόνες και μακρολίδες, που σκοτώνουν ενδοκυτταρίως τη Λεγεωνέλλα και δεν επιτρέπουν την επανάπτυξή της. Η Αζιθρομυκίνη είναι η πιο ενεργή μακρολίδη και έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα από την ερυθρομυκίνη έναντι της ενδοκυττάριας ανάπτυξης της Λεγεωνέλλας (Edelstein, 1991; Fitzgeorge, 1993; Jonas, 2003). Η κλινική εμπειρία με τη χρήση της αζιθρομυκίνης στη θεραπεία της Νόσου των Λεγεωναρίων είναι ότι η χρήση αυτού είναι ασφαλής και αποτελεσματική για τον ασθενή (Edelstein, 1995; Plouffe, 2003). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που λαμβάνουν μονοθεραπεία με ενδοφλέβια αζιθρομυκίνη για 2-7 ημέρες, η οποία συνεχίζεται στη συνέχεια από το στόμα, θεραπεύονται.

Η αποτελεσματικότητα της λεβοφλαξισίνης αναφέρθηκε σε μία μελέτη που συνέκρινε έξι κλινικές δοκιμές που συμπεριλάμβαναν συνολικά 1.997 ασθενείς με πνευμονία της κοινότητας. Πάνω από 90% των ήπιων – μέτριων περιπτώσεων θεραπεύτηκαν. Κανένας θάνατος δεν αναφέρθηκε (Yu et al, 2004). Σε άλλες μελέτες έγινε σύγκριση της Λεβοφλαξισίνης με άλλες μακρολίδες όπου έδειξαν ότι δεν υπήρχαν στατιστικώς

σημαντικές διαφορές στις περιπτώσεις των ήπιων-μέτριων νόσων αλλά στους ασθενείς με σοβαρή νόσο η λεβοφλοξασίνη ήταν ελαφρώς πιο αποτελεσματική. Ο συνδυασμός της ριφαμπικίνης και της λεβοφλοξασίνης δεν προσδίδει επιπλέον όφελος όμως προσθέτει παρενέργειες. Εν συντομία, η λεβοφλοξασίνη φαίνεται να σχετίζεται με καλύτερο κλινικό αποτέλεσμα, περιλαμβάνοντας γρηγορότερη απόσυρση των συμπτωμάτων της πνευμονίας, γρηγορότερη επίτευξη της κλινικής σταθερότητας και μικρότερη παραμονή στο νοσοκομείο. Με βάση τα παραπάνω η μονοθεραπεία με λεβοφλοξασίνη μπορεί να θεωρηθεί ως θεραπεία πρώτης εκλογής .

Έτσι ως θεραπεία για τη Λεγεωνέλλα συστήνεται η χρήση φλουροκινολόνων και νεότερων μακρολίδων (Pedro –Botet et al,2006).

Οι ασθενείς που θεραπεύονται με ειδικά αντιβιοτικά συνήθως βελτιώνονται ταχέως με τις συστηματικές εκδηλώσεις, όπως η σύγχυση και η σήψη, να εξαφανίζονται πολύ γρήγορα. Μέχρι μία εβδομάδα μπορεί να χρειαστεί για τους ασθενείς να απυρετήσουν τελείως αν και ο πυρετός αρχίζει να μειώνεται από το πρώτο δωδεκάωρο από την έναρξη της θεραπείας.

Οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς ή ασθενείς με προχωρημένη πνευμονία μπορεί να έχουν είτε καθόλου απόκριση ή πολύ αργή απόκριση στην ειδική θεραπεία, με παρατεταμένο πυρετό και αναπνευστική ανεπάρκεια.

Η καθυστέρηση στην έναρξη της κατάλληλης θεραπείας της νόσου των Λεγεωναρίων αυξάνει σημαντικά τη θνησιμότητα (Heath et al, 1996; Gacouin et al, 2002; Lettinga et al, 2002). Για αυτό συστήνεται ότι στην εμπειρική θεραπεία των σοβαρών μορφών της πνευμονίας της κοινότητας πρέπει να συμπεριληφθεί αγωγή που να καλύπτει τη νόσο των Λεγεωναρίων. Σε οδηγίες που έχει δημοσιεύσει το 2007 η αμερικανική εταιρεία θώρακος για τη διαχείριση της πνευμονίας της κοινότητας σε ενήλικες προτείνεται η αγωγή για τη Λεγεωνέλλα να είναι η αζιθρομυκίνη και οι φλουροκινολόνες (Λεβοφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη, γεμιφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη) και αζιθρομυκίνη ενώ ως εναλλακτική θεραπεία επιλέγεται η δοξυκυκλίνη. Η δοσολογία τους είναι η συνήθης μία δόση την ημέρα, όμως άλλοι ερευνητές προτείνουν και το διπλασιασμό της δόσης αυτών κατά την πρώτη χορήγηση των αντιβιοτικών σε πολύ σοβαρές περιπτώσεις με σκοπό την καλύτερη έκβαση της υγείας του ασθενούς (π.χ. 500 mgqd ή

750 mgqd λεβοφλοξασίνη). (Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus, 2007)

### **In vitro ευαισθησία της Λεγεωνέλλας στα αντιβιοτικά**

Τεστ ευαισθησίας μπορούν να εφαρμοστούν σε τεχνητά μέσα για την εύρεση ενεργών αντιβιοτικών έναντι στη Λεγεωνέλλα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η σύσταση των εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων (όπως ο οργανικός άνθρακας ) μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα του in vitro ελέγχου της ευαισθησίας του μικροβίου στα αντιβιοτικά. Μακρολίδες, κινολόνες, κετολίδες, κινोπριστίνη/νταλφοπριστίνη, δοξκυκλίνη, μιπενέμη, ριφαμπικίνη και τιγκεκυκλίνη είναι παράγοντες που είναι ενεργοί in vitro.(Stout, 1998; Nielsen, 2000; Hammerschlag, 2001; Edelstein, 2003; Stout, 2005). Αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να προκληθεί σε εργαστηριακά πειράματα (Dowling, 1985; Nielsen, 2000b; Jonas, 2003). Παρόλ αυτά δεν έχει σημειωθεί μέχρι τώρα αντοχή στα αντιβιοτικά σε κλινικά περιστατικά. Αναφερόμενες αποτυχίες στη θεραπεία ή παρατεταμένη κλινική συνδρομή δε συσχετίστηκαν με ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά (Rudin, 1984; Kurz, 1988; Tan, 2001; Glaser 2005).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η Λεγεωνέλλα δεν περιλαμβάνεται ακόμη στις οδηγίες του EUCAST . (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 5.0, valid from 2015-01-01, <http://www.eucast.org>.)

Η κατάλληλη θεραπεία με αντιβιοτικά έναντι της Λεγεωνέλλας δεν απαιτεί την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους επειδή όλα τα είδη της Λεγεωνέλλας που έχουν ελεγχθεί είναι ευαίσθητα στα κοινά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται (Αζιθρομυκίνη και Λεβοφλοξασίνη) τόσο στις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις όσο και στις λοιμώξεις της κοινότητας. Σε αντίθεση με τις πνευμονίες της κοινότητας που οφείλονται σε *Mycoplasma pneumoniae* και *Streptococcus pneumoniae*, επίκτητη αντοχή στα αντιβιοτικά δεν έχει αναφερθεί για τη Λεγεωνέλλα, αν και μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει ένα κλινικό στέλεχος όπου εμφάνισε αντοχή στην αζιθρομυκίνη και τη Σiproφλοξασίνη.(Infectious Diseases Society of America, American Thoracic Society, 2007; Lewis, Thacker, Shepard, et al, 1978; Diederer, 2008; Garcia-Vidal, Carratala , 2006; American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America, 2005; 219. Edelstein, 1995; Lee, Vickers, Yu, et al, 1993;) Μία επακόλουθη μελέτη προσπάθησε

να περιγράψει την μοριακή βάση της αντοχής αυτής αλλά δεν μπόρεσε να προσδιορίσει αν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrA* έγιναν πριν ή μετά τη λήψη της αντιβίωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία μακρολίδη επόμενης γενιάς (η πρώτη φλουροκετολίδη), η σολιθρομυκίνη η οποία είναι στη φάση ΙΙΙ των κλινικών δοκιμών και τουλάχιστο *in vitro* φαίνεται να είναι πολύ ενεργή έναντι της *L.pneumophila* οροτύπου 1. (Bebear, Pereyre, Peuchant, 2011; Cornick, Bentley, 2012; Bruin, Ijzerman, den Boer, et al, 2012)

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

### **5.1 Η έκταση της νόσου**

Η επίπτωση της νόσου των Λεγεωναρίων της κοινότητας ποικίλλει σύμφωνα με το επίπεδο της επιδημιολογικής επιτήρησης και αναφοράς. Αφού πολλές χώρες δε χρησιμοποιούν κατάλληλες μεθόδους για τη διάγνωση της λοίμωξης ή δεν έχουν επαρκές σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης, ο πραγματικός δείκτης της επίπτωσης είναι άγνωστος. Στην Ευρώπη, Αυστραλία και ΗΠΑ ανιχνεύονται 10–15 κρούσματα ανά εκατομμύριο πληθυσμού.

### **5.2 Κατανομή και Επιδημιολογικοί Δείκτες της Λεγεωνέλλωσης**

Η νόσος των Λεγεωναρίων θεωρείται ότι κατανέμεται σε όλο τον κόσμο. Η θνητότητα των κρουσμάτων εξαρτάται από τη σοβαρότητα της νόσου, πως αυτή αποκτήθηκε, πότε διαγιγνώσθηκε, την καταλληλότητα και την έναρξη της αντιμικροβιακής θεραπείας και την παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου (Tkatch et al., 1998; Fernandez et al., 2002; Garcia-Fulgueiras et al., 2003; Roson et al., 2004; Edelstein & Cianciotto, 2005)

Στην έξαρση κρουσμάτων στη Φιλαδέλφεια το 1976, 34 από τους 182 ασθενείς (18.7%) πέθαναν (Fraser et al., 1977). Επομένως ο μέσος όρος της θνησιμότητας είχε υπολογιστεί να είναι γύρω στο 15–20% των νοσηλευόμενων περιπτώσεων (Edelstein & Meyer, 1984; Guerin, 1992; Roig & Rello, 2003). Στις ΗΠΑ, η θνητότητα είχε καταγραφεί έως 40% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, συγκρινόμενη με το 20% μεταξύ των ασθενών με πνευμονία της κοινότητας (CDC, 1997a). Πιο πρόσφατα δεδομένα από τις ΗΠΑ και την Αυστραλία έδειξαν δείκτες θνητότητας 14% για

ενδονοσοκομειακά κρούσματα και 5–10% για κρούσματα της κοινότητας (Benin et al., 2002; Howden et al., 2003). Στην Ευρώπη, ο συνολικός δείκτης θνητότητας είναι περίπου στο 12%. Η πρόωμη διάγνωση αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση του ασθενούς. Στη μεγαλύτερη καταγεγραμμένη έξαρση κρουσμάτων που συνέβη στη Murcia της Ισπανίας, υπήρχαν 449 επιβεβαιωμένα κρούσματα, αλλά ο δείκτης θνητότητας ήταν μόλις 1% (Garcia-Fulgueiras et al, 2003). Αυτός ο χαμηλός δείκτης θνητότητας οφειλόταν προφανώς στην ενημέρωση των γιατρών για τον κίνδυνο της Λεγεωνέλλωσης καθώς επίσης πως η αναγνώριση, η επιβίωση και η ανάρρωση εξαρτάται από την έγκαιρη επέμβαση και τη σωστή επιλογή αντιμικροβιακής θεραπείας, ιδιαίτερα σε σοβαρές περιπτώσεις (Tkatch et al, 1998; Gacouin et al, 2002; Roig & Rello, 2003). Προχωρημένη ηλικία και συνοσηρότητα είναι δείκτες υπέρ του θανάτου για τη νόσο των Λεγεωναρίων. Μία μελέτη αξιολόγησε προγνωστικούς παράγοντες σοβαρών κρουσμάτων της νόσου των Λεγεωναρίων που εισήχθησαν στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (elEbiary et al, 1997). Σε αυτή τη μελέτη, ο μόνος ανεξάρτητος παράγοντας που σχετιζόταν με το θάνατο, ήταν APACHE σκορ μεγαλύτερο από 15 στην εισαγωγή (APACHE — acute physiology and chronic health evaluation — is an algorithm for predicting hospital mortality). Ο Cunha (1998) δημοσίευσε επίσης ένα σύστημα βαθμολόγησης βασιζόμενο σε κλινικά σημεία της νόσου των Λεγεωναρίων και εργαστηριακά ευρήματα (Cuhna, 1998).

### **Η.Π.Α - CDC**

Ένας εκτιμώμενος αριθμός 8.000–18.000 ατόμων νοσηλεύονται για Λεγεωνέλλωση κάθε χρόνο στις Η.Π.Α. Περίπου 5% -30% των κρουσμάτων πεθαίνουν (Centers for Disease Control and Prevention, 2011). Κατά τη διάρκεια των ετών 2000 και μετά, κρούσματα Λεγεωνέλλωσης στις ΗΠΑ αναφέρθηκαν στο CDC αυξημένα κατά 279%, από 1.110 το 2000 στα 4.202 το 2011. Κατά τη διάρκεια της ίδιας περιόδου, η εθνική επίπτωση της Λεγεωνέλλωσης αυξήθηκε κατά 249%, από 0,39 ανά 100.000 άτομα το 2000 σε 1,36 ανά 100.000 άτομα το 2011 (Centers for Disease Control and Prevention , 2011; Adams, Gallagher, Jajosky, et al, 2013).

Σε μία έρευνα που διεξήχθη στην Νέα Υόρκη, υπολογίσθηκε η επίπτωση και η θνησιμότητα στα κρούσματα από την Νέα Υόρκη για τη χρονική περίοδο 2002-2011. Οι ορισμοί κρούσματος ήταν αυτοί που ορίζει το συμβούλιο των επιδημιολόγων της

Πολιτείας και περιοχής (Council of State and Territorial Epidemiologists, 2005). Αυτά τα κριτήρια συμπεριελάμβαναν ακτινολογική ή κλινική πνευμονία και εργαστηριακή διάγνωση με ανίχνευση αντιγόνου στα ούρα καλλιέργεια ή τετραπλάσια αύξηση τίτλου αντισωμάτων στον ορό για την *L.pneumophila*.

Τα κρούσματα διαγνώστηκαν με το τεστ των ούρων ( $n = 1.409$ , 97,2%). Ποσοστό 5,7% ( $n = 82$ ) όλων των κρουσμάτων επιβεβαιώθηκαν με καλλιέργεια. Ο αδρός δείκτης επίπτωσης της Λεγεωνέλλωσης αυξήθηκε από 0,83 κρούσματα/100.000 πληθυσμό το 2002 στην υψηλότερη επίπτωση των 2,74 κρουσμάτων/100.000 πληθυσμό το 2009, μία αύξηση κατά 230%. Στο 2010 και 2011, οι αδροί συντελεστές επίπτωσης παρέμειναν υψηλοί στα 2,02 και 2,64 κρούσματα /100.000 πληθυσμό αντίστοιχα. Ο μέσος όρος επίπτωσης για το 2002-2011 ήταν 1,75 κρούσματα/100.000 πληθυσμό. Η επίπτωση της Λεγεωνέλλωσης αυξήθηκε σε όλες τις ηλικιακές ομάδες κατά την περίοδο ανάλυσης, αλλά η μεγαλύτερη αύξηση (826%) ήταν για την ηλικιακή ομάδα 70–79 από το 2002 έως το 2010. Η επίπτωση των κρουσμάτων από την κοινότητα ήταν σταθερά υψηλότερη κατά το καλοκαίρι και νωρίς το φθινόπωρο. 71,6% ( $n = 1.038$ ) των κρουσμάτων διαγνώστηκαν κατά τη διάρκεια των μηνών Ιουνίου έως Οκτώβριο. Ο μέσος όρος της επίπτωσης ήταν υψηλότερος για τον ανδρικό πληθυσμό σε σχέση με το γυναικείο. (2,29 κρούσματα/100,000 πληθυσμό έναντι 1,26 κρούσματα/100.000 πληθυσμό ( $p = 0.0004$ ) και ήταν υψηλότερος για τις μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες. Ο μέσος όρος ηλικίας των κρουσμάτων ήταν τα 61 έτη (μέσος όρος 61,8 έτη, εύρος από 9 μηνών έως 103 ετών), και η συνολική επίπτωση αυξήθηκε για κάθε ηλικιακή ομάδα, με την μέγιστη επίπτωση στην ομάδα των άνω των 80 ετών. Τα κρούσματα προσβλήθηκαν κυρίως στην κοινότητα (88,3%,  $n = 1.279$ ) από τα επιβεβαιωμένα (7,0%,  $n = 102$ ) ή πιθανά (4,7%,  $n = 68$ ) ενδονοσοκομειακά.

Συνολικά, 12,8% (185/1.449) των ασθενών με Λεγεωνέλλωση πέθαναν πριν η διερεύνηση των κρουσμάτων κλείσει. Οι ρυθμοί θανάτων ήταν σημαντικά υψηλότεροι για τους ασθενείς με ενδονοσοκομειακή λοίμωξη από αυτούς με λοίμωξη της κοινότητας. (odds ratio [OR] 4.78, 95% CI 3.07–7.46). Συνολικά, 35,3% (36/102) των κρουσμάτων με σαφώς ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις πέθαναν, συγκρινόμενοι με το 10,2% (131/1.279) εκείνων με λοιμώξεις που αποκτήθηκαν στην κοινότητα.

Οι αδροί δείκτες για τους θανάτους των γυναικών ήταν 1,48 φορές μεγαλύτεροι από εκείνους των ανδρών για τις λοιμώξεις της κοινότητας (95% CI 1,09–2,02;  $p = 0,02$ ), αλλά μετά από προσαρμογή των ηλικιών δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά για τους θανάτους μεταξύ των αντρών και γυναικών (OR 1,33, 95% CI 0,97–1,83;  $p = 0,07$ ).

Στις Η.Π.Α. ο οργανισμός που ασχολείται με τη Λεγεωνέλλα είναι το CDC. Στην ιστοσελίδα αυτού υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τις Λεγεωνελλώσεις τόσο για τον πληθυσμό όσο και για τους ιατρούς και τους άλλους επαγγελματίες υγείας. ([www.cdc.org](http://www.cdc.org) Farnham, Alleyne, Cimini, et al,2014)

### **Καναδάς**

Στο Οντάριο, η πρώτη αύξηση της Λεγεωνέλλωσης συνέβη στο 2005, η οποία οφειλόταν σε μία έξαρση κρουσμάτων σε οίκο ευγηρίας στο Τορόντο. Από το 2009, οι δείκτες επίπτωσης των αναφερόμενων επιβεβαιωμένων κρουσμάτων Λεγεωνέλλωσης έχει αυξηθεί κατά μέσο όρο 39.2% κάθε χρόνο. Στο 2013, 264 κρούσματα αναφέρθηκαν στο Οντάριο, τα οποία αντιστοιχούν σε επίπτωση 2.0 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμό (Public health Ontario, 2014).

### **Σιγκαπούρη**

Σε μία μελέτη για τον προσδιορισμό των επιδημιολογικών δεικτών για τη νόσο της Λεγεωνέλλωσης στη Σιγκαπούρη μελετήθηκαν κρούσματα κατά τα έτη 2000-2009. Κατά της διάρκειας αυτής της περιόδου, 238 εγχώρια και 33 εισαγόμενα κρούσματα Λεγεωνέλλωσης αναφέρθηκαν. Αν και η ετήσια επίπτωση για τα εγχώρια κρούσματα μειώθηκε από 0,46 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμό το 2003 σε 0,16 κρούσματα ανά 100.000 το 2009, το ποσοστό των εισαγόμενων κρουσμάτων αυξήθηκε από 6,2% κατά τη διάρκεια της περιόδου 2000–2004 σε 27,3% κατά τη διάρκεια της περιόδου 2005–2009 ( $p < 0.0005$ ).

Ο συνολικός δείκτης θνητότητας ήταν (CFR) 2,2% για τις επιβεβαιωμένες και πιθανές περιπτώσεις. Ενώ μόνο για τις επιβεβαιωμένες περιπτώσεις ήταν 3,7% . Αν και κανένα από τα κρούσματα δε διαγνώσθηκε με μέθοδο ανοσοφθορισμού ή καλλιέργεια αναπνευστικών εκκρίσεων το ποσοστό των κρουσμάτων που διαγνώσθηκαν με τη



χρήση του τεστ των ούρων αυξήθηκε από 10,8% το 2000 σε 19,0% το 2005 και 45,5% το 2009. Ανάμεσα στις τρεις κύριες εθνικές ομάδες που διαβιούν εκεί, οι Ινδοί είχαν τον υψηλότερο μέσο όρο του δείκτη της επίπτωσης (0,83 κρούσματα/100.000 πληθυσμό), ακολουθούμενοι από τους Κινέζους (0.70 κρούσματα/100.000 πληθυσμό) και τους Μαλαισιανούς (0.55 κρούσματα/100,000 πληθυσμό) (Lam, Ang, Tan, et al, 2011).

### **Αυστραλία**

Υπήρχε μία αύξηση κατά 23% στις αναφορές των λεγεωνελλώσεων το 2011 (n=80) σε σχέση με τα προηγούμενα 4 χρόνια (n=65). Όπως είναι τυπικό στη Δυτική Αυστραλία, η πλειονότητα των λοιμώξεων οφείλονται στην *Legionella longbeachae* (72%), που σχετίζεται με την έκθεση στην κηπουρική και το υπόλοιπο προκλήθηκε από τη *L. pneumophila*, που σχετίζεται με τη δημιουργία αερολυμάτων. Τέσσερα από τα 14 κρούσματα από *L. pneumophila* που καταγράφηκαν στο 2011 ήταν μέρος μίας έξαρσης κρουσμάτων που ξεκίνησε το 2010 και σχετιζόταν με ένα ιδιαίτερο ξενοδοχείο στην Κούτα στο Μπαλί στην Ινδονησία. Τα κρούσματα που συσχετίστηκαν με αυτό το ξενοδοχείο ή μια κοντινή πηγή ήταν κάτοικοι της Βικτώριας της Αυστραλίας και Ευρωπαίοι (Steele,1989).

### **Αφρική**

Ενώ τα πρώτα κρούσματα Λεγεωνέλλας αναφέρθηκαν από το Γιοχάνεσμπουργκ το 1980 δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την επίπτωση και τη θνησιμότητα ή θνητότητα της νόσου στην μεγάλη αυτή ήπειρο λόγω μη επαρκούς επιδημιολογικής επιτήρησης της νόσου. Δεδομένου ότι στην Αφρική έχουμε υψηλά ποσοστά ασθενών με HIV που είναι ανοσοκατεσταλμένοι οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στο να προσβληθούν από Λεγεωνέλλωση θα ήταν καλό να υπήρχε μία καλύτερη οργάνωση για την πρόληψη και αντιμετώπιση της νόσου των Λεγεωναρίων (Wolter, 2016).

### **Ευρώπη**

Το Ευρωπαϊκό δίκτυο Επιτήρησης για τη νόσο των Λεγεωναρίων πραγματοποιεί την επιτήρηση της νόσου των Λεγεωναρίων για την Ευρώπη. Όλα τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής ένωσης και Ισλανδίας και Νορβηγίας, συμμετέχουν στο δίκτυο. Τα μέλη

των δικτύων είναι επιδημιολόγοι ή μικροβιολόγοι που είναι εξουσιοδοτημένοι από τις αρχές δημόσιας υγείας του κάθε κράτους.

Το ELDSNet συντονίζεται από το ECDC με την υποστήριξη μίας επιτροπής συντονισμού που αποτελείται από αντιπροσώπους από κάθε μέλος κράτος της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η επιτροπή συμβουλεύει το ECDC με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να ενδυναμώνεται και να βελτιώνεται η επιδημιολογική επιτήρηση και πρόληψη στην Ευρώπη. Η επιτροπή επίσης συντάσσει και υποβλέπει τεχνικές οδηγίες σχετικά με το δίκτυο και βοηθά το ECDC στην οργάνωση της συνάντησης του δικτύου που πραγματοποιείται κάθε χρόνο. Το ELDSNet επίσης συνεργάζεται με συνεταιίρους όπως η Παγκόσμια Οργάνωση υγείας (WHO), αρχές δημόσιας υγείας των κρατών εκτός ευρωζώνης και τουριστικούς πράκτορες.

Το 1986, δημιουργήθηκε η Ευρωπαϊκή ομάδα εργασίας για τις Λοιμώξεις από Λεγεωνέλλα (EWGLI) με σκοπό να καταστήσουν δυνατή τη διεθνή συνεργασία σε όλη την ευρώπη για τις λοιμώξεις από Λεγεωνέλλα. Το EWGLI εισήγαγε το Ευρωπαϊκό Σχήμα Επιδημιολογικής επιτήρησης για τη νόσο των Λεγεωναρίων που σχετίζεται με τα ταξίδια, το οποίο στη συνέχεια ονομάστηκε EWGLINET. Το σχήμα αυτό συντονιζόταν από το Εθνικό Εργαστήριο βακτηριολογίας στη Στοκχόλμη και χρηματοδοτούνταν από την ΠΟΥ μέχρι το 1993, όταν ο συντονισμός μεταφέρθηκε στο κέντρο Επιδημιολογικής επιτήρησης μεταδιδόμενων ασθενειών στις εργαστηριακές υπηρεσίες δημόσιας υγείας και η ευρωπαϊκή ένωση έγινε η κύρια πηγή χρηματοδότησης. Μεταξύ του 2007 και του 2010, το EWGLINET χρηματοδοτήθηκε από το ECDC. Από τον Απρίλιο του 2010, συντονίζεται από το ECDC και το όνομα του σχήματος άλλαξε σε Ευρωπαϊκό δίκτυο Επιδημιολογικής επιτήρησης της νόσου των Λεγεωναρίων (ELDSNet). Τέλος το EWGLI άλλαξε όνομα σε ESGLI (European Study Group of Legionella Infections), αφού εντάχθηκε στους κόλπους της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Μικροβιολογίας (ESCMID) (European Centre for Disease Prevention and Control agency of the European Union, 2016).

Στην Ελλάδα οι πληροφορίες σχετικά με τη νόσο των Λεγεωναρίων συγκεντρώνονται στο γραφείο νοσημάτων που μεταδίδονται μέσω του αναπνευστικού συστήματος και ανήκει στο τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης του ΚΕΕΛΠΙΝΟ. Η νόσος των Λεγεωναρίων ανήκει στα υποχρεωτικώς δηλούμενα νοσήματα. Το ΚΕΕΛΠΙΝΟ είναι ο

επίσημος φορέας που συντονίζει τη διερεύνηση συρροής κρουσμάτων και προωθεί τις πληροφορίες στο ELDSNet.

Το ELDSNet προκειμένου να συντονίσει το έργο της επιδημιολογικής επιτήρησης της Νόσου των Λεγεωναρίων στην Ευρώπη έχει καθορίσει ορισμούς για τα κρούσματα, οι οποίοι παρατίθενται παρακάτω:

**Ορισμοί κρουσμάτων:** Η νόσος των Λεγεωναρίων είναι μία μη συνήθης μορφή πνευμονίας. Η νόσος δεν έχει ιδιαίτερα κλινικά χαρακτηριστικά που θα την έκαναν να διακρίνεται από άλλες μορφές πνευμονίας γι' αυτό εργαστηριακές διερευνήσεις πρέπει να διεξάγονται προκειμένου να επιτευχθεί η διάγνωση.

**Πιθανό κρούσμα:** Κάθε άτομο που πληροί τα κλινικά κριτήρια και τουλάχιστο ένα θετικό εργαστηριακό κριτήριο.

**Επιβεβαιωμένο κρούσμα:** Κάθε άτομο που πληροί τα κλινικά και τα εργαστηριακά κριτήρια.

**Κλινικά κριτήρια:** Οποιοδήποτε άτομο με πνευμονία

**Εργαστηριακά κριτήρια για επιβεβαιωμένο κρούσμα**

Τουλάχιστο ένα από τα παρακάτω:

- Απομόνωση *Legionella* spp από εκκρίσεις του αναπνευστικού ή οποιουδήποτε άλλου σημείου που φυσιολογικά είναι στείρο.
- Ανίχνευση αντιγόνου *L. pneumophila* σε ούρα.
- Σημαντική αύξηση επιπέδων των ειδικών αντισωμάτων για τη *L. pneumophila* οροτύπου 1 σε διπλά δείγματα ορού.

**Εργαστηριακά κριτήρια για ένα πιθανό κρούσμα**

Τουλάχιστο ένα από τα παρακάτω τέσσερα:

- Ανίχνευση αντιγόνου *Legionella pneumophila* σε εκκρίσεις του αναπνευστικού ή σε πνευμονικό ιστό π.χ. με χρώση DFA χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια με μονοκλωνικά αντισώματα
- Ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος σε αναπνευστικές εκκρίσεις, πνευμονικό ιστό ή άλλο σημείο που φυσιολογικά είναι στείρο.
- Σημαντική αύξηση στα επίπεδα ειδικών αντισωμάτων για *L. pneumophila* άλλων από ορότυπο 1 ή άλλο είδος *Legionella* spp. σε διπλά δείγματα ορού.
- Μία τιμή με υψηλά επίπεδα ειδικών αντισωμάτων για τη *L. pneumophila* οροτύπου 1 στον ορό.

(Commission Implementing Decision 2012/506/EU of 8 August 2012).

### **Νόσος των Λεγεωναρίων που σχετίζεται με τα ταξίδια**

Μεμονωμένα κρούσματα TALD (Travel associated Legionnaires' disease) αναφέρονται στο ECDC σε καθημερινή βάση μέσω του TESSy. Η χώρα που αναφέρει το κρούσμα είναι η χώρα στην οποία διαγιγνώσκεται το κρούσμα. Γι' αυτό η χώρα που αναφέρει το κρούσμα μπορεί να διαφέρει από τη χώρα στην οποία διαμένει ο ασθενής. Στην αναφορά των κρουσμάτων συμπεριλαμβάνονται στοιχεία όπως η ηλικία, το φύλο, η ημερομηνία έναρξης της νόσου, η μέθοδος διάγνωσης και πληροφορίες από το ταξίδι για τα διάφορα μέρη που μπορεί να παρέμεινε το κρούσμα από 2 έως 10 ημέρες πριν την έναρξη της νόσου. Μόνο κρούσματα που διέμειναν σε εμπορικού τύπου καταλύματα αναφέρονται (σε αντίθεση με κρούσματα που διέμειναν σε συγγενείς ή φίλους). Μετά την παραλαβή της αναφοράς, κάθε νέο κρούσμα ταξινομείται ως μεμονωμένο κρούσμα ή ως μέρος μίας έξαρσης κρουσμάτων, σύμφωνα με τους ορισμούς που έχουν οριστεί από το δίκτυο:

- **Ένα μεμονωμένο κρούσμα:** ένα άτομο που έμεινε σε κατάλυμα σε δύο με δέκα ημέρες πριν την έναρξη της νόσου. Το μέρος δεν έχει συσχετιστεί με κανένα άλλο κρούσμα της Νόσου των Λεγεωναρίων στα προηγούμενα δύο χρόνια.
- **Συρροή κρουσμάτων:** δύο ή περισσότερα κρούσματα που έμειναν στα ίδια καταλύματα σε δύο έως δέκα ημέρες πριν την έναρξη της νόσου, και των οποίων η έναρξη της νόσου ήταν εντός της ίδιας χρονικής περιόδου δύο ετών.

Μία έξαρση κρουσμάτων τριών περιπτώσεων ή περισσότερο, με έναρξη της νόσου εντός τριών μηνών, ονομάζεται ταχέως αναδύομενη έξαρση κρουσμάτων και μία περίληψη της αναφοράς αποστέλλεται στους ταξιδιωτικούς πράκτορες. Όταν μία έξαρση κρουσμάτων ανιχνεύεται, μία διερεύνηση απαιτείται από τις αρχές δημόσιας υγείας στο ύποπτο κατάλυμα και στη συνέχεια πρέπει να αποσταλούν τα πρώτα αποτελέσματα της εκτίμησης κινδύνου καθώς και τα μέτρα ελέγχου στο ELDSNet μέσω πιστοποιημένης υπηρεσίας από κάθε κράτος, εντός δύο εβδομάδων από το συναγερμό χρησιμοποιώντας τη φόρμα Α.

Μία τελική φόρμα (Β) χρησιμοποιείται για την αναφορά – εντός ακόμη τεσσάρων εβδομάδων – των τελικών αποτελεσμάτων των περιβαλλοντικών δειγματοληψιών και των μέτρων ελέγχου, επιτρέποντας έτσι σε έξι εβδομάδες να έχει ολοκληρωθεί η διερεύνηση. Αν οι φόρμες δεν επιστρέψουν έγκαιρα πίσω ή αν περιέχουν μη ικανοποιητικά μέτρα ελέγχου, τότε δημοσιεύονται λεπτομέρειες του καταλύματος στον ιστότοπό του και ενημερώνονται οι ταξιδιωτικοί πράκτορες για το κατάλυμα που δημοσιοποιήθηκε.

Αν η έξαρση κρουσμάτων σχετίζεται με περισσότερα από ένα κατάλυμα θεωρείται μία πολύπλοκη συρροή κρουσμάτων και όλα τα μέρη που ενέχονται με τα κρούσματα πρέπει να διερευνηθούν με τις διαδικασίες που έχουν περιγραφεί πιο πάνω.

### **Ανάλυση δεδομένων για το έτος 2014**

#### **Κατάταξη κρουσμάτων και δείκτης επίπτωσης αυτών**

Από τα 6.941 αναφερόμενα κρούσματα, τα 6.377 (92%) κατατάχθηκαν ως επιβεβαιωμένα και τα υπόλοιπα 564 (8%) ως πιθανά.

Από τα 564 πιθανά κρούσματα, τα 227 (40%) αναφέρθηκαν από τη Γερμανία. Η Εσθονία και η Λάτβια έχουν ένα μεγάλο ποσοστό από πιθανά κρούσματα (70% και 62%, αντίστοιχα). Ο δείκτης επίπτωσης ανά εκατομμύριο κατοίκων ήταν 13,5 για το 2014, που ήταν η υψηλότερη τιμή που έχει παρατηρηθεί ποτέ από το 2005.

#### **Ηλικία και Φύλο**

Ο μέσος όρος της ηλικίας στην ημερομηνία της έναρξης της νόσου ήταν τα 62 έτη. (IQR 52–74). Ήταν σημαντικά υψηλότερος στις γυναίκες, όπου ήταν τα 65 έτη, (IQR 54–77) σε σχέση με τους άντρες, όπου ήταν τα 61 έτη, (IQR 51–72) ( $p < 0.01$ ).

Οι επιπτώσεις ήταν αυξημένες σε σχέση με την ηλικία, με ένα maximum 79,6/106 κατοίκους στους άνδρες με ηλικία 90 ετών και πάνω. Άνθρωποι μεγαλύτεροι των 50 ετών αποτελούσαν τα 5.494 (80%) από τα 6.852 κρούσματα με γνωστή την ηλικία και το φύλο. Από τα 6852 κρούσματα τα 4893 (71%) ήταν άνδρες. Σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, η νόσος ήταν πιο κοινή στους άνδρες με μία συνολική αναλογία άνδρας προς γυναίκα να είναι: 2,6:1. Αυτή η αναλογία έφτασε σε μέγιστη τιμή 4,1:1 στην ηλικιακή ομάδα 30–39 ετών.

### **Προέλευση κρούσματος**

Το 2014, από τα 5.984 κρούσματα με αναφερόμενη την προέλευση του κρούσματος, 4.406 (74%) αναφέρθηκαν ως κρούσματα πνευμονίας της κοινότητας. Κρούσματα που σχετίζονται με ταξίδια και ενδονοσοκομειακά κρούσματα αντιστοιχούσαν σε 18% και 7% του συνόλου, αντίστοιχα. Το υπόλοιπο 2% των κρουσμάτων αναφέρθηκαν ότι προέρχονταν από άλλες πιθανές πηγές λοίμωξης. Η κατανομή των κρουσμάτων ως προς την πιθανή προέλευση του κρούσματος παραμένει η ίδια από το 2008. Ενδονοσοκομειακά κρούσματα αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ποσοστό των κρουσμάτων στις πιο μεγάλες ηλικιακές ομάδες.

### **Εξάρσεις κρουσμάτων**

#### **Χρόνος και τοποθεσία**

Από τα 401 κρούσματα που ήταν μέρος συρροής κρουσμάτων, τα 375 (94%) αναφέρθηκαν από την Πορτογαλία και σχετιζόταν με την έξαρση κρουσμάτων στη «Vila Franca de Xira». Η συγκεκριμένη είναι η μεγαλύτερη έξαρση κρουσμάτων που έχει αναφερθεί ως τώρα στο TESSy. Η διερεύνηση υπέδειξε ως πιθανή πηγή της έξαρσης τα βιομηχανικά υδρόψυκτα συστήματα κλιματισμού.

### **Θνησιμότητα**

#### **Χρόνος και τοποθεσία**

Ο αναφερόμενος ρυθμός θνησιμότητας της νόσου των Λεγεωναρίων για το 2014 ήταν 0,9 ανά ένα εκατομμύριο κατοίκους, το οποίο είναι παραπλήσιο με τα αντίστοιχους

ρυθμούς που έχουν καταγραφεί από το 2008, οι οποίοι κυμαίνονται από 0,7 έως 0,9 ανά εκατομμύριο κατοίκων. Από τα 5.503 κρούσματα με γνωστή κατάληξη της νόσου, 456 αναφέρθηκαν ότι πέθαναν, οδηγώντας σε ένα ρυθμό θνητότητας (CFR) του επιπέδου 8%. Σε χώρες που αναφέρθηκαν λιγότερα από 25% των κρουσμάτων με άγνωστη κατάληξη, ο μέσος όρος θνητότητας ήταν επίσης 7% .

Η θνητότητα ήταν υψηλότερη στις μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες και στα δύο φύλα. Στην ομάδα άνω των 50 ετών, ο ρυθμός θνητότητας αυξάνεται με την ηλικία και στα δύο φύλα.

### **Προέλευση της λοίμωξης**

Ο CFR ήταν πάνω από τρεις φορές μεγαλύτερος στα ενδονοσοκομειακά περιστατικά από τη πνευμονία της κοινότητας. Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, αφού οι ενδονοσοκομειακοί ασθενείς υποφέρουν από άλλα υποκείμενα νοσήματα. Κρούσματα με ιστορικό ταξιδιού στο εξωτερικό είχαν το χαμηλότερο CFR. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε στο γεγονός ότι οι τουρίστες έχουν καλή υγεία.

### **Κλινική και περιβαλλοντική μικροβιολογία και παθογόνα**

#### **Εργαστηριακές μέθοδοι**

Για τα 6.941 αναφερόμενα κρούσματα, 7.750 εργαστηριακές δοκιμές εκτελέστηκαν, εκ των οποίων 6.038 (78%) διαγνώστηκαν με τη δοκιμή της ανίχνευσης αντιγόνου της Λεγεωνέλλας στα ούρα. Από τις 29 χώρες που αναφέρουν κρούσματα, οχτώ ανέφεραν πάνω από ένα τεστ ανά κρούσμα με μέσο όρο 1,2 τεστ ανά κρούσμα. Η κατανομή των τεστ ποικίλλει ανάμεσα στις χώρες.

Επιβεβαιώσεις με καλλιέργεια δεν αναφέρθηκαν από 14 χώρες, αλλά έφτασαν το 47% των διαγνώσεων στη Δανία. Από τις χώρες που δεν ανέφεραν καμία επιβεβαίωση με καλλιέργεια στο 2014, οκτώ (Βουλγαρία, Κροατία, Κύπρος, Λετονία, Λιθουανία, Μάλτα, Ρουμανία και Σλοβενία) δεν έχουν αναφέρει ποτέ επιβεβαίωση με καλλιέργεια. Μερικές από τις μεγάλες χώρες που αναφέρουν κρούσματα όπως η Ιταλία ή η Ισπανία στηρίζονται σχεδόν αποκλειστικά στο τεστ των ούρων (UAT). Η Λετονία είναι η μόνη χώρα που στηρίζεται σε υψηλούς τίτλους αντισωμάτων σε μονής σειρά δείγματα για την πλειονότητα των κρουσμάτων της (62%). Από τα 6.941 κρούσματα, 6.038 (87%) ήταν θετικά με το τεστ ούρων, ένα ποσοστό παρόμοιο με του 2013. Στα τελευταία

πέντε χρόνια, το ποσοστό των κρουσμάτων που αναφέρονται ότι διαγνώστηκαν με PCR συνεχώς αυξάνεται από λιγότερο από 2% το 2008 έως το 8% το 2014. Το 2014, το ποσοστό των κρουσμάτων που επιβεβαιώθηκαν με PCR ήταν πάνω από 20% σε έξι χώρες (Αυστρία, Τσεχία, Δανία, Λουξεμβούργο, Σουηδία και Ηνωμένο Βασίλειο).

### **Παθογόνα**

Από τα 819 κρούσματα που είναι επιβεβαιωμένα με καλλιέργεια, τα 777 (95%) οφειλόταν στην *L. pneumophila*. Ο ορότυπος 1 αντιπροσώπευε 662 (85%) από τα 777 κρούσματα επιβεβαιωμένα με καλλιέργεια. Τέσσερις υπότυποι (Allentown/France, Benidorm, Knoxville and Philadelphia) αποτελούσαν το 85% περίπου από τα 246 στελέχη που τυποποιήθηκαν με τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAb). Επιπροσθέτως, επτά χώρες (Αυστρία, Τσεχία, Δανία, Ολλανδία, Πορτογαλία, Ισπανία και Ηνωμένο Βασίλειο) ανέφεραν αποτελέσματα αλληλούχισης για 303 κρούσματα.

### **Περιβάλλον**

Η δυνατότητα για περιβαλλοντική διερεύνηση υπήρχε για 3.623 (67%) από τα 4.648 κρούσματα που ήταν γνωστό ότι δεν ταξίδεψαν στο εξωτερικό μέσα στο χρόνο επώασης. Διερεύνηση διεξήχθη για 1161 (32%) από τα 3623 κρούσματα με τη γνωστή κατάσταση. Η Λεγεωνέλλα ανιχνεύτηκε σε 666 (63%) από τις 1055 διερευνήσεις για τις οποίες αναφέρθηκαν περιβαλλοντικά ευρήματα (Table 15), με 698 σημεία δειγματοληψίας θετικά: 403 (58%) από πύργους ψύξης, 281 (26%) δίκτυα ύδρευσης, (66 συστήματα ύδρευσης ζεστού νερού, 31 συστήματα ύδρευσης κρύου νερού και 184 μη προσδιοριζόμενα δίκτυα ύδρευσης), επτά κολυμβητικές δεξαμενές (1%) και έξι μέρη δειγματοληψίας (1%) αναφερόμενα ως 'άλλα'. Όλα τα σημεία δειγματοληψίας που ήταν θετικά και ανήκαν στην κατηγορία των πύργων ψύξης προέρχονταν από την έξαρση κρουσμάτων στην Πορτογαλία. Σε 59 (9%) από τα 666 κρούσματα με θετικά περιβαλλοντικά ευρήματα, στελέχη μπορούσαν να ταιριάξουν με κλινικά στελέχη (37 πύργοι ψύξης, 3 συστήματα ύδρευσης ζεστού νερού, 2 συστήματα κρύου νερού, 14 μη προσδιοριζόμενα συστήματα ύδρευσης και δύο κολυμβητικές δεξαμενές).



## **Νόσος των Λεγεωναρίων σχετιζόμενη με ταξίδι**

### **Κρούσματα - Αναφορές**

Το ELDSNet έλαβε αναφορές για 953 κρούσματα TALD με ημερομηνία έναρξης μέσα στο 2014. Αυτό ήταν υψηλότερο κατά 21% από το 2013 (787 κρούσματα) και είναι ο υψηλότερος αριθμός που έχει αναφερθεί στο δίκτυο.

Κρούσματα αναφέρθηκαν από 25 χώρες: 18 EU/EEA Κράτη μέλη και 7 κράτη εκτός ΕΕ: Ελβετία (10 κρούσματα), Ισραήλ (4 κρούσματα) οι ΗΠΑ (3 κρούσματα), Ανδόρα, Νέα Ζηλανδία, Ταϊλάνδη και Τουρκία (από ένα κρούσμα η καθεμία). Το 2013, πέντε κράτη εκτός ΕΕ ανέφεραν κρούσματα, ενώ τα προηγούμενα χρόνια η ΗΠΑ ήταν η μόνη χώρα εκτός ΕΕ που κοινοποιούσε κρούσματα. Η Γερμανία ανέφερε 54 κρούσματα το 2014, συνεχίζοντας την αυξητική τάση από τότε που ξεκίνησε να κοινοποιεί κρούσμα σε σχέση με το ταξίδι. Μισές (52%) όλων των κρουσμάτων TALD αναφέρθηκαν – σε φθίνουσα σειρά συχνότητας – από τις ακόλουθες χώρες: Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ιταλία και Ολλανδία ακολουθούμενες από την Ισπανία, Γερμανία και Σουηδία). Αυτές οι χώρες κοινοποίησαν 50 κρούσματα η καθεμία. Έντεκα από τις δεκατρείς χώρες που κοινοποίησαν τουλάχιστον 10 κρούσματα είδαν μία αύξηση των κρουσμάτων μεταξύ των ετών 2013 και 2014.

### **Εποχικότητα**

Κρούσματα που αναφέρθηκαν το 2014 έδειξαν συνήθεις εποχικές παραλλαγές, με 81% όλων των κρουσμάτων να εμφανίζονται από τον Ιούνιο έως τον Οκτώβριο, ενώ την αντίστοιχη περίοδο του 2013 ήταν 69%. Σε κάθε ένα από αυτούς τους πέντε μήνες, πάνω από 100 TALD κρούσματα κοινοποιήθηκαν στο ELDSNet (με μέγιστη τιμή 146 και 147 τον Αύγουστο και το Σεπτέμβριο, αντίστοιχα). Παρόμοια με το 2013, η διάρκεια της εποχής κοινοποίησης ήταν μεγαλύτερη από τα προηγούμενα χρόνια με 114 κρούσματα να συμβαίνουν ως τα τέλη Οκτωβρίου. Από την άλλη, το Φεβρουάριο 28 κρούσματα αναφέρθηκαν, αριθμός που ήταν ελαφρά μεγαλύτερος σε σχέση με τα ελάχιστα αναφερόμενα κρούσματα τα προηγούμενα έτη.

### **Ηλικία και φύλο**

Παρόμοια με τα προηγούμενα χρόνια και σε σύμπτωση με τα συνολικά δεδομένα της επιδημιολογικής επιτήρησης της Νόσου των Λεγεωναρίων ως προς το φύλο, τα δύο

τρίτα (648, 68%) των αναφερόμενων κρουσμάτων ήταν άνδρες. Τα κρούσματα είχαν μία μέση τιμή ηλικίας 61 ετών (IQR 52-70), με 79% των κρουσμάτων να είναι άνω των 50 ετών.

### **Κατάληξη περιστατικού**

Η κατάληξη του περιστατικού ήταν γνωστή για 520 (55%) των κρουσμάτων, εκ των οποίων 17 (3%) έχει πεθάνει κατά τη χρονική στιγμή της αναφοράς. Τα θανατηφόρα κρούσματα ήταν μεταξύ 37 και 88 χρονών και 9 ήταν άρρενες.

### **Κλινική Μικροβιολογία και παθογόνα**

Ένα σύνολο 891 TALD κρουσμάτων (93%) κατατάχθηκαν ως επιβεβαιωμένα και 62 (7%) ως πιθανά. Από τα 1030 εργαστηριακά τεστ, 85% ήταν UAT, 4% καλλιέργεια και 9% PCR. Το τελευταίο παρέμεινε στα επίπεδα του 2012 και του 2013 μετά από μία αύξηση της τάξης του 6% το 2011.

Σε 697 κρούσματα (73%), *L. pneumophila* ορότυπου 1 αναφέρθηκε ως ο αιτιολογικός παράγοντας. Αποτελέσματα τυποποίησης με μονοκλωνικά αντισώματα αναφέρθηκαν σε 25 κρούσματα (3%). Τύποι αλληλούχισης αναφέρθηκαν για 27 κρούσματα (3%) από 6 χώρες: Δανία (12), Ηνωμένο Βασίλειο (5), Τσεχία (4), Σουηδία (4), Γερμανία (1) και Ισπανία (1).

### **Ταξίδια: επισκέψεις και μέρη**

Τα TALD κρούσματα είχαν 1.371 επισκέψεις σε 1.225 ξεχωριστά καταλύματα σε όλο τον κόσμο. Από αυτά, 1000 ήταν εντός της EU/EEA, 347 ήταν έξω από την EU/EEA (Figures 15 and 16) και 24 ήταν σε πλοία. Συνολικά, τα κρούσματα επισκέφθηκαν 71 χώρες και 21 πλοία σε 2-10 ημέρες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων. Οι τρεις χώρες προορισμού με τα περισσότερα κρούσματα TALD ήταν η Ιταλία (n=302, 22%), η Γαλλία (n=234, 17%), και η Ισπανία (n=155, 11%). Από τις 1.345 τουριστικές επισκέψεις για τις οποίες ο τύπος του καταλύματος έχει αναφερθεί, 79% αφορούσε ξενοδοχεία, 9% χώρους κάμπινγκ, 5% διαμερίσματα, 2% πλοία, and 5% άλλους τύπους καταλυμάτων. Το ποσοστό των κρουσμάτων εσωτερικού τουρισμού ποικίλλει ανά χώρα .

### **Συρροές κρουσμάτων**

Το 2014, το ELDSNet ανακάλυψε 132 νέες απλές συρροές κρουσμάτων και 132 νέες πολύπλοκες. Οι συρροές κρουσμάτων αναφέρθηκαν σε 25 χώρες (16 εντός ΕΕ και 9 σε κράτη εκτός ΕΕ.) και σε πλοία (που δεν προσδιορίζονται σε ποια χώρα ανήκουν). Όλες μαζί, 349 (37%) όλων των TALD κρουσμάτων αποτελούσαν μέρος συρροής κρουσμάτων. Υπήρχαν τρεις συρροές κρουσμάτων των δύο κρουσμάτων σε πλοία. Από τις 140 αναφερόμενες συρροές κρουσμάτων, οι 96 (69%) αποτελούνταν από δύο κρούσματα. Οι υπόλοιπες συρροές κρουσμάτων (31%) κυμαίνονταν σε αριθμό κρουσμάτων από τρία έως εννέα.

### **Διερευνήσεις και δημοσιοποίηση των καταλυμάτων**

Το 2014 κανένα όνομα καταλύματος δε δημοσιεύτηκε στην ιστοσελίδα του ECDC, επειδή οι εκθέσεις αξιολόγησης για όλα τα μέρη των συρροών κρουσμάτων παραλήφθηκαν στον οριζόμενο χρόνο, δηλώνοντας ότι οι κατάλληλες διορθωτικές ενέργειες έχουν εφαρμοστεί. Λάβαμε ένα σύνολο από 165 προσωρινές περιβαλλοντικές εκθέσεις αξιολόγησης μέσα στην προθεσμία των 2 εβδομάδων και τον ίδιο αριθμό τελικών εκθέσεων αξιολόγησης εντός της προθεσμίας των έξι εβδομάδων.

### **Επιδημιολογική επιτήρηση πεδίου(Event-based)**

Το 2014, 14 νέες και 4 ενημερώσεις για ταχέως εξελισσόμενες συρροές κρουσμάτων στην Ελλάδα, την Ιταλία, την Ισπανία, την Τυνησία και την Τουρκία αναφέρθηκαν στους τουριστικούς πράκτορες.

### **Νομοθετικό πλαίσιο Ελλάδα**

Στην Ελλάδα μόλις το 2017 ψηφίστηκε νόμος για τη Λεγεωνέλλα στο δίκτυο νερού όπου προσδίδονται παραμετρικές τιμές [ΚΥΓ1(δ)/ ΓΠ οικ.67322, (19-9-2017)] . Έως τότε υπήρχε μόνο μία εγκύκλιος για την ανάλυση και τον έλεγχο της Λεγεωνέλλας στα νερά. Η εγκύκλιος είναι η ΔΥΓ2/οικ.70777 (12-07-2012) [ΔΥΓ2/οικ.70777(12-07-2012)] και η σύνταξή της στηρίχθηκε στις οδηγίες του ESGLI. Επίσης υπάρχει και μία άλλη εγκύκλιος η ΔΥΓ2/οικ.118578 (12-12-2012) [ΔΥΓ2/οικ.118578 (12-12-2012)] με την οποία το υπουργείο υγείας ζητά την ενημέρωση από τις αρμόδιες υπηρεσίες

δημόσιας υγείας σε περίπτωση κρουσμάτων Λεγεωνελλώσεων ή αποτελεσμάτων περιβαλλοντικών ελέγχων που είναι εκτός ορίων.

### **ΚΕΕΛΠΝΟ - Ελλάδα**

Η επίπτωση της Ν. των Λεγεωναρίων στην Ελλάδα σύμφωνα με επίσημα στοιχεία του ΚΕΕΛΠΝΟ κυμαίνεται ως εξής από το έτος 2004 – 2013. (**Πίνακας 4**, [www.keelpno.gr](http://www.keelpno.gr)).

**Πίνακας 4.** Η διακύμανση ή το εύρος επίπτωσης της Ν. των Λεγεωναρίων στην Ελλάδα ανά 100.000 πληθυσμού και η ελληνική περιφέρεια με την υψηλότερη επίπτωση ανά έτος, κατά τα έτη 2004 – 2013.

Έτος	Διακύμανση Επίπτωσης (ανά 100.000 πληθυσμού)	Περιφέρεια με υψηλότερη επίπτωση ανά έτος
2004	0 – 0,66	Νότιο Αιγαίο
2005	0 – 0,9	Ιόνια Νησιά
2006	0 – 0,89	Ιόνια Νησιά
2007	0 – 0,86	Ήπειρος
2008	0 – 0,41	Κεντρική Μακεδονία
2009	0 – 1,29	Ιόνια Νησιά
2010	0 – 0,36	Στερεά Ελλάδα και Εύβοια
2011	0 – 0,53	Στερεά Ελλάδα και Εύβοια
2012	0 – 0,58	Ήπειρος
2013	0 – 1,93	Ιόνια Νησιά

Στους **πίνακες 5-8** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά επιδημιολογικά δεδομένα για την Ελλάδα από τα στοιχεία του ECDC για τα έτη 2010 έως 2014.

**Πίνακας 5.** Αναφερόμενα κρούσματα, επίπτωση ανά εκατομύριο πληθυσμού και θνητότητα της νόσου των Λεγεωναρίων στην Ελλάδα για τα έτη 2010 έως 2014. (ECDC)

Έτος	Κρούσματα	Επίπτωση	Θνητότητα
2010	9	0,8	0%
2011	18	1,6	6%
2012	27	2,4	8%
2013	38	3,4	11%
2014	27	2,5	12%

**Πίνακας 6.** Αναφερόμενα κρούσματα της νόσου των Λεγεωναρίων ανά κατηγορία προέλευσης της λοίμωξης στην Ελλάδα από το 2010 έως 2014. (ECDC)

Έτος	Κοινότητας	Ενδονοσοκομειακή	Ταξίδι εξωτερικού	Ταξίδι εντός χώρας	Άλλα
2010	5	1	0	2	1
2011	9	2	0	5	1
2012	17	7	0	3	0

2013	22	6	0	10	0
2014	20	4	0	3	0

**Πίνακας 7.** Αναφερόμενες εργαστηριακές μέθοδοι και αναλογία αυτών για κάθε μέθοδο, στην Ελλάδα από το 2010 έως το 2014.(πάνω από μία μέθοδος ανά κρούσμα είναι πιθανόν να έχει χρησιμοποιηθεί). (ECDC)

Έτος	Καλλιέργεια	Τετραπλάσια αύξηση τίτλου αντισωμάτων	Άμεσος ανοσοφθορισμός	CR	Υψηλός μονός τίτλος αντισωμάτων	Αντιγόνο στα ούρα	Συνολικά
2010	1 (10%)	0	0		0	9 (90%)	10
2011	0	0	0	(5%)	0	18(95%)	19
2012	1(4%)	0	0		0	26(96%)	27
2013	0	0	0	(3%)	6(16%)	31(88%)	38
2014	0	0	0		1(4%)	26(90%)	27

**Πίνακας 8.** Κρούσματα σχετιζόμενα με ταξίδι που έχουν αναφερθεί από την Ελλάδα κατά τα έτη 2009 – 2014 φαίνονται παρακάτω: (ECDC)

Έτος	Αριθμός κρουσμάτων
2009	0
2010	0

2011	4 (1%)
2012	1 (<1%)
2013	8 (1%)
Έτος	Αριθμός κρουσμάτων

Από το 2010 που υπάρχουν στοιχεία έχουν αναφερθεί 2 συρροές κρουσμάτων από την Ελλάδα το 2010. Το 2011 αναφέρθηκαν 3 συρροές εκ των οποίων η μία συρροή ήταν η μεγαλύτερη που αναφέρθηκε εκείνο το έτος με 12 κρούσματα που αναφέρθηκαν από το Ηνωμένο Βασίλειο, αφορούσε δηλαδή Βρετανούς τουρίστες. Το 2012 και το 2013 δεν αναφέρθηκαν συρροές κρουσμάτων από την Ελλάδα. Ενώ το 2014 υπήρχαν συρροές κι από την Ελλάδα χωρίς να διευκρινίζεται ο ακριβής αριθμός, ανάμεσα στις 14 που αναφέρθηκαν στο ESGLI.

### **Μελέτες στην Ελλάδα**

Διάφορες μελέτες έχουν γίνει στην Ελλάδα σε σχέση με τον αποικισμό δικτύων ύδρευσης νερού κι άλλων υδάτινων περιβάλλοντων με λεγεωνέλλα. Στην βορειοανατολική Ελλάδα οι Αλεξανδροπούλου Ι. και η υπόλοιπη ομάδα μελέτησαν την μοριακή επιδημιολογία και εφάρμοσαν περιβαλλοντική επιτήρηση για τη *L.pneumophila* σε μονάδες υγείας για 4 χρόνια. *Legionella* spp. ανιχνεύθηκε σε 71 από τα 458 συλλεχθέντα δείγματα. Η πλειονότητα των στελεχών ανήκε στο είδος της *L.pneumophila* ομάδας οροτύπων 2-15 (75,0%), ενώ στελέχη *L.pneumophila* οροτύπου 1 (23.6 %) απομονώθηκαν από ένα μόνο νοσοκομείο. Το υψηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων βρέθηκε στα πιο απομακρυσμένα σημεία (19,4%), ενώ καμμία *Legionella* spp. δεν ανιχνεύθηκε στους πύργους ψύξης. Μοριακή τυποποίηση έγινε με RAPD και SBT που κατέδειξε την επικρατηση συγκεκριμένου κλώνου σε κάθε νοσοκομείο. Οι συγγραφείς υπογραμμίζουν την ανάγκη για μακροπρόθεσμη περιβαλλοντική επιδημιολογική επιτήρηση της Λεγεωνέλλας με την υιοθέτηση της καλλιέργειας και των μοριακών μεθόδων (Alexandropoulou, Ntougias, Konstantinidis,etal, 2015)

Σε μια άλλη μελέτη που έγινε στην Κρήτη, ο Κλοχάκης Δ. και οι λοιποί συγγραφείς εξέτασαν σε εύρος 8 ετών, 1494 δείγματα νερού από δίκτυο ύδρευσης και πύργους ψύξης ξενοδοχείων από τις τέσσερις περιοχές της Κρήτης. Απομονώθηκαν 103 στελέχη εκ των οποίων τα 48 ανήκαν στην *L.pneumophila* (ορότυποι 1,2,3,5,6,8,12,13,15) ενώ τα υπόλοιπα ανήκαν σε άλλα είδη Λεγεωνέλλας. Ακολούθησε μοριακή τυποποίηση που ανέδειξε ένα επικρατή κλώνο για τον ορότυπο 1 της *L.pneumophila*, τον ST 37 (Chochlakis, Sandalakis, Panoulis, etal, 2013).

Μια άλλη μελέτη από τη Μουχτούρη Β. και την υπόλοιπη συγγραφική ομάδα μελέτησε τη συχνότητα αποικισμού των δικτύων ύδρευσης στα ελληνικά ξενοδοχεία καθώς και τους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξή της σε αυτά. Η συχνότητα βρέθηκε στο 20,8%, ενώ παράγοντες κινδύνου που βρέθηκαν ήταν ο θερμοσίφωναας, η θερμοκρασία του δείγματος, η εποχική λειτουργία και η παρουσία ανεξάρτητου συστήματος απολύμανσης. Σ' αυτή τη μελέτη βρέθηκαν θετικά για *Legionella* spp 260/962 (27%) δείγματα, από τα οποία τα 120/962 (12,5%) ήταν θετικά για *L.pneumophila* sg1, τα 117/962 (12,2%) για *L.pneumophila* sg2-14 και 32/962 (3,3%) σε *Legionella non pneumophila*. Ουσιαστικά, τα ποσοστά της *L.pneumophila* sg1 και της *L.pneumophila* sg 2-14 στα περιβαλλοντικά δείγματα από ξενοδοχεία ήταν σχεδόν της ίδιας τάξης με ελάχιστη υπεροχή του οροτύπου 1 (Mouchtouri, Velonakis, Tsakalof, etal, 2007).

Σε μια άλλη μελέτη της Μουχτούρη Β. *Legionella* spp ανιχνεύτηκαν σε 92 από 497 δίκτυα ύδρευσης που εξετάστηκαν. Εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της θερμικής απολύμανσης. Η *L.pneumophila* αποδείχτηκε πιο ανθεκτική στη θερμική απολύμανση. Σ' αυτή τη μελέτη από τα 27 αποικισμένα δίκτυα ύδρευσης με Λεγεωνέλλα από ξενοδοχεία, τα 15 ήταν αποικισμένα με *L.pneumophila* sg1, τα 10 με *L.pneumophila* sg2-14 και τα 7 με *Legionella non pneumophila*. Αντίστοιχα στα νοσοκομεία από τα 4 θετικά για Λεγεωνέλλα δίκτυα ύδρευσης, τα 3 ήταν αποικισμένα με *L.pneumophila* sg1 και 3 με *L.pneumophila* sg 2-14. Τέλος, από τα δίκτυα ύδρευσης των αθλητικών εγκαταστάσεων, δύο δίκτυα ύδρευσης βρέθηκαν αποικισμένα με Λεγεωνέλλα, εκ των οποίων το ένα με *L.pneumophila* sg1 και το άλλο με τη *L.pneumophila* sg 2-14. Στα δίκτυα ύδρευσης των ξενοδοχείων που είναι περισσότερα σε αριθμό επικρατεί περισσότερο η *L.pneumophila* sg1, ενώ στα δίκτυα ύδρευσης των νοσοκομείων και των αθλητικών εγκαταστάσεων με πολύ μικρότερο αριθμό θετικών δικτύων, φαίνεται να



αποικίζονται ισόποσα από τη *L.pneumophila* sg1 και τη *L.pneumophila* sg 2-14 (Mouchtouri, Velonakis & Hadjichristodoulou, 2007).

Η Γκουτζιάνα Γ. και η υπόλοιπη συγγραφική ομάδα μελέτησαν τον αποικισμό της Λεγεωνέλλας στο δίκτυο ύδρευσης των επιβατικών φέρι μπόουτ και των κρουαζιεροπλοίων. Όλα τα δείγματα (133) που συλλέχθηκαν από κρουαζιεροπλοία ήταν αρνητικά. Αντίθετα στα φέρι μπόουτ από τα 21 δίκτυα νερού τα 14 ήταν θετικά για τη Λεγεωνέλλα. Απομονώθηκαν 96 στελέχη εκ των οποίων τα 87 (90,6%) ήταν *L.pneumophila*. Από αυτά τα 44,8% ήταν *L. pneumophila* οροτύπου 1, ενώ το 45.8% ήταν *L. pneumophila* οροτύπων 2–14 και *Legionella non pneumophila* spp. στο 9.4%. Δείγματα από το κλιματιστικό σύστημα των φέριμπόουτ ήταν αρνητικά για αποικισμό από Λεγεωνέλλα. Σε ότι αφορά τα δείγματα στο δίκτυο του ζεστού νερού βρέθηκαν 65/172 θετικά δείγματα για Λεγεωνέλλα εκ των οποίων 32/172 (18,6%) ήταν θετικά για *L.pn.1*, 38/172 (22,1%) για *L.pn 2-14* και 7/172 (4,1%) για *Legionella non pneumophila*. Κατά την εξέταση δειγμάτων από το δίκτυο ύδρευσης του κρύου νερού, τα 17/97 (17,5%) ήταν θετικά για αποικισμό με Λεγεωνέλλα εκ των οποίων τα 11/97 (11,3%) ανήκαν στην *L.pneumophila* sg1, τα 6/97 (6,2%) στην *L.pneumophila* sg 2-14 και τα 2/97 (2,1%) στην *Legionella non pneumophila*. Παρατηρούμε ότι στο δίκτυο του ζεστού νερού των φέριμπόουτ επικρατεί η *Lpn2-14* ενώ στο δίκτυο του κρύου νερού επικρατεί η *Lpn1*. Η θερμοκρασία των δειγμάτων του ζεστού νερού δε συσχετίστηκε με τον αποικισμό των *L. pneumophila* serogroup (sg) 1 και *L. pneumophila* sg 2 to 14. Αυξήσεις στο pH  $\geq 7.8$  και της OMX  $\geq 400$  CFU/L, συσχετίστηκε θετικά με τις συγκεντρώσεις της *L. pneumophila* sg 2 to 14 και της *Legionella* spp. αντίστοιχα. Ελεύθερο χλώριο  $\geq 0.2$  mg/L αναχαιτίζει τον αποικισμό της *Legionella* spp. (Goutziana, Mouchtouri, Karanika, et al, 2008).

# **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την εκπόνηση της διατριβής έχουν συγκεντρωθεί 82 στελέχη *Legionellarpneumophila* ομάδας οροτύπων 2 – 14. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν τυχαία από σύνολο 171 στελεχών που είχαν απομονωθεί από δείγματα νερού που συλλέχθηκαν σε περίοδο 2 ετών στα πλαίσια των ελέγχων δημόσιας υγείας για την προετοιμασία των Ολυμπιακών Αγώνων του 2004 στην Αθήνα.

Αρχικά η οροτύπηση έγινε με αντιορούς λάτεξ, ενώ στη συνέχεια έγινε επιβεβαίωση και διάκριση των οροτύπων με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Mabs), όπου δύο από τα στελέχη αποδείχθηκε ότι ήταν τελικά ορότυπος 1 και εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Τα υπόλοιπα 80 στελέχη τυποποιήθηκαν με τη μέθοδο της AFLP και σ' αυτά έγιναν μοριακές αναλύσεις για την ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας. Για οικονομικούς λόγους 56 από τα 80 τυποποιήθηκαν και με τη μέθοδο της SBT. Τα 80 στελέχη απομονώθηκαν μετά από την ανάλυση χιλίων οκτακοσίων εβδομήντα δειγμάτων (1870) νερού που ελήφθησαν από 385 ξενοδοχεία (1.086 δείγματα), 94 αθλητικές εγκαταστάσεις (382 δείγματα), 10 κρουαζιερόπλοια (133 δείγματα) και 21 φέρι-μπόουτ (269 δείγματα).

Αποσπάσματα αυτών των αποτελεσμάτων έχουν δημοσιευτεί και αλλού (Mouchtouri, et al, 2007; Mouchtouri, et al, 2007; Goutziana, et al, 2008). Τα δείγματα νερού προέρχονται από τις 13 Ολυμπιακές Περιφέρειες που αντιπροσωπεύουν περίπου το 70% του πληθυσμού της Ελλάδας και κατανέμονται γεωγραφικά στην βόρεια, κεντρική και νότια Ελλάδα. Τέσσερις περιφέρειες ανήκουν στην Αττική και εννέα στην υπόλοιπη Ελλάδα.

### 6.1 Συλλογή δειγμάτων

#### 6.1.1 Γενικά

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί δειγματοληψία νερού θα πρέπει να προηγηθεί εκτίμηση κινδύνου ανάπτυξης και μετάδοσης της λεγεωνέλλας. Συγκεκριμένα απαιτείται σχολαστική έρευνα η οποία θα πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Επιθεώρηση κτιρίου (μέγεθος κτιρίου και συστημάτων κυκλοφορίας του νερού)

2. Λεπτομερής χαρτογράφησης του εκάστοτε υδατικού δικτύου η οποία θα περιλαμβάνει:

i. Τον έλεγχο όλων των συστημάτων νερού:

- Υδατοδεξαμενές
- Συσκευές θέρμανσης νερού
- Συστήματα κρύου-ζεστού νερού
- Πύργοι ψύξης
- Κολυμβητικές δεξαμενές/spra
- Εγκαταστάσεις πυρόσβεσης

ii. Την πιθανότητα επαφής ατόμων με μολυσμένα από το βακτήριο αερολύματα.

3. Δειγματοληπτικός έλεγχος: Τα δείγματα λαμβάνονται με βάση την αξιολόγηση του κινδύνου (εντοπισμός κρίσιμων σημείων όπου αναπτύσσεται η *Legionellaspp.* – σωληνώσεις, βρόγχοι, στάσιμα νερά κτλ). Στη διαδικασία αυτή συμβάλλει σε σημαντικό βαθμό ο υπεύθυνος μηχανικός συντήρησης και λειτουργίας του συστήματος νερού.

Το πρόγραμμα δειγματοληψιών πρέπει να σχεδιάζεται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε τα δείγματα που θα συλλεχθούν να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικά του συστήματος νερού.

### **6.1.2 Συχνότητα δειγματοληψίας**

Σύμφωνα με εγκύκλιο (354 ΔΥΓ2/οικ.70777,(12-07-2012) «Πρόληψη της νόσου των Λεγεωναρίων») που εκδίδει κάθε χρόνο το Υπουργείο Υγείας η δειγματοληψία για ανίχνευση λεγεωνέλλας πρέπει να πραγματοποιείται τουλάχιστον κάθε έξι μήνες. Η συχνότητα δειγματοληψίας βέβαια εξαρτάται και από τα αποτελέσματα της εκτίμησης κινδύνου του δικτύου ύδρευσης καθώς και των εργαστηριακών αναλύσεων.

### **6.1.3 Επιλογή θέσης και λήψη δειγμάτων**

A) Υδρόψυκτα κεντρικά συστήματα κλιματισμού:

- Νερό δικτύου: Συλλέγεται ένα δείγμα νερού από το νερό τροφοδοσίας του κεντρικού υδρόψυκτου συστήματος κλιματισμού.

- Δείγμα από το νερό που εισέρχεται στον πύργο ψύξης
- Δεξαμενή του πύργου ψύξης: Συλλέγεται ένα δείγμα νερού από το εσωτερικό της δεξαμενής του πύργου ψύξης με εμβάπτιση, από σημείο όσο το δυνατόν πιο απομακρυσμένο από το σημείο εισόδου του νερού στη δεξαμενή του πύργου.
- Εάν η δειγματοληψία αποτελεί μέρος επιδημιολογικής διερεύνησης, προτείνεται η λήψη ιζημάτων από τη δεξαμενή του πύργου ψύξης.

Σημείωση: Η διαδικασία δειγματοληψίας ξεκινάει 30 λεπτά, αφότου σταματήσει η λειτουργία του πύργου ψύξης

B) Σύστημα κυκλοφορίας κρύου νερού:

- Υδατοδεξαμενές: Συλλέγεται ένα δείγμα νερού από τη δεξαμενή αποθήκευσης κρύου νερού. Συνιστάται η δειγματοληψία να πραγματοποιείται από κρουνό δειγματοληψίας που πρέπει να υπάρχει στην υδατοδεξαμενή. Όταν μια δεξαμενή δεν διαθέτει κρουνό για τη λήψη δείγματος, τότε αναγκαστικά λαμβάνεται δείγμα με εμβάπτιση του περιέκτη (ο οποίος είναι αποστειρωμένος μέσα και έξω). Η μέθοδος αυτή πρέπει να αποφεύγεται γιατί οι κίνδυνοι μόλυνσης της δεξαμενής και του δείγματος είναι μεγάλοι.
- Δίκτυο ύδρευσης (καταιωνιστήρες, βρύσες κ.τ.λ.): Λαμβάνονται δύο δείγματα:

I. Άμεσο δείγμα: Συλλέξτε το νερό που βγαίνει από τη βρύση αμέσως μόλις την ανοίξετε. Αυτό το δείγμα αντιπροσωπεύει τη χλωρίδα της εξόδου.

II. Μετά από ροή: Αφήστε το νερό να τρέξει δύο λεπτά και μετρήστε τη θερμοκρασία. Στη συνέχεια καθαρίστε και απολυμάνετε το στόμιο του κρουνού με διάλυμα 1% υποχλωριώδους νατρίου ή 70% αιθανόλης. Αφήστε το νερό να τρέξει για επιπλέον ένα λεπτό στη μέγιστη ροή και χωρίς να ρυθμίσετε τη ροή του νερού συλλέξτε ένα δεύτερο δείγμα, το οποίο θα είναι πιο αντιπροσωπευτικό του νερού που ρέει στο σύστημα.

Σημείωση: Πραγματοποιείται μέτρηση της θερμοκρασίας από κάθε δείγμα νερού και καταγράφεται στο δελτίο δειγματοληψίας. Επίσης με το κατάλληλο σύστημα προσδιορισμού του υπολειμματικού χλωρίου και του pH πραγματοποιούνται οι αντίστοιχες μετρήσεις. Μην χρησιμοποιείτε το δείγμα νερού στη φιάλη δειγματοληψίας για τη μέτρηση της θερμοκρασίας ή οποιασδήποτε άλλης επιτόπιας παραμέτρου.

Γ) Σύστημα κυκλοφορίας ζεστού νερού:

- Λέβητας Θέρμανσης του νερού (boiler): Λαμβάνονται δύο δείγματα:
  - I. Αμέσως μετά το μπόιλερ ή στο κοντινότερο σημείο προς αυτό.
  - II. Αμέσως πριν την επιστροφή του νερού στο μπόιλερ ή στο κοντινότερο σημείο προς αυτό.
- Εάν υπάρχει δεξαμενή αποθήκευσης ζεστού νερού τα δείγματα που θα ληφθούν πρέπει να συλλέγονται από τη βαλβίδα αποστράγγισης ιλύος.
- Δίκτυο ύδρευσης (καταιωνιστήρες, βρύσες κ.τ.λ.): Λαμβάνονται δύο δείγματα:
  - I. Άμεσο δείγμα: Συλλέξτε το νερό που βγαίνει από τη βρύση αμέσως μόλις την ανοίξετε. Αυτό το δείγμα αντιπροσωπεύει τη χλωρίδα της εξόδου
  - II. Μετά από ροή: Αφήστε το νερό να τρέξει ένα λεπτό και μετρήστε τη θερμοκρασία. Στη συνέχεια καθαρίστε και απολυμάνετε το στόμιο του κρουνού με διάλυμα 1% υποχλωριώδους νατρίου ή 70% αιθανόλης. Αφήστε το νερό να τρέξει για επιπλέον ένα λεπτό στη μέγιστη ροή και χωρίς να ρυθμίσετε τη ροή του νερού συλλέξτε ένα δεύτερο δείγμα, το οποίο θα είναι πιο αντιπροσωπευτικό του νερού που ρέει στο σύστημα.
  - III. Ξέσμα με βαμβακοφόρο στυλεό:
    - a. Πάρτε δείγμα (ξέσμα) με βαμβακοφόρο αποστειρωμένο στυλεό από τα εσωτερικά τοιχώματα (των καταιωνιστήρων και των χειρολαβών τους ή από άλλες σωληνώσεις και συσκευές), με περιστροφική κίνηση.
    - b. Πάρτε δείγμα από τον καταιωνιστήρα στο σημείο που ενώνεται με το σωλήνα.

Σημείωση: Τα ξέσματα πρέπει να μεταφέρονται σε 0,5-1,0 ml νερού που λαμβάνεται από το ίδιο σημείο της δειγματοληψίας ή σε αντίστοιχη ποσότητα φυσιολογικού ορού. Βγάλτε τυχόν εξαρτήματα (φίλτρα ή σίτες) από τα στόμια της βρύσης και στείλτε για καλλιέργεια το ίζημα που έχει μαζευτεί.

Σημείωση: Πραγματοποιείται μέτρηση της θερμοκρασίας από κάθε δείγμα νερού και καταγράφεται στο δελτίο δειγματοληψίας. Δεν πραγματοποιείται μέτρηση υπολειμματικού χλωρίου και pH. Μην χρησιμοποιείτε το δείγμα νερού στη φιάλη δειγματοληψίας για τη μέτρηση της θερμοκρασίας ή οποιασδήποτε άλλης επιτόπιας παραμέτρου.

Δ) Κολυμβητικές δεξαμενές, δεξαμενές υδροθεραπείας (spa): Συλλέγονται δείγματα από:

- I. Δεξαμενή
- II. Φίλτρο
- III. Δεξαμενή εξισορρόπησης της ποσότητας του νερού
- IV. Από το εσωτερικό των σωληνώσεων ανακυκλοφορίας του αέρα/νερού με τη χρήση ειδικών στείλεων.

Ε) Υγραντήρες χώρου:

- I. Συλλέγεται δείγμα απευθείας από το μηχάνημα (υγραντήρας)

ΣΤ) Συντριβάνια:

- I. Συλλογή δείγματος, από το θερμότερο σημείο (εάν είναι δυνατόν)

Ζ) Καζανάκια αποχωρητηρίων (μπορεί να είναι εστίες ανάπτυξης είτε λόγω υψηλών θερμοκρασιών, είτε λόγω περιορισμένης χρήσης) :

- I. Συλλογή δείγματος απευθείας από τη δεξαμενή με καθαρό αποστειρωμένο περιέκτη.
- II. Λήψη επιχρίσματος με χρήση στείλεου από την εσωτερική επιφάνεια της συσκευής.
- A. Λήψη δείγματος (ξέσμα) με βαμβακοφόρο αποστειρωμένο στείλεο από τα εσωτερικά τοιχώματα, με περιστροφική κίνηση.

Σημείωση: Τα ξέσματα πρέπει να μεταφέρονται σε 0,5-1,0 ml νερού που λαμβάνεται από το ίδιο σημείο της δειγματοληψίας ή σε αντίστοιχη ποσότητα φυσιολογικού ορού.

Αφήστε λίγο κενό ώστε να επιτρέπεται η ανάδευση του δείγματος για την ομοιόμορφη κατανομή των μικροοργανισμών.

B. Για τη διερεύνηση κρούσματος ή έξαρσης κρουσμάτων σε ένα κτίριο (π.χ. νοσοκομείο ή ξενοδοχείο) τα σημεία που πρέπει να πραγματοποιηθεί η δειγματοληψία είναι τα εξής:

- Δεξαμενή αποθήκευσης νερού
- Λέβητας θέρμανσης (boiler)
- Από το πιο κοντινό σημείο στο λέβητα θέρμανσης
- Από το πιο απομακρυσμένο σημείο στο λέβητα θέρμανσης
- Από το δωμάτιο όπου διέμεινε το άτομο που νόσησε
- Από το ψυχαγωγικό συγκρότημα πισίνα, πισίνα υδροθεραπείας κ.τ.λ.
- Από δωμάτια άλλων ορόφων, που είναι αντιπροσωπευτικά των διαφόρων διακλαδώσεων του συστήματος.
- Περιοχές όπου παρατηρήθηκε στασιμότητα του νερού π.χ. κλειστό δωμάτιο.

#### **6.1.4 Χειρισμός δειγμάτων**

Τα δείγματα νερού μεταφέρονται σε περιέκτες που είναι ερμητικά σφραγισμένοι και προστατεύονται από τις επιδράσεις του φωτός και την υπερβολική θερμότητα, καθώς η ποιότητα του δείγματος νερού είναι πιθανόν να μεταβληθεί, λόγω φυσικών, χημικών ή βιολογικών αντιδράσεων.

#### **ΑΠΟΣΤΟΛΗ – ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

Οι περιέκτες με τα δείγματα νερού τοποθετούνται με ασφάλεια σε ισόθερμα δοχεία υπό ψύξη και η επιθυμητή θερμοκρασία (2°C - 8°C) επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση παγοκύστεων. Προστατεύστε τα δείγματα από το φως του ήλιου.



Οι παγοκύστες δεν τοποθετούνται σε άμεση επαφή με τον περιέκτη. Για τον σκοπό αυτόν, τοποθετούνται ανάμεσα στον περιέκτη και τις παγοκύστες προστατευτικά φύλλα πλαστικού με αεροκυψέλες, ή φύλλα χαρτιού (π.χ. από εφημερίδα). Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει ο σωστός υπολογισμός της ποσότητας των παγοκύστεων σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων, τον συνολικό όγκο καθώς και την αρχική τους θερμοκρασία.

Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη δειγματοληψία μέχρι την ανάλυση του δείγματος στο εργαστήριο πρέπει να είναι όσο το δυνατόν συντομότερος. Συγκεκριμένα, η ανάλυση θα πρέπει να ξεκινήσει εντός της ίδιας εργάσιμης ημέρας. Οι μέγιστοι χρόνοι συντήρησης των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου του χρόνου μεταφοράς) παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Τα δείγματα νερού με υψηλή θερμοκρασία δεν θα πρέπει να τοποθετούνται στο ίδιο ισόθερμο δοχείο με τα δείγματα χαμηλής θερμοκρασίας.

Για τα δείγματα που μεταφέρονται για διαστήματα πάνω από 8 ώρες, είναι αναγκαίο να παρακολουθείτε και να καταγράφετε τη θερμοκρασία.

Οι συνθήκες μεταφοράς πρέπει να τεκμηριώνονται.

Στο δελτίο δειγματοληψίας καταγράφονται λεπτομερώς οι συνθήκες μεταφοράς και συντήρησης [ΔΥΓ2/οικ.70777, 2012); EWGLI, 2011].

## **ΥΠΟΔΟΧΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

Το προσωπικό του εργαστηρίου ελέγχει:

- την καταλληλότητα της συσκευασίας του δείγματος,
- τη θερμοκρασία
- την επάρκεια της ποσότητας για τη διενέργεια όλων των αιτούμενων δοκιμών
- την ημερομηνία και την ώρα της δειγματοληψίας

και συμπληρώνει στο δελτίο δειγματοληψίας που συνοδεύει το δείγμα τα απαραίτητα δεδομένα. Ακόμα, καταγράφει και τις τυχόν αποκλίσεις ως προς τη συσκευασία και τις συνθήκες μεταφοράς του δείγματος.

#### **ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

Τα συνιστώμενα αποδεκτά όρια θερμοκρασίας συντήρησης των δειγμάτων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9.** Συνιστώμενα και αποδεκτά όρια θερμοκρασίας συντήρησης δείγματος, εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά σε συγκεκριμένα πρότυπα

	Μέγιστος χρόνος συντήρησης δείγματος σε ώρες (h) συμπεριλαμβανομένου του χρόνου μεταφοράς		Θερμοκρασία συντήρησης νερού σε °C	
	απαιτούμενος	αποδεκτός	απαιτούμενη	αποδεκτή
Καλλιεργήσιμοι μικροοργανισμοί				
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (22 °C, 30 °C, ή 36 °C)	8	12	5 ± 3	
Legionella spp	24		5 ± 3	θερμοκρασία περιβάλλοντος
		48	5 ± 3	

#### **6.2 Εκτέλεση πειραματικού μέρους**

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε από το Μάιο του 2005 έως το Δεκέμβρη του 2014.

Η τυποποίηση των στελεχών με AFLP πραγματοποιήθηκε στο μικροβιολογικό εργαστήριο της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας στην Αθήνα.

Η οροτύπηση των στελεχών με μονοκλωνικά αντισώματα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ιατρικής μικροβιολογίας στο Ιατρικό τμήμα της Δρέσδης, στη Γερμανία.

Η ανίχνευση των γονιδίων παθογονικότητας και η τυποποίηση των στελεχών με τη μέθοδο SBT πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Υγιεινής κι Επιδημιολογίας, του Ιατρικού τμήματος Λάρισας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας .

### **6.2.1 Ανίχνευση και καταμέτρηση Λεγεωνέλλας σε δείγματα νερού**

Τα δείγματα του νερού επεξεργάστηκαν με μέθοδο διήθησης μέσω μεμβρανών που βασίζεται στην αντίστοιχη πρότυπη ISO 11731:1998 (ISO 11731). Ο τελικός προσδιορισμός των αποικιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δοκιμής συγκόλλησης με σωματίδια λάτεξ (Oxoid).

Αυτή η δοκιμή μπορεί να διακρίνει τον ορότυπο 1 της *L.pneumophila*, την ομάδα οροτύπων 2-14 της *L.pneumophila*, ενώ μπορεί να ανιχνεύει και μία ομάδα ειδών *Legionella* μη-*pneumophila*.

#### **Μέθοδος διήθησης μέσω μεμβρανών**

##### **Αρχή της μεθόδου**

##### **Η ποσότητα του δείγματος προς δοκιμή**

Ο μέγιστος όγκος του δείγματος προς ανάλυση εξαρτάται από τη διηθησιμότητα του δείγματος νερού και από τις μεμβράνες που χρησιμοποιούνται. Αυτή η τεχνική είναι κατάλληλη για νερά που περιέχουν μικρά οργανικά σωματίδια ή κολλοειδή (π.χ. σίδηρος) όπως π.χ. το πόσιμο νερό. Με τις μεμβράνες να έχουν ένα μέσο όρο μεγέθους διαμέτρου 0,45 μm, μπορεί να είναι δυνατό να φιλτραριστούν αρκετά λίτρα τέτοιου είδους νερού διαμέσου μίας και μόνο μεμβράνης και έτσι επιτυγχάνεται υψηλού επιπέδου ευαισθησία της δοκιμής. Για ορισμένους οργανισμούς, (όπως η Λεγεωνέλλα), όμως η διήθηση μέσω μεμβράνης απαιτεί συνήθως μεμβράνη με μέγεθος διαμέτρου πόρων 0,2 μm.

Ο όγκος του δείγματος προς ανάλυση ή η αραιώση αυτού πρέπει να επιλεγθεί έτσι ώστε ο αναμενόμενος αριθμός των τυπικών αποικιών στην μεμβράνη διαμέτρου 47-50 mm να είναι από 10 έως 100 αριθμός αποικιών. Ο συνολικός αριθμός των αποικιών στη μεμβράνη (τυπικές και μη τυπικές) πρέπει να είναι λιγότερος από 200. Να σημειωθεί όμως, ότι ο συνολικός αριθμός των μετρήσιμων αποικιών εξαρτάται από το μέγεθος των αποικιών, οπότε είναι μικρότερος από 200 για μεγάλο μεγέθους αποικίες.

## Διήθηση

Η αποστειρωμένη συσκευή διήθησης συνδέεται με μία αντλία κενού. Στη συνέχεια τοποθετείται μία στείρα μεμβράνη με τη γκρι διαγράμμιση προς τα επάνω, στο πορώδες δίσκο της βάσης του φίλτρου, με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας η οποία έρχεται σε επαφή μόνο με το εξωτερικό μέρος της μεμβράνης σε επαφή.

Ακολουθεί η τοποθέτηση του αποστειρωμένου κυπέλλου στη βάση του φίλτρου. Μετά είτε με τη βοήθεια πιπέτας ή με απευθείας απόχυση μέσα στο κυπέλλο εισάγεται ένα από τα παρακάτω είδη δείγματος (με το διακόπτη της αντλίας κλειστό):

- Ένα γνωστό όγκο του δείγματος ή αραιώση αυτού, μετά από επιμελή ανάδευση (τουλάχιστο 10 ml)
- Το περιεχόμενο μίας φιάλης που περιέχει τον όγκο δείγματος προς ανάλυση και τον αντίστοιχο όγκο διαλύτη έτσι ώστε να επέλθει τελικός όγκος τουλάχιστο 10 ml.
- Τουλάχιστο 10 ml διαλύτη, όπου ο όγκος του δείγματος προς ανάλυση, μετράται με μία πιπέτα, και προστίθεται σε αυτόν και γίνεται ανάδευση με την πιπέτα.

Στη συνέχεια τίθεται σε λειτουργία η αντλία και εφαρμόζεται κενό (γύρω στα 170 kPa) έτσι ώστε να διηθηθεί το νερό διαμέσου της μεμβράνης. Η λειτουργία της αντλίας παύεται μόλις έχει διηθηθεί το δείγμα του νερού και θα ήταν χρήσιμο να καθαριστεί το κυπέλλο με τη διήθηση μία έως τρεις φορές 10-30 ml στείρου διαλύτη όσο το φίλτρο είναι ακόμη στη θέση του.

## Μεταφορά της μεμβράνης

Το κυπέλλο απομακρύνεται (με διακοπή της λειτουργίας της αντλίας) και η μεμβράνη μεταφέρεται με αποστειρωμένη λαβίδα σε ένα από τα επόμενα, διασφαλίζοντας ότι δε παγιδεύονται φυσαλίδες αέρα μεταξύ της μεμβράνης και του θρεπτικού υποστρώματος:

- Σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό που βρίσκεται μέσα σε ένα τρυβλίο
- Ένα αποστειρωμένο λυοφιλομένο θρεπτικό υπόστρωμα που έχει υγρανθεί με ένα υγρό υπόστρωμα ή έχει ανασυσταθεί με αποστειρωμένο νερό σε ένα τρυβλίο Petri

- Σε ένα κενό τρυβλίο Petri ή σε λίγη ποσότητα στερεού θρεπτικού υποστρώματος σε ένα τρυβλίο Petri, όπου στη συνέχεια θα επιστρωθεί με νέα στρώση του θρεπτικού υποστρώματος καλύπτοντας τη μεμβράνη

Για διαφορετικούς όγκους του ίδιου δείγματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί διαδοχικά το ίδιο κυπέλλιο χωρίς ενδιάμεση αποστείρωση με την προϋπόθεση ότι πρώτα θα διηθηθούν οι μικρότεροι όγκοι ή οι μεγαλύτερες αραιώσεις. Για τη διήθηση επόμενου δείγματος, ή χρησιμοποιείται μία διαφορετική αποστειρωμένη συσκευή διήθησης ή αποστειρώνεται το κυπέλλιο και η βάση του φίλτρου με φλόγα. Εναλλακτικά, ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή για την απολύμανση.

### **Επώαση**

Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία αναποδογυρίζονται και τοποθετούνται σε ένα θάλαμο επώασης ή σε ένα περιέκτη εντός ενός υδατόλουτρου. Οι σωροί των τρυβλίων δεν πρέπει να κατασκευάζονται με πάνω από 6 τρυβλία Petri έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι η θερμοκρασία του επωαστικού θαλάμου θα περιβάλλει επαρκώς και γρήγορα όλα τα θρεπτικά υποστρώματα. Στη συνέχεια επιλέγεται η διάρκεια και η θερμοκρασία της επώασης ανάλογα με τον μικροοργανισμό ή την ομάδα των μικροοργανισμών που αναζητούνται προς απομόνωση.

Η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δύο στάδια:

Προ-επώαση ποικίλης διάρκειας για παράδειγμα 2-4 ώρες σε χαμηλότερη θερμοκρασία (π.χ. 25 °C - 30°C), μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να επιτραπεί στους στρεσαρισμένους μικροοργανισμούς να αναζωογονηθούν. Στη συνέχεια ακολουθεί μία μεγαλύτερη διάρκεια επώαση στη συνήθη θερμοκρασία επώασης για το μικροοργανισμό που αναζητείται.

### **Καταμέτρηση**

#### **Γενικά**

Η αξιολόγηση των τρυβλίων ή των μεμβρανών ξεκινά αμέσως μετά την επώαση. Αν αυτό δεν είναι εφικτό, τότε μπορούν να φυλαχθούν στους  $(5 \pm 3)$  °C για σύντομες περιόδους (π.χ. λίγες ημέρες) δεδομένου ότι δεν θα επηρεαστούν οι αριθμοί, η εμφάνιση ή ακόλουθη επιβεβαίωση των αποικιών. Αν τα τρυβλία ή οι μεμβράνες

αποθηκεύονται, πρέπει να αξιολογηθεί η περίοδος της αποθήκευσης εάν είναι ή όχι αποδεκτή για τη μέθοδο και το είδος του δείγματος.

### **Αποικίες που πρόκειται να καταμετρηθούν και να επιβεβαιωθούν**

Για συνολικές μετρήσεις σε ένα μη εκλεκτικό υπόστρωμα, καταμετρώνται όλες οι αποικίες. Στην περίπτωση των εκλεκτικών και διαφοροποιητικών υλικών μόνο εκείνες οι αποικίες που εμφανίζουν χαρακτηριστική μορφολογία του μικροοργανισμού που αναζητάται, θα καταμετρηθούν. Μεγέθυνση μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν το μέγεθος της αποικίας είναι μικρό ή όταν είναι δύσκολο να διαχωρισθεί αν πρόκειται για αποικία ή άλλο σωματίδιο. Σε γενικές γραμμές, είναι ασύνηθες για τέτοιες καταμετρήσεις να υποδεικνύονται οι οργανισμοί που ανήκουν σε μία μόνο ταξινομική ομάδα γι αυτό και οι αποικίες χαρακτηρίζονται ως υποθετικές ή άτυπες.

Για πιο ακριβή χαρακτηρισμό, επιβεβαιωτικές δοκιμές είναι απαραίτητες.

Στην πράξη είναι ανέφικτο να επιβεβαιωθούν όλες οι ύποπτες αποικίες σε περίπτωση που είναι πολλές σε αριθμό. Σε τέτοιες περιπτώσεις εξετάζονται όλες οι τυπικές αποικίες από μία υπο-περιοχή του τρυβλίου ή της μεμβράνης.

### **Πρωτόκολλο**

#### **Επεξεργασία του δείγματος**

Συγκεκριμένα, μετά από καλή ανάδευση του δείγματος, 200ml δείγματος νερού διηθούνται μέσω μεμβράνης από νιτρική κυτταρίνη με διάμετρο πόρων 45μm, με τη χρήση συσκευής διήθησης υπό αρνητική πίεση.

Με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας, γίνεται η μεταφορά της μεμβράνης μέσα σε αποστειρωμένα φιαλίδια με βιδωτό πώμα, τα οποία περιέχουν 10ml αποστειρωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Ringer's. Το φιαλίδιο αναδεύεται έντονα με περιδίνηση για τουλάχιστο δύο λεπτά έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί που έχουν κατακρατηθεί στη μεμβράνη να πέσουν μέσα στο υγρό ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά και από αυτό το στάδιο έχει προκύψει μέσω συμπύκνωσης το δείγμα που θα αναλυθεί περαιτέρω, που δεν είναι άλλο από τα 10 ml Ringer's.

Το τελικό συμπυκνωμένο δείγμα καλλιεργείται με τρεις τρόπους:

- άμεσα χωρίς περαιτέρω επεξεργασία,

- μετά από επίδραση θερμότητας και
- μετά από επεξεργασία με οξύ, όπως αναφέρεται παρακάτω:

### **Άμεση ανάλυση**

Γίνεται ενοφθαλμισμός 0,1ml συμπυκνώματος σε τρυβλίο με το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Glycine-Vancomycin-Polymyxin-Cycloheximide (GVPC) και διανέμεται πάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου άσηπτα με τη βοήθεια πλαστικού διανεμητή μίας χρήσης (spreader). (Μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης).

Ανάλυση μετά την επίδραση θερμότητας

Τοποθετούνται 2ml του συμπυκνώματος σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα το οποίο τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  για  $30 \pm 2$  λεπτά.

Αφού γίνει ανάμιξη του θερμασμένου δείγματος, γίνεται ενοφθαλμισμός 0,1ml αυτού σε τρυβλίο με το θρεπτικό υπόστρωμα GVPC και διανέμεται πάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου άσηπτα με τη βοήθεια πλαστικού διανεμητή μίας χρήσης (spreader). (μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης).

### **Ανάλυση μετά την επίδραση οξύ**

Τοποθετείται 1-2 ml του συμπυκνώματος σε στείρο δοχείο με βιδωτό πώμα το οποίο φυγοκεντρείται στις 3000 g για  $30 \pm 1$  λεπτά. Το μισό υπερκείμενο απορρίπτεται με την κατάλληλου όγκου πιπέτα και ακολουθεί ανάδευση στο vortex.

Στη συνέχεια, αντικαθιστούμε την ποσότητα του υπερκειμένου που απόρριφθηκε με οξύ (acid buffer) (1:1) και αναδεύουμε λίγο. Το αφήνουμε για  $(5 \pm 0,5)$  λεπτά και έπειτα γίνεται ενοφθαλμισμός 0,1ml αυτού σε τρυβλίο με το θρεπτικό υπόστρωμα GVPC και διανέμεται πάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου άσηπτα με τη βοήθεια πλαστικού διανεμητή μίας χρήσης (spreader).

### **Επώαση**

Τα τρυβλία επωάζονται στους  $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  μέσα σε θάλαμο κατά προτίμηση με  $\text{CO}_2$  για 10 μέρες. Σε συνθήκες επώασης με ατμόσφαιρα αυξανόμενης υγρασίας είναι δυνατό να αναπτυχθούν καλύτερα ορισμένα είδη Λεγεωνέλλας.

### Αξιολόγηση αποικιών

Κατά τη διάρκεια των δέκα ημερών της επώασης γίνεται εξέταση των τρυβλίων τρεις φορές τουλάχιστον, με χρονικά διαστήματα 2 με 4 μέρες.

Μετά την επώαση, οι αποικίες εξετάζονται σε στερεομικροσκόπιο με χρήση άπλετου ηλιακού φωτός. Οι αποικίες της Λεγεωνέλλας έχουν τη μορφή θρυμματισμένου γυαλιού και μαργαριταρώδη ιριδίζουσα απόχρωση. Οι χαρακτηριστικές αποικίες της Λεγεωνέλλας είναι λείες χρώματος λευκού ή γκρι, μπλε, μωβ, αλλά μπορεί να εμφανίζονται ως ροζ, ανοιχτά πράσινες (lime) ή κοκκινωπές.

Σημειώνονται τα διαφορετικά είδη των αποικιών και αριθμούνται οι διαφορετικές αποικίες από κάθε τρυβλίο.

### Επιβεβαίωση- Ταυτοποίηση και οροτύπηση

Καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης και για κάθε τρυβλίο, επιλέγουμε για επιβεβαίωση τουλάχιστον 3 αποικίες από κάθε είδος τυπικών αποικιών. Κάθε αποικία που επιλέχθηκε ενοφθαλμίζεται ταυτόχρονα σε δύο υποστρώματα. Σε ένα τρυβλίο με εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα BufferedCharcoalYeastExtractKetoglutarate (BCYE) και ένα άλλο που περιέχει το ευρέως φάσματος θρεπτικό υπόστρωμα NutrientAgar (NA) . Τα τρυβλία επωάζονται στους  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  για 2 μέρες τουλάχιστον. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε BCYE και δεν αναπτύσσονται σε NA άγαρ, επιβεβαιώνονται ως *Legionellaspp*.

Τα είδη της Λεγεωνέλλας ταυτοποιούνται και οροτυποποιούνται με τη δοκιμή συγκόλλησης με σωματίδια latex. Η συγκεκριμένη δοκιμασία μπορεί να δώσει ως αποτέλεσμα: *L. pneumophila* οροτύπου1, *L.pneumophila* ομάδας οροτύπων 2- 14 ή ομάδα ειδών *Legionella* που δεν ανήκουν στο είδος *pneumophila* και είναι: *Legionellalongbeachae* ορότυποι 1 & 2, *Legionellabozemaniai* ορότυποι 1 & 2, *Legionelladumoffii*, *Legionellagormanii*, *Legionellajordanis*, *Legionellamicdadei*, *Legionellaanisa* που έχουν προκαλέσει νόσο σε άνθρωπο. Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή του kit.

### **ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Υπολογίζεται ο αριθμός των Μονάδων Σχηματισμού Αποικιών (cfu) των ειδών της Λεγεωνέλλας ανά 1L αρχικού μη συμπυκνωμένου δείγματος ως εξής:



$$C = \frac{n \times v}{i} \times \frac{1}{s}$$

όπου:

C= cfu/L στο αρχικό δείγμα

n= ο αριθμός των αποικιών πάνω στο τρυβλίο

v= ο όγκος (σε ml) του συμπυκνωμένου δείγματος (10ml)

i= ο όγκος (σε ml) του δείγματος που ενοφθαλμίστηκε πάνω στο τρυβλίο (0,1ml)

s= ο όγκος (σε L) του νερού από το οποίο συμπυκνώθηκε η μικροχλωρίδα (0,2L)

Άρα, η παραπάνω σχέση γίνεται ως εξής:

$$C = n \times 500$$

Το τρυβλίο που δείχνει το μέγιστο αριθμό επιβεβαιωμένων αποικιών θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο αριθμός των ειδών της Λεγεωνέλλας στο αρχικό δείγμα. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των αποικιών που υπολογίστηκαν στα 2 τρυβλία, γιατί δεν αποτελούν αντίγραφα εφόσον το καθένα έχει υποστεί ξεχωριστή επεξεργασία (θέρμανση ή μη).

Όπως είναι φανερό το όριο ανίχνευσης στην παραπάνω μέθοδο φτάνει τα 500cfu/L, δεδομένου ότι κάθε μικροοργανισμός Λεγεωνέλλας ανακτάται από το αρχικό δείγμα με αυτή την τεχνική. Ωστόσο, στην πράξη οι μικροοργανισμοί χάνονται σε κάθε στάδιο της μεθόδου, π.χ. ανεπαρκής διήθηση μέσω των μεμβρανών.

Κατά την αναφορά των αποτελεσμάτων, εκφράζεται ο αριθμός των cfu των *Legionellaspp.* ανά λίτρο νερού προσδιορίζοντας το μαθηματικό όριο ανίχνευσης, τον όγκο του δείγματος που εξετάστηκε καθώς και τον αντίστοιχο όγκο που καλλιεργήθηκε.

Αν δεν υπάρχουν αποικίες Λεγεωνέλλας, το αποτέλεσμα εκφράζεται ως:

«δεν ανιχνεύτηκε Λεγεωνέλλα (μαθηματικό όριο ανίχνευσης= 500cfu/L)»

Αν έχουν ανιχνευτεί αποικίες Λεγεωνέλλας, το αποτέλεσμα εκφράζεται ως:

«α σε 1L», όπου α= ο αριθμός των αποικιών της Λεγεωνέλλας σε 1L δείγματος

Το αποτέλεσμα δύναται να περιέχει πληροφορίες για την ορολογική ταυτοποίηση ως *L. pneumophilla* ορότυπος 1, 2-14, ή άλλα είδη – εκτός της *L. pneumophilla*- της Λεγεωνέλλας.

### **6.2.2 Ορολογική τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας**

Αρχικά η οροτύπηση έγινε όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω με συγκολλητινοαντίδραση με σωματίδια Latex (Oxoid). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατή η διάκριση ενός στελέχους Λεγεωνέλλας σε *L.pneumophila* ορότυπου 1, *L.pneumophila* ομάδας οροτύπων 2-14 και ομάδα στελεχών που ανήκουν σε άλλα είδη από το είδος της *L.pneumophila*. Για τη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκαν στελέχη *L.pneumophila* ομάδας οροτύπων 2-14.

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη συγκόλληση μπλε σωματιδίων λάτεξ που είναι ευαισθητοποιημένα με ειδικά αντισώματα κουνελιού έναντι αντιγόνων της *L.pneumophila* ορότυπου 1, ομάδας οροτύπων 2-14, ομάδας άλλων ειδών (*Legionella longbeachae* ορότυποι 1 & 2, *Legionella bozemanii* ορότυποι 1 & 2, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legionella jordanis*, *Legionella micdadei*, *Legionella anisa*), με τα αντίστοιχα αντιγόνα του κυτταρικού τοιχώματος της Λεγεωνέλλας, σχηματίζοντας ορατά συσσωματώματα. Με αυτόν τον τρόπο παρέχεται ένα απλό και γρήγορο screening για τη διαπίστωση επικράτησης παθογονικών ειδών και οροτύπων της Λεγεωνέλλας.

#### **Πρωτόκολλο**

Κατά την εφαρμογή της δοκιμής συγκόλλησης, ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή του κιτ Oxoid Legionella Latex Kit. Η ολική ευαισθησία του κιτ είναι 99%. Η συνολική ειδικότητα του κιτ είναι 100% ([http://www.oxid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=DR0800&c=uk&lang=EN&minfo=Y](http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=DR0800&c=uk&lang=EN&minfo=Y)).

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της άμεσης δοκιμής:

α. Τα αντιδραστήρια αφήνονται να περιέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα εναιωρήματα των σωματιδίων latex πρέπει να αναμιχθούν έντονα πριν τη χρήση.

β. Μία σταγόνα από κάθε αντιδραστήριο latex τοποθετείται σε κάθε ένα από τους 4 κύκλους της κάρτας δοκιμής. Είναι προτιμότερο να τοποθετούνται στην άκρη του κύκλου.

γ. Μία σταγόνα ρυθμιστικού διαλύματος προστίθεται σε κάθε ένα από τους 4 κύκλους της κάρτας δοκιμής. Σ' αυτό το στάδιο πρέπει να διασφαλιστεί ότι το αντιδραστήριο latex και το ρυθμιστικό διάλυμα δεν είναι αναμεμιγμένα.

δ. Μία αποικία μεγέθους τουλάχιστον 1 mm ή δύο αν είναι μικρότερες, λαμβάνονται με τη χρήση ενός κρίκου και αναμιγνύονται προσεχτικά στο ρυθμιστικό διάλυμα. Για καλύτερα αποτελέσματα πρέπει να διασφαλιστεί ότι το διάλυμα είναι λείο και ομοιογενές. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία με παρόμοιες αποικίες με κάθε ένα από τα άλλα αντιδραστήρια.

ε. Γίνεται ανάμιξη των αντιδραστηρίων latex και των βακτηριακών εναιωρημάτων και απλώνονται έτσι ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του κύκλου αντίδρασης με τη βοήθεια του κρίκου.

στ. Ανακίνηση της κάρτας με απαλές κινήσεις σε κυκλική τροχιά και παρακολούθηση για την εμφάνιση συγκόλλησης. Η ανακίνηση της κάρτας δεν πρέπει να συνεχιστεί για πέρα από ένα λεπτό και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί μεγεθυντικός φακός ως βοήθεια για την ανάγνωση του αποτελέσματος.

ζ. Μετά το πέρας της δοκιμής απορρίπτεται η κάρτα δοκιμής σε κατάλληλο περιέκτη

η. Οι περιέκτες των αντιδραστηρίων κλείνονται και φυλάσσονται στο ψυγείο

#### Διαδικασίες ελέγχου (Control)

Τα αντιδραστήρια του ελέγχου που παρέχονται πρέπει να χρησιμοποιούνται για να ελεγχθεί αν λειτουργούν σωστά τα αντιδραστήρια λάτεξ κάθε μέρα πριν από τις προγραμματισμένες δοκιμές ρουτίνας. Το θετικό κοντρόλ πρέπει να δείξει συγκόλληση με το αντιδραστήριο λάτεξ μέσα σε ένα λεπτό. Το αρνητικό κοντρόλ δεν πρέπει να δείξει συγκόλληση μέσα σε ένα λεπτό. Το kit δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί αν οι αντιδράσεις των κοντρόλ είναι οι μη αναμενόμενες.

#### Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Θετικά αποτελέσματα

Ένα αποτέλεσμα είναι θετικό όταν η συγκόλληση των μπλε λατεξ σωματιδίων συμβεί εντός ενός λεπτού και χωρίς συγκόλληση στον κύκλο κοντρόλ. Μία θετική αντίδραση υποδεικνύει ότι το αντιγόνο του αντίστοιχου οροτύπου της Λεγεωνέλλας ανιχνεύθηκε στο δείγμα.

#### Αρνητικά αποτελέσματα

Ένα αρνητικό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται αν δε συμβεί συγκόλληση και ένα λείο χωρίς κόκκους (συσσωματώματα) μπλε εναιώρημα παραμένει ως έχει μετά από ένα λεπτό στους κύκλους αντίδρασης.

#### Μη ερμηνεύσιμο αποτέλεσμα

Η δοκιμή είναι μη ερμηνεύσιμη αν τα αντιδραστήρια ελέγχου παρουσιάζουν συγκόλληση. Αυτό υποδεικνύει ότι η καλλιέργεια προκαλεί αυτοσυγκόλληση.

#### Κοκκώδεις ή γραμμικές αντιδράσεις

Περιστασιακά κοκκώδεις ή γραμμικές αντιδράσεις μπορούν να αναπτυχθούν εξαιτίας της ιδιαίτερης φύσης του υλικού δοκιμής. Όταν τέτοιες αντιδράσεις συμβαίνουν πρέπει να ερμηνευθούν χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα κριτήρια:

Το αποτέλεσμα είναι θετικό όταν υπάρχει διακριτή καθαρότητα του μπλε φόντου στα αντιδραστήρια δοκιμής.

#### **Οροτύπηση με μονοκλωνικά αντισώματα.**

Για να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ορότυπος του κάθε στελέχους ακολούθησε οροτύπηση με μονοκλωνικά αντισώματα (Mab) χρησιμοποιώντας τη δοκιμή ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης (EnzymeLinkedImmunosorbentAssay -ELISA) και/ή τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Όπου απαιτήθηκε χρησιμοποιήθηκε το πάνελ μονοκλωνικών αντισωμάτων τη Δρέσδης για τη Λεγεωνέλλα. (Helbig, etal, 1997)

## **ELISA**

### **Αρχή μεθόδου**

Ως μία μέθοδος αναλυτικής βιοχημείας, η ELISA ενέχει την ανίχνευση μίας παραμέτρου σε ένα δείγμα υγρής μορφής με αντιδραστήρια υγρής μορφής κατά τη διάρκεια της ανάλυσης τα οποία βρίσκονται μέσα σε ένα θάλαμο αντίδρασης ή σε

πηγαδάκι το οποίο είναι αναγκαίο για να περικλείει όλα τα αντιδραστήρια προκειμένου να μη διαχυθούν.

Ως ετερογενής μέθοδος η ELISA ξεχωρίζει μερικά συστατικά του μίγματος αντίδρασης με απορρόφηση συγκεκριμένων συστατικών σε στερεή φάση η οποία είναι μονιμοποιημένη. Στην ELISA, ένα υγρό δείγμα προστίθεται στη στατική στερεή φάση με ειδικά μόρια δέσμησης και ακολουθείται από πολλαπλά υγρά αντιδραστήρια που προστίθενται διαδοχικά, επωάζονται και πλένονται ακολουθούμενα από οπτικές αλλαγές (π.χ. ανάπτυξη χρώματος από το προϊόν μίας ενζυμικής αντίδρασης) στο τελικό υγρό στο πηγαδάκι από το οποίο καταμετρείται η ποσότητα της προς εξέταση παραμέτρου. Η ποιοτική ανάγνωση συνήθως βασίζεται στην ανίχνευση της έντασης της μετάδοσης συγκεκριμένων μηκών κύματος φωτός με φασματοφωτόμετρο μέσω του υγρού, το οποίο ενέχει ποσοτικοποίηση της εκπομπής ορισμένων συγκεκριμένων μηκών κύματος μέσω υγρού (όπως επίσης και τον διαυγή βυθό από το πηγαδάκι). Η ευαισθησία της ανίχνευσης εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό του σήματος κατά τη διάρκεια των αναλυτικών αντιδράσεων. Καθώς οι ενζυμικές αντιδράσεις είναι πολύ γνωστές διαδικασίες πολλαπλασιασμού, το σήμα ξεκινά από τα ένζυμα που συνδέονται στα αντιδραστήρια ανίχνευσης σε προκαθορισμένες αναλογίες έτσι ώστε να υπολογιστεί με ακρίβεια ένα ποσοτικό αποτέλεσμα –από εκεί πηγάζει και το όνομα «enzymelinked» (Lequin, 2005).

Η παράμετρος προς εξέταση ονομάζεται επίσης και ο συζευκτής επειδή θα προσδεθεί ειδικά σε ένα αντιδραστήριο ανίχνευσης, για αυτό και η ELISA ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων σύζευξης. Το ειδικό αντιδραστήριο με το οποίο θα προσδεθεί η προς εξέταση ανάλυση είναι ακινητοποιημένο π.χ. συνήθως επικαλύπτει και είναι λυοφιλομένο στον διαφανή πάτο του πηγαδιού και μερικές φορές ακόμη και στα πλευρικά τοιχώματα του πηγαδιού, το οποίο συνήθως κατασκευάζεται ως πλάκα με πολλαπλά πηγαδάκια γνωστή ως πλάκα ELISA. Συμβατικά όπως και με άλλες ενζυμικές μεθόδους η ειδικότητα της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος είναι αυτή που χρησιμοποιείται γιατί είναι εύκολο να παρασκευασθεί έναντι ενός αντιγόνου μέσα σε ένα πηγαδάκι ως αντιδραστήριο. Αν η παράμετρος προς εξέταση είναι ένα αντίσωμα τότε το αντιδραστήριο δέσμησης μπορεί να είναι το αντίστοιχο αντιγόνο. (VanWeemen,1971; Schuurs, et al, 1971)

Ανοσολογικές πλάκες ELISA είναι επιστρωμένες με νεκρά βακτήρια μετά από επεξεργασία με θερμότητα (10 min, 95°C). Ακολουθεί η προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων ως υπερκείμενο καλλιέργειας διαλυμένη σε PBS-T-FCS σε συγκέντρωση 2μg IgG/ml. Για τα μονοκλωνικά αντισώματα που ανήκουν στον ισότυπο IgM χρησιμοποιείται αραιώση 1:20. Μετά από επώαση για 90 min στους 37°C και τρεις πλύσεις, η πρόσδεση ανιχνεύεται με την υπεροξειδάση (anti-mouse (polyvalent) - horseradish) που είναι διαλελυμένη σε PBS - T - FCS. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα υποστρώματος (substrate solution) που περιέχει ο-φαινυλδιαμίνη (1mg/ml) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 0,003%) σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικών (pH 5,0). Η αντίδραση σταματά με 2 M θειικό οξύ μετά από 30 λεπτά. Οπτικές πυκνότητες στα 492 nm (OD492) των τυφλών δεν ξεπερνούσαν την τιμή 0,075. Η ισχύς των δεσμών της αντίδρασης περιγράφηκαν ημιποσοτικά ως «++» για OD492 ≥ 0,5 και ως «+» για τιμές OD492 από 0,2 < OD492 < 0,5 (Helbig, et al, 1997).

### **Έμμεσος Ανοσοφθορισμός (IFT)**

Αποικίες Λεγεωνέλλας λαμβάνονται από ένα τρυβλίο BCYE. Στη συνέχεια αφήνονται να μονιμοποιηθούν σε φορμαλίνη 1%, ολονυκτίς (O/N). Αναδιαλύονται σε 0,5% yolk sac PBS δίνοντας τελική συγκέντρωση περίπου 3x10<sup>8</sup>. Με τη μορφή αυτή εναποτίθενται στο πλακάκι για εξέταση μέσω του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ως αδιάλυτα υπερκείμενα κυτταρικών καλλιέργειών. Το αντιδραστήριο σύζευξης (conjugate) είναι πολυδύναμος αντιορός που έχει παραχθεί σε κασίκες έναντι ποντικών με ισοθιακυανική φλουροσκεΐνη (Helbig, et al, 1997).

### **6.2.3 Μοριακή τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας**

Κάθε ένα απομονωθέν στέλεχος *L.pneumophila* ομάδας οροτύπων 2-14 υποβλήθηκε σε περαιτέρω τυποποίηση με τη μοριακή μέθοδο του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού περιοριστικών τμημάτων χρωμοσωματικού DNA πολλαπλασιασμένων με αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης (AFLP-Amplified Fragment Length Polymorphism). Για την εφαρμογή της μοριακής αυτής μεθόδου απαραίτητο στάδιο είναι η απομόνωση του μικροβιακού DNA. Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε

συμπεριλαμβάνοντας και την τεχνική απομόνωσης του DNA περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

## **AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

### **Αρχή της μεθόδου**

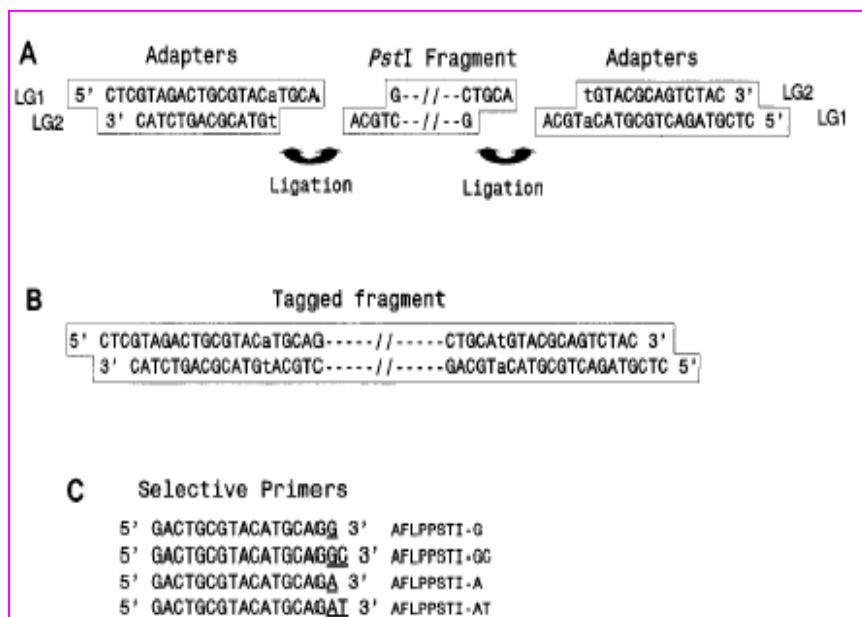
Η μέθοδος απαρτίζεται από μία απλή αντίδραση περιορισμού – σύνδεσης (επανάωσης, ένωσης, επανασύνδεσης, τεχνητής σύνδεσης) ακολουθούμενη από πολλαπλασιασμό με PCR. (Δες διάγραμμα ροής 1). Σε μία αντίδραση ενός σταδίου το γενομικό DNA πέπτεται με ένα ειδικό ένζυμο και ειδικά κατασκευασμένοι προσαρμοστές (adapters) συνδέονται στα τμήματα που προκύπτουν μετά από τη θραύση. Οι προσαρμοστές (adapters) έχουν τρία βασικά χαρακτηριστικά:

- επιτρέπουν την επανασύνδεση προσκολλώμενου τελικού άκρου (sticky -end) συμβατή με την ενδονουκλεάση που χρησιμοποιείται για την πέψη του DNA στόχου,
- εξαφανίζουν τα σημεία περιορισμού μετά από την σύνδεση
- δημιουργούν μία αλληλουχία – υπόστρωμα για τον επερχόμενο πολλαπλασιασμό με PCR.

Τα τμήματα περιορισμού που προκύπτουν με αυτή τη μέθοδο αναφέρονται ως «σημασμένα τμήματα» “tagged fragments,” είναι αυτά που πρόκειται να πολλαπλασιαστούν με PCR με εκκινητές συμπληρωματικούς με τους προσαρμοστές (adapters). Οι διάφοροι πολυμορφισμοί μήκους που προκύπτουν ως προϊόντα της PCR μπορούν να διατρίξουν με ευκολία γέλη αгарόζης ή πολυακρυλαμίδιου και μπορούν να ανιχνευθούν με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου ή αργύρου.

Οι διαφορετικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό των σημασμένων τμημάτων μέσω PCR προσδιορίζουν τα τμήματα τα οποία πρόκειται να πολλαπλασιαστούν.

Εκκινητές πλήρως συμπληρωματικοί στους προσαρμοστές (adapters) (μη ειδικοί εκκινητές) θα πολλαπλασιάσουν αδιάκριτα όλα τα σημασμένα τμήματα DNA, ενώ οι εκκινητές με ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια να εκτείνονται περὶ από τη σύνθεση των προσαρμοστών (adapters) στο άκρο 3 (ειδικοί εκκινητές) αναμένεται να πολλαπλασιάσουν μόνο ένα μέρος του πληθυσμού των σημασμένων τμημάτων.



**Εικόνα 8: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας AFLP.** (A) Προσαρμοστές (adapters ) σχεδιάζονται να είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και να επιτρέπουν σύνδεση κολλώδους τελικού άκρου με τα τμήματα περιορισμού που προέκυψαν μετά τη χρήση του ενζύμου PstI. (B) Τα σημασμένα τμήματα αντιπροσωπεύουν τα υποστρώματα DNA στην επακόλουθη αντίδραση PCR. (C) Ειδικό (εκλεκτικό) εκκινητές χρησιμοποιούνται στο τελικό στάδιο του πολλαπλασιασμού.

Τα νουκλεοτίδια με τα μικρά γράμματα αντιπροσωπεύουν το νουκλεοτίδιο που κλειδώνει στους προσαρμοστές που είναι υπεύθυνοι για την εξαφάνιση των σημείων περιορισμού (59-CTGCA/G-39) για τη δράση της PstI μετά τη σύνδεση. Τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια είναι υπεύθυνα για την εκλεκτικότητα μεταξύ των εκκινητών της AFLP.[Fry, Savelkoul and Visca, 2009]

### Πρωτόκολλο

Ανακαλλιέργεια των στελεχών *Λεγεωνέλλας* συντηρημένα σε διάλυμα γλυκερόλης υπό βαθεία κατάψυξη αρχικά σε τρυβλία GVPC, ώστε να προκύψουν μεμονωμένες αποικίες (48 – 72 h) και στη συνέχεια ανακαλλιέργεια μίας μεμονωμένης αποικίας σε τρυβλία BCYE, ώστε να προκύψουν καθαρές μεμονωμένες αποικίες (48 – 72 h). Στη συνέχεια ακολουθεί η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA με το kit Nucleon BACC<sub>2</sub> DNA Extraction (Amersham Pharmacia Biotec).



Συλλέγονται 10 απομονωμένες αποικίες με κρίκο σε 1 ml φυσιολογικό ορό μέσα σε σωληνάρια τύπου erpendorf των 1,5 ml. Ακολουθεί περιδίνηση (Vortex) για λίγα δευτερόλεπτα. Για την κατακρήμνιση των κυττάρων γίνεται φυγοκέντρηση στις 6000 στροφές/λεπτό (rpm) για 5 λεπτά. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου. Στη συνέχεια προστίθεται υπό άσηπτες συνθήκες, 1 ml αντιδραστηρίου A και γίνεται αναδιάλυση του ιζήματος. Παραμένει στον πάγο για 5 λεπτά. Ακολουθεί επανάληψη της φυγοκέντρησης που περιγράφηκε πιο πάνω και απόρριψη του υπερκειμένου. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml Αντιδραστηρίου B και επαναδιαλύεται το ίζημα. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε γυάλινα σωληνάρια των 10 ml. Προστίθεται 1 ml Αντιδραστηρίου B και 38μl ενζύμου Rnase από διάλυμα αποθήκευσης (stock) 20 μg/ml. Αναδεύεται με περιδίνηση και επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 37ο C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 500 μl διαλύματος υπερχλωρικό νάτριο (sodium perchlorate) και αναδεύεται με κυκλικές κινήσεις. Προστίθενται 2 ml χλωροφορμίου και γίνεται ανάδευση με 10 κυκλικές κινήσεις. Μεταφέρεται με απόχυση σε γυάλινο φυγοκεντρικό σωληνάριο των 10 ml. Προστίθενται 300 μl διαλύματος ρητίνης (Nucleon resin). Σε αυτό το σημείο δεν πρέπει να γίνει ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές/λεπτό (rpm) για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης σχηματίζεται ένα διαυγές υδατικό υπερκείμενο, μια λευκή μεσόφαση, ακολουθεί μία σκούρα καφέ μεσόφαση και κάτω-κάτω η οργανική φάση του χλωροφορμίου. Με προσοχή λαμβάνεται η υπερκείμενη υδατική φάση και μεταφέρεται σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα των 30 ml. Προστίθενται 5 ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και πραγματοποιείται ανάδευση με κυκλικές κινήσεις μέχρι να εμφανιστεί ένα λευκό ίζημα. Αυτό το ίζημα είναι το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές/λεπτό (rpm) για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου. Προστίθενται 2 ml αιθανόλης 70%.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές/λεπτό (rpm) για 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου με προσοχή γιατί το ίζημα μπορεί να είναι χαλαρό. Ακολουθεί στέγνωμα του ιζήματος με ολονύκτια (O/N = overnight) παραμονή στον πάγο ή παραμονή στους 44οC για 60 λεπτά.

Τέλος, πραγματοποιείται η επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml ενέσιμο νερό.

## Αντίδραση πέψης – σύνδεσης DNA

(Αντίδραση restriction –ligation).

Ετοιμάζεται μίγμα για όσα δείγματα είναι προς εξέταση συν ένα. Οι όγκοι των αντιδραστηρίων για τη μία αντίδραση φαίνονται στον **πίνακα 10**.

**Πίνακας 10:** Αναλογίες αντιδραστηρίων για τη δημιουργία μίγματος μίας αντίδρασης restriction –ligation.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Ενέσιμο νερό	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 Λιγάσης 10X	2 μl
AFLP-LG1(εκκινητής)	2 μl
AFLP-LG2(εκκινητής)	2 μl
Περιοριστικό ένζυμο(PstI)	2 μl
Λιγάση	1 μl

Διαμοιράζονται 10 μl μίγματος σε σωληνάρια τύπου eppendorf του 0.5 ml. Προστίθενται 10 μl DNA. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 3 ώρες στο θερμικό κυκλοποιητή.

- Μεταφορά της αντίδρασης restriction – ligation σε σωληνάρια τύπου eppendorf του 1.5 ml. Σε κάθε αντίδραση restriction – ligation προσθέτουμε τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον **πίνακα 11**.

**Πίνακας 11:** Αναλογίες αντιδραστηρίων που προστίθενται σε μία αντίδραση restriction – ligation

Αντιδραστήριο	Όγκοι
Ενέσιμο νερό	47 μl
Οξικό Αμμώνιο 7,5 M	33 μl

Παγωμένη Απόλυτη αιθανόλη	100 μl
---------------------------	--------

Ανάδευση με περιδίνηση.

Παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12.000 στροφές/λεπτό (rpm) για 10 λεπτά. Στο τέλος το υπερκείμενο απορρίπτεται. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl 70% αιθανόλης. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση σε 12.000 στροφές/λεπτό (rpm) για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα στεγνώνει με O/N (Overnight) παραμονή στον πάγκο ή παραμονή στους 44°C για 60 λεπτά. Τέλος αναδιαλύεται σε 100 μl ενέσιμο νερό.

### Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

Ποσότητα από την αντίδραση πέψης – σύνδεσης (restriction – ligation) αραιώνεται με ενέσιμο νερό (1μl αντίδρασης + 49 μl νερό)

Προετοιμάζεται μίγμα για όσα δείγματα είναι προς ανάλυση συν δύο. Οι όγκοι των αντιδραστηρίων για τη μία αντίδραση παρουσιάζονται στον **πίνακα 12**.

### Πίνακας 12: Αναλογίες αντιδραστηρίων για μία αντίδραση PCR της AFLP

Αντιδραστήριο	Όγκος
Ενέσιμο νερό	17,25 μl
MgCl <sub>2</sub> 25 Mm	1 μl
Ένζυμο AFLP-PstI-G (στοκ 42,9 ng/μl)	1,75 μl

20 μl από το μίγμα διαμοιράζονται στα έτοιμα σωληνάκια “Ready – To – GoPCRBeads” και 5 μl από την αραιωμένη αντίδραση “restriction – ligation” (1:50). Στο σωληνάριο που χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας προστίθεται μόνο 5 μl ενέσιμο νερό. Ακολουθεί ήπια ανάδευση.

Ακολουθεί τοποθέτηση των δειγμάτων στο θερμικό κυκλοποιητή.

### Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή

Οι συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή για την PCR της AFLP φαίνονται στον **πίνακα 13**.

**Πίνακας 13:** Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή για την PCR της AFLP

Στάδιο	Θερμοκρασία (οC)	Χρόνος	Περιγραφή	Αριθμός κύκλων
1	94	4 min	Αρχική Αποδιάταξη	1
2	94	1 min	Αποδιάταξη	33
	60	1 min	Πρόσδεση	
	72	2,5 min	Επιμήκυνση	
3	12	∞	Κράτημα	

### Ηλεκτροφόρηση

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση παρασκευάζεται γέλη αγαρόζης (UltraPureElectrophoresisGrade) 1,5% σε TBE (Tris/Borate/EDTA) ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 1x. (1050 gr σκόνης προστίθεται σε 70 ml 1x TBE). Ακολουθεί θέρμανση σε θερμαινόμενη εστία μέχρι διαυγάσεως του διαλύματος και διοχέτευση αυτού μέσα στο ειδικό καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Αφήνεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει. Στη συνέχεια προστίθενται στις αντιδράσεις 4,5μl χρωστικής και εναποτίθενται 10μl από κάθε δείγμα σε κάθε ένα πηγαδάκι. Προστίθεται επίσης με εναπόθεση 12μl ηγεμόνα μοριακών βαρών (MBI Fermentas Ladder Mix (0,75μg/lane). Εφαρμόζεται τάση 70 Volts για 3,5 - 4 ώρες (3,45 V/cm). Μετά την ηλεκτροφόρηση η γέλη εμβαπτίζεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 1μg/ml (200 ml νερό + 100 μl βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 2 mg/ml) για 20-30 λεπτά. Ακολουθεί η οπτικοποίηση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης σε θάλαμο με υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

### Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η ερμηνεία των προφίλ της AFLP μεταξύ των στελεχών Λεγεωνέλλας στηρίχθηκε στα κριτήρια του Tenover όπως αυτός τα έχει περιγράψει για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της Ηλεκτροφόρησης Γέλης σε Παλλόμενο Πεδίο (PulseFieldGelElectrophoresis-PFGE).[Tenover et al, 1995] Μόνο μάντες που αντιστοιχούσαν σε μοριακά βάρη μεταξύ 300bp και 3500bp για κάθε σχέδιο (pattern) ελήφθησαν υπόψη.

Τα αποτελέσματα της τυποποίησης επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα GelcompareII (AppliedMaths, Βέλγιο) προκειμένου να γίνει η σύγκριση των προφίλ μεταξύ των διαφορετικών γελών αгарόζης .

Η ανάλυση σε ομάδες (clusteranalysis) βασίστηκε στην μέθοδο του συντελεστή dice (dicecoefficient) και στην στατιστική μέθοδο Unweighted Pair Group Method with Averages (UPGMA). Οι σταθερές που χρησιμοποιήθηκαν όταν ζητήθηκαν από το λογισμικό ήταν για την Band position tolerance = 2% και για το optimisation setting = 0,5%. Στελέχη με ομολογία πάνω από 90% θεωρήθηκαν όμοια γενετικά στελέχη.

#### **Τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας με τη μέθοδο Sequence – basedtyping (SBT).**

Το πρωτόκολλο SBT του ESGLI (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for Legionella Infections) για την επιδημιολογική τυποποίηση της *Legionella pneumophila* (SBT Protocol, version 5), ακολουθήθηκε για την τυποποίηση των στελεχών *Legionella pneumophila* ομάδας οροτύπων2-14.

([http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php\[protocols\]](http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php[protocols])). Για κάποια από τα στελέχη απαιτήθηκε να εφαρμοστεί και το πρωτόκολλο για την τυποποίηση με αλληλούχιση βάσεων του γονιδίου neuAh (SBT protocol version1).

Για την ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο για την ποιότητα αλληλούχισης της Λεγεωνέλλας (Legionella Sequence Quality Tool). ([http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/sbt/seq\\_assemble\\_legionella1.cgi](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/sbt/seq_assemble_legionella1.cgi)). Όλα τα δεδομένα συμπεριλαμβανομένων και νέων τύπων αλληλούχισης (STs) εισήχθησαν στη βάση δεδομένων του ESGLI για τη SBT. ([http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php\[strain\\_data\\_submission\]](http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php[strain_data_submission])).

Οι θέσεις δράσης των εκκινητών (primers) σε σχέση με τον αύξων αριθμό της αλληλουχίας αναφοράς στη τράπεζα γονιδίων (GeneBank) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 14):

**Πίνακας 14: Εκκινητές πολλαπλασιασμού της SBT(Amplification primers)**

Γονίδιο	Όνομα εκκινητή	Θέση	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία πρόσδεσης	Μέγεθος τμήματος (bp)
<i>flaA</i>	flaA-587F	568-587	GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG	55 °C	414
	flaA-960R	981-960	CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G		
<i>pilE</i>	pilE-35F	12-35	CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA	55 °C	460
	pilE-453R	471-453	GCT GGC GCA CTC GGT ATC T		
<i>asd</i>	asd-511F	487-511	CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G	55 °C	576
	asd-1039R	1062-1039	CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC		
<i>mip</i>	mip-74F	58-74	GCT GCA ACC GAT GCC AC	55 °C	559
	mip-595R	616-595	CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C		
<i>mompS</i>	mompS-450F	430-450	TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG	55 °C	711
	mompS-1116R	1140-1116	TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C		
<i>proA</i>	proA-1107F	1090-1107	GAT CGC CAA TGC AAT TAG	55 °C	481
	proA-1553R	1570-1553	ACC ATA ACA TCA AAA GCC		
<i>neuA</i>	neuA-196F	176-196	CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG	55 °C	459
	neuA-634R	634-611	CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC		

**Εκκινητές Αλληλούχισης (Sequencingprimers):**

Είναι όμοιοι με τους παραπάνω εκτός από την αντίστροφη αλληλούχιση του γονιδίου στόχου *mompS* όπου στη θέση του εκκινητή *mompS-1116R* χρησιμοποιείται ο εκκινητής *mompS-1015R*. Τα στοιχεία του φαίνονται παρακάτω:

Όνομα εκκινητή	Θέση	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')
<i>mompS-1015R</i>	1032-1015	CAG AAG CTG CGA AAT CAG

Άρα για το γονίδιο *mompS* χρησιμοποιούνται ανά στάδιο οι παρακάτω εκκινητές.:

MompS πρωταρχικός πολλαπλασιασμός:

- mompS-450F: 5' - TTGACCATGAGTGGGATTGG - 3'
- mompS-1116R: 5' - TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C - 3'
- mompS αλληλούχιση:
- mompS-450F: 5' - TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG - 3'
- mompS-1015R: 5' - CAG AAG CTG CGA AAT CAG - 3'

### Τροποποιημένο πρωτόκολλο με τους εκκινητές M13.

Για την απλοποίηση και επιτάχυνση της διαδικασίας της αλληλούχισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν κοινοί εκκινητές για όλα τα γονίδια στόχους οι οποίοι είναι: ο M13 forward (5' - TGTAACGACGGCCAGT - 3') και ο M13 reverse (5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3'). Οι M13F και M13R χρησιμοποιούνται για την πρόσθια (έμπροσθεν) και ανάστροφη (αντίστροφη) αλληλούχιση όλων των PCR προϊόντων, εκτός από τον mompS-1015R (αντί του M13R) που χρησιμοποιείται για την ανάστροφη αντίδραση αλληλούχισης του mompSPCR προϊόντος. Αυτό είναι και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης.

**Πίνακας 15: Εκκινητές πολλαπλασιασμού της SBT (τροποποιημένο πρωτόκολλο)**

Γονίδιο	Όνομα εκκινητή	Θέση	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία πρόσδεσης	Μέγεθος τμήματος (bp)
<i>flaA</i>	flaA-587F (M13F)	568-587	TGTAACGACGGCCAGT <u>GCGTATTGCTCAAAATACTG</u>	55 °C	414
	flaA-960R (M13R)	981-960	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CCATTAATCGTTAAGTTGTAGG</u>		
<i>pilE</i>	pilE-35F (M13F)	12-35	TGTAACGACGGCCAGT <u>CACAATCGGATGGAACACAACTA</u>	55 °C	460
	pilE-453R (M13R)	471-453	CAGGAAACAGCTATGACC <u>GCTGGCGCACTCGGTATCT</u>		
<i>asd</i>	asd-511F (M13F)	487-511	TGTAACGACGGCCAGT <u>CCCTAATTGCTCTACCATTTCAGATG</u>	55 °C	576
	asd-1039R (M13R)	1062-1039	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC</u>		
<i>mip</i>	mip-74F (M13F)	58-74	TGTAACGACGGCCAGT <u>GCTGCAACCGATGCCAC</u>	55 °C	559
	mip-595R (M13R)	616-595	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C</u>		

<b><i>mompS</i></b>	mompS-450F (M13F)	430-450	TGTA AACGACGGCCAGT <u>TTGACCATGAGTGGGATTGG</u>	55 °C	711
	mompS-1116R	1140-1116	TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C		
<b><i>proA</i></b>	proA-1107F (M13F)	1090-1107	TGTA AACGACGGCCAGT <u>GATCGCCAATGCAATTAG</u>	55 °C	481
	proA-1553R (M13R)	1570-1553	CAGGAAACAGCTATGACC <u>ACCATAACATCAAAGCC</u>		
<b><i>neuA</i></b>	neuA-196F (M13F)	176-196	TGTA AACGACGGCCAGT <u>CCGTTCAATATGGGGCTTCAG</u>	55 °C	459
	neuA-634R (M13R)	634-611	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CGATGTCGATGGATTCAATAAC</u>		

**Στον πίνακα 16** φαίνονται οι αλληλουχίες αναφοράς και οι περιοχές στόχοι που περικλείονται για την εισαγωγή του αλληλίου καθώς και το μέγεθος κάθε περιοχής, που χρησιμοποιούνται για την εγγραφή του αλληλίου.

**Πίνακας 16:** Αλληλουχίες αναφοράς και περιοχές που χρησιμοποιούνται για την εγγραφή του αλληλίου.

Στόχος	Μέγεθος αμπλικονίου	Αύξων αριθμός αλληλουχίας αναφοράς στην Τράπεζα γονιδίων(Genebank)	Περιοχή στόχος που περικλείεται για την εισαγωγή του αλληλίου	Μέγεθος της περιοχής στόχου(nt)
<i>flaA</i>	414	X83232	653-834	182
<i>pilE</i>	460	AF048690	103-435	333
<i>asd</i>	576	AF034213	538-1010	473
<i>mip</i>	559	AJ496269	117-518	402
<i>mompS</i>	711	AF078136	523-874	352
<i>proA</i>	481	M32884	1134-1538	405
<i>neuA</i>	459	AJ007311	229-582	354

### Πρωτογενής πολλαπλασιασμός (Primary amplification)

Η αντίδραση της PCR τελείται σε τελικό όγκο 20 μl. Τα σωληνάρια τύπου erpendorf που θα υποδεχθούν την αντίδραση της PCR, τοποθετούνται αρχικά σε ένα ψυχρό



υπόστρωμα. Στη συνέχεια προστίθεται σε καθένα από αυτά 4 μl του μίγματος του ενζύμου της DNA πολυμεράσης Taq και στη συνέχεια 14μl από το υπόλοιπο μίγμα αντίδρασης. Ακολουθεί η εναπόθεση των δειγμάτων με την εξής σειρά: αρνητικό κοντρόλ, δείγματα υπό εξέταση και τέλος το θετικό κοντρόλ. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα πριν τοποθετηθούν στο θερμικό κυκλοποιητή.

Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται αναλυτικά η σύσταση του μίγματος της πολυμεράσης (**πίνακας 17**) και του μίγματος αντίδρασης (**πίνακας 18**):

**Πίνακας 17:** Μίγμα TaqDNA πολυμεράσης

Αντιδραστήριο	Όγκος/αντίδραση (μl)
Νερό ελεύθερο ενδονουκλεασών	3,6 μl
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (x10)	0,2 μl
TaqDNA πολυμεράση (5U/μl)	0,2 μl
Όγκος αντίδρασης	4,0 μl

Ετοιμάζονται 7 διαφορετικά μίγματα αντίδρασης, ένα για κάθε γονίδιο στόχο.

**Πίνακας 18:** Μίγμα αντίδρασης PCR

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση στοκ διαλύματος	Τελική συγκέντρωση	Όγκος/αντίδραση (μl)
Νερό ελεύθερο ενδονουκλεασών	-	-	9,4
PCR ρυθμιστικό διάλυμα	10 x	1 x	2.0
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5 mM	1.0
Εκκινητής F	10 pmol/μl	4 pmoles	0,4
Εκκινητής R	10 pmol/l	4 pmoles	0,4
Δεοξυνουκλεοτίδια	5 mM	200μM	0,8
Όγκος αντίδρασης	-	-	14,0

### Κοντρόλ

Για κάθε τρέξιμο PCR συμπεριλήφθηκαν ένα αρνητικό (2 μl νερού ελεύθερο ενδονουκλεασών) και ένα θετικό κοντρόλ (2 μl DNA γνωστής *L. pneumophila*).

Πιο κάτω περιγράφονται οι συνθήκες για την πραγματοποίηση της PCR (**Πίνακας 19**).

**Πίνακας 19:** Παράμετροι του θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος		Αριθμός κύκλων
1	95	5 min	Αρχική Αποδιάταξη	1
2	95	30 sec	Αποδιάταξη	35
	55	30 sec	Πρόσδεση	
	72	45 sec	Επιμήκυνση	
3	72	10 min	Τελική Επιμήκυνση	1
4	12	∞	Κράτημα	-

### **Πρωτόκολλο για το γονίδιο neuAh**

#### **Πρωτογενής πολλαπλασιασμός**

Η αντίδραση της PCR τελείται σε τελικό όγκο 20 μl. Τα σωληνάρια τύπου erpendorf που θα υποδεχθούν την αντίδραση της PCR, τοποθετούνται αρχικά σε ένα ψυχρό υπόστρωμα. Στη συνέχεια προστίθεται σε καθένα από αυτά 14μl από το μίγμα αντίδρασης και 2μl από το σχετικό υπόστρωμα. Ακολουθεί η εναπόθεση των δειγμάτων με την εξής σειρά: αρνητικό κοντρόλ, δείγματα υπό εξέταση και τέλος το θετικό

κοντρόλ. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα πριν τοποθετηθούν στο θερμικό κυκλοποιητή.

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται αναλυτικά οι εκκινητές του γονιδίου *neuAh*, οι αλληλουχίες αναφοράς, οι τροποποιημένοι εκκινητές M13, η σύσταση του μίγματος αντίδρασης και οι συνθήκες θερμοκρασίας για την PCR. (πίνακες 20-24).

**Πίνακας 20:** Εκκινητές γονιδίου *neuAh*

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Αναμενόμενο μέγεθος τμήματος (bp)
<i>neuAh_L</i>	ATCCAGCAGTTTTTAMAAATT TAGG	791-794*
<i>neuAh_R</i>	TGGCTGCATAAAAYTAATTCTT TAGCCA	

**Πίνακας 21:** Αλληλουχίες αναφοράς και περιοχές που χρησιμοποιούνται για την ανάγνωση του αλληλίου:

Γονίδιο στόχος	Μέγεθος αμπλικονίου (bp)	Αύξων αριθμός GenBank	Περιοχήστόχος	Μέγεθος της περιοχής στόχου (bp)
<i>neuAh</i>	794	FN256429	229-582	354
<i>neuAh</i>	791	FR750546	229-579	351

**Πίνακας 22:** M13-τροποποιημένοι εκκινητές *neuAh*

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Αναμενόμενο μέγεθος τμήματος (bp)
<i>neuAh_L</i> (M13F)	TGTA <del>AAACGACG</del> CCAGTATCCAGCAG TTTTAMAAATTTAGG	827-830
<i>neuAh_R</i> (M13R)	CAGGAAACAGCTATGACCTGGCTGCAT AAAYTAATTCTTTAGCCA	

**Πίνακας 23:** Σύσταση μίγματος αντίδρασης

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση στοκ διαλύματος	Τελική συγκέντρωση	Όγκος/αντίδραση (μl)
Νερό ελεύθερο ενδονουκλεασών	-	-	13,2
PCR ρυθμιστικό διάλυμα	10 x	1 x	2,0
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	1,0
Εκκινητής F	10 pmol/μl	4 pmoles	0,4
Εκκινητής R	10 pmol/l	4 pmoles	0,4
Δεοξυνουκλεοτίδια	5 mM	200μM	0,8
Taq DNA πολυμεράση		5 U/μl	0,2
Όγκος αντίδρασης	-	-	18,0

**Πίνακας 24:** Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος		Αριθμός κύκλων
1	95	5 min	Αρχική Αποδιάταξη	1
2	95	30 sec	Αποδιάταξη	35
	55	30 sec	Πρόσδεση	
	72	60sec	Επιμήκυνση	
3	72	10 min	Τελική Επιμήκυνση	1
4	12	∞	Κράτημα	-

Ακολουθούν τα περαιτέρω στάδια της μεθόδου που είναι κοινά για τα δύο πρωτόκολλα.

#### **Ανάλυση των προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη**

Τα προϊόντα της PCR καθώς και ένα χαμηλού εύρους ηγεμόνα μοριακών βαρών DNA (ladder) (2 μl + 18 μl 1xloadingbuffer) εναποτίθενται σε 1-2% γέλη αγαρόζης. (Σε τι

τάση και για πόση ώρα). Στη συνέχεια ακολουθεί ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση ενός συστήματος υπεριώδους φωτός (UV). Αν τα θετικά και αρνητικά κοντρόλ καθώς και τα αποτελέσματα των υπό εξέταση δειγμάτων είναι ικανοποιητικά, προχωρά η διαδικασία για την αλληλούχιση του DNA.

### **Αλληλούχιση DNA**

Τα προϊόντα της PCR απεστάλησαν σε ένα εξωτερικό εμπορικό παροχέα υπηρεσιών αλληλούχισης. (Macrogen) Ο αναλυτής που χρησιμοποιεί ο συγκεκριμένος παροχέας είναι το ABI 3730 XL της AppliedBiosystems.

### **Αρχή της μεθόδου**

#### **Μέθοδος Sanger** (Sanger et al, 1977)

Η αλληλούχιση του DNA με τη μέθοδο Sanger, είναι μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος ανάγνωσης των νουκλεοτιδίων βάσεων που απαρτίζουν ένα τμήμα DNA το οποίο είναι είτε κλωνοποιημένο είτε προϊόν PCR.

Η αλληλουχία στόχος ενισχύεται γραμμικά με τη χρήση ενός μόνο εκκινητή με αντίδραση παρόμοια της PCR. Επιπλέον, μαζί με τις τριφωσφορικές δεοξυριβονουκλεοτιδικές βάσεις (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP και dGTP) , χρησιμοποιούνται και τριφωσφορικές δι-δεοξυριβονουκλεοτιδικές βάσεις (ddNTPs: ddATP, ddTTP, ddCTP και ddGTP), κάθε μία από τις οποίες είναι σημασμένη με διαφορετικό φθοριοχρώμα. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι κατά τη διαδικασία επιμήκυνσης από την DNA πολυμεράση, μπορεί στον νέο κλώνο DNA να προστεθούν τυχαία ddNTPs αντί για dNTPs. Όταν συμβεί αυτό, η επιμήκυνση της αλυσίδας σταματάει καθώς δεν μπορεί να συνδεθεί νέο νουκλεοτίδιο. Τα ddNTPs στερούνται της 3'-OH που απαιτείται για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων. Για το λόγο αυτό η συγκεκριμένη διαδικασία ονομάζεται και μέθοδος τερματισμού αλυσίδας. Η αναλογία dNTPs και ddNTPs στην αντίδραση ρυθμίζεται έτσι ώστε να μη τερματίζεται πάντα η σύνθεση σε κάθε σημείο που συναντάται μια συγκεκριμένη βάση. Εάν ο λόγος φυσιολογικών προς διδέοξυ νουκλεοτιδίων είναι αρκετά υψηλός, πολλές DNA αλυσίδες θα πετύχουν να προσθέσουν αρκετά νουκλεοτίδια πριν την προσθήκη ενός διδέοξυ που θα σταματήσει την διαδικασία. Στο τέλος της αντίδρασης θα υπάρχουν «τερματισμένα» προϊόντα σε κάθε θέση που συναντάται A, C, G ή T, ανάλογα με το ddNTP. Στα «τερματισμένα» προϊόντα θα έχει

εισαχθεί φθοριόχρωμα μέσω των ddNTPs ολοκληρωμένων και φθοριοσημασμένων «τερματισμένων» αλυσίδων στην αντίδραση αλληλούχισης. Ένας τριχοειδικός αναλυτής διαχωρίζει τα παραγόμενα θραύσματα βάσει μεγέθους. Βάσει αυτών μπορούμε να «διαβάσουμε» την αλληλουχία από κάτω προς τα πάνω.

Τα προϊόντα της αντίδρασης αποδιατάσσονται με θέρμανση και διαχωρίζονται βάσει μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ουρίας-πολυακρυκαμιδίου. Η διακριτική ικανότητα της ανάλυσης επιτρέπει το διαχωρισμό προϊόντων με διαφορά μιας μόνο βάσης. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης τα φθοριοσημασμένα προϊόντα ενεργοποιούνται από ακτίνα laser και εκπέμπουν φως που συλλέγεται από αυτοματοποιημένο αναλυτή DNA ο οποίος «διαβάζει» την αλληλουχία και την παρουσιάζει σαν χρωματογράφημα. Χρωματογραφήματα από τις συμπληρωματικές αλυσίδες ευθυγραμμίζονται με την βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων

Ο αναλυτής αλληλούχισης ABI 3730 XL είναι ένας τριχοειδικός αναλυτής αλληλούχισης που έχει τη δυνατότητα επεξεργασίας 384 δειγμάτων ταυτόχρονα, ενώ μπορεί να φθάσει περίπου τα 4000 δείγματα / εβδομάδα (<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/brochure-ab-genetic-analyzers.pdf>)

## **ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

### **Εργαλείο Ποιότητας Αλληλούχισης (Sequence Quality Tool)**

Τα αρχεία με την πρόσθια (έμπροσθεν) και ανάστροφη αλληλούχιση υποβάλλονται στο εργαλείο ποιότητας αλληλούχισης ([www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/sbt/seq\\_assemble\\_legionella1.cgi](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/sbt/seq_assemble_legionella1.cgi)). Αυτό το εργαλείο διαβάζει και συναρμολογεί τις διαβασμένες αλληλουχίες (contigs), βρίσκει τις αρχικές και τελικές θέσεις αναφοράς σε αυτά, κόβει τη διαβασμένη αλληλουχία χρησιμοποιώντας αυτές τις θέσεις και τέλος ταιριάζει την υποεξέταση αλληλουχία με αυτές που υπάρχουν ήδη στη βάση δεδομένων του SBT. Το εργαλείο προσδιορίζει ξεχωριστά τα αλλήλια κι έπειτα προσδίδει ένα αλληλικό προφίλ και ένα τύπο αλληλούχισης (ST). Αλληλουχίες με ταίριασμα <100% προσδιορίζονται με -1, και επίσης υποδεικνύονται οι θέσεις των αναντιστοιχιών. Αλληλουχίες κακής ποιότητας πρέπει είτε να επαναληφθούν ή να αναλυθούν περαιτέρω χρησιμοποιώντας ένα λογισμικό ειδικό για την ανάλυση DNA όπως π.χ. BioNumerics (AppliedMaths).

## **Βάση Δεδομένων SBT**

([www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php))

Δεδομένα από τις αντιδράσεις αλληλούχισης τόσο των έμπροσθεν όσο και των αντίστροφων συνδυάζονται και ευθυγραμμίζονται ώστε να παράγουν μία σειρά αλληλούχισης. Αλληλουχίες αναφοράς κομμένες στο σωστό μήκος μπορούν να κατεβούν από τον ιστότοπο με σκοπό να βοηθήσουν στη συναρμολόγηση των διαβασμένων αλληλουχιών. Συνεχείς σειρές αλληλούχισης κομμένες στο σωστό μήκος υποβάλλονται στη βάση δεδομένων SBT ως αρχείο "flat text file". Η βάση δεδομένων αποδίδει έναν αριθμό που αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο αλληλικό τύπο π.χ. 1, όταν η υποβαλλόμενη αλληλουχία παρουσιάζει 100% ταύτιση με προϋπάρχον αλλήλιο. Αλληλουχίες με <100% ταίριασμα προσδιορίζονται ως η πλησιέστερη αντιστοιχία σε ένα ήδη καταχωρημένο τύπο αλληλίου με τον αριθμό των αναντιστοιχιών να προσδιορίζεται. Η βάση δεδομένων SBT επίσης επιστρέφει μία σειρά με τις αναντιστοιχίες υπογραμμισμένες με χρώμα.

Για κάθε στέλεχος ο συνδυασμός των αλληλίων σε κάθε γενετικό τόπο προσδιορίζεται ως αλληλικό προφίλ με προκαθορισμένη σειρά π.χ. *flaA*, *prfE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*. Για παράδειγμα, το στέλεχος EULno. 120, έχει ως αλληλικό προφίλ 4,7,11,3,11,12,9.

Αν ένας μεμονωμένος αλληλικός αριθμός δεν έχει προσδιορισθεί ποτέ ξανά, το μηδέν (0) εισέρχεται στο αλληλικό προφίλ με σκοπό να διατηρηθεί η ακεραιότητα της μορφοποίησής του. Για παράδειγμα, αν ο αριθμός του αλληλίου για το γονίδιο *proA* δεν έχει προσδιορισθεί για το παραπάνω παράδειγμα, το προφίλ θα γίνει 4,7,11,3,11,0,9 και αν το *mompS* αλλήλιο δεν έχει προσδιορισθεί, θα γίνει 4,7,11,3,0,12,9.

### **Υποβολή νέου αλληλίου**

Ένα νέο αλλήλιο πρέπει να υποβληθεί στο σύνδεσμο "NewAlleleSubmission" στη βάση δεδομένων του ESGLI για SBT ([http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/legionella/php/sbt\\_query1.php](http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/legionella/php/sbt_query1.php)). Αυτός ο σύνδεσμος επιτρέπει την υποβολή αρχείων έμπροσθεν και αντίστροφης αλληλούχισης σε ένα αυτόματο εργαλείο ποιότητας αλληλούχισης. Αν οι αλληλουχίες πληρούν επιτυχώς τα κριτήρια θα ζητηθεί να υποβληθούν τα δεδομένα στους υπευθύνους μέσω του ίδιου συνδέσμου.

#### 6.2.4 Ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας

Στη συνέχεια τα 80 αυτά στελέχη αναλύθηκαν με μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση δύο γενετικών τόπων παθογονικότητας των *lvh* και *rtxA*, που προηγουμένως είχαν βρεθεί ότι έχουν ισχυρή σχέση με την εκδήλωση της νόσου των Λεγεωναρίων σε ανθρώπους από την *Legionella pneumophila* οροτύπου 1 (Samrakandi, et al, 2002; Huang, et al, 2004), προκειμένου να ερευνησουμε την τυχόν ύπαρξή τους και στα στελέχη *Legionella pneumophila* 2-14. Έξι ζεύγη εκκινητών συνολικά χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Για την ανίχνευση της περιοχής *lvh* χρησιμοποιήθηκαν τα εξής 4 ζεύγη: *lvh1-prpA* και *lvh2-prpA*, *lvh3-lvhB3* και *lvh4-lvhB4*, *lvh5-lvhB8* και *lvh6-lvhB9*, και *lvr1-lvrE* και *lvr2-lvrE* ενώ για την περιοχή *rtxA*, 2 ζεύγη: *rtx1-rtxA* και *rtx2-rtxA* καθώς και το *rtx3-rtxA* και *rtx4-rtxA*. Οι ίδιες αλληλουχίες εκκινητών και συνθηκών PCR χρησιμοποιήθηκαν όπως έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Samrakandi, et al, 2002; Huang, et al, 2004).

Ακολουθούν τα πρωτόκολλα των μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση των προαναφερθέντων γονιδίων. Σε ένα πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης της Πολυμεράσης απαιτούνται:

Γενετικό υλικό του μικροοργανισμού (DNA), Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer), Άλατα Χλωριούχου Μαγνησίου (MgCl<sub>2</sub>), Δεοξυνεοκλεουτίδια (Dntps), Εκκινητές (Primers), Ένζυμο Πολυμεράσης του DNA (Taq) και νερό(H<sub>2</sub>O).

##### A. **prp A και lvh B3**

Ακολουθεί το πρωτόκολλο της PCR για τα παραπάνω γονίδια τόσο ως προς τη δημιουργία του μίγματος αντίδρασης (**πίνακας 25**) όσο και για τις συνθήκες θερμοκρασίας και τον αριθμό των κύκλων αυτής (**πίνακας 26**).

**Πίνακας 25:** Σύσταση μίγματος αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Όγκοι	Όνομα εκκινητών	Όνομα εκκινητών
DNA (70 ng/μl)	5μl		
Buffer 10X	5μl		



MgCl <sub>2</sub>	25 Mm	5μl		
Dntps	10 Mm	1μl		
Primer (1)	10pmol/ml	1μl	<i>lvh1-prpA</i>	<i>lvh3-lvhB3</i>
Primer (2)	10pmol/ml	1μl	<i>lvh2-prpA</i>	<i>lvh4-lvhB4</i>
Taq	5u/λ	0.5μl		
H <sub>2</sub> O		31.5μl		
<b>Μοριακό βάρος προϊόντος</b>			259 bp	950 bp
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>		50μl		

**Πίνακας 26:** Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος		Αριθμός κύκλων
1	94	5 min	Αρχική Αποδιάταξη	1
2	94	1 min	Αποδιάταξη	30
	52	1 min	Πρόσδεση	
	72	1 min	Επιμήκυνση	
3	72	10 min	Τελική	1

			Επιμήκυνση	
4	12	$\infty$	Κράτημα	-

**B. *lvhB8-B9* και *rtxA* (*rtx3* – *rtx4*)**

Ακολουθεί το πρωτόκολλο της PCR για τα παραπάνω γονίδια τόσο ως προς τη δημιουργία του μίγματος αντίδρασης (**πίνακας 27**) όσο και για τις συνθήκες θερμοκρασίας και τον αριθμό των κύκλων αυτής (**πίνακας 28**).

**Πίνακας 27:** Σύσταση του μίγματος αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Όγκοι	Όνομα εκκινητών	Όνομα εκκινητών
DNA (70 ng/μl)	5μl		
Buffer 10X	5μl		
MgCl <sub>2</sub> 25 Mm	5μl		
Dntps 10 Mm	1μl		
Primer (1) 10pmol/ml	1μl	<i>lvh5/lvhB8</i>	<i>rtx3/rtxA</i>
Primer (2) 10pmol/ml	1μl	<i>lvh6/lvhB9</i>	<i>rtx4/rtxA</i>
Taq 5u/λ	0,5μl		
H <sub>2</sub> O	31,5μl		

<b>Μοριακό βάρος προϊόντος</b>		235 bp	545 bp
ΣΥΝΟΛΟ	50μl		

**Πίνακας 28:** Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος		Αριθμός κύκλων
1	94	5 min	Αρχική Αποδιάταξη	1
2	94	1 min	Αποδιάταξη	30
	54	1 min	Πρόσδεση	
	72	1 min	Επιμήκυνση	
3	72	10 min	Τελική Επιμήκυνση	1
4	12	∞	Κράτημα	-

C. *lvrE* και *rtxA* (*rtx1-rtx2*)

Ακολουθεί το πρωτόκολλο της PCR για τα παραπάνω γονίδια τόσο ως προς τη δημιουργία του μίγματος αντίδρασης (πίνακας 29) όσο και για τις συνθήκες θερμοκρασίας και τον αριθμό των κύκλων αυτής (πίνακας 30).

**Πίνακας 29:** Σύσταση του μίγματος αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Όγκοι	Όνομα εκκινητών	Όνομα εκκινητών
DNA (70 ng/μl)	5μl		
Buffer 10X	5μl		
MgCl <sub>2</sub> 25 Mm	5μl		
Dntps 10 mM	1μl		
Primer (1) 10pmol/ml	1μl	<i>lvr1-lvrE</i>	<i>rtx1-rtxA</i>
Primer (2) 10pmol/ml	1μl	<i>lvr2-lvrE</i>	<i>rtx2-rtxA</i>
Taq 5u/λ	0,5μl		
H <sub>2</sub> O	31,5μl		
Μοριακό βάρος προϊόντος		420 bp	630 bp
ΣΥΝΟΛΟ	50μl		

**Πίνακας 30:** Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος		Αριθμός κύκλων
1	94	5 min	Αρχική Αποδιάταξη	1
2	94	1 min	Αποδιάταξη	30
	60	1 min	Πρόσδεση	
	72	1 min	Επιμήκυνση	
3	72	10 min	Τελική Επιμήκυνση	1
4	12	∞	Κράτημα	-

Στατιστική ανάλυση. Η δοκιμή Fisher's exact χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση τυχόν συσχετίσεων μεταξύ των παραμέτρων διαφόρων κατηγοριών. Ένα αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό όταν η Pvalue ήταν <0,05.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 7.1 Ανίχνευση και καταμέτρηση Λεγεωνέλλας σε δείγματα νερού

Από τα 1086 δείγματα νερού που αναλύθηκαν, 172 (9,2%) ήταν θετικά για τη *L.pneumophila* οροτύπου 1, 171 (9,1%) για *L.pneumophila* ομάδας οροτύπων 2-14 και 45 (2,4%) για άλλα είδη *Legionella-non pneumophila*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον **πίνακα 31**.

**Πίνακας 31:** Αποτελέσματα απομόνωσης *Legionella* σε δίκτυο νερού ποικίλων εγκαταστάσεων

Τύπος δομής	Αριθμός περιβαλλοντικών δειγμάτων	Αριθμός περιβαλλοντικών δειγμάτων			
		<i>Legionella</i> spp.	<i>L.pneumophila</i> sg 1	<i>L.pneumophila</i> sg 2-14	<i>Legionellanon-pneumophila</i>
Ξενοδοχεία	1.086	268 (24.7%)	121 (11.1%)	120 (11.0%)	36 (3.3%)
Κρουαζιερόπλοια	133	0	0	0	0
Φέρυ μπόουτ	269	82 (30.5%)	43 (16%)	44 (16.3%)	9 (3.3%)
Αθλητικές εγκαταστάσεις	382	15 (3.9%)	8 (2.1%)	7 (1.8%)	0
Σύνολο	1.870	365 (19.5%)	172 (9.2%)	171 (9.1%)	45 (2.4%)

## 7.2 Ορολογική τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας

Τα 80 στελέχη που έχουν επιλεγθεί τυχαία ανήκαν σε διάφορους οροτύπους: Τα αποτελέσματα της οροτύπησης έχουν ως εξής: 37 στελέχη (46,2 %) ανήκαν στον ορότυπο 6 ενώ 26 στελέχη (32,5%) στον ορότυπο 3. Επτά στελέχη (8,8%) ανήκαν σε ποικίλλους οροτύπους: Στον ορότυπο 4 βρέθηκε 1 στέλεχος (1,3%), στον ορότυπο 5, 1 στέλεχος (1,3%), στον ορότυπο 8, 3 στελέχη (3,7%) και στον ορότυπο 10, 2 στελέχη (2,5%). Υπήρχαν 10 στελέχη (12,5%) που ήταν μη τυποποίησιμα με τη μέθοδο των μονοκλωνικών αντισωμάτων (NT). Μία στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0.001$ ) βρέθηκε στην κατανομή των οροτύπων μεταξύ της Αττικής και της υπόλοιπης Ελλάδας. Στην Αττική, 23 από τα 37 στελέχη (62,2%) ήταν ορότυπος 6, ενώ στην υπόλοιπη Ελλάδα, ο ορότυπος 3 ήταν ο πιο συχνός, αφού 22 από 43 στελέχη (51,2%) ανήκαν στον ορότυπο 3.

## 7.3 Μοριακή τυποποίηση στελεχών Λεγεωνέλλας

Τα 80 στελέχη *L.pneumophila* ομάδας οροτύπων 2-14 μετά την τυποποίηση με AFLP αποκάλυψαν 39 διαφορετικούς κλώνους. Από τα 36 στελέχη που ανήκαν στον ορότυπο 6 αναδύθηκαν 17 διαφορετικοί τύποι AFLP. Από τα 27 στελέχη οροτύπου 3 αναδύθηκαν 14 διαφορετικοί AFLP τύποι ενώ τα 9 στελέχη NT (μη τυποποίησιμα για ορότυπο με μονοκλωνικά αντισώματα) εμφάνισαν 8 διαφορετικούς τύπους AFLP.

Τα αποτελέσματα της ορολογικής και μοριακής τυποποίησης των 80 στελεχών της *L.pneumophila* φαίνονται στον **πίνακα 32**.

**Πίνακας 32.** Αποτελέσματα ορολογικής και μοριακής τυποποίησης 80 στελεχών *L.pneumophila* sg 2-14 οροτύπων με οροτύπηση και AFLP.

Αύξων αριθμός	Κωδικός σημείου υγειονομικής επιθεώρησης	Κωδικός πόλης	AFLP (AF) τύπος	Ορότυπος
1	O-1	P-1	1	3

2	O-2	P-1	1	6
3	H-1	P-2	1	6
4	O-3	P-1	1	3
5	O-2	P-1	1	6
6	O-2	P-1	1	6
7	H-2	P-3	1	6
8	H-3	P-4	2	3
9	H-4	P-5	2	3
10	H-4	P-5	2	3
11	SP-1	P-2	3	8
12	SP-1	P-2	3	8
13	O-4	P-1	3	6
14	H-5	P-3	4	3
15	H-5	P-3	4	3
16	H-4	P-5	4	3
17	H-5	P-3	5	6



18	H-5	P-3	5	6
19	H-5	P-3	5	6
20	H-6	P-6	6	6
21	O-5	P-1	6	6
22	H-7	P-6	6	6
23	H-8	P-7	6	6
24	H-9	P-8	7	3
25	O-3	P-1	8	3
26	O-3	P-1	8	3
27	H-10	P-1	8	3
28	H-10	P-1	8	3
29	H-10	P-1	8	3
30	H-11	P-9	8	3
31	H-12	P-10	8	6
32	H-13	P-9	8	NT
33	H-14	P-9	9	10

34	H-10	P-1	9	3
35	H-15	P-3	10	3
36	H-16	P-11	11	3
37	H-16	P-11	12	3
38	H-17	P-11	12	3
39	H-16	P-11	12	3
40	H-18	P-3	13	6
41	O-6	P-1	14	6
42	H-19	P-9	14	6
43	O-7	P-9	15	6
44	H-7	P-1	16	6
45	F-4	P-2	16	6
46	H-20	P-4	16	6
47	H-21	P-7	17	6
48	H-21	P-7	17	6
49	H-20	P-4	18	6

50	F-2	P-2	19	NT
51	H-4	P-5	20	8
52	O-8	P-1	21	3
53	F-1	P-3	22	NT
54	H-22	P-12	22	4
55	F-2	P-2	23	6
56	H-5	P-3	24	NT
57	F-3	P-2	25	NT
58	H-23	P-9	26	NT
59	H-24	P-3	27	NT
60	H-24	P-3	27	NT
61	H-5	P-3	28	NT
62	H-22	P-12	29	3
63	H-22	P-12	29	3
64	H-25	P-9	30	3
65	H-4	P-5	31	3

66	H-26	P-3	31	6
67	H-27	P-12	32	6
68	H-28	P-3	32	6
69	F-2	P-2	32	6
70	F-2	P-2	33	6
71	F-2	P-2	34	6
72	H-1	P-2	35	6
73	F-1	P-2	35	6
74	F-1	P-2	35	6
75	F-1	P-2	35	6
76	F-1	P-2	36	6
77	H-21	P-7	36	6
78	H-29	P-11	37	10
79	H-30	P-3	38	5
80	H-16	P-11	39	NT

Ο=Οικία, Η= Ξενοδοχείο, F=Φέρυμπόουτ, SP= Αθλητικό κέντρο και P=Περιφέρεια P-2, P-3, P-4, P-7: Ανήκουν στην Αττική.

P-1, P-5, P-6, P-8, P-9, P-10, P-11, P-12: Ανήκουν στην υπόλοιπη Ελλάδα.

Ο πιο συχνός τύπος κατά AFLP, όπως φαίνεται στον πίνακα 13, ήταν ο AF8 (n=8), ακολουθούμενος από τον AF1 (n=7) και ακολουθούν οι AF6 και AF35 (n=4 ο καθένας). Μία στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P < 0.001$ ) στην κατανομή των τύπων AFLP μεταξύ Αττικής και της υπόλοιπης Ελλάδας έχει βρεθεί. Στην Αττική, 18,9% των στελεχών ανήκαν στους τύπους AF5 και AF35 (7 από 37). Στην υπόλοιπη Ελλάδα, 18,6% των στελεχών ανήκαν έναν τύπο, τον AF8 (8 από 43 στελέχη).

Η τυποποίηση με SBT εφαρμόστηκε σε 56 στελέχη από τα 80. Ανάμεσα στα 28 στελέχη οροτύπου 6, 11 διαφορετικοί STs βρέθηκαν. Ανάμεσα σε 19 στελέχη οροτύπου 3, 6 διαφορετικοί STs βρέθηκαν. Πέντε NT στελέχη ανήκαν σε 5 διαφορετικούς STs. Συνολικά, 10 νέοι STs βρέθηκαν. Αυτοί είναι ST1825, ST1929, ST1930, ST2082, ST2083, ST2084, ST2085, ST2086, ST2087, και ST2088. Τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων φαίνονται με λεπτομέρεια στον πίνακα 15. Τέλος, βρέθηκε μία στατιστικώς σημαντική διαφορά στην κατανομή των STs μεταξύ Αττικής και της υπόλοιπης Ελλάδας. Ο επικρατών ST στην Αττική ήταν ο ST68, με 7 από 25 στελέχη (28%), ενώ σε άλλες περιοχές της Ελλάδας 8 από τα 31 (25,8%) στελέχη ανήκαν στον τύπο ST728.

Σύγκριση της AFLP με την SBT. Όπως φαίνεται στον πίνακα 15, για τα 19 στελέχη του οροτύπου 3, 6 διαφορετικοί STs και 10 διαφορετικοί AFLP τύποι βρέθηκαν. Συγκρίνοντας αυτά τα αποτελέσματα, φαίνεται ότι τα στελέχη που έχουν τον ίδιο ST μπορούν να ανήκουν σε περισσότερους από ένα AFLP τύπο. Για παράδειγμα, στελέχη του ST68 παρουσίασαν την υψηλότερη ποικιλομορφία, ανήκοντας σε 5 διαφορετικούς τύπους AFLP, ενώ αυτοί που ανήκαν στον ST87 ανήκαν σε 3 διαφορετικούς τύπους AFLP, όπως και τα στελέχη του ST728. Τελικά, η ποικιλομορφία των AFLP τύπων που ανήκουν στον ίδιο ST τύπο αυξάνεται όσο ο αριθμός των στελεχών που αποτελούν την ομάδα αυτή αυξάνεται. Στις περιπτώσεις που οι ομάδες των στελεχών με κοινό ST αποτελούνται από μικρό αριθμό στελεχών, τότε ένας τύπος AFLP παρατηρείται για κάθε ένα διαφορετικό ST. Επιπρόσθετα, στελέχη με ίδιους AFLP τύπους μπορούν να ανήκουν σε διαφορετικούς οροτύπους. Αυτό παρατηρείται στην ομάδα των στελεχών που ανήκουν στον AFLP τύπο, όπου συμπεριλαμβάνονται στελέχη που ανήκουν και στον ορότυπο 6 και στον ορότυπο 3.

Αντίθετα, στελέχη που ανήκουν στον ίδιο ST τύπο παρουσιάζουν μία σταθερότητα ως προς το είδος του οροτύπου όπου ανήκουν. Αυτά τα δεδομένα παρουσιάζονται στον **πίνακα 33**.

No	Κωδικός σημείου υγειονομικής επιθεώρησης*	Κωδικός περιφέρειας	FLP (AF) τύπος	ST τύπος	ST γονίδια							Ορότυπος	
					laA	ilA	sd	ip	ompS	roA	euA		
1	O-1	P-1		7		0		8				3	3
2	O-2	P-1		61		0	4	8	1	4			6
3	H-1	P-2		61		0	4	8	1	4			6
4	O-3	P-1		7		0		8				3	3
5	O-2	P-1		61		0	4	8	1	4			6
6	O-2	P-1		61		0	4	8	1	4			6
7	H-2	P-3		825		0	5		1			5	6
8	H-3	P-4		929				8					3

9	H-4	P-5		929				8				3
10	H-4	P-5		929				8				3
11	SP-1	P-2		358			2	0		5	03	8
12	SP-1	P-2		358			2	0		5	03	8
13	O-4	P-1		61		0	4	8	1	4		6
14	H-5	P-3		083		0	5	8	1			6
15	H-5	P-3		083		0	5	8	1			6
16	H-5	P-3		083		0	5	8	1			6
17	H-6	P-6		083		0	5	8	1			6
18	O-5	P-1		084		0	9		9			6
19	H-7	P-6		085		0	5	8				6

20	H-8	P-7		083		0	5	8	1			6
21	H-9	P-8		93	0	2		8	6	8	3	3
22	O-3	P-1		28		0		8				3
23	O-3	P-1		28		0		8				3
24	H-10	P-1		28		0		8				3
25	H-10	P-1		28		0		8				3
26	H-10	P-1		28		0		8				3
27	H-11	P-9		28		0		8				3
28	H-12	P-10		21		0						6
29	H-13	P-9		086		0	5	8		4		NT
30	H-14	P-9		930		0		8	1	4		10



31	H-10	P-1		28		0		8				3
32	H-16	P-11	1	7		0		8			3	3
33	H-16	P-11	2	7		0		8			3	3
34	H-16	P-11	2	7		0		8			3	3
35	H-18	P-3	3	53		0		8		4		6
36	O-7	P-9	5	8		3		8	4			6
37	F-4	P-2	6	8		3		8	4			6
38	H-20	P-4	6	1		0		8				6
39	H-21	P-7	7	8		3		8	4			6
40	H-21	P-7	7	8		3		8	4			6
41	H-20	P-4	8	1		0		8				6

42	F-2	P-2	9	082		0	5	8	1		07	NT
43	O-8	P-1	1	28		0		8				3
44	F-1	P-3	2	575			8	0				NT
45	H-22	P-12	2	226		0	7	8	3	1		4
46	H-5	P-3	4	087		0	5	8	1			NT
47	H-5	P-3	8	088		0	5	8	1			NT
48	H-22	P-12	9	61		0	7	8	3	1	3	3
49	H-25	P-9	0	97		0	7	8	3		3	3
50	H-27	P-12	2	49		3			4			6
51	F-2	P-2	4	999						1		6
52	H-1	P-2	5	21		0						6

53	F-1	P-2	5	8		3		8	4			6
54	F-1	P-2	5	8		3		8	4			6
55	F-1	P-2	6	8		3		8	4			6
56	H-21	P-7	6	8		3		8	4			6

**Πίνακας 33.** Αποτελέσματα ορολογικής και μοριακής τυποποίησης 56 στελεχών με οροτύπηση, με AFLP και SBT μεθόδους, συνδεδεμένα με περιβαλλοντικά επιδημιολογικά δεδομένα.

\*Ο=Οικία, Η=Ξενοδοχείο, F=Φέρι, SP=Αθλητικό Κέντρο and C=Πόλη

P-2, P-3, P-4, P-7 Ανήκουν στην περιοχή της Αττικής

P-1, P-5, P-6, P-8, P-9, P-10, P-11, P-12 Ανήκει στην υπόλοιπη Ελλάδα.

Στην **εικόνα 9** παρουσιάζεται ένα αναλυτικό υπόδειγμα αποτελέσματος ST τύπου, όπως αυτό εξάγεται από τη βάση δεδομένων του ESGLI.

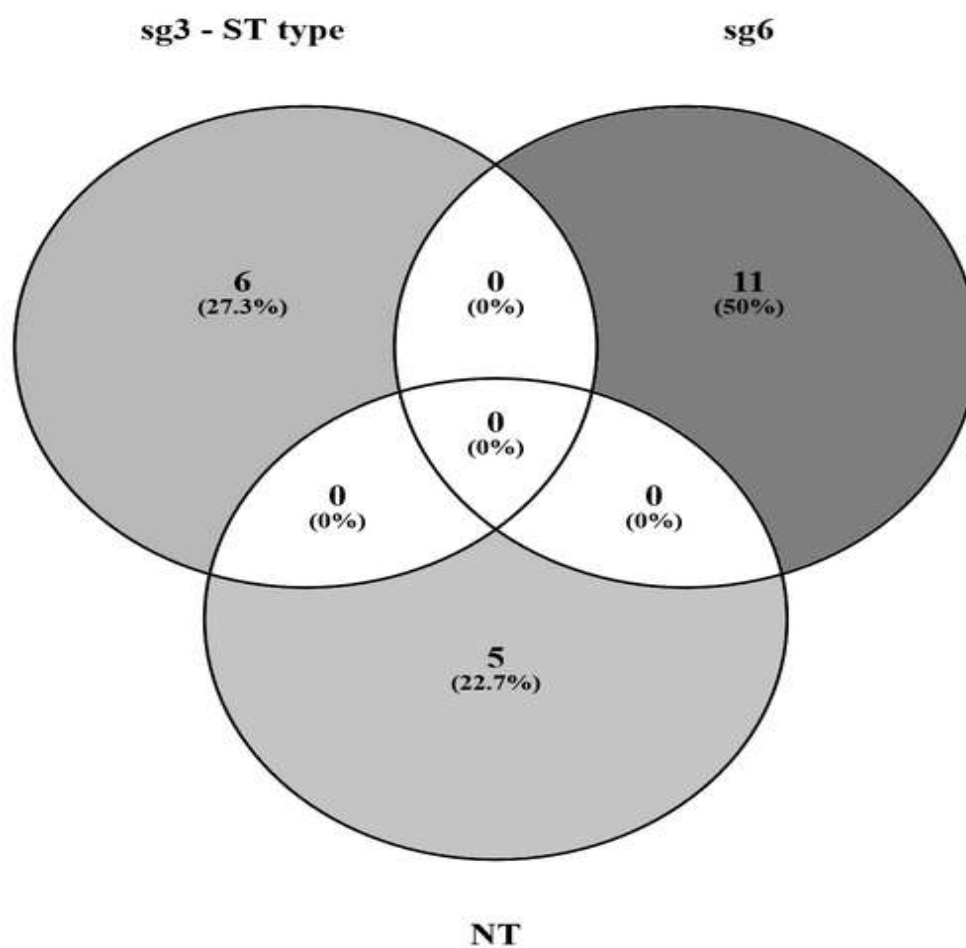
Allele	Length	Average Quality	Start Marker?	End Marker?	Correct Size	Sequence ID's (Length) (Average Quality)	Closest Match	Exact Match	Quality TestPass
laA	420	88.65	Yes	yes	yes	50_M- R.ab1(365)(58.29)50_M -F.ab1(341)(47.21)	0	0	yes
iIE	468	83.92	Yes	yes	yes	51_M- R.ab1(405)(48.92)51_M	0	2	yes

						-F.ab1(400)(48.92)			
sd	581	87.40	Yes	yes	yes	52_M- R.ab1(530)(65.58)52_M -F.ab1(476)(58.60)	0		yes
ip	564	81.43	Yes	yes	yes	53_M- R.ab1(528)(65.68)53_M -F.ab1(348)(56.08)	0	8	yes
ompS	667	89.99	Yes	yes	yes	54_mompS101 5R.ab1(580)(62.96)54_ M-F.ab1(600)(57.11)	0	6	yes
roA	494	82.16	yes	yes	yes	55_M- R.ab1(398)(55.80)55_M -F.ab1(413)(57.66)	0	8	yes
euA	491	79.72	yes	yes	yes	56_M- R.ab1(431)(48.90)56_M -F.ab1(424)(35.63)	0	3	yes

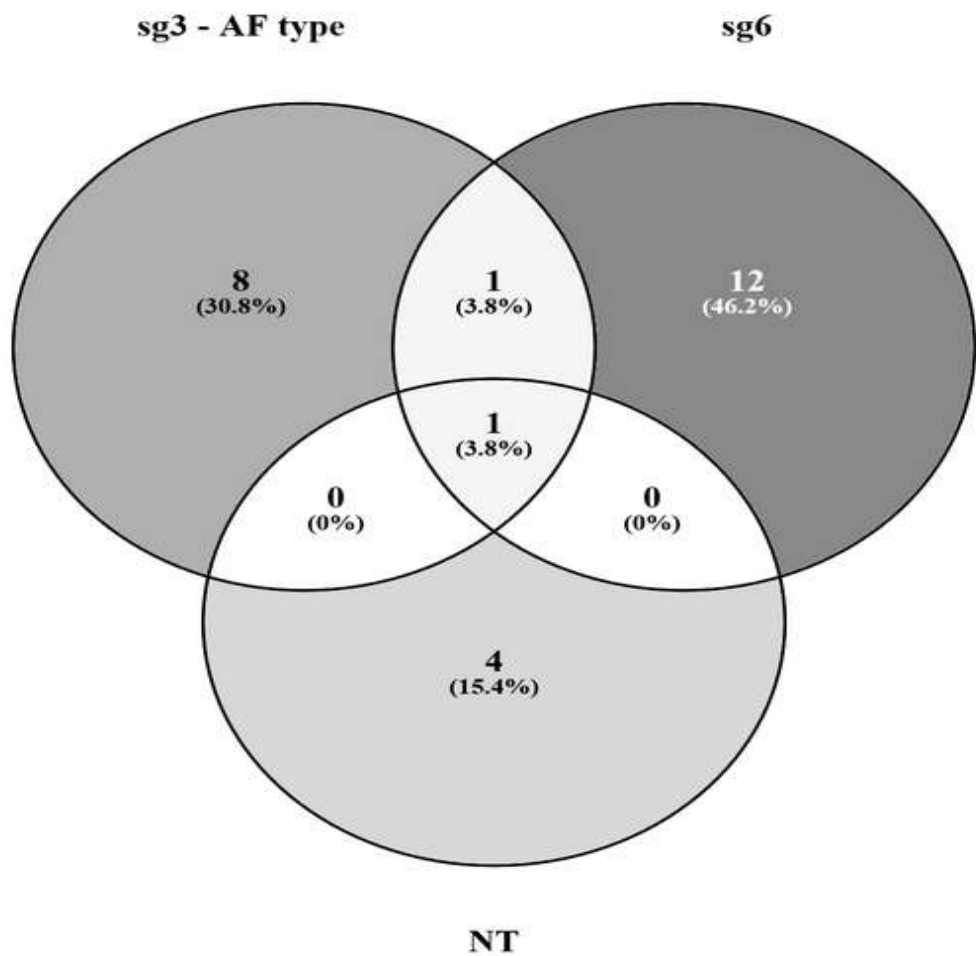
Sequence Type match = ST 993

**Εικόνα 9:** Ενδεικτικό παράδειγμα αποτύπωσης του αριθμητικού προφίλ ενός SBT τύπου όπως προκύπτει από το αντίστοιχη βάση δεδομένων του ESGLI.

### Διαγράμματα Venn



**Διάγραμμα 1:** Διάγραμμα Venn για τους ST τύπους των οροτύπων 3, 6 και NT.



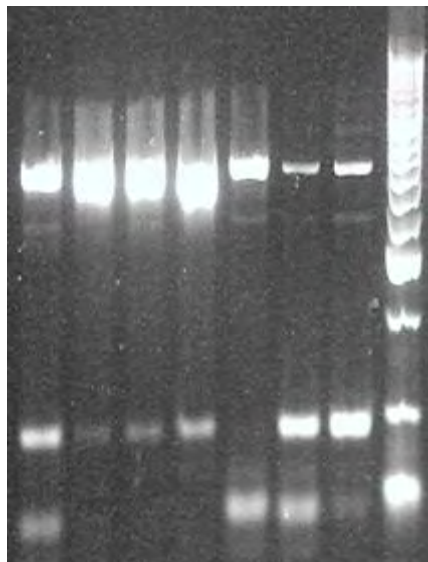
**Διάγραμμα 2:** Διάγραμμα Venn για τους AF τύπους των οροτύπων 3, 6 και NT.

Τα διαγράμματα Venn δημιουργήθηκαν για τις 3 πιο πολυπληθείς υποομάδες των οροτύπων 3,6, και μη τυποποιησιμα στελέχη και των αντίστοιχων ST τύπων. Από τα διαγράμματα προκύπτει ότι δεν υπάρχει κανένας κοινός τύπος ST μεταξύ των 3 υποομάδων οροτύπων.

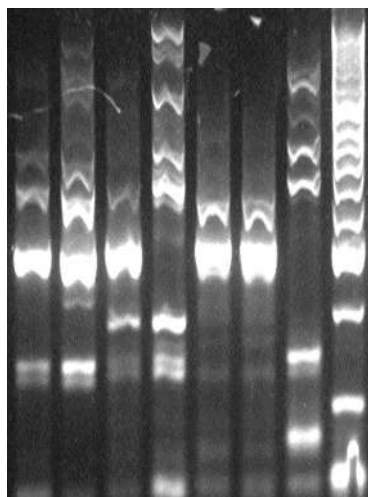
Επίσης, ένα δεύτερο διάγραμμα δημιουργήθηκε μεταξύ των τριών προαναφερθεισών υποομάδων και των τύπων AFLP. Το οποίο έδειξε ένα κοινό τύπο AFLP μεταξύ των 3 υποομάδων και ένα επιπλέον κοινό μεταξύ δύο υποομάδων. Τα διαγράμματα Venn δεν μπορούσαν να εφαρμοστούν στο σύνολο των στελεχών γιατί οι υποομάδες ήταν περισσότερες από 4 (Με τη χρήση του προγράμματος Venny 2.1).

#### 7.4 Ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας

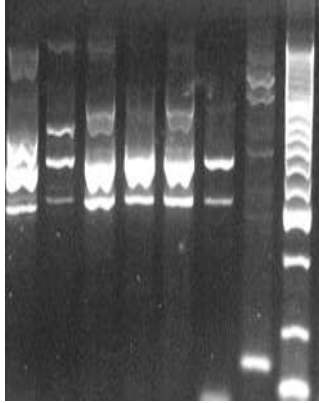
Η απεικόνιση των πειραμάτων για την μοριακή ανίχνευση των γονιδίων παθογονικότητας με τη μέθοδο της PCR παρατίθεται παρακάτω. (εικόνες 10 – 15).



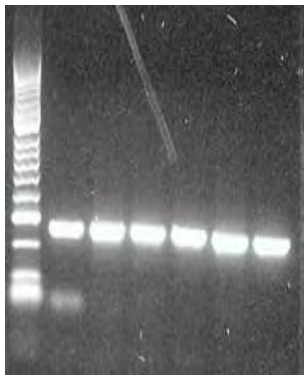
**Εικόνα 10:** PCR για το γονίδιο rtxA (3,4)



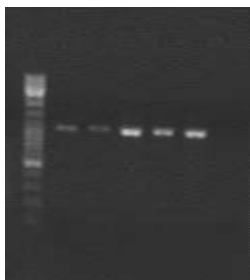
**Εικόνα 11:** PCR για το γονίδιο prp.



**Εικόνα 12:** PCR για γονίδιο *lvrE* (1,2)

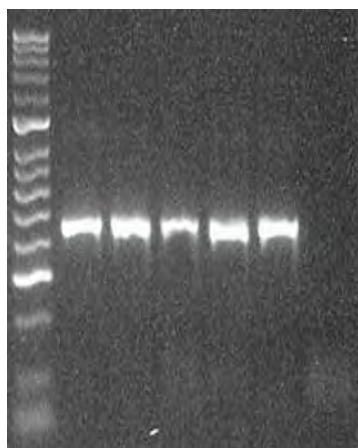


**Εικόνα 13:** PCR για γονίδιο *lvhB9*



**Εικόνα 14:** PCR για γονίδιο *lvhB* (3,4)





**Εικόνα 15:** Pcr για γονίδιο rtxA (1,2)

### Ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας

Όλα τα στελέχη υποβλήθηκαν σε μοριακή ανίχνευση των γενετικών τόπων παθογονικότητας *lvh* και *rtxA*. Ο γενετικός τόπος *lvh* ανιχνεύθηκε σε 75 στελέχη (93,8%), ενώ ο *rtxA* γενετικός τόπος ανιχνεύθηκε σε 76 στελέχη (95%). Σε 73 στελέχη (91,3%) ανιχνεύθηκαν και οι δύο γενετικοί τύποι. Απουσία και των δύο γενετικών τόπων δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα στέλεχος. Οι δύο γενετικοί τόποι ανιχνεύθηκαν σε υψηλά ποσοστά και στα στελέχη που ανήκαν στον ίδιο ορότυπο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **πίνακα 34**.

**Πίνακας 34.** Ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας σε στελέχη *L.pneumophila* sg 2-14 για κάθε ορότυπο.

Ορότυπος	Αριθμός θετικών στελεχών <i>L.pneumophila</i> οροτύπων 2-14		
	<i>lvh</i> γενετικός τόπος	<i>rtxA</i> γενετικός τόπος	<i>lvh&amp;rtxA</i> γενετικοί τόποι
6	37/37 (100%)	35/37 (94.6%)	35/37 (94.6%)
3	24/26 (92.3%)	25/26 (96.1%)	24/26 (92.3%)
NT	9/10 (90%)	9/10 (90%)	9/10 (90%)

8	2/3 (66.6%)	3/3 (100%)	2/3 (66.6%)
5	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
10	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
4	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1(100%)
Total	75/80 (93.8%)	76/80(95%)	73/80 (91.3%)

## Κεφάλαιο 8: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι μία μεγάλη ποικιλία από διαφορετικούς κλώνους της *L.pneumophila* ομάδας οροτύπων 2-14 (Lp 2-14) βρίσκονται στο περιβάλλον. Ο πιο συχνός ορότυπος βρέθηκε να είναι ο ορότυπος 6 και ακολουθεί ο ορότυπος 3. Σε μία μελέτη που έγινε στη Γαλλία για την κατανομή της Λεγεωνέλλας σε 259 κλινικά και 2747 περιβαλλοντικά δείγματα, η *L.pneumophila* οροτύπου 1 (Lp1) ήταν το αίτιο των κλινικών περιπτώσεων σε ποσοστό 95,4% αλλά στο περιβάλλον βρέθηκε σε ποσοστό μόνο 28,2%. Ο ορότυπος 6 και ο ορότυπος 3 μαζί αν και αποτελούν ένα χαμηλό ποσοστό (2%) των κλινικών κρουσμάτων, ήταν τα πιο συχνά αίτια από τα μη οροτύπου1 στελέχη της *L.pneumophila* (Lp-non1). Στα περιβαλλοντικά στελέχη οι δύο ορότυποι επίσης βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό, 10,8% (ορότυπος 3) και 11,1% (ορότυπος 6) κάνοντας ένα άθροισμα 21,9% (Lawrence, et al, 1999). Αυτοί οι συγκεκριμένοι ορότυποι είναι οι πιο συχνοί και παθογονικοί από τους Lp-non1 μεταξύ των κλινικών κρουσμάτων (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016; Helbig, 2002; Yu, et al, 2002). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει μία σοβαρή πιθανότητα μετάδοσης της νόσου των Λεγεωναρίων με σημαντικό αίτιο αυτούς τους οροτύπους στην Ελλάδα σε ευαίσθητους ξενιστές.

Επιπλέον, αρκετές κλινικές περιπτώσεις περιγράφουν νόσο των Λεγεωναρίων που οφείλεται σε Lp-non1. Αυτές περιλαμβάνουν τους οροτύπους 6,3,5,8,10,11 και 12 (Fendukly, Bernander and Hanson, 2007; Mencacci, Corbucci, and Castellani, 2011; Aubert, et al,1990; Grottola, et al., 2012; Nishizuka, et al, 2014; Zhang et al, 2014) Αξίζει να σημειωθεί ότι συλοϊμώξεις στους ανθρώπους από δύο διαφορετικούς οροτύπους έχουν επίσης αναφερθεί (Aubert, et al, 1990; Grottola, et al, 2012; Nishizuka, et al, 2014; Zhang, et al, 2014).

Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με δεδομένα από μία μελέτη που έγινε στην Ολλανδία από το 2002 ως το 2012, όπου 24,7% (367/1117) των περιβαλλοντικών δειγμάτων ήταν θετικά για Λεγεωνέλλα. Εβδομήντα έξι από τα 367 (20,7%) ήταν θετικά για μη-1 Lp και 26,4% (97/367) ήταν θετικά για την Lp1. Lp1 βρέθηκε σε 28 (19,7%) των κρουσμάτων, μη-1Lp σε 6 (4,2%) και άλλα είδη της Λεγεωνέλλας σε 22 (15,5%) (Den Boer, et al, 2015).

Στην Αγγλία και Ουαλία, από το 2000 έως 2008, ο Harisson et al βρήκαν 43,5% (120/276) Lp2-15 και 55,8% Lp1 (154/276) σε περιβαλλοντικά δείγματα, ενώ τα κλινικά στελέχη μόνο σε 2,4% (4/167) ανήκαν στην Lp2-14 (Harrison, Afshar, Doshi, et al, 2009).

Σε αντίθεση στην Νοτιοανατολική Ιταλία από το 2000-2009, η Lp2-14 βρέθηκε σε κτίρια της κοινότητας σε επικράτηση με 40,8% (831/2038), έναντι 33% (673/2038) για την Lp1. Περαιτέρω δεδομένα για την οροτύπηση των κλινικών στελεχών δεν υπάρχουν (Napoli, 2010).

Ο Ανεβλαβής και η ομάδα του, ανέφερε σε μία μελέτη ότι 1390 κρούσματα πνευμονίας της κοινότητας εισήχθησαν σε δύο νοσοκομεία της βόρειας και της νότιας Ελλάδας, όπου μόνο 435 (31,3%) είχαν θετικές καλλιέργειες πτυέλων. Οι εναπομείνουσες 955 περιπτώσεις (68,7%) παρέμειναν αδιάγνωστες. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό των κρουσμάτων των πνευμονιών της κοινότητας με άγνωστη αιτία υπάρχει στην Ελλάδα. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν εκτελείται ταχεία δοκιμή για την ανίχνευση της Lp2-14 και ότι η εφαρμογή της καλλιέργειας αυτής στα πτύελα και στις βρογχικές εκκρίσεις για την απομόνωση της Λεγεωνέλλας είναι σπάνια, είναι πιθανόν πως η νόσος των Λεγεωναρίων που οφείλεται σε Lp2-14 υποδιαγιγνώσκεται (Anevlavis, et al, 2009).

Στη μελέτη μας, 39 διαφορετικοί τύποι AFLP προέρχονται από τα 80 στελέχη. Οι γενετικές ομάδες που ήταν γειτονικές παρουσίαζαν την τάση να ανήκουν στον ίδιο ορότυπο. Για παράδειγμα, οι γενετικές ομάδες των τύπων AF8 έως AF12 αποτελούνταν από 15 στελέχη; 12/15 στελέχη ανήκαν στον ορότυπο 3. Σε γειτονικές γενετικές ομάδες, όπως οι AF13 έως AF18 (συνολικά 10 στελέχη), όλα τα στελέχη ανήκουν στον ορότυπο 6. Στις AF22 έως AF28, 7/9 στελέχη ήταν μη τυποποιήσιμα, και τελικά στις AF31 έως AF36, 12/13 στελέχη ανήκαν στον ορότυπο 6. Οι ST τύποι που βρέθηκαν σ' αυτή τη μελέτη απαντώνται στη βάση δεδομένων του ESGLI σε κλινικά στελέχη επίσης. Αυτό σημαίνει ότι αναπόφευκτα έχουν προκαλέσει πνευμονία στους ανθρώπους. Ανάμεσα στους 14 γνωστούς STs, οι 11 είναι υπεύθυνοι για κλινικά κρούσματα. Επιπρόσθετα, 11 νέοι STs έχουν βρεθεί. Οι STs σε κλινικά στελέχη που απαντώνται στη βάση δεδομένων του ESGLI από τους STs αυτής της μελέτης είναι οι ST68 και ST87. STs από τη μελέτη μας που δεν έχουν βρεθεί ακόμη σε κλινικά στελέχη

στη βάση δεδομένων τουESGLI είναι οι ST1575, ST1226 και ST361. Αποτελέσματα δείχνουν ότι διαφορετικοί κλώνοι της Lp2–14 είναι πιο επικρατείς στην Αττική από ότι στην υπόλοιπη Ελλάδα. Ο ST68, που ανήκει στον πιο συχνό τύπο ST των κλινικών κρουσμάτων στη βάση δεδομένων του ESGLI, απαντάται πιο συχνά στην Αττική από ότι στην υπόλοιπη Ελλάδα.

Αυτή η διαφοροποίηση είναι σε συμφωνία με την επικράτηση των οροτύπων σε δύο περιοχές, αφού ο ορότυπος 6 είναι επικρατών στην Αττική ενώ ο ορότυπος 3 επικρατεί στην υπόλοιπη Ελλάδα. Και οι δύο περιοχές είναι αστικές και δεν υπήρχε κάποια ειδική επικράτηση από ένα συγκεκριμένο κλώνο σε ένα συγκεκριμένο σημείο νερού. (Ξενοδοχείο, Πλοίο, κτλ). Έτσι, η πιο πιθανή εξήγηση για τις διαφορές των επικρατούντων κλώνων είναι η γεωγραφική τοποθεσία.

Επιπρόσθετα με αυτά σε αυτή τη μελέτη, όλα τα στελέχη έχουν εξεταστεί για την ύπαρξη γονιδίων παθογονικότητας που έχουν ήδη εξεταστεί για την Lp1. Ειδικό γενετικό τόπος *lvh* και *rtxA* επιλέχθηκαν διότι έχουν υποδειχτεί ως κατάλληλοι δείκτες για την παθογονικότητα της *L.pneumophila* μετά τη μελέτη 19 σημαντικών γονιδίων παθογονικότητας (Huang,etal,2006). Ένα γενετικό στοιχείο του γενετικού τόπου *lvh* στο γονιδίωμα του στελέχους Φιλαδέλφεια 1 (που προέρχεται δηλαδή από το στέλεχος της πρώτης έξαρσης κρουσμάτων στη Φιλαδέλφεια, PA) ανιχνεύτηκε στο γονιδίωμα του στελέχους Lp6 το οποίο έχει υποστεί διαδοχική αλληλούχηση στον Καναδά (AdilKhan,et al, 2013). Διαφορετικές μελέτες προτείνουν ότι υπάρχει ανασυνδυασμός και οριζόντια μεταφορά γονιδίων διαμέσου του πλασμιδίου Pp36 από το γενετικό τόπο *lvh* και άλλων γενετικών τόπων που ενέχονται στα συστήματα έκκρισης τύπου IV (Adil Khan, 2013; Cazalet, 2004).

Ο γενετικός τόπος *rtxA* κωδικοποιεί την τοξίνη που σχηματίζει πόρους που ρυθμίζεται από το σύστημα *dot/icm* και παίζει σημαντικό ρόλο στην είσοδο του βακτηρίου μέσα στο κύτταρο ξενιστή (D’Auria,et al, 2008). Η τοξίνη *Rtx* αποτελείται από δύο περιοχές. Η περιοχή N-terminal είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση και η περιοχή C-terminal συμμετέχει στην προσκόλληση και το σχηματισμό πόρου (Huang, et al, 2006).

Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι οι γενετικοί τόποι υπάρχουν στα στελέχη Lpnon-1 σε ένα αρκετά υψηλό ποσοστό. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Lpnon-1 έχει τους μηχανισμούς παθογονικότητας να προσκωλλάται, εισέρχεται και να διαφεύγει την

οξίνιση του κενοτοπίου στο κύτταρο ξενιστή, ένα γεγονός που συμφωνεί με τη δυνατότητα λοιμογονικότητας αυτών των στελεχών.

Κατά τη γνώση μας, κανένα περιστατικό νόσου των λεγεωναρίων που να οφείλεται σε στέλεχος Lpnon-1 δεν έχει διαγνωσθεί στην Ελλάδα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην σχεδόν αποκλειστική χρήση του τεστ ανοσοχρωματογραφίας για το αντιγόνο της Λεγεωνέλλας στα ούρα για τη διάγνωση της νόσου των Λεγεωναρίων στα Ελληνικά νοσοκομεία. Αυτό το τεστ έχει εξαιρετική ευαισθησία για την Lp1 (97.2% σε συμπυκνωμένα δείγματα ούρων) και ειδικότητα (100%) και προτείνεται για αυτό το διαγνωστικό σκοπό (Domínguez, et al, 1999).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το κιτ BinaxNOW για το αντιγόνο της Λεγεωνέλλας σε ούρα έχει δώσει θετικό αποτέλεσμα για τον ορότυπο 3 και 6 όταν το όριο ανίχνευσης ήταν 100 φορές μεγαλύτερο από το όριο ανίχνευσης για τον ορότυπο 1 (Helbig, Uldum, Luck, et al, 2001).

Το κιτ της Biotest βασίζεται στην ανοσοενζυμική μέθοδο (EIA) που είναι το μόνο διαγνωστικό εργαλείο για την ταχεία εργαστηριακή διάγνωση της νόσου των Λεγεωναρίων που προκαλείται από στελέχη διαφορετικά από τον ορότυπο 1. Η ευαισθησία για την Lpnon-1 είναι 86%, έναντι 94,6% για την Lp1 (Harrison, 1998).

Η καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων όπως πτύελα ή βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα είναι εξαιρετικά σπάνια στα Ελληνικά νοσοκομεία. Αυτό είναι επίσης ένα κοινό φαινόμενο και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016). Επιδημιολογικά δεδομένα από την τελευταία έκθεση που προέρχεται από το ECDC δείχνουν χαρακτηριστικά ότι το έτος 2014, από τις 27 περιπτώσεις που αναφέρονται από την Ελλάδα, οι 26 (90%) διαγνώστηκαν με τεστ ούρων και 1(4%) διαγνώστηκε από τον υψηλό τίτλο ενός μονού αντισώματος, ενώ κανένα (0%) δεν επιβεβαιώθηκε με καλλιέργεια ή PCR. Αυτά τα δεδομένα θεωρούνται αντιπροσωπευτικά και για άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Από το σύνολο των 6.941 κρουσμάτων, 6.038 (87%) διαγνώστηκαν με τεστ ούρων, 577(8%) με PCR, 247(4%) με ένα υψηλό τίτλο μονής σειράς αντισώματος, 819 (12%) με καλλιέργεια, 67 (1%) με τετραπλάσια αύξηση αντισωμάτων και μόνο 2 (<1%) με άμεσο ανοσοφθορισμό (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016). Η πλειονότητα των αναφερόμενων περιπτώσεων κατά την περίοδο 2010 έως 2014 στην Ελλάδα

διαγνώσθηκαν με το τεστ ούρων (82% to 96%), ενώ τα κρούσματα που διαγνώσθηκαν με καλλιέργεια ήταν 4% έως 10%, αυτά που διαγνώσθηκαν με PCR 3% έως 5%, και εκείνα με μονό υψηλό τίτλο 4% έως 16%. Η τετραπλάσια αύξηση τίτλου αντισώματος και ο άμεσος ανοσοφθορισμός δεν χρησιμοποιήθηκαν ποτέ (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016; European Centre for Disease Prevention and Control, 2015; European Centre for Disease Prevention and Control, 2014; European Centre for Disease Prevention and Control, 2013; European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). Η καλλιέργεια αναπνευστικών εκκρίσεων μπορούν να διενεργηθούν κυρίως στα Ελληνικά Εργαστήρια Δημόσιας Υγείας. Ακόμη και σ' αυτή την περίπτωση, τα κλινικά δείγματα αποστέλλονται σ' αυτά τα εργαστήρια μετά από κάποιο θετικό τεστ ούρων. Αναπόφευκτα, ένας απροσδιόριστος αριθμός κρουσμάτων νόσου των Λεγεωναρίων παραμένει αδιάγνωστος, ένα γεγονός που κάνει την εισαγωγή της καλλιέργειας και της PCR στο διαγνωστικό πρωτόκολλο της πιθανής λοίμωξης από Λεγεωνέλλα κριτικής σημασίας. Ένας πιθανός περιορισμός αυτής της μελέτης είναι η αντιπροσωπευτικότητα των περιβαλλοντικών δειγμάτων και στελεχών από το Ελληνικό περιβάλλον τόσο σε χρόνο όσο και σε χώρο. Αναγνωρίζουμε ότι κατά τη φάση του σχεδιασμού αντιπροσωπευτικότητα δε λήφθηκε υπόψη, αλλά αφού τα δείγματα και τα στελέχη προέρχονται από 13 περιφέρειες που καλύπτουν πάνω από το 70% του Ελληνικού πληθυσμού, μπορούμε να υποθέσουμε ότι είναι τα στελέχη μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικά του Ελληνικού περιβάλλοντος. Τελικά, βασιζόμενοι σ' αυτά τα αποτελέσματα, θα ήταν χρήσιμο να λαμβάνεται υπόψη η άμεση εισαγωγή κατάλληλου διαγνωστικού τεστ για την Lp2-14 σε ούρα και ακόμη στα δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού στα Ελληνικά Νοσοκομεία, αφού προσδιορίσαμε αρκετούς διάσπαρτους κλώνους της Lp2-14 να υπάρχουν στο Ελληνικό περιβάλλον που θα μπορούσε να είναι λοιμογόνοι για τον άνθρωπο. Μία καλή θεώρηση μίας εναλλακτικής και πιο οικονομικής προσέγγισης στη διάγνωση είναι να γίνει επικέντρωση στους οροτύπους κάθε περιοχής στο κλινικό διαγνωστικό πάνελ έτσι ώστε να βελτιωθεί η διάγνωση. Περαιτέρω μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για να διερευνηθούν αν τα στελέχη της Lp1 έχουν αναπτύξει περισσότερους μηχανισμούς παθογονικότητας με τη φυσική επιλογή σε σχέση με τα στελέχη Lpnon-1. Διερευνώντας τη λοιμογονικότητα της Lp και χαρτογραφώντας τη διασπορά των κλώνων αυτού του βακτηρίου στο

περιβάλλον θα μπορούσε να οδηγήσει στην εφαρμογή καλύτερων και εντονότερων μέτρων για τον έλεγχο και την πρόληψη της Λεγεωνέλλωσης.

## **ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

1. Στο ελληνικό περιβάλλον υπάρχει διασπορά στελεχών *L.pneumophila* τόσο οροτύπου 1 όσο και οροτύπων 2-14.
2. Οι πιο συχνοί ορότυποι της Lp2-14 στο περιβάλλον είναι οι 6 και 3, σύμφωνα με την παγκόσμια επίπτωση.
3. Στην Αττική επικρατεί ο ορότυπος 6, ενώ στην υπόλοιπη Ελλάδα ο ορότυπος 3. Η διαφορά μπορεί να οφείλεται κυρίως σε γεωγραφικούς λόγους: αστικό – ημιαστικό περιβάλλον.
4. Στην Αττική επικρατεί ο ST τύπος 68, ενώ στην υπόλοιπη Ελλάδα ο ST τύπος 87. Η διαφορά μπορεί να οφείλεται κυρίως σε γεωγραφικούς λόγους αστικό – ημιαστικό περιβάλλον.
5. Φαίνεται να υπάρχει σταθερή συσχέτιση οροτύπου και ST τύπου.
6. Δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση οροτύπου και Aflp τύπου.
7. Η AFLP έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα αλλά η SBT είναι πιο σταθερή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για συγκρίσεις στελεχών.
8. Ύπαρξη γονιδίων παθογονικότητας στο μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών Lp2-14. Δυνειτικά ανθρώπινο παθογόνο.
9. Ανάγκη εισαγωγής ταχείας διαγνωστικής δοκιμής για την *L.pneumophila* 2-14 σε ούρα.
10. Πιο συστηματική εφαρμογή PCR για ανίχνευση γενετικού υλικού Λεγεωνέλλας σε δείγματα πτυέλων, βρογχικών εκκρίσεων, BAL, στα νοσοκομεία.
11. Εφαρμογή καλλιέργειας για απομόνωση Λεγεωνέλλας σε δείγματα πτυέλων, βρογχικών εκκρίσεων, BAL, στα νοσοκομεία.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να εξερευνήσει την διασπορά, την κλωνικότητα και τη λοιμογονικότητα της *Legionella pneumophila* οροτύπων 2-14 στο Ελληνικό Περιβάλλον. Ογδόντα στελέχη *Legionella pneumophila* οροτύπων 2-14 που απομονώθηκαν από το δίκτυο πόσιμου νερού των ξενοδοχείων, νοσοκομείων, αθλητικών εγκαταστάσεων και φέρυ στην Ελλάδα οροτυπήθηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα (Mabs) και αναλύθηκαν με μοριακή ανάλυση με amplified fragment length polymorphism (AFLP) για γενετική διάκριση. Πενήντα έξι από τα ογδόντα στελέχη τυποποιήθηκαν επίσης με τη μέθοδο της διαδοχικής αλληλούχισης SBT. Όλα τα στελέχη αναλύθηκαν περαιτέρω για την ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας: *Legionella vir homologue* (*lvh*) και *repeats in structural toxin* (*rtxA*). Τριάντα επτά στελέχη (46,2%) ανήκαν στον ορότυπο 6, 26 στελέχη (32,5%) στον ορότυπο 3, και 7 (8,8%) σε άλλους οροτύπους (4,5,8, και 10). Δέκα στελέχη (12,5%) ήταν μη τυποποίησιμα στους γνωστούς οροτύπους (NT). Τριανταενέα διαφορετικοί AFLP τύποι βρέθηκαν ανάμεσα στα 80 στελέχη *L.pneumophila* οροτύπων 2-14 και 24 διαφορετικοί SBT τύποι βρέθηκαν στα 56 στελέχη που δοκιμάστηκαν. Ανάμεσα στα 80 στελέχη, ο γενετικός τόπος *lvh* βρέθηκε σε 75 (93,8%), ο γενετικός τόπος *rtxA* βρέθηκε σε 76 (95%), και οι δύο γενετικοί τόποι βρέθηκαν σε 73 (91,3%) στελέχη. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η γενετική ποικιλότητα της *L.pneumophila* οροτύπων 2-14 στο ελληνικό περιβάλλον καθώς και το υψηλό ποσοστό των γενετικών τόπων παθογονικότητας. Η εισαγωγή ενός αποτελεσματικού διαγνωστικού τεστ για την *L.pneumophila* οροτύπων 2 - 14 σε ούρα και η προώθηση της εξέτασης δειγμάτων του αναπνευστικού για τους νοσηλευόμενους ασθενείς για πνευμονία στα ελληνικά νοσοκομεία είναι απαραίτητη.

**ABSTRACT.** The aim of this study is to explore the dispersion, clonality, and virulence of *Legionella pneumophila* serogroups 2 to 14 in the Greek environment. Eighty *L.pneumophila* serogroup 2 to 14 strains isolated from water distribution systems of hotels, hospitals, athletic venues, and ferries in Greece were tested by monoclonal antibodies (MAbs) for serogroup discrimination and molecularly by amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic diversity. Fifty-six of 80 strains were also typed

by the sequence-based typing (SBT) method. All strains were further analyzed for detection of two pathogenicity loci: *Legionella vir homologue (lvh)* and *repeats in structural toxin (rtxA)*. Thirty-seven strains (46.2%) belonged to serogroup 6, 26 strains (32.5%) to serogroup 3, and 7 (8.8%) to other serogroups (4,5,8, and 10). Ten strains (12.5%) were non typeable (NT) into the known serogroups. Thirty-nine different AFLP types were found among the 80 *L.pneumophila* serogroup 2 to 14 strains, and 24 different SBT types were found among the 56 strains tested. Among the 80 strains, the *lvh* locus was present in 75 (93.8%), the *rtxA* locus was found in 76 (95%), and both loci were found in 73 (91.3%) strains. This study showed that there is genetic variability of *L.pneumophila* serogroups 2 to 14 in the Greek environment as well as a high percentage of the pathogenicity loci. Introducing an effective diagnostic test for *L.pneumophila* serogroups 2 to 14 in urine and promoting the examination of respiratory specimens from patients hospitalized for pneumonia in Greek hospitals are essential.

## **Βιβλιογραφία**

**Abu Kwaik, Y., Fields B. S., and Engleberg N. C.** “Protein expression by the protozoan *Hartmannella vermiformis* upon contact with its bacterial parasite *Legionella pneumophila*”, *Infect. Immun.*,1994: 62:1860–1866.

**Abu Kwaik, Y., Gao L. Y., Stone B. J., et al.**“Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998: 64:3127–3133.

**Abu Kwaik, Y.**“The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum”, *Appl. Environ. Microbiol.*,1996: 62:2022–2028.

**Adams, D.A, Gallagher K.M., Jajosky R.A., et al.**“Summary of notifiable diseases—United States, 2011”, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013: 60:1–117.

**Adeleke, A. A., Fields B. S., Benson R. F., et al.**“*Legionella drozanskii* sp.nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001: 51:1151–1160.

**Adeleke, A., Pruckler J., Benson R., et al.**“*Legionella*-like amebal pathogens—phylogenetic status and possible role in respiratory disease”, *Emerg. Infect. Dis.*,1996: 2:225–230.

**Adil Khan, M.A., Knox N., Prashar A., et al.**“Comparative genomics reveal that host-innate immune responses influence the clinical prevalence of *Legionella pneumophila* serogroups”, *PLoS One*, 2013: 8:e67298.

**Aguero-Rosenfeld, M. E., and Edelstein P. H.**“Retrospective evaluation of the Du Pont radioimmunoassay kit for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigenuria in humans”, *J. Clin. Microbiol.*,1988: 26: 1775–1778.

**Albalat,R.G., Broch B.B., Bono J.M.**“Validation of the Legipid Bioalarm Legionella assay”, J. AOAC. Int.,2012: 95:1440– 1451.

**Alexandropoulou, I.G., Ntougias S., Theocharis G, et al.**“Environmental surveillance and molecular epidemiology of waterborne pathogen *Legionella pneumophila* in health-care facilities of Northeastern Greece: a 4-year survey”, Environmental Science and Pollution Research, 2015: 22(10): 7628–7640

**Alexiou-Daniel S., Papoutsi A., Papa A., et al.** “Typing of *Legionella pneumophila* strains isolated in Greece by arbitrarily- primed PCR”, Cell. Mol. Biol.,1996: 42: 833-38.

**Allegra,S., Girardot F., Grattard F., et al.** “Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples”, J. Appl. Microbiol., 2011: 110: 952–961.

**American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America.** “Guidelines for the management of adults with hospital acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia”, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2005: 171:388–416. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200405-644ST>.

**Anevlavis, S., Petroglou N., Tzavaras A., et al.**“A prospective study of the diagnostic utility of sputum Gram stain in pneumonia”, J.Infect., 2009: 59:83–89.

**Annaka T.**“Rapid and simple detection of Legionella species by LAMP, a new DNA amplification method”, Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi, 2003:14:25–30. (In Japanese.)

**Aragon, V., Kurtz S., and Cianciotto N. P.** “Legionella pneumophila major acid phosphatase and its role in intracellular infection”, *Infect. Immun.*, 2001: 69:177–185.

**Aragon, V., Kurtz S., Flieger A., et al.** “Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient Legionella pneumophila”, *Infect. Immun.*, 2000: 68:1855–1863.

**Arnold, F.W., Summersgill J.T., Lajoie A.S., et al.** “Community-Acquired Pneumonia Organization Investigators. A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia”, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2007:175: 1086–1093.

**Arnow, P.M., Chou T., Weil D., et al.** “Nosocomial Legionnaires’ disease caused by aerolized tap water from respiratory devices”, *J.Infect.Dis.*,1982: 146, 460-467.

**Aubert, G., Bornstein N., Rayet I., et al.** “Nosocomial infection with Legionella pneumophila serogroup1 and 8 in a neonate”, *Scand. J. Infect. Dis.*,1990: 22:367–370.

**Ballard, A. L., Fry N. K., Chan L., et al.** “Detection of Legionella pneumophila using a realtime PCR hybridization assay”, *J. Clin. Microbiol.*, 2000: 38:4215–4218.

**Bandyopadhyay, P., Liu S., Gabbai C. B., et al.** “Environmental mimics and the *Lvh* type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*”, *Infect. Immun.*, 2007:75:723–735.

**Bangsborg, J. M., Shand G. H., Hansen K. et al.** “Performance of four different indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to detect specific IgG, IgA, and IgM in Legionnaires’ disease”, *APMIS* 1994: 102:501–508.

**Barbaree, J.M., Fields B.S., Feeley J.C., et al.** “Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular

multiplication of *Legionella pneumophila*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986: 51:422–424.

**Bartlett, C.L.R., Swann R.A., Casal J., et al.** “Recurrent Legionnaires disease from a hotel water system”. In *Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium*, C. Thornsberry, A. Balows, J.C. Feeley, and W. Jakubowski, eds. (Washington, DC: American Society for Microbiology), 1984: pp. 237-239.

**Bebear C, Pereyre S, Peuchant O.** “*Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics”, *Future Microbiol.*, 2011: 6:423–431. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.11.18>.

**Bedrina B, Macian S, Solis I, et al.** “Fast immunosensing technique to detect *Legionella pneumophila* in different natural and anthropogenic environments: comparative and collaborative trials”, *BMC Microbiol.*, 2013: 13:88.

**Bellinger-Kawahara, C., and Horwitz M.A.** “Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes”, *J. Exp. Med.*, 1990: 172:1201–1210.

**Benin, A.L., Benson R.F., Besser R.E.** “Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis”, *Clin Infect Dis.* 2002: 35(9):1039-46.

**Benin, A.L., and Besser R.E.** “Abstr 41st”, *Intersci Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Abstr.* 873, 2001.

**Benson, R. F., Tang P. W., and Fields B. S.** “Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires’ disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*”, *J. Clin. Microbiol.*, 2000: 38: 2763–2765.

**Benson, R.F., and Fields B.S.** “Classification of the genus *Legionella*”, *Semin. Respir. Infect.*,1998: 13:90–99.

**Benson, R.F., Thacker W.L., Plikaytis B.B., et al.**“Cross-reactions in *Legionella* antisera with *Bordetella pertussis* strains”, *J. Clin. Microbiol.*,1987: 25:594–596.

**Bentham, R.H., and Broadbent C.R.**“A model for autumn outbreaks of Legionnaires’ disease associated with cooling towers, linked to system operation and size”, *Epidemiol. Infect.*,1993: 111:287–295.

**Berdal, B. P., Farshy C. E., and Feeley J. C.**“Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay”, *J. Clin. Microbiol.*, 1979: 9:575–578.

**Berger, K. H., and Isberg R. R.**“Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*”, *Mol. Microbiol.*,1993: 7:7–19.

**Berk, S.G., Ting R.S., Turner G.W., et al.**“Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp”, *Appl. Environ. Microbiol.*,1998: 64:279–286.

**Bernander, S., Gastrin B., Lofgren S., et al.**“*Legionella* urinary antigen in early disease”, *Scand. J. Infect. Dis.*, 1994: 26:777–778.

**Bertelli C, Greub G.**“Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology”, *Clin. Microbiol. Infect.*2013;19:803– 813.

**[bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](https://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)**

**[strain data submission]**

**[bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](https://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)[protocols]**

- Blatt, S.P., Parkinson M.D., Pace E., et al.** “Nosocomial Legionnaires’ disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition”, *Am. J. Med.* 1993: 95, 16 – 22.
- Bornstein, N., Marmet, D., Dumaine M.H., et al.** “Detection of flagella in 278 *Legionella* strains by latex reagent sensitized with anti-flagellum immunoglobulins”, *J. Clin. Microbiol.*, 1991: 29:953–956.
- Bornstein, N., Janin N., Bourguignon G., et al.** “Prevalence of anti-*Legionella* antibodies in a healthy population and in patients with tuberculosis or pneumonia”, *Isr. J. Med. Sci.*, 1986: 22:740–744.
- Bosshardt, S.C., Benson R.F., and Fields B.S.** “Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*”, *Microb. Pathog.*, 1997: 23:107–112.
- Boswell, T. C. and Kudesia, G.** “Serological cross reaction between *Legionella* and *Campylobacter* in the rapid microagglutination test”, *J. Clin. Pathol.*, 1996: 49:584–586.
- Bozue, J. A., and Johnson W.** “Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion”, *Infect. Immun.*, 1996: 64:668–673.
- Brabender, W., Hinthorn D.R., Asher M., et al.** “*Legionella pneumophila* wound infection”, *JAMA*, 1983: 250, 3091 -3092.
- Brenner, D.J.**, “Classification of Legionellaceae. Current status and remaining questions”, *Isr. J. Med. Sci.*, 1986: 22(9):620-32.
- Brenner, D.J., Feeley, J.C., and Weaver, R.E.** “Legionellaceae”, In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, vol.1. Baltimore, MD, Lippincott Williams & Wilkins: 1984: 279-288.



**Brenner, D.J., Steigerwalt A.G., and McDade J.E.**“Classification of the Legionnaires’ disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova”, Ann. Intern. Med., 1979;90:656–658.

**Brown A, Vickers RM, Elder EM, et al.**“Plasmid and surface markers of endemic and epidemic *Legionella pneumophila* strains”. J. Clin.Microbiol., 1982;16: 230-35.

**Brown, A., Lema M., Ciesielski C. A., et al.**“Combined plasmid and peptide analysis of clinical and environmental *Legionella pneumophila* strains associated with a small cluster of Legionnaires’ disease cases”, Infection., 1985: 13:163–166.

**Bruin JP, Ijzerman EP, den Boer JW, Mouton JW, Diederren BM.** “Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates”, Diagn. Microbiol. Infect., 2012: 72: 102-108.

**Buesching, W. J., Brust R. A., and Ayers L. W.** “Enhanced primary isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens by low-pH treatment” J. Clin. Microbiol.,1983: 17:1153–1155.

**Cazalet, C., Rusniok C., Brüggemann H., et al.**“Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity”, Nat. Genet.,2004: 36:1165–1173.

**Centers for Disease and Control.**“Legionellosis—United States. 2000–2009”, MMWR., Morb. Mortal Wkly Rep., 2011: 60:1083–6.

**Centers for Disease Control and Prevention.** “*Legionella* (Legionnaires’ disease and Pontiac fever)”. 2013 [cited 2013 Mar 14].

<http://www.cdc.gov/legionella/about/treatment-complications.html>

**Centers for Disease Control and Prevention.** “Final recommendations to minimize transmission of Legionnaires’ disease from whirlpool spas on cruise ships”, 1995. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.

**Centers for Disease Control and Prevention.** “Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia”, *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 1997: 46:RR-1:1–79.

**Centers for Disease Control and Prevention.** “Legionnaires’ disease associated with potting soil—California, Oregon, and Washington, May– June 2000”. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2000: 49:777–778.

**Chang F.Y., Jacobs S.L., Colodny S.M., et al.** “Nosocomial Legionnaires’ disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 5 : laboratory and epidemiologic implications”, *J. Infect. Dis.*, 1996:174:1116–1119.

**Chang, F. Y., Stout J. E., and Yu V. L.** “Assessment of enzyme immunoassay versus radioimmunoassay for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in frozen urine specimens”, *J. Clin. Microbiol.*, 1996: 34:2628–2629.

**Chen Y, Tateda K, Fujita K, et al.** “Sequential changes of *Legionella* antigens and bacterial load in the lungs and urines of a mouse model of pneumonia”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010:66:253–260.

**Chochlakis, D., Sandalakis V., Panoulis C., et al.** “Typing of *Legionella* strains isolated from environmental samples in Crete, Greece, during the period 2004–2011”. 2013: 11 (4) 762-771.

**Cianciotto, N. P., and Fields B. S.** “*Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992: 89:5188–5191.

**Cianciotto, N. P., Bangsberg J.M., Eisenstein B. I., et al.** “ Identification of mip-like genes in the genus *Legionella*”, *Infect. Immun.* 1990: 58:2912-2918.

**Cianciotto, N. P., Eisenstein B. I., Mody C. H., et al.**“A *Legionella pneumophila* gene encoding ga species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection”, *Infect. Immun.*,1989: 57:1255–1262.

**Cirillo, J. D., Cirillo S. L. G., Yan L., et al.**“Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*”, *Infect. Immun.*,1999: 67:4427–4434.

**Cirillo, S. L., Bermudez L. E., El-Etr S. H., et al.** “*Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence”, *Infect. Immun.*, 2001:69:508-517.

**Cloud, J. L., Carroll K. C., Pixton P., et al.**“Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation”, *J. Clin. Microbiol.*, 2000: 38:1709–1712.

**Collins, M. T., McDonald J., Høiby N., et al.**“Agglutinating antibody titers to members of the family Legionellaceae in cystic fibrosis patients as a result of cross-reacting antibodies to *Pseudomonas aeruginosa*”, *J. Clin. Microbiol.*,1984: 19:757–762.

**Commission Implementing Decision** 2012/506/EU of 8 August 2012, amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council.

**Cornick JE, Bentley SD.** “*Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides”,

Microbes Infect., 2012: 14:573–583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.01.012>.

**Correia, AM, Gonçalves J, Gomes JP., et al.** “Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires’ Disease”, N. Engl. J. Med., 2016: 374:497-498.

**Council of State and Territorial Epidemiologists.** “Strengthening surveillance for travel-associated legionellosis and revised case definitions for legionellosis”, 2005 [cited 2013 Jul 1]. <http://www.cdc.gov/legionella/health-depts/CSTE-position-statement.html>

**Cunha BA.**“Clinical features of legionnaires' disease.”, Semin Respir Infect. 1998;13(2):116-27.

**de Ory,F., Echevarria J.M., Pelaz C., et al.**“Detection of specific IgM antibody in the investigation of an outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 1” , Clin. Microbiol. Infect.,2000: 6:64–68.

**DeForges, L., Legrand P., Tankovic J., et al.** “Case of false-positive results of the urinary antigen test for *Legionella pneumophila*”, Clin. Infect. Dis.,1999: 29:953–954.

**Den Boer, J.W., Euser S.M., Brandsema P., et al.** “Results from the national *Legionella* outbreak detection program, the Netherlands, 2002-2012”, Emerg. Infect. Dis.,2015: 21:1167–1173.

**Detilleux, P. G., Deyoe B. L., and Cheville N. F.**“Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro”, Infect. Immun.,1990: 58:2320–2328.

**Diaz MH, Waller JL, Napoliello RA, et al. 2013.** “Optimization of multiple pathogen detection using the Taq Man Array Card: application for a population-based study of neonatal infection”, PLoSOne 8:e66183.

**Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, et al.** “Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing,. Nat.Rev. Genet. 2012:13:601–612.

**Diederer BM.** “*Legionella* spp. and Legionnaires’ disease”, J. Infect., 2008: 56:1–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2007.09.010>.

**Dieterle, R.R.** “Methods for the demonstration of *Spirochaeta pallida* in single microscopic sections”, Archives of Neurology and Psychiatry, 1927: 18:73-80.

**Dilger, T., Melzl H., Gessner A.** “Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry.” J. Microbiol. Methods., 2016: 127:1549.

**Dirven, K., Ieven M., Peeters M.F., et al.** “Comparison of three *Legionella* urinary antigen assays during an outbreak of legionellosis in Belgium”, J. Med. Microbiol.,2005: 54:1213–1216.

**Domínguez, J. A., Galí N., Matas L., et al.** “Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples”, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,1999: 18:896–898.

**Domínguez, J. A., Galí N., Pedroso P., et al.** “Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest-*Legionella*-urine antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples”, J. Clin. Microbiol.,1998: 36:2718–2722.

**Domínguez, J. A., Manterola J. M., Blavia R., et al.**“Detection of *Legionella pneumophila* serogroup-1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration”, J. Clin. Microbiol.,1996: 34: 2334–2336.

**Domínguez, J. A., Matas L., Manterola J. M., et al.**“Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of *Legionella pneumophila* serogroup1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples”, J. Clin. Microbiol.,1997: 35:1627–1629.

**Dournon, E.**“Isolation of legionellae from clinical specimens”, 1988: p.13–30. In T. G. Harrison and A. G. Taylor (ed.), A laboratory manual for Legionella. John Wiley and Sons, New York, N.Y.

**Dowling, J.N., McDevitt D.A., and Pasculle A.W.**“Isolation and preliminary characterization of erythromycin-resistant variants of *Legionella micdadei* and *Legionella pneumophila*”, Antimicrob. Agents. Chemother., 1985:27, 272-274.

**Drozanski, W.**“Fatal bacterial infection in soil amoebae”, Acta Microbiol. Pol.,1956: 5:315–317.

**Dwyer, D. E., Gibbons V. L., BradyL. M., et al.**“Serological reaction to *Legionella pneumophila* group 4 in a patient with Q fever”, J. Infect. Dis.,1988: 158:499–500.

**Edelstein, P. H., and Edelstein M. A. C.**“Evaluation of the Merifluor *Legionella* immunofluorescent reagent for identifying and detecting 21 *Legionella* species”, J. Clin. Microbiol.,1989: 27:2455–2458.

**Edelstein, P. H., McKinneyR. M., Meyer R. D.,et al.**“Immunologic diagnosis of Legionnaires’ disease: cross-reactions with anaerobic and microaerophilic organisms and infections caused by them”, J. Infect. Dis.,1980: 141:652–655.

**Edelstein, P. H., Snitzer J. B., and Bridge J. A.** “Enhancement of recovery of *Legionella pneumophila* from contaminated respiratory tract specimens by heat”, J. Clin. Microbiol., 1982: 16:1061–1065.

**Edelstein, P. H.** “Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water”, J. Clin. Microbiol., 1982: 16:697–699.

**Edelstein P.H.** “Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires’ disease: a review”, Clin. Infect. Dis., 1995: 21(Suppl 3):S265–S276.

**Edelstein, P. H.** “Detection of antibodies to *Legionella* spp.”, 1997: p. 502– 509. In N. R. Rose, E. C. de Macario, J. D. Folds, H. C. Lane, and R. M. Nakamura (ed.), Manual of clinical laboratory immunology, vol. 5. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Edelstein, P. H.** “Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens”, J. Clin. Microbiol., 1981: 14:298–303.

**Edelstein, P. H.** “The laboratory diagnosis of Legionnaires’ disease”, Semin. Respir. Infect., 1987: 2:235–241.

**Edelstein, P. H.** “Legionnaires’ disease”, Clin. Infect. Dis., 1993: 16:741–749.

**Edelstein, P.H. & Gianciotto, N.P.** “Legionella. In principles and practice of infectious diseases”, G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin, eds. (Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone), 2005: 2711-2724.

**Edelstein, P.H., Beer K.B., Sturge JC, et al.** “Clinical utility of a monoclonal direct fluorescent reagent specific for *Legionella pneumophila*: comparative study with other reagents”, J. Clin. Microbiol., 1985:22: 419 – 421.

**Edelstein, P.H., Edelstein, M.A.** “In vitro activity of azithromycin against clinical isolates of *Legionella* species”, *Antimicrob Agents Chemother.*, 1991: 35(1):180-1.

**Edelstein, P.H., Weiss W.J., and Edelstein M.A.C.**“Activities of tigecycline (GAR-936) against *Legionella pneumophila* in vitro and in guinea pigs with *L.pneumophila* pneumonia”, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003: 47, 533 – 540.

**Edelstein, P.H.**“Clinical features of Legionnaires’ disease: a selective review”,In *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, N.P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P.H. Edelstein, B.S. Fields, D.F. Geary, T.G.Harisson, C.A.Joseph, R.M. Ratcliff, J.E.Stout, and M.S. Swanson, eds. (Washington, DC: ASM Press), 2006a: pp 3-7.

**Edelstein, P.H.**“Clinical features of Pontiac fever and Legionnaires’ disease” in *Legionella* molecular microbiology book, Klaus Heuner and Michelle Swanson, eds (Norfolk, UK, CAP), 2008: pp 9-14.

**Edelstein, P.H.**“Detection of antibodies to *Legionella*”, In manual of molecular and clinical laboratory immunology, B.Detrick, R.G. Hamilton, and J.D. Folds, eds. (Washington, DC: ASM Press), 2006b: pp. 468-476.

**Edelstein, P.H.** “ Laboratory diagnosis of Legionnaires’ disease: an update from 1984”, 1993: p. 7–11. In J. M. Barbaree, R. F. Breiman, and A. P. Dufour (ed.), *Legionella: current status and emerging perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Edelstein, P.H.**“Review of azithromycin activity against *Legionella* spp”. *Pathol. Biol. (Paris)*, 1995: 43, 569-572.

**Edelstein, P.H.**“Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis”, *Clin. Infect. Dis.*, 2007: 44, 229-231.



**Edelstein, P.H. & Meyer R.D.**,“Legionnaires' disease. A review”, *Chest.*, 1984: 85(1):114-20.

**Edelstein, PH.**“Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: time for a change”, *Ann. Intern. Med.*, 1998: 129(4):328-30.

**eEbiary M, Sarmiento X, Torres A, et al.**“Prognostic factors of severe *Legionella pneumonia* requiring admission to ICU”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997: 156(5):1467-72.

**Engleberg, N. C., Carter C., Weber D. R., et al.** “DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity”, *Infect. Immun.*, 1989: 57:1263–1270.

**European Centre for Disease Prevention and Control agency of the European Union** “Legionnaires’ disease - Annual Epidemiological Report 2016 [2014 data]”.

**European Centre for Disease Prevention and Control.** “ECDC surveillance report—Legionnaires’ disease in Europe, 2014”,2016. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/\\_layouts/forms/Publication\\_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1423](http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1423). Accessed 14 July 2016.

**European working group for Legionella infections (2002).** “European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaire’s Disease”. (London: PHLS)<http://www.ewgli.org>

**EWGLI** “Technical Guidelines for the Investigation, Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires’ Disease 2011”.

**Fallon, R.J** .“Legionella”,In: Parker MT, Duerden BI,eds. *Topley and Wilson’s principles of bacteriology, virology, and immunity*, Vol.2. London: 1990: 275-287.

**Farnham A., Alleyne L., Cimini D., et al.** “Legionnaires’ Disease Incidence and Risk Factors, New York, New York, USA, 2002–2011”, *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 20, No. 11, November 2014.

**Farshy, C. E., Cruce D.D., Klein G.C., et al.** “Immunoglobulin specificity of the microagglutination test for the Legionnaires’ disease bacterium”, *Ann. Intern. Med.*,1979: 90:690.

**Farshy, C. E., Klein G. C., and Feeley J. C.** “Detection of antibodies to legionnaires disease organism by microagglutination and micro-enzymelinked immunosorbent assay tests”, *J. Clin. Microbiol.*,1978: 7:327–331.

**Feeley, J. C., Gibson R. J., Gorman G. W., et al.** “Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*”, *J. Clin. Microbiol.*,1979: 10:437– 441.

**Feeley, J. C., Gorman G. W., Weaver R. E., et al.** “Primary isolation media for Legionnaires’ disease bacterium”, *J. Clin. Microbiol.*,1978: 8:320–325.

**Fendukly, F., Bernander S., Hanson H.S.** “Nosocomial Legionnaires’ disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 6: implication of the sequence-based typing method (SBT)”, *Scand. J. Infect. Dis.*,2007: 39:213–216.

**Ferguson, D.A., Jr., and Mayberry W.R.** “Differentiation of *Legionella* species by soluble protein patterns in polyacrylamides lab gels”, *Microbios.*,1987: 52:105–114.

**Fernandez,J.A., López P., Orozco D., et al.** “Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002: 21(10):729-35.

**Fields, B. S.** “*Legionellae* and Legionnaires’ disease”, In C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter (ed.), *Manual of*

environmental microbiology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1997: p. 666–675.

**Fields, B. S., Fields S. R., Loy J. N., et al.** “Attachment and entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*”, J. Infect. Dis.,1993: 167:1146–1150.

**Fields, B. S.**“The molecular ecology of *legionellae*”, Trends Microbiol. 1996: 4:286–290.

**Fields, B.S.** “*Legionella* and *protozoa*: interaction of a pathogen and its natural host”, In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP,eds. *Legionella: Current status and emerging perspectives*. Washington DC, American Society for Microbiology,1993: 4:286-290.

**Fiore, A. E., Nuorti J. P., Levine O. S., et al.**“Epidemic Legionnaires’ disease two decades later: old sources, new diagnostic methods”, Clin. Infect. Dis.,1998: 26:426–433.

**Fischer, G., Bang H., Ludwig B., et al.** “Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPlase) activity”, Mol. Microbiol.,1992: 6:1375–1383.

**Fitzgeorge, R.B., Lever S., and Baskerville A.**“A comparison of the efficacy of azithromycin and clarithromycin in oral therapy of experimental air-borne Legionnaires’ disease”, J. Antimicrob. Chemother.,1993: 31 Suppl E, 171-176.

**Fliermans, C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., et al.** “Ecological distribution of *legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 1981:41:9-16.

**Flournoy, D. J., Belobraydic K. A., Silberg S. L., et al.**“False positive *Legionella pneumophila* direct immunofluorescent monoclonal antibody test caused by *Bacillus cereus* spores”, Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,1988: 9:123–125.

- Formica, N., Tallis G., Zwolak B., et al.** “Legionnaires’ disease outbreak: Victoria’s largest identified outbreak”, *Commun. Dis. Intel.*, 2000: 24:199–202.
- Fox, K.F., and Brown A.** “Application of numerical systematics to the phenotypic differentiation of *legionellae*”, *J. Clin. Microbiol.*, 1989: 27:1952–1955.
- Fraser, D.W., Tsai T.R., Orenstein W., et al.** “Legionnaires’ disease: description of an epidemic of pneumonia”, *N. Engl. J. Med.*, 1977: 297:1189–1197.
- Fry, N.K., Bangsberg J.M., Bergmans A., et al.** “Designation of the European Working Group on Legionella Infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002: 21:722–728.
- Fry, N.K., Savelkoul P.H., Visca P.** “AFLP: Amplified fragment-length polymorphism analysis”, *Methods Mol. Biol.*, 2009: 551:89-104.
- Fry, N.K., Warwick S., Saunders N.A., et al.** “The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*”, *J. Gen. Microbiol.*, 1991: 137:1215–1222.
- Fuchslin, H.P., Kotzsch S., Keserue H.A., et al.** “Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry”, *Cytometry A*, 2010: 77:264–274.
- Fujinami, Y., Kikkawa H.S., Kurosaki Y., et al.** “Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry”, *Microbiol. Res.*, 2011: 166(2):77-86.

**Gacouin, A., Le T., Lavoue S., et al.**“Severe pneumonia due to *Legionella pneumophila*: prognostic factors, impact of delayed appropriate antimicrobial therapy”, *Intensive Care Med.*, 2002: 28, 686 -691.

**Gaia, V., Casati S., Tonolla M.** “Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting”, *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011: 34(1):40-4.

**Gao, L. Y., and Abu Kwaik Y.**“The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*”, *Environ. Microbiol.*,2000: 2:79–90.

**Gao, L. Y., Harb O. S., and Abu Kwaik Y.**“Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and *protozoa*”, *Infect. Immun.*,1997: 65:4738–4746.

**Gao, L. Y., Stone B. J., Brieland J. K., et al.**“Different fates of *Legionella pneumophila* pmi and mil mutants within macrophages and alveolar epithelial cells”, *Microb. Pathog.*,1998: 25:291–306.

**Gao,L.Y., and Abu Kwaik. Y.**“Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity”, *Infect. Immun.*,1999: 67:862–870.

**Garcia, M., Campbell I., Tang P., et al.**“Incidence of Legionnaires’ disease and report of *Legionella sainthelensi* serogroup 1 infection in Toronto, Canada”, 1993: p. 37–39. In J. M. Barbaree, R. F. Breiman, and A. P. DuFour (ed.), *Legionella: current status and emerging perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Garcia-Fulgueiras,A., NavarroC., Fenoll D., et al.**“Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain”, *Emerg Infect Dis.* 2003: 9(8):915-21

**Garrity, G.M., Brown A. & Vickers R.M.**,”Tatlockia and Fluoribacter: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*”, *Int. J. Syst. Bact.*, 1980: 30: 609-614.

**Garcia-Vidal C, Carratala J.** “Current clinical management of Legionnaires’ disease”. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2006:4:995–1004. <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.4.6.995>.

**Georghiou, R.P., Doggett M.A., Kielhofner A.M., et al.** “Molecular fingerprinting of *Legionella* species by repetitive element PCR”, *J. Clin. Microbiol.*, 1994: 32(12): 2989-94.

**Glaser, S., Weitzel T., Schiller R., et al.**“Persistent culture-positive *Legionella* infection in an immunocompetent adult”, *Clin. Infect. Dis.*,2005: 41, 765-766.

**Glick, T.H., Gregg M.B., Berman B., et al.** “Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects”, *Am. J. Epidemiol.*,1978: 107: 149 – 160.

**Gomez-Lus P., Fields B.S., Benson R.F., et al.**“Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup 1”, *J. Clin. Microbiol.*, 1993: 31:1940–1942.

**Gosting, L. H., Cabrian K., Sturge J. C., et al.**“Identification of a species-specific antigen in *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody”, *J. Clin. Microbiol.*,1984: 20:1031–1035.

**Goutziana, G., Mouchtouri V.A., Karanika M., et al.**“*Legionella* species colonization of water distribution systems, pools and air conditioning systems in cruise ships and ferries”, BMC Public Health, 2008 8:390.

**Grady,G.F., and Gilfillan R.F.**“Relation of *Mycoplasma pneumoniae* seroreactivity, immunosuppression, and chronic disease to Legionnaires’ disease. A twelve-month prospective study of sporadic cases in Massachusetts”, Ann. Intern. Med.,1979: 90:607–610.

**Graham RMA, Doyle CJ, Jennison AV.** “Real-time investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak using whole genome sequencing”, Epidemiol. Infect. 2014;142:2347–2351.

**Granados, A., Podzamczar, D., Gudino, I.F., et al.** “Pneumonia due to *Legionella pneumophila* and pneumococcal pneumonia: similarities and differences on presentation”, Eur. Respir. J.,1989: 2:130–134.

**Gray,J.J., Ward K.N., Warren R.E., et al.**“Serological cross-reaction between *Legionella pneumophila* and *Citrobacter freundii* in indirect immunofluorescence and rapid microagglutination tests”, J. Clin. Microbiol.,1991: 29:200–201.

**Green, P. N., and Pirrie R. S.** “A laboratory apparatus for the generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms”, J.Appl.Bacteriol.,1993: 74:388–393.

**Grist, N.R., Reid D., and NajeraR.**“Legionnaires’ disease and the traveler”, Ann. Intern. Med.,1979: 90: 563-564.

**Grottola, A., Forghieri F., Meacci M., et al.**“Severe pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 11, Italy”, Emerg. Infect. Dis.,2012: 18:1911–1913.

**Guerin, J.C.**,“Epidemiology of legionnaires' disease. From myth to reality”, Rev. Mal. Respir. 1992;9 Suppl 1:R53-6.

**Hackman, B.A., Plouffe J.F., Benson R.F., et al.**“Comparison of Binax *Legionella* urinary antigen EIA kit with Binax Ria urinary antigen kit for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen”, J. Clin. Microbiol.,1996: 34:1579–1580.

**Hagele, S., Hacker J., and Brand B. C.** “*Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death”, FEMS Microbiol. Lett.,1998: 169:51–58.

**Hagele, S., Kohler R., Merkert H.,et al.** “Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*”, Cell. Microbiol.,2000: 2:165–171.

**Hammer, B. K., and Swanson M. S.**“Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp”, Mol. Microbiol.,1999: 33:721–731.

**Hammerschlag, M.R., Roblin P.M., and Bbar C.M.**“Activity of telithromycin, a new ketolide antibacterial, against atypical and intracellular respiratory tract pathogens”, J. Antimicrob. Chemother.,2001: 48 Suppl T1, 25-31.

**Hanne, S., WatsonP., Bharat P., et al.**“Outbreak of Legionnaires' disease linked to a humidifier in a hotel in wales, united kingdom”, In *Legionella*, R.Marre, Y.A.Kwaik, C.Bartlett, N.P. Cianciotto, B.S.Fields, M.Frosch, J. Hacker, and P.C. Luck, ed. ( Washington, DC: ASM Press), 2002: pp. 346-348.

**Harisson, T. et al.**“A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA”, Clin. Microbiol. Infect.,1988: 4, 359 – 365.



**Harrison TG, Afshar B, Doshi N, et al.** “Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008)” Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2009;28(7):781-91.

**Harrison, T. G., and Taylor A. G.** “The diagnosis of Legionnaires’ disease by estimation of antibody levels”, 1988: p. 113–135. In T. G. Harrison and A. G. Taylor (ed.), A laboratory manual for Legionella, vol. 1. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, England.

**Harrison, T. G., and Taylor, A. G.** “A rapid microagglutination test for the diagnosis of *Legionella pneumophila* (serogroup 1) infection”, J. Clin. Pathol.,1982: 35:1028–1031.

**Harrison, T. G., Dournon E., and Taylor A. G.** “Evaluation of sensitivity of two serological tests for diagnosing pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1”, J. Clin. Pathol.,1987: 40:77–82.

**Harrison,T.G., and Taylor A.G.** “A laboratory manual for *Legionella*”, Wiley, New York, N.Y. 1988.

**Hayden, R. T., Uhl J. R., Qian X., et al.** “Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection and culture”, J. Clin. Microbiol.,2001:2618–2626.

**Heath, C.H., Grove D.I., and Looke D.F.** “Delay in appropriate therapy of *Legionella pneumonia* associated with increased mortality”, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,1996: 15, 286-290.

**Hebert, G.A.** "Hippurate hydrolysis by *Legionella pneumophila*", J. Clin. Microbiol., 1981: 13:240–242.

**Helbig, J. H., Engelstadter T., Maiwald M., et al.** "Diagnostic relevance of the detection of *Legionella* DNA in urine samples by the polymerase chain reaction", Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1999: 18:716–722.

**Helbig, J. H., Ludwig B., Luck P.C., et al.** "Monoclonal antibodies to *Legionella* Mip proteins recognize genus and species-specific epitopes", Clin. Diagn. Lab. Immunol., 1995: 2:160–165.

**Helbig, J., Uldum S. A., Luck P. C., et al.** "Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the Binax NOW", J. Med. Microbiol., 2001: 50:509–516.

**Helbig, J.H., Bernander S., Castellani Pastoris, M., et al.** "Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups", Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2002: 21:710–716.

**Helbig, J.H., Kurtz J.B., Pastoris M.C., et al.** "Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups", J. Clin. Microbiol., 1997: 35(11):2841-5.

**Helsel, L.O., Bibb W.F., Butler C.A., et al.** "Recognition of a genus-wide antigen of *Legionella* by a monoclonal antibody", Curr. Microbiol., 1988: 16:201–208.

"Legionellosis and nonpneumonic legionellosis". In: Heymann D, editor. Control of communicable diseases manual. Washington (DC): American Public Health Association; 2008. p. 337–40.

**Hookey, J. V., Saunders N. A., Fry N. K., et al.** “Phylogeny of *legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens”, *Int. J. Syst. Bacteriol*,1996: 46:526–531.

**Horwitz, M. A., and Maxfield F. R.**“*Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes”, *J. Cell Biol.*,1984: 99:1936– 1943.

**Horwitz, M. A.**“Formation of a novel phagosome by the Legionnaires’ disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes”, *J. Exp. Med.*,1983:158:1319–1331.

**Horwitz, M. A.**“Phagocytosis of the Legionnaires’ disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil”, *Cell*,1984: 36:27–33.

**Horwitz, M. A.**“Phagocytosis of the Legionnaires’ disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil”,*Cell*,1984: 36:27–33.

**Horwitz, M.A.**“The Legionnaires’ disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes”, *J. Exp. Med.*,1983: 158:2108–2126.

**Horwitz,M.A., and Silverstein S.C.**“Legionnaires’disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes”, *J. Clin. Investig.*,1980: 66:441–450.

**Howden BP, Stuart RL, Tallis G,et al.**“Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with legionnaires' disease”, *Intern Med J.*, 2003: 33(11):484-8.

**[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43233/1/9241562978\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43233/1/9241562978_eng.pdf)**

<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/brochure-ab-genetic-analyzers.pdf>

**Huang, B., Heron B.A., Gray B.R., et al.** “A predominant and virulent *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain detected in isolates from patients and water in Queensland, Australia, by an amplified fragment length polymorphism protocol and virulence genebased PCR assays”, J. Clin. Microbiol., 2004: 42:4164–4168.

**Huang, B., Yuan Z. Heron B.A., et al.** “Distribution of 19 major virulence genes in *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and water in Queensland, Australia”, J. Med. Microbiol., 2006: 55:993–997.

**Ingram, J. G., and Plouffe J. F.** “Danger of sputum purulence screens in culture of *Legionella* species”, J. Clin. Microbiol., 1994: 32:209–210.

**International Organization for Standardization,** Geneva, Switzerland. “ISO11731. Water quality—detection and enumeration of *Legionella*”.

**Jackson EB, Crocker TT, Smadel JE.** “Studies on two *rickettsia*-like agents probably isolated from guinea pigs”. Bacteriol. Proc., 1952:52:119.

**Jaulhac, B., Nowicki M., Bornstein N., et al.** “Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification”, J. Clin. Microbiol., 1992: 30:920– 924.

**Jimenez-Lucho, V., Shulman M., and Johnson J.** “*Bordetella bronchiseptica* in an AIDS patient cross-reacts with *Legionella* antisera”, J. Clin. Microbiol. 1994: 32:3095–3096.

**Joly P., Falconnet P-A, André J., et al,** “Quantitative Real-Time *Legionella* PCR for Environmental Water Samples: Data Interpretation”, Appl. Environ. Microbiol., 2006: 72(4): 2801–2808.

**Jonas, D., Meyer H.G., Matthes P., et al.** “Comparative Evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires’ disease in hospitals”, *J. Clin. Microbiol.*, 2000: 38 (6): 2284-91.

**Jonas, D., Rosenbaum A., Weyrich S., et al.** “Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *legionellae* in bronchoalveolar fluid”, *J. Clin. Microbiol.*, 1995: 33:1247–1252.

**Jonas, D., Engels I., Hartung D., et al.** “Development and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003: 51, 275 – 280.

**Kashuba, A. D., and C. H. Ballow.** “*Legionella* urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1996: 24:129–139.

**Katz, S. M., and Hammel J. M.** “The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*”, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1987: 17:150–156.

**Kaufmann, A.F., McDade J.E., Patton C.M., et al.** “Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission”, *Am. J. Epidemiol.*, 1981: 114: 337-347.

**Kazandjian, D., Chiew R., and Gilbert G. L.** “Rapid diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test”, *J. Clin. Microbiol.*, 1997: 35:954–956.

**Keserue, H.A., Baumgartner, A., Felleisen, R., et al.** “Rapid detection of total and viable *Legionella pneumophila* in tap water by immunomagnetic separation, double fluorescent staining and flow cytometry”, *Microb. Biotechnol.*, 2012: 5:753–763.

- Kessler, H. H., Reinthaler F. F., Pschaid A., et al.** “Rapid detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavage fluids with the EnviroAmp *Legionella* PCR amplification and detection kit”, J. Clin. Microbiol.,1993: 31:3325–3328.
- King, C. H., Fields B. S., Shotts E. B., Jr., et al.** “Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells”, Infect. Immun.,1991: 59: 758–763.
- Kirby, B.D., Peck H., and Meyer R.D.** “Radiographic features of Legionnaires’ disease”, Chest, 1979: 76, 562-565.
- Klein, G. C.** “Cross-reaction to *Legionella pneumophila* antigen in sera with elevated titers to *Pseudomonas pseudomallei*”, J. Clin. Microbiol.,1980: 27–29.
- Klein, G. C., Jones W. L.,and Feeley J.C.** “Upperlimit of normal titer for detection of antibodies to *Legionella pneumophila* by the microagglutination test”, J. Clin. Microbiol., 1979: 10:754–755.
- Kodani, M., Winchell J.M.** “Engineered combined-positive-control template for real-time reverse transcription-PCR in multiple-pathogen-detection assays”, J. Clin. Microbiol.,2012:50:1057–1060.
- Kohler, R. B., Wheat L. J., French M. L., et al.** “Cross-reactive urinary antigens among patients infected with *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 4 and the Leiden 1 strain”, J. Infect. Dis.,1985: 152:1007–1012.
- Kohler, R. B., Winn W. C., Jr., and Wheat L. J.** “Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires’ disease”, J. Clin. Microbiol.,1984: 20:605–607.
- Kohler, R. B., Zimmerman S. E., Wilson E., et al.** “Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires’ disease: detection and partial characterization of urinary antigen”, Ann. Intern. Med.,1981: 94:601–605.

- Kurtz, R.W., Graninger W., Egger T.P., et al.** “Failure of treatment of *Legionella pneumoniae* with ciprofloxacin”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1988: 22, 389-391.
- Kusnetsov, J. M., Keskitalo P. J., Ahonen H. E., et al.** “Growth of *Legionella* and other heterotrophic bacteria in a circulating cooling water system exposed to ultraviolet irradiation”, *J. Appl. Bacteriol.*, 1994: 77:461–466.
- Kwong J.C., McCallum N., Sintchenko V., et al.** “Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology”, *Pathology* 2015:47:199–210
- Lally E. T., Kieba I. R., Sato A., et al.** “*RTX* toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells”, *J. Biol. Chem.*, 1997:272(48):30463-9.
- Lam M.C., Ang L.W., Tan A.L., et al.** “Epidemiology and Control of Legionellosis, Singapore” *Emerg. Infect. Dis.* 2011: 17(7): 1209–1215.
- Lattimer GL, Rachman RA, Scarlato M.** “Legionnaires' disease pneumonia: histopathologic features and comparison with microbial and chemical pneumonias”, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1979:9(5):353-61.
- Laussucq, S., Schuster D., Alexander W. J., et al.** “False-positive DNA probe test for *Legionella* species associated with a cluster of respiratory illnesses”, *J. Clin. Microbiol.*, 1988: 26:1442–1444.
- Lawrence, C., Reyrolle M., Dubrou S., et al.** “Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period”, *J. Clin. Microbiol.*, 1999: 37:2652–2655.
- Lawrence, C., Ronco E., Dubrou S., et al.** “Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the nosocomial environment by

arbitrarily primed PCR and pulsed- field gel electrophoresis”, J. Med. Microbiol., 1999: 48(4): 327-33.

**Lee T.C., Vickers R.M., Yu V.L., et al.**“Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study”, J.Clin. Microbiol.,1993: 31:2764–2768.

**Lee, H.K., Woo M.K., Ju Y.I., et al.**“Prevalence of antibodies in response to *Legionella* species, analysis of a healthy population from Jeollanam-do Province, Korea”, J. Microbiol.,2008: 46:160–164.

**Lema, M., and Brown A.** Electrophoretic characterization of soluble protein extracts of *Legionella pneumophila* and other members of the family Legionellaceae”, J. Clin. Microbiol.,1983: 17:1132–1140.

**Lepine, L. A., Jernigan D. B., Butler J. C., et al.**“A recurrent outbreak of nosocomial legionnaires’ disease detected by urinary antigen testing: evidence for long-term colonization of a hospital plumbing system”, Infect. Control Hosp. Epidemiol.,1998: 19:905–910.

**Lequin, R. M.** “Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)”, Clinical Chemistry,2005: 51 (12): 2415–8.

**Lettinga, K.D., Verbon, A.,Weverling, G.J., et al.** “Legionnaires’ disease at a dutch flower show: prognostic factors and impact of therapy”, Emerg. Infect. Dis.,2002: 8, 1448-1454.

**Lévesque S, Plante P-L, Mendis N,etal.**“Genomic characterization of a large outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains in Quebec City, 2012”, PLoS One 2014;9(8):e103852.



**Lewis VJ, Thacker WL, Shepard CC, McDade JE.** “In vivo susceptibility of the Legionnaires disease bacterium to ten antimicrobial agents”. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1978: 13:419–422. <http://dx.doi.org/10.1128 /AAC.13.3.419>.

**Liles, M. R., Edelstein P. H., and Cianciotto N. P.** “The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular rpathogen *Legionella pneumophila*”, *Mol.Microbiol.*, 1999: 31:959–970.

**Liles, M. R., Viswanathan V. K., and Cianciotto N. P.** “Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion”, *Infect. Immun.*, 1998: 66:1776–1782.

**Lisby, G., and Dessau R.** “Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994: 13:225–231.

**Loens K, Beck T, Goossens H, et al.** “Development of conventional and real-time NASBA for the detection of *Legionella* species in respiratory specimens”, *J. Microbiol. Methods.*, 2006: 67:408–415.

**Loens K, Beck T, Ursi D, et al.** “Development of real-time multiplex nucleic acid sequencebased amplification for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Legionella* spp. in respiratory specimens”, *J. Clin. Microbiol.* 2008: 46:185–191.

**Lowry, P.W., Blankenship R.J., Gridley W., et al.** “A cluster of *legionella* sternal-wound infections dye to postoperative topical exposure to contaminated tap water”, *N. Engl. J. Med.*, 1991: 324, 109-113.

**Lu X, Mo Z-Y, Zhao H-B, et al.** “LAMP-based method for a rapid identification of *Legionella* spp. And *Legionella pneumophila*” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,2011;92:179–187.

**MacDonell, M.T., and Colwell R.R.** “The nucleotide sequence of the 5S Rrna from *Legionella pneumophila*”, *Nucleic Acids Res.*, 1987: 15: 1335.

**Mahbubani, M. H., Bej A. K., Miller R., et al.** “Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods”, *Mol. Cell. Probes*, 1990: 4:175–187.

**Maher, W. E., Para M. F., and Plouffe J. F.** “Subtyping of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates by monoclonal antibody and plasmid techniques”, *J. Clin. Microbiol.*,1987: 25:2281–2284.

**Maher, W. E., Plouffe J. F., and Para M. F.** “Plasmid profiles of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1”, *J. Clin. Microbiol.*,1983: 18:1422–1423.

**Maiwald, M., Helbig J. H., and Luck, P. C.** “Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections”, *J. Microbiol. Methods*,1998: 33:59–79.

**Maiwald, M., Schill M., Stockinger C., et al.** “*Legionella* DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*,1995: 14:25–33.

**Maloney, F., Hoge C.W., Farley T.A., et al.** “Community wide outbreak of Legionnaires’ Disease associated with grocery store mist machine”, *J. Infect. Dis.*,1992: 165, 736 – 739.

**Mandell, L.A., Wunderink R.E., Anzueto A., et al.** Infectious diseases society of America. “American Thoracic Society Consensus Guidelines on the management of Community Acquired pneumonia in adults”, 2007: 44(2): S27-72.

**Marra, A., Blander S. J., Horwitz M. A., et al.** “Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992: 89:9607–9611.

**Marrie,T.J., Haldane, D., and Bezanson, G.** “Nosocomial Legionnaires’ disease: clinical and radiographic patterns”, Can. J. Infect. Dis.,1992: 3, 253 – 260.

**Marshall, L. E., BoswellT. C., and Kudesia G.** “False positive *Legionella* serology in Campylobacter infection: *Campylobacter* serotypes, duration of antibody response and elimination of cross-reactions in the indirect fluorescent antibody test”, Epidemiol. Infect.,1994: 112:347–357.

**Marston, B. J., Lipman H. B., and Breiman R. F.** “Surveillance for legionnaires’ disease. Risk factors for morbidity and mortality”, Arch. Intern. Med.,1994: 154:2417–2422.

**Martin C., Requero M. A., Masin J., et al.** “Membrane restructuring by *Bordetella pertussis* adenylatecyclase toxin, a member of the RTX toxin family”, J. Bacteriol., 2004:186:3760-3765.

**Mastro, T.D., Fields B.S., Breiman R.F., et al.** “Nosocomial Legionnaires’ disease and use of medication nebulizers”, J.Infect.Dis., 1991: 163, 667-671.

**Matsiota-Bernard, P., Pitsouni E., Legakis N., et al.** “Evaluation of commercial amplification kit for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens”, J. Clin. Microbiol.,1994: 32:1503–1505.

**Matsiota-Bernard,P., Waser S., and Vrioni G.** “Detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia”, Clin. Microbiol. Infect.,2000: 6:223–225.

**McAdam PR, Vander Broek CW, Lindsay DSJ, et al.**“Gene flow in environmental *Legionella pneumophila* leads to genetic and pathogenic heterogeneity within a Legionnaires’ disease outbreak”, Genome Biol. 2014:15:504.

**McClelland, M.R., Vaszar L.T., and Kagawa F.T.**“Pneumonia and osteomyelitis due to *Legionella longbeachae* in a woman with systemic lupus erythematosus”, Clin.Infect.Dis.,2004: 38, e102 – e106.

**McDade, J.E., Shepard C.C., Fraser D.W., et al.**“Legionnaires' Disease — Isolation of a Bacterium and Demonstration of Its Role in Other Respiratory Disease”,N. Engl. J. Med., 1977: 297:1197-1203.

**McIntyre, M., Kurtz J. B., and Selkon J. B.**“Prevalence of antibodies to 15 antigens of *Legionellaceae* in patients with community-acquired pneumonia”, Epidemiol. Infect.,1990: 104:39–45.

**Mencacci, A., Corbucci C., Castellani A.**“*Legionella pneumophila* serogroup 3 pneumonia in a patient with low-grade 4 non-Hodgkin lymphoma: a case report”, J. Med. Case Rep.,2011: 5:387.

**Mermel, L.A., Josephson S.L., Giorgio C.H., et al.**“Association of Legionnaires’ disease with construction: contamination of potable water?” Infect. Control Hosp. Epidemiol.,1995: 16: 76-81.

**Meyer, R.D., Edelstein P.H., Kirby B.D., et al.**“Legionnaires’ disease: unusual clinical and laboratory features”, Ann. Intern. Med.,1980: 93, 240-243.

**Meyer, R.D., Edelstein P.H., Kirby B.D., et al.**“Legionnaires’ disease: unusual clinical and laboratory features”, *Ann. Intern. Med.*,1980: 93, 240-243.

**Miyamoto, H., Yamamoto H., Arima K., et al.**“Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *legionellae* in hospital cooling tower water”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997: 63:2489-2494.

**Molofsky A. B., Swanson M. S.** “*Legionella pneumophila CsrA* is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication ”, *Mol. Microbiol.*, 2003:50(2):445-61.

**Moran-Gilad J, Prior K, Yakunin E, et al.**“Design and application of a core genome multilocus sequence typing scheme for investigation of Legionnaires’ disease incidents”, *Euro Surveill.* 2015:20(28):pii21186.

**Moran-Gilad, J., Mentasti M., Lazarovitch T., et al.**“Molecular epidemiology of Legionnaires' disease in Israel”, *ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI), Clin. Microbiol. Infect.*, 2014: 20(7):690-6.

**Morrill, W. E., Barbaree J. M., Fields B. S., et al.**“Increased recovery of *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin”, *J. Clin. Microbiol.*,1990: 28:616–618.

**Moss, C.W., and DeesS.B.**“Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires’ disease bacteria”, *J. Clin. Microbiol.*, 1979: 9:648– 649.

**Mouchtouri V, Velonakis E, Hadjichristodoulou C.**“Thermal disinfection of hotels, hospitals and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species”, *Am. J. Infect. Control.*, 2007: 35:623– 627.

- Mouchtouri, VA, Velonakis E, Tsakalof A, et al.** “Risk Factors for Contamination of Hotel Water Distribution Systems by *Legionella* Species,” *Appl Environ Microbiol.* 2007 Mar; 73(5): 1489–149
- Murdoch, D. R., and Chambers S. T.** “Detection of *Legionella* DNA in peripheral leukocytes, serum, and urine from a patient with pneumonia caused by *Legionella dumoffii*”, *Clin. Infect. Dis.*, 2000: 30:382–383.
- Murdoch, D.R., Walford E.J., Jennings L.C., et al.** “Use of the polymerase chain-reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia”, *Clin. Infect. Dis.*, 1996: 23:475–480.
- Murga, R., Forster T. S., Brown E., et al.** “The role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable water system”, *Microbiology*, 2001: 147:3121–3126.
- Musso, D., and Raoult D.** “Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*”, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1997: 4:208– 212.
- Nagai, H., and Roy C.** “The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter”, *EMBO J.*, 2001: 20:5962–5970.
- Nagington, J., Wreghitt T. G., Tobin J. O., et al.** “The antibody response in Legionnaires’ disease”, *J. Hyg.*, 1979: 83:377–381.
- Napoli, C., Fasano F., Iatta R., et al.** “*Legionella* spp. and legionellosis in southeastern Italy: disease epidemiology and environmental surveillance in community and health care facilities”, *BMC Public Health*, 2010: 10:660.

**Nielsen, K., Bangsberg J.M., and Hoiby N.**“Susceptibility of *Legionella* species to five antibiotics and development of resistance by exposure to erythromycin, ciprofloxacin, and rifampicin”, *Diagn. Microbiol.Infect.Dis.*, 2000a: 36, 43-48.

**Nielsen,K., Hindersson P., Hoiby N., et al.**“Sequencing of the *rpoB* Gene in *Legionella pneumophila* and characterization of mutations associated with rifampicin resistance in the *Legionellaceae*”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000b: 44, 2679-2683.

**Nishizuka, M., Suzuki H., Ara T., et al.**“A case of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 12 and treated successfully with imipenem”, *J. Infect. Chemother.*, 2014: 20:390–393.

**Olsen, C.W., Elverda IP., Jørgensen C.S. et al.**“Comparison of the sensitivity of the *Legionella* urinary antigen EIA kits from Binax and Biotest with urine from patients with infections caused by less common serogroups and subgroups of *Legionella*”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*,2009: 28:817–820.

**Ormsbee, R. A., Peacock M. G., Lattimer G. L., et al.**“Legionnaires’ disease: antigenic peculiarities, strain differences, and antibiotic sensitivities of the agent”, *J. Infect. Dis.*,1978: 138:260–264.

**Orrison, L. H., Bibb W. F., Cherry W. B., and L. Thacker.**“Determination of antigenic relationships among legionellae and non-legionellae by direct fluorescent-antibody and immunodiffusion tests”, *J. Clin. Microbiol.*,1983: 17:332–337.

**Osterholm, M.T., ChinT.D., OsborneD.O., et al.** “A 1957 outbreak of Legionnaires’ disease associated with a meat packing plant”, *Am. J. Epidemiol.*,1983: 117, 60-67.

**Owen RJ.** “Chromosomal DNA fingerprinting - a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens”, *J. Clin. Microbiol.* 1989;130: 89-99.

**Pasculle, A. W., Feeley J. C., Gibson R. J., et al.** “Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue”, *J. Infect. Dis.*,1980: 141:727–732.

**Payne, N. R., and Horwitz M. A.** “Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors”, *J. Exp. Med.*,1987: 166:1377–1389.

**Pedro – Botet, L. and Yu V.L.** “*Legionella*: macrolides or quinolones?”, *Clin. Microbiol. Infect.*,2006: 12 Suppl 3, 25-30.

**Pine, L., George, J.R. Reeves, M.W. et al.** “Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*”, *J. Clin. Microbiol.*,1979: 9:615–626.

**Plouffe, J. F., File T. M., Jr., Breiman R. F., et al.** “Reevaluation of the definition of Legionnaires’ disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group”, *Clin. Infect. Dis.*,1995: 20:1286–1291.

**Plouffe, J.F. et al.** “Reevaluation of the definition of Legionnaires’ disease: use of the urinary antigen assay. Community based pneumonia incidence Study group”. *Clin. Infect. Dis.*, 20 1995: 1286-1291.

**Plouffe, J.F., Breiman R.F., Fields B.S., et al.** “Azithromycin in the treatment of *Legionella pneumonia* requiring hospitalization”, *Clin. Infect.Dis.*, 2003: 37, 1475 – 1480.



**Pruckler, J. M., Benson R. F., Moyenuddin M., et al.** “Association of flagellum expression and intracellular growth of *Legionella pneumophila*”, *Infect. Immun.*,1995: 63:4928–4932.

**Public health Ontario.** “Monthly Infectious Diseases Surveillance Report”, Volume 3, Issue 5. May 2014.

**Qin T, Zhang W, Liu W, et al.** “Population structure and minimum core genome typing of *Legionella pneumophila*”, *Sci Rep* 2016:6:21356.

**R, Ohno A, Nakahara T, et al.** “*Legionella pneumophila* in rain water on roads”, *Emerg. Infect. Dis.*, 2009:15:1295– 1297.

**Ramirez, J. A., Ahkee S., Tolentino A., et al.** “Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory-infection using the polymerase chain-reaction on a single throat swab specimen”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*,1996: 24:7–14.

**Ramirez, J. A., and Summersgill J. T.** “Rapid tests for the diagnosis of *Legionella* infections”, *J. Ky. Med. Assoc.*,1994: 92:62–65.

**Ratcliff, R. M., Donnellan S. C., Lanser J. A., et al.** “Interspecies sequence differences in the Mip protein from the genus *Legionella*: implications for function and evolutionary relatedness”, *Mol. Microbiol.*,1997: 25:1149–1158.

**Ratcliff, R.M., Lanser J.A., Manning P.A. et al.** “Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene”, *J. Clin. Microbiol.* 1998: 36:1560–1567.

**Reidt U, Geisberger B, Heller C, et al.** “Automated immunomagnetic processing and separation of *Legionella pneumophila* with manual detection by sandwich

ELISA and PCR amplification of the ompS gene”, J.Lab.Autom., 2011: 16:157–164.

**Reuter S, Harrison TG, Koeser CU, et al.** “A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a Legionella outbreak”, BMJ Open 2013: 33(1): e002175.

**Rigby, E. W., Plouffe J. F., Hackman B. A., et al.** “Stability of *Legionella* urinary antigens over time”, Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,1997: 28:1–3.

**Rogers, J., and C. W. Keevil.** “Immunogold and fluorescein immunolabeling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy”, Appl. Environ. Microbiol.,1992: 58:2326–2330.

**Rogers, J., Dowsett A. B., and Keevil C. W.** “A paint incorporating silver to control mixed biofilms containing *Legionella pneumophila*”, J. Ind. Microbiol.,1995: 15:377–383.

**Rogers, J., Dowsett A. B., Dennis P. J., et al.** “Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora”, Appl. Environ. Microbiol.,1994: 60: 1585–1592.

**Roig J.,& Rello J.** “Legionnaires' disease: a rational approach to therapy”, J. Antimicrob. Chemother., 2003: 51(5):1119-29.

**Roig, J., Domingo C., and Morera J.** “Legionnaires’ disease”, Chest,1994: 105:1817–1825.

**Rosón, B., Carratalà J., Fernández-Sabé N., et al.** “Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia”, *Arch Intern Med.*, 2004: 164(5):502-8.

**Rossier, O., and Cianciotto N.** “Type II secretion is a subset of the pilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*”, *Infect. Immun.*, 2001: 69:2092–2098.

**Rowbotham, T. J.** “Current views on the relationships between amoebae, *legionellae* and man”, *Isr. J. Med. Sci.*, 1986:22:678–689.

**Rowbotham, T. J.** “Isolation of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from human feces with use of amebic cocultures”, *Clin. Infect. Dis.*, 1998: 26:502– 503.

**Rowbotham, T. J.** “*Legionella*-like amoebal pathogens”, 1993: p. 137–140. In J. M. Barbaree, R. F. Breiman, and A. P. Dufour (ed.), *Legionella: current status and emerging perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Rowbotham, T.J.** “Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae”, *J Clin Pathol.*, 1980: 33(12):1179-83.

**Rudin, J.E., Evans T.L., and Wing E.J.** “Failure of erythromycin in treatment of *Legionella micdadei* pneumonia”, *Am.J.Med.*, 1984: 76, 318-320.

**Ruehleman, S.A., and Crawford G.R.** “Panic in the potting shed: the association between *Legionella longbeachae* serogroup1 and potting soils in Australia”, *Med. J. Aust.*, 1996: 164:36–38.

**Ruutu, P., Valtonen V., Elonen E., et al.** “Invasive pulmonary aspergillosis: a diagnostic and therapeutic problem. Clinical experience with eight haematologic patients”, *Scand. J. Infect. Dis.*, 1987: 19, 569-575.

- Sadosky, A. B., Wiater L. A., and Shuman H. A.** “Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages”, *Infect. Immun.*,1993: 61:5361–5373.
- Sampson, J. S., Plikaytis B.B., Aloisio C.H. et al.** “Immunologic characterization and specificity of three monoclonal antibodies against the 58-kilodalton protein of *Legionella pneumophila*”, *J. Clin. Microbiol.*,1991: 29:836–841.
- Samrakandi, M.M., Cirillo S.L.G., Ridenour D.A., et al.** “Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains” *J.Clin.Microbiol.* 2002: 40:1352–1362.
- Sánchez-Busó L, Guiral S, Crespi S,et al.** “Genomic investigation of a legionellosis outbreak in a persistently colonized hotel”, *Front. Microbiol.* 2016:6:1556.
- Sanger, F., Nicklen S., Coulson A.R.** “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors”,*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1977: 74(12):5463-7.
- Saunders, N.A., Harrison, T.G., Kachwalla N., et al.** “Identification of species of the genus *Legionella* using a cloned rRNA gene from *Legionella pneumophila*”, *J. Gen. Microbiol.*,1988b: 134: 2363-74.
- Saunders, N.A., Kachwalla N., Harrison T.G., et al.** “Cloned nucleic acid probes for detection and identification of *Legionellae*”, *Analyt. Proceed.*, 1988a: 25: 128-29.
- Segal G, Russo J., Shuman H.A.** “Relationships between a new type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*”, *Mol. Microbiol.*, 1999: 34(4):799-809.

**Sethi, S., Gore M.T., Sethi K.K.** “Increased sensitivity of a direct fluorescent antibody test for *Legionella pneumophila* in bronchoalveolar lavage samples by immunomagnetic separation based on BioMags”, *J.Microbiol. Methods.*, 2007: 70:328–335.

**Socan, M., Kese D., and Marinic-Fisher N.** “Polymerase chain reaction for detection of *Legionellae* DNA in urine samples from patients with community-acquired pneumonia”, *Folia Microbiol.*, 2000: 45:469–472.

**Solomon, J. M., Rupper A., Cardelli J. A., et al.** “Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions”, *Infect. Immun.*, 2000: 68:2939–2947.

**Starnbach, M. N., Falkow S., and Tompkins L. S.** “Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization”, *J. Clin. Microbiol.*, 1989: 27:1257–1261.

**States, SJ et al.** “Temperature and the survival and multiplication of *Legionella pneumophila* associated with *Hartmannella vermiformis*”, In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP, eds. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington, DC, American Society for Microbiology: 1993: 147 – 149.

**Steele, T. W.** “Legionnaires’ disease in South Australia, 1979–1988” *Med. J. Aust.*, 1989: 151:322, 325–326, 328.

**Steele, T. W.** “Legionnaires’ disease in South Australia”, 1979–1988. *Med. J. Aust.*, 1989: 151:322, 325–326, 328.

**Steinmetz, I., Rheinheimer C., Hubner I. et al.** “Genus-specific epitope on the 60-kilodalton *Legionella* heat shock protein recognized by a monoclonal antibody”, *J. Clin. Microbiol.*, 1991: 29:346–354.

**Stone, B. J., and Abu Kwaik Y.**“Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells”, *Infect. Immun.*,1998: 66:1768–1775.

**Stout, J.E., Arnold B., and Yu V.L.**“Activity of azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, dirithromycin, quinopristin/dalfopristin and erythromycin against *Legionella* species by intracellular susceptibility testing in HL-60 cells”, *J. Antimicrob. Chemother.*,1998: 41, 289-291.

**Stout, J.E., Sens K., Mietzner S., et al.**“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, 302-307.

**Stout, J.E., Joly J., Para M., et al.**“Comparison of molecular methods for subtyping patients and epidemiologically linked environmental isolates of *Legionella pneumophila*”, *J. Infect. Dis.*,1988: 157:486–495.

**Swanson, M. S., and Isberg R. R.**“Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum”, *Infect. Immun.*, 1995: 63:3609– 3620.

**Swanson, M.S., and Hammer B.K.**“*Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages”, *Annu. Rev. Microbiol.*,2000: 54:567–613.

**Tan M.J., Tan J.S., Hamor R.H. et al.** “The radiologic manifestations of Legionnaires’ disease. The Ohio Community-Based Pneumonia Incidence Study Group”, *Chest*, 2000 :117, 398-403.

**Tan, J.S., FileDiPersio J.R., DiPersio L.P., et al.**“Persistently positive culture results in a patient with community-acquired pneumonia due to *Legionella pneumophila*”, Clin. Infect.Dis.,2001: 32, 1562-1566.

**Tang, P. W., and Toma, S.**“Broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Legionella* soluble antigens”, J. Clin. Microbiol.,1986: 24:556–558.

**Tang, P. W., Toma S., and W. D. Rajkumar.**“Detection of urinary antigens of *Legionella pneumophila* serogroup 12 by broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay”, J. Clin. Microbiol.,1989: 27:783–784.

**Tang, P., and C. Krishnan.**“*Legionella* antigenuria: six-year study of broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay as a routine diagnostic test” 1993: p.12–13. In J.M.Barbaree, R.F.Breiman, and A.P.DuFour (ed.), *Legionella: current status and emerging perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Tatlock, H.A.**“*Rickettsia*-like organism recovered from guinea pigs”, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1944: 57:95–99.

**Taylor, A. G., and Harrison T. G.**“Serological tests for *Legionella pneumophila* serogroup 1 infections”, Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A,1983: 255:20–26.

**Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. et al.** “Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing” J. Clin. Microbiol. 1995 Sep;33(9):2233-9.

**Terranova, W., Cohen M.L., and Fraser D.W.**“1974 outbreak of Legionnaires’ Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features”, Lancet 2,1978: 122-124.

**Thacker, S.B., Bennett J.V., Tsai T.F., et al.** “An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires’ disease bacterium”, *J. Infect. Dis.*,1978: 138: 512 – 519.

**Thacker, W.L., Benson R.F., Schiffman R.B., et al.**“*Legionella tucsonensis* sp. nov. isolated from a renal transplant recipient”, *J. Clin. Microbiol.*,1989: 27:1831–1834.

**Thacker, W.L., Plikaytis B.B., and Wilkinson H.W.**“Identification of 22 *Legionella* species and 33 serogroups with the slide agglutination test”, *J. Clin. Microbiol.*,1985: 21:779–782.

**The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** “Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters”, Version 5.0, 2015.  
<http://www.eucast.org>

**Tilton, R.C.** “Legionnaires’ disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay”, *Ann. Intern. Med.*,1979: 90:697–698.

**Tison, D.L., Pope D.H., Cherry W.B., et al.** “Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria)”, *Appl Environ Microbiol.*, 1980: 39(2):456-9.

**Tkatch, L.S.,Kusne S., Irish W.D.et al.** “Epidemiology of *legionella pneumophila* and factors associated with legionella-related mortality at a tertiary care center”,*Clin. Infect. Dis.*, 1998: 27(6):1479-86.

**Tossa P., Deloge-Abarkan M., Zmirou-Navier D, et al.** “Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies”, in *Legionella* molecular microbiology book, Klaus Heuner and Michelle Swanson, eds (Norflock, UK, CAP), 2008: pp 9-14.



**US Department of Health and Human Services-Public Health Service-Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health,** “*Legionella pneumophila*; other *Legionella*-like agents”, In Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, J.Y. Richmond and R.W. McKinney, eds. (Washington, DC: US Government Printing Office), 1993: pp. 92-93.

**van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al.** “Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology”, Clin. Microbiol. Infect. 2007;13(Suppl 3):1–46.

**Van Weemen, B.K., Schuurs A.H.W.M.**, "Immunoassay using antigen—enzyme conjugates". FEBS Letters.,1971: 15 (3): 232–236.

**Venkataraman, C, Haack BJ, Bondada S et al.**“Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires’ disease bacterium”, J. Exp. Med. 1997: 186:537 – 547.

**Vesey, G., Dennis P.J., Lee J.V., et al.**“Further development of simple tests to differentiate the *legionellas*”, J. Appl. Bacteriol.,1988: 65:339–345.

**Vickers, R.M., Brown A., and Garrity G.M.** “Dye-containing buffered charcoal-yeast extract medium for differentiation of members of the family *Legionellaceae*”, J. Clin. Microbiol.,1981: 13:380–382.

**Vickers, R.M., Stout J.E., Yu V.L., et al.**“Manual of culture methodology for *Legionella*”, Semin. Respir. Infect.,1987: 2:274–279.

**Vogel, J.P., Andrews H.L., Wong S.K., et al.**“Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*”, Science,1998: 279: 873–876.

**Wadowsky, R.M. and Yee RB.** “Effect of non-*Legionellaceae* bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water”, *Appl Environ Microbiol.*, 1985: 49(5):1206-10.

**Walker, J. T., Sonesson A., Keevil C. W., et al.**“Detection of *Legionella pneumophila* in biofilms containing a complex microbial consortium by gas chromatography-mass spectrometry analysis of genus-specific hydroxy fatty acids”, *FEMS Microbiol. Lett.*,1993: 113:139–144.

**Weir, S. C., Fischer S. H., Stock F., et al.**“Detection of *Legionella* by PCR in respiratory specimens using a commercially available kit”, *Am. J. Clin. Pathol.*,1998: 110:295–300.

**Wilkinson, H. W., and Brake B. J.**“Formalin-killed versus heat-killed *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in the indirect immunofluorescence assay for legionellosis”, *J. Clin. Microbiol.*,1982: 16:979–981.

**Wilkinson, H. W., Cruce D. D., and BroomeC. V.** “Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera”, *J. Clin. Microbiol.*,1981: 13:139–146.

**Wilkinson, H. W., Farshy C. E., Fikes B. J., et al.**“Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *Legionella pneumophila* and inhibition of titers against non specific, gram negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis”, *J. Clin. Microbiol.*,1979: 10:685–689.

**Wilkinson, H. W., FikesB. J. and CruceD. D.**“Indirect immunofluorescence test for serodiagnosis of Legionnaires disease: evidence for serogroup diversity of Legionnaires’ disease bacterial antigens and for multiple specificity of human antibodies”, *J. Clin. Microbiol.*,1979: 9:379–383.

**Wilkinson, H. W., Reingold A. L., Brake B. J., et al.**“Reactivity of serum from patients with suspected legionellosis against 29 antigens of *legionellaceae* and *Legionella* like organisms by indirect immunofluorescence assay”, J. Infect. Dis.,1983: 147: 23–31.

**Wilkinson, H. W.**“Hospital-laboratory diagnosis of *Legionella* infections”,U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.1987.

**Wilkinson, I.J., Sangster N., Ratcliff R.M., et al.**“Problems associated with identification of *Legionella* species from the environment and isolation of six possible new species”, Appl. Environ. Microbiol.,1990: 56:796–802.

**Williams, A., and Lever M. S.**“Characterisation of *Legionella pneumophila* antigen in urine of guinea pigs and humans with Legionnaires’ disease”, J. Infect.,1995: 30:13–16.

**Wilson, D. A., Yen-Lieberman B., Reischl U.,et al.** “Detection of *Legionella pneumophila* by Real-Time PCR for the mip Gene”, J. Clin. Microbiol., 2003: 41(7): 3327–3330.

Wolter N. “Legionnaires’ Disease in South Africa, 2012–2014”.  
(www.cdc.gov/eidVol.22, No.1, 2016)

[www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella)

[/sbt/seq\\_assemble\\_legionella1.cgi](http://sbt/seq_assemble_legionella1.cgi)

[www.hpa-bioinfotools.org.uk/legionella/php/sbt\\_query1.php](http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/legionella/php/sbt_query1.php)

[www.keelpno.gr](http://www.keelpno.gr)

[www.oxid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=DR0800&c=uk&lang=EN  
&minfo=Y](http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=DR0800&c=uk&lang=EN&minfo=Y)

**Yanez, M.A., Carrasco-Serrano C., Barbera V.M., et al.**“Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene”, *App.l Environ. Microbiol.*,2005: 71:3433–3441.

**Yonke, C. A., Stiefel H. E., Wilson D. L., et al.**“Evaluation of an indirect hemagglutination test for *Legionella pneumophila* serogroups 1 to 4”, *J. Clin. Microbiol.*,1981: 13:1040–1045.

**Yu VL, Plouffe JF, Castellani Pastoris M, et al.**“Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey”, *J. Infect. Dis.*, 2002: 186:127–128.

**Yu, V.L.**“Nosocomial legionellosis”, *Curr. Opin. Infect. Dis.*,2000: 13, 385-388.

**Yu,V.,Greenberg L., Zadeikis R.N.,et al.**“Levofloxacin efficacy in the treatment of community-acquired legionellosis”, *Chest*,2004: 125, 2135-2139.

**Zhang Q, Zhou H, Chen R, et al.**“Legionnaires’ disease caused by *Legionella pneumophila* 5 and 10, China”, *Emerg. Infect. Dis.*,2014: 20:1242–1243.

**Zimmerman, S. E., French M. L., Allen S. D., et al.**“Immunoglobulin M antibody titers in the diagnosis of Legionnaires’ disease”, *J. Clin. Microbiol.*,1982: 16:1007–1011.

**ΔΥΓ2/οικ.118578**, (12-12-2012) «Ενημέρωση της Υπηρεσίας μας επί ενεργειών σας σε περιπτώσεις Κρουσμάτων που οφείλονται στη νόσο των λεγεωναρίων και στην ακαταλληλότητα της ποιότητας του πόσιμου νερού»

**ΔΥΓ2/οικ.70777**,(12-07-2012) «Πρόληψη της νόσου των Λεγεωναρίων»

**ΚΥΓ1(δ)/ ΓΠ οικ.67322**, (19-9-2017) «Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της Οδηγίας 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης, της 3ης Νοεμβρίου 1998 όπως τροποποιήθηκε με την Οδηγία (ΕΕ) 2015/1787 (L260,7.10.2015).