

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΤΖΑΒΑΡΑ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

Μεταπτυχιακή διατριβή

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ
ΜΟΡΙΑΚΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΛΕΓΙΟΝΕΛΛΑΣ
ΠΝΕΥΜΟΦΙΛΗΣ (LEGIONELLA PNEUMOPHILA) ΣΕ
ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ (εμφιαλωμένα, ψύκτες κλπ).**



ΛΑΡΙΣΑ 2013

Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανίχνευση και
μοριακό χαρακτηρισμό *Legionella pneumophila* σε
πόσιμο νερό (εμφιαλομένα, ψύκτες)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη
Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Επίκουρος καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΚΟΜΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Αναπληρωτής καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση
βιοδραστικών μορίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση αυτού του θέματος και την πολύτιμη βοήθεια του στη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την κα Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα Διδάκτορα, μέλος Ε.Ε.ΔΙΠ. για το ενδιαφέρον και την άριστη συνεργασία μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ακόμη, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές Μόσιαλο Δημήτριο και Κομιώτη Δημήτριο για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή κατά την αξιολόγηση της εργασίας μου.

Ακόμη ένα ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου για την συμπαράστασή τους και την βοήθειά τους στην ερευνητική εργασία.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου και στον αδερφό μου για την προσφορά τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι λεγιονέλλες είναι βακτήρια που απομονώνονται από τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, αλλά και από τα νερά της υδρεύσεως και τα όργανα του ανθρώπου. Δεν αποικίζουν το σώμα του ανθρώπου αλλά προκαλούν νόσο κυρίως του αναπνευστικού συστήματός του με θνητότητα 10-15%. Από όλα τα είδη λεγιονέλλων, το συχνότερο είναι η *Legionella pneumophila*.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση της *Legionella pneumophila* σε πόσιμα νερά.

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, γνωστή ως αντίδραση PCR, αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την ανίχνευση λοιμώξεων που προκαλούνται από τα γνωστά είδη *Legionella*. Διάφορες δοκιμές PCR έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση του βακτηρίου, χρησιμοποιώντας ειδικές DNA αλληλουχίες για την *Legionella pneumophila*.

Στην παρούσα έρευνα συλλέχθηκαν συνολικά 33 δείγματα εκ των οποίων τα 26 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης, τα 4 ήταν εμφιαλωμένα νερά που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο, τα 2 ήταν από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων και το 1 προέρχονταν από εν λειτουργία μηχανήμα ψύκτη νερού.

Σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκε PCR για *Legionella* και PCR για *Legionella pneumophila*. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Από τα 33 δείγματα τα 4 βρέθηκαν θετικά και για τις 2 PCR. Αυτά τα δείγματα είχαν συγκεντρωθεί από σπίτια ασθενών, που νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομείο για *Legionella pneumophila*. Στα υπόλοιπα 29 δείγματα πόσιμου νερού που εξετάστηκαν με τις μεθόδους και τις τεχνικές που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύτηκε *Legionella pneumophila*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας μας, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος μόλυνσης του πληθυσμού από λεγιονέλλα μέσω των συστημάτων οικιακής χρήσης ζεστού ή κρύου νερού.

Κρίνεται σκόπιμο επομένως, η απαγόρευση που υπάρχει από τη νομοθεσία στην χρήση αυτών των συστημάτων από τον πληθυσμό, όταν υπερβαίνονται τα όρια περιεκτικότητας με *Legionella pneumophila* στο δίκτυο ύδρευσης, να συνεχίσει να εφαρμόζεται πιστά και με ακρίβεια.

ABSTRACT

Legionellas are bacteria which are collected from lake's and river's surface water, from supplied water and human organs. They do not colonize the human body but mainly cause disease of the respiratory system with 10-15% mortality. Of all *Legionella* species, the most common is *Legionella pneumophila*.

A total of 33 samples were collected of which 26 were from the network of water supplies, 4 were bottled waters marketed in, 2 were from food processing plants and 1 from water cooler machine operation. To each sample was applied to PCR for *Legionella* and PCR for *Legionella pneumophila*. The results were:

Of the 33 samples 4 were found positive for *Legionella pneumophila*. These samples were collected from patients' homes, who were hospitalized for *Legionella pneumophila*. In the remaining 29 samples of drinking water that were tested with the methods and techniques described in the present study *Legionella pneumophila* was not detected.

According to the results of our work, there is a real risk of *Legionella* infection from household systems of hot or cold water.

The population must be protected by the prohibition of the use of water supply, in the case where the levels of the detected *Legionella pneumophila* exceed the permissible limits.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΓΕΝΙΚΑ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
LEGIONELLA PNEUMOPHILA	
1.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	11
1.1.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	13
1.1.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	13
1.1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ-ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	14
1.1.5. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ. ΟΡΟΤΥΠΙΑ	15
1.1.6. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ	15
1.1.7. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ	19
1.1.8. ΝΟΣΟΙ	22
1.1.9. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ	23
1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ – ΓΕΝΙΚΑ	24
1.2.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	24
1.2.2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
1.2.3. ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
1.3.1. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΣΕ ΥΠΟΓΕΙΑ ΥΔΑΤΑ ...	30
1.3.2 ΜΕΤΑΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ	32
1.3.3. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	33
ΣΚΟΠΟΣ	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	35
2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	37
2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ – ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ	37
2.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΘΙΣΗΣΗΣ ΜΕ PEG	38
2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA	39
2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION)..	40
2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	41
2.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	42

2.7 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ ΓΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ LEGIONELLA ΚΑΙ LEGIONELLA PNEUMOPHILA	45
3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ PCR	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι λεγιονέλλες ανήκουν στην Οικογένεια των Legionellaceae η οποία περιλαμβάνεται στην ομάδα των Αεροβίων/Μικροαεροφίλων Gram αρνητικών Βακτηριδίων και Κόκκων κατά τη νέα ταξινόμηση των μικροβίων στο Bergey's Manual of Systemic Bacteriology.

Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, αζυμωτικά, απαιτητικά, που έχουν ανάγκη από κυστεΐνη και ενώσεις σιδήρου, για την ανάπτυξή τους, αερόβια, κινούμενα. Απομονώνονται από τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, αλλά και από τα νερά της υδρεύσεως και τα όργανα του ανθρώπου. Δεν αποικίζουν το σώμα του ανθρώπου αλλά προκαλούν νόσο κυρίως του αναπνευστικού.

Στο γένος των Legionella ανήκουν 20 είδη από τα οποία τα 15 ακόλουθα έχουν απομονωθεί από πάσχοντες ανθρώπους.

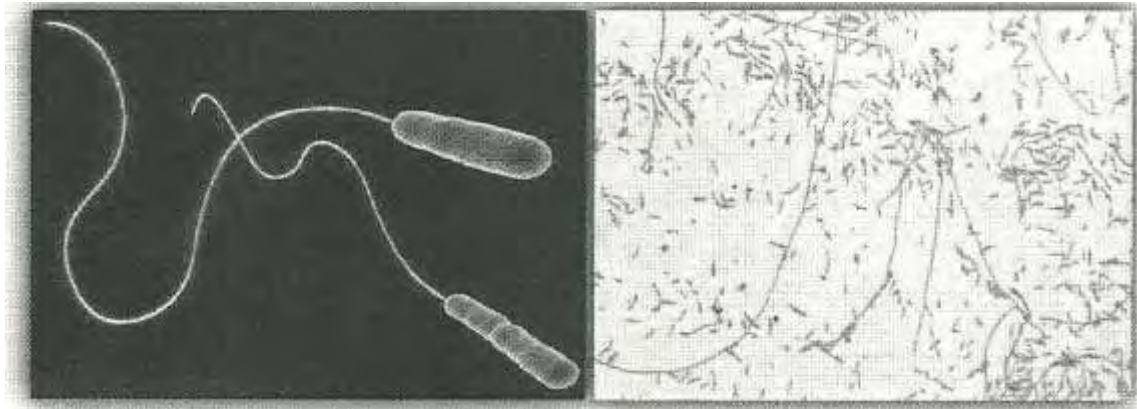
Legionella pneumophil	L. birminghamensis
L. micdadei	L. ciniciensis
L. bozemanii	L. longbeachae
L. dumofii	L. anisa
L. feeleii	L. oakridgensis
L. gormanii	L. wadsworthii
L. hackeliae	L. maceachernii
L. jordanis	L. tusconensis

Από τα είδη αυτά το συχνότερο είναι η Legionella pneumophila και σε μεγάλη απόσταση συχνότητας η L. micdadei και ακόμη σπανιότερες οι άλλες λεγιονέλλες.

Τα μη παθογόνα (προς το παρόν) είδη είναι τα εξής: L. bunensis, L. cherii, L. erythra, L. jamestowniensis, L. israelensis, L. moravica, L. parisis, L. quinlivanii, L. rubilucens, L. sainthelensi, L. santacrucis, L. spiritensis, L. steigerwaltii.

Η αναγνώριση νέων ειδών γίνεται με βάση την τεχνική των DNA ομολόγων. Οι λοιπές καλλιεργητικές ή βιολογικές διαφορές δεν αρκούν για το διαχωρισμό των ειδών. Σαφή διαχωριστική ιδιότητα παρουσιάζει το

είδος *L. micdadei* που στις ιστολογικές τομές και στα πτύελα εμφανίζεται σαν οξυάντοχο με ειδική χρώση σε αντίθεση με όλα τα άλλα είδη.



Εικόνα 1: Αριστερά, τρισδιάστατη απεικόνιση του βακτηρίου *Legionella*. Δεξιά, Χρώση Gram της *Legionella pneumophila*

LEGIONELLA PNEUMOPHILA

1.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η Legionella εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1977 από το Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου ασθενειών (CDC), μετά από επιδημία πνευμονίας, που παρουσίασε μεγάλος αριθμός βετεράνων της Αμερικανικής Λεγεώνας. Κατά την διάρκεια παρακολούθησης συνεδρίου το έτος 1976, στο ξενοδοχείο Bellevue Stratford στην Φιλαδέλφεια της Πενσυλβάνιας στις Η.Π.Α., αναφέρθηκαν 221 κρούσματα πνευμονίας, εκ των οποίων 34 κατέληξαν σε θάνατο. Η επιδημιολογική διερεύνηση των κρουσμάτων κατέληξε στο συμπέρασμα πως ένα βακτήριο ήταν υπεύθυνο για την επιδημία, που αργότερα ονομάστηκε Legionella pneumophila. Το όνομα Legionella το πήρε προς τιμήν των βετεράνων της Αμερικανικής Λεγεώνας που επλήγησαν, ενώ το όνομα pneumophila έχει ελληνική ρίζα, που σημαίνει προτίμηση στους πνεύμονες.

Ετεροχρονισμένα, ανασύροντας από την τράπεζα κατεψυγμένων ορών, δείγματα ιστών 50 ετών από αρρώστους με την ίδια συμπτωματολογία, αποκαλύφθηκε πως και τότε ο αιτιολογικός παράγοντας ήταν η Legionella, ενώ περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων οδήγησε στην ταυτοποίηση των υποομάδων Legionella, όπως Legionella micdadei, Legionella pneumophila και Legionella bozemanii (McDade 2002). Η Νόσος των Λεγεωνάριων μέχρι εκείνη την χρονική στιγμή ήταν άγνωστη, οπότε επρόκειτο για μια παλιά ασθένεια που όμως αναγνωρίστηκε μόλις το 1976 (Fang et al 1989).

Πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές έρευνες, για να εξακριβωθεί η αιτία κάποιων επιδημιών που μέχρι τότε παρέμενε άγνωστη. Η πρώτη επιδημία πνευμονίας, με 81 ασθενείς και 14 θανάτους, κατά την οποία τα κρούσματα είχαν μολυνθεί με το βακτήριο Legionella pneumophila εμφανίστηκε το 1965 στο νοσοκομείο St.Elizabeth στην Ουάσιγκτον. Η δεύτερη ανεξακρίβωτη επιδημία πνευμονίας ήταν στην Ισπανία το 1973 και η τρίτη το 1974 στο ίδιο ξενοδοχείο της Φιλαδέλφειας που είχε ξεσπάσει το 1976 και η επιδημία της Αμερικανικής Λεγεώνας. Κάποια σποραδικά κρούσματα της νόσου είχαν εμφανιστεί την χρονιά του 1943, του 1947 και του 1959 (Brenner DJ1987).

Η *Legionella* είναι ένα Gram αρνητικό αερόβιο βακτήριο το οποίο ανιχνεύεται στο υδάτινο περιβάλλον (Fields et al 2002). Ο όρος «Νόσος των Λεγεωνάριων» καθορίζει την πνευμονία που προκαλούν τα είδη της *Legionella*, ενώ ο όρος Legionellosis αναφέρεται στα κλινικά σύνδρομα που προκαλούνται από τα βακτήρια του γένους *Legionella*. Ο πυρετός Pontiac αναφέρεται σε μια ήπιας μορφής τύπου γρίπης, βραχείας διάρκειας. Η *Legionella* προκαλεί οξεία βακτηριακή λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος με θνητότητα 10-15%.



Εικόνα 2: Σχηματική περιγραφή βακτηρίου *Legionella*

1.1.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Λεπτό, μακρύ, πολύμορφο, Gram αρνητικό βακτηρίδιο, διαστάσεων 0,5-0,7x2-20 μm κινούμενο με 1-2 ή περισσότερες πολικές ή πλάγιες βλεφαρίδες, άσπορο, αερόβιο. Η συμπεριφορά του στη Gram διαφέρει από αυτήν των άλλων Gram αρνητικών βακτηριδίων. Ενώ χρωματίζεται με την πρώτη χρωστική και αποχρωματίζεται με το οινόπνευμα δεν μεταχρωματίζεται με τη δεύτερη χρωστική, δηλαδή με τη σαφρανίνη. Για το λόγο αυτό δεν αναγνωρίζεται στην άμεση μικροσκοπική εξέταση κλινικού δείγματος.

Στα ιστολογικά παρασκευάσματα χρωματίζεται με τις αργυρούχες χρωστικές και στα άμεσα μικροβιολογικά παρασκευάσματα κλινικού υλικού με φθορίζοντα αντισώματα στο μικροσκόπιο φθορισμού.

1.1.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Δεν αναπτύσσεται στα κοινά και στα συνήθη αιματούχα θρεπτικά υλικά γιατί έχει ανάγκη κυστεΐνης και ιόντων σιδήρου για την ανάπτυξή του.

Ειδικό υλικό για την ανάπτυξη των λεγιονελλών είναι το BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) άγαρ. Άλλα υλικά είναι το CYE, όπως το BCYE χωρίς τα ρυθμιστικά άλατα, το F-G άγαρ (Feeley-Gorman). Αναπτύσσεται και σε υγρά θρεπτικά υλικά εμπλουτισμένα καταλλήλως.

Αν δεν υπάρχουν τα ειδικά αυτά θρεπτικά υλικά μπορεί να γίνει σπορά σε υλικό Mueller-Hinton εμπλουτισμένο με αιμοσφαιρίνη και IsoVitaleX. Σε πτωχά υλικά υγρά μπορεί να αναπτυχθεί εφόσον συνυπάρχουν ζωντανά κύτταρα όπως αμοιβάδες ή ακόμη και σε νερό με παρουσία φωτοσυνθετικών βακτηριδίων, αμοιβάδων, μαστιγοφόρων κ.ά. Αναπτύσσεται σε συνθετικά υλικά με αμινοξέα και άλατα σιδήρου, σε κυτταροκαλλιέργειες σαν ενδοκυττάριο παράσιτο. Δεν αναπτύσσεται στο χλωριωμένο και το αποσταγμένο νερό.

Η επώαση των καλλιεργημάτων γίνεται αερόβια ή παρουσία λίγου CO₂ (5%) σε θερμοκρασία 37° C για 3-5 ημέρες που αν δεν αναπτυχθούν αποικίες παρατείνεται μέχρι και 7 ημέρες.

Οι αποικίες στα υλικά αυτά είναι μικρές, κυκλικές με σαφή όρια, γκρίζες, γυαλιστερές, ή σαν από τριμμένο γυαλί. Σε υλικά που περιέχουν τυροσίνη παρατηρείται καστανή χροιά στο υλικό γύρω από τις αποικίες. Μερικά είδη λεγιονελλών παρουσιάζουν γαλαζόλευκο ιριδισμό.

Προκειμένου για καλλιέργεια αίματος μπορεί να χρησιμοποιεί διφασικό υλικό με το BCYE άγαρ και ζωμό με κυστεΐνη.

1.1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ – ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι λεγιονέλλες δεν διασπούν κανένα σάκχαρο ούτε φυσικά και τη γλυκόζη. Πηγή άνθρακος και ενέργειάς τους είναι τα αμινοξέα. Υδρολύουν το άμυλο. Οι βασικές ιδιότητες για το είδος *L. pneumophila* και το είδος *L. micdadei* αναγράφονται στον πίνακα 1.

Οι χαρακτήρες αυτοί δεν αρκούν για την ταυτοποίησή των. Απαιτείται ορολογική ταυτοποίηση, χρωματογραφικό προφίλ των λιπαρών οξέων της επιφάνειάς του, κ.ά.

Πίνακας 1. Ιδιότητες διαχωριστικές μεταξύ δύο ειδών λεγιονελλών

Ιδιότητες	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. micdadei</i>
Γλυκόζη (F/O)	-	-
Οξειδάση	-/W	+
Καταλάση	+	+
Ουρεάση	-	-
NO ₃	-	-
Πηκτής ρευστοποίηση	+	+
Ιππουρικού υδρόλυση	+	-
β-λακταμάση παραγωγή	+	-
Κινητικότητα	+	+
Ιριδισμός	-	-
Οξεοφιλία	-	+ (στο κλινικό υλικό)

1.1.5. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ. ΟΡΟΤΥΠΙΑ

Τα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση και το διαχωρισμό των στελεχών των λεγιονελλών σε τύπους είναι τα εξής:

α) Πλέγμα διακλαδιζομένων και μη διακλαδιζομένων αλυσίδων λιπαρών οξέων στο κυτταρικό τοίχωμα χαρακτηριστικών του γένους. Εξετάζονται με υγρή χρωματογραφία.

Αυτά και το μοναδικό για τα προκαρυωτικά dihydro επιτρέπουν την ταυτοποίηση του γένους και του είδους.

β) Αντιγόνα από ολόκληρο το μικροβιακό σώμα. Τα αντισώματα προς τα αντιγόνα αυτά επιτρέπουν το διαχωρισμό των στελεχών της *L. pneumophila* σε 14 ορολογικούς τύπους καθώς και στελεχών των άλλων ειδών. Συνολικά από τα 29 είδη των λεγιονελλών έχουν ταυτοποιηθεί 70 ορότυποι. Στις ορολογικές αυτές αντιδράσεις δεν είναι γνωστό ποιο ή ποιά είναι τα συγκεκριμένα αντιγόνα που αντιδρούν με τους αντι-ορούς. Μπορεί να προέρχονται από την εξωτερική μεμβράνη, από το κυτταρικό τοίχωμα ή την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η οροτυπία με τους αντιορούς αυτούς γίνεται με τη μέθοδο του άμεσου ανοσοφθορισμού.

Στο εμπόριο κυκλοφορεί πολυδύναμος αντι-ορός για τους ορότυπους από 1 έως 6. Ο ορότυπος 1 είναι ο συχνότερος, βρίσκονται όμως σε κλινικά υλικά και άλλοι ορότυποι.

1.1.6. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ

Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως ο βαθμός παθογένειας του βακτηρίου είναι άμεσα συνδεδεμένος με την οικολογία του. Πρώτος ο Rowbotham απέδειξε πως η *L. pneumophila* μπορεί να μολύνει αμοιβάδα και ο Horwitz's με κλασσικές τεχνικές απέδειξε πως μπορεί επίσης να πολλαπλασιαστεί ενδοκυτταρικά σε μακροφάγα (Rowbotham TJ.1980).



Εικόνα 3: Ηλεκτρονική μικρογραφία αμοιβάδας, καθώς παγιδεύει ένα βακτήριο *Legionella pneumophila*

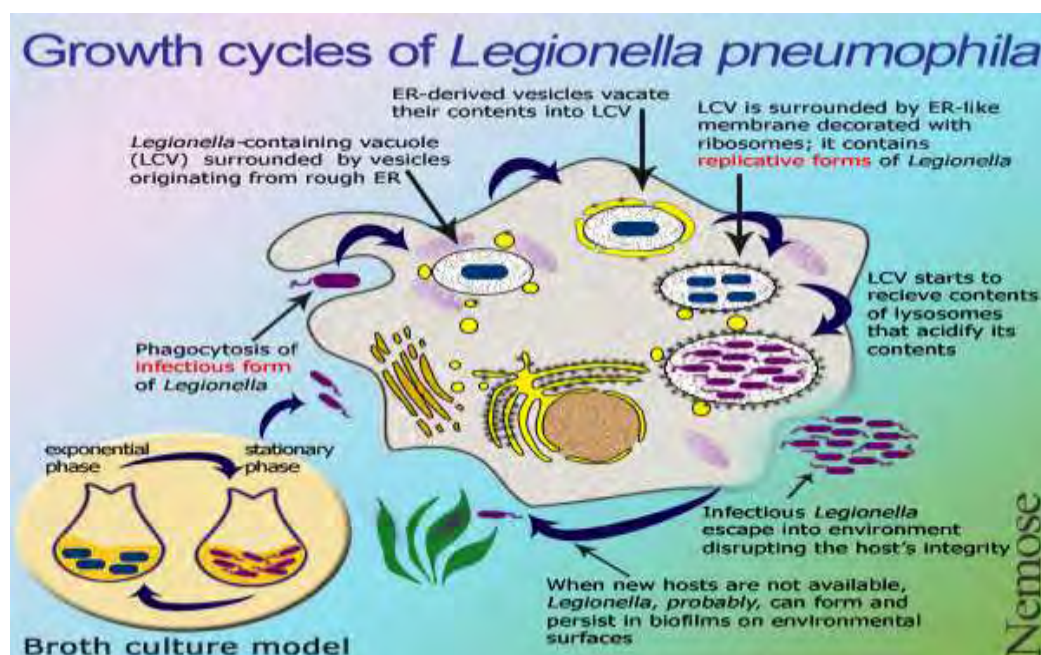
Η συγκεκριμένη ηλεκτρονική μικρογραφία δείχνει μια αμοιβάδα, την *Hartmannella vermiformis* (πορτοκαλί περιοχή) καθώς παγιδεύει ένα βακτήριο *Legionella pneumophila* (πράσινο) με ένα προεκτεταμένο ψευδόποδο.

Μετά την εισαγωγή του, το βακτήριο της *Legionella pneumophila* μπορεί να επιζήσει σαν συμβιωτικό εντός αυτού που μετέπειτα γίνεται το πρωτόζωο ξενιστής. Η αμοιβάδα στην συνέχεια γίνεται αυτό που αποκαλείται «Δούρειος Ίππος», διότι εσωκλείει το παθογόνο βακτήριο, και η αμοιβάδα μπορεί να του προσφέρει προστασία, και μάλιστα, σε περιπτώσεις δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών, είναι ικανή να μεταμορφωθεί σε κυστική μορφή ενεργοποιώντας το, και τα συμβιωτικά παθογενή βακτήρια να αντέξουν σε τέτοιες περιβαλλοντικές δύσκολες καταστάσεις.

Ο κύκλος ζωής της *Legionella* είναι παρόμοιος σε πρωτόζωα και σε μακροφάγα. Βέβαια υπάρχουν κάποιες διαφορές όσο αναφορά τον μηχανισμό εισόδου και εξόδου του βακτηρίου από το αντίστοιχο είδος κυττάρου-ξενιστή.

Έχει διαπιστωθεί από μελέτες πως δεν μπορούν όλα τα είδη να μολύνουν τα μακροφάγα. Ωστόσο η *L.pneumophila*, διαθέτοντας τους παράγοντες τοξικότητας, μπορεί να μολύνει και να αναπαραχθεί σε

διάφορα πρωτόζωα, που βρίσκονται στο χώμα και στο νερό (Cianciotto NP 2001).

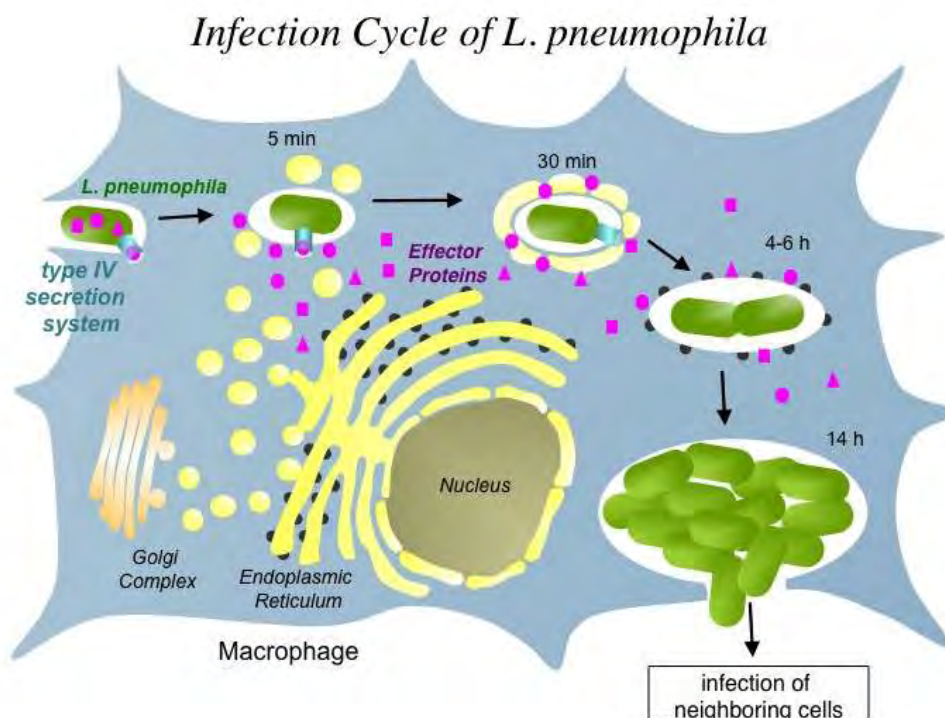


Εικόνα 4: Ο κύκλος ζωής του βακτηρίου *L.pneumophila*

Ο κύκλος ζωής του βακτηρίου έχει δύο ξεχωριστές φάσεις. Μία κυτταρική φάση, κατά την οποία τα βακτήρια έχουν χαμηλή ή ανύπαρκτη τοξικότητα, χωρίς κινητικότητα και μία φάση μετάδοσης. Η μολυσματική φάση συμβαίνει μετά από ένα μετασχηματισμό των βακτηρίων κατά τον οποίο τα βακτήρια μορφολογικά είναι παχοί, κοντοί βλεφαριδοφόροι ράβδοι, ευαίσθητα στο νάτριο, ανθεκτικά και δεν διαθέτουν την ικανότητα να αναπαραχθούν (Steinert et al 2002, Swanson M.Updated 2007). Σε αυτό το στάδιο κινούνται λόγω της αύξησης των μαστίγιων τους και εμφανίζουν τοξικότητα στον ξενιστή τους. Όταν βρίσκονται σε αυτό το στάδιο αναζητούν κάποιο κύτταρο ξενιστή προκειμένου να το μολύνουν.

Όταν τα βακτήρια βρουν κάποιο κύτταρο ξενιστή εισέρχονται στο φαγόσωμα με την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης (McCoy WF 2005). Ωστόσο, μόνο τα μολυσματικά στελέχη μπορούν να πολλαπλασιαστούν στο εσωτερικό των φαγοκυττάρων, αναστέλλοντας επίσης την σύντηξη του φαγοσώματος με το λυσόσωμα (Horwitz MA1993). Αυτό οδηγεί στον

θάνατο των μακροφάγων και στην απελευθέρωση από το κύτταρο, μεγάλου αριθμού βακτηρίων *Legionella*. Στην συνέχεια τα βακτήρια μπορούν να μολύνουν άλλα μακροφάγα.



Εικόνα 5: Κύκλος μόλυνσης της *L. pneumophila*

Η *L. Pneumophila* μεταφέρει ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που επιδρούν μέσα στο κύτταρο ξενιστή μέσω ενός κωδικοποιημένου συστήματος (T4SS) τύπου IV με την ονομασία Dot/Icm. Γνωρίζουμε ελάχιστα για την μοριακή λειτουργία αυτών των διαμεταφερόμενων υποστρωμάτων. Τα μεταλλαγμένα βακτήρια με ένα ελαττωματικό Dot/Icm σύστημα είναι αμολυσματικά, καταδεικνύοντας την μεγάλη σημασία των επιδρώντων πρωτεϊνών για την παθογένεση *L. Pneumophila*.

Μετά την εισχώρηση στο κύτταρο- ξενιστή, η *L. Pneumophila* ακαριαία επιστρατεύει μεταφορικά κυστίδια στην επιφάνεια του κυτταρικού κενού (LCV), που περιέχει *L. Pneumophila*, για να δημιουργηθεί ένα καμουφλαρισμένο διαμέρισμα το οποίο υποστηρίζει την αντιγραφή του βακτηρίου. Μια διαδρομή ενός από τα κυστίδια, που παρεμβάλλεται από *L. Pneumophila*, είναι η πρώιμη μυστική διαδρομή

μεταξύ του ενδοπλασματικού δικτύου και του σύμπλεγμα Golgi. Το Rab1 ένα ρυθμιστικό κλειδί γι αυτήν την διαδρομή, παροδικά εδρεύει στο κυτταρικό κενό που περιέχει την *L. Pneumophila*, δείχνοντας έτσι ότι η *L. Pneumophila* χρησιμοποιεί το Rab1 ώστε να ανακατευθύνει την μυστική κυκλοφορία του κυστιδίου στο κυτταρικό του κενό (LCV).

1.1.7. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Η λεγιονέλλα είναι μικρόβιο εκλεκτικά ενδοκυττάριο. Όπως για την επιβίωση στο νερό χρησιμοποιεί σαν ξενιστή της τις αμοιβάδες και άλλους μικροοργανισμούς έτσι και στη δραστική επαφή της με τον άνθρωπο χρησιμοποιεί τα κύτταρα των ιστών που προσβάλλει και κατά κύριο λόγο τα μακροφάγα και τ' άλλα μονοπύρρηνα. Εισβάλλει στα κύτταρα αυτά μέσω του μηχανισμού της φαγοκυττάρωσης. Το φαγόσωμα που σχηματίζεται με την είσοδό της περιβάλλεται από ριβοσώματα και μιτοχόνδρια. Εκεί πολλαπλασιάζεται με ταχύ ρυθμό και σε μεγάλο αριθμό ενώ παράλληλα προστατεύει το κύτταρο από την είσοδο λυσοσωμάτων προσφέροντας προστασία στον ξενιστή της. Ο ενδοκυττάριος πολλαπλασιασμός αναστέλλεται με την ενεργοποίηση των μακροφάγων με λεμφοκίνες και με την γ-ιντερφερόνη.

Στον άνθρωπο προσβάλλει σχεδόν αποκλειστικά τα κύτταρα του πνευμονικού παρεγχύματος και των τελικών βρογχιολίων όχι όμως και τα κύτταρα των μεγαλύτερων βρογχιολίων και βρόγχων. Προκαλεί νέκρωση των προσβληθέντων κυττάρων κατά τόπους που τείνουν να συνενωθούν με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρών αποστημάτων με πολυμορφοπύρρηνα και μακροφάγα. Ιστολογικά παρατηρείται διήθηση του μεσοκυττάριου χώρου με ουδετερόφιλα και μακροφάγα.

Τα κυκλοφορούντα αντισώματα δεν έχουν καμιά επίδραση ανασταλτική για την είσοδο και τον πολλαπλασιασμό της λεγιονέλλας στα φαγοκύτταρα. Αντίθετα, με την παρουσία τους προάγουν τη φαγοκυττάρωση, δηλαδή βοηθούν στην ανάπτυξη της νόσου και όχι στην καταπολέμησή της. Κάθε λοιπόν προσπάθεια προφύλαξης θα πρέπει να στραφεί προς την ενίσχυση της κυτταρικής ανοσίας.

Ευπαθείς σε λεγιονελλώσεις, με υψηλό ποσοστό νοσηρότητας αλλά και θνησιμότητας, είναι οι χρονίως ανοσοκατασταλλόμενοι ιδία με κορτιζόνη, οι δέκτες μοσχευμάτων νεφρού, αλλά και καρδιάς, οι καρκινοπαθείς, οι πάσχοντες από νοσήματα με ανοσοκαταστολή αλλά και όλα τα άτομα υψηλού κινδύνου προς όλες τις λοιμώξεις όπως είναι οι διαβητικοί, οι αλκοολικοί, οι καπνιστές και οι ηλικιωμένοι.

Η *L.pneumophila* βρίσκεται σε ύδατα και στο εσωτερικό των βιομεμβράνων. Επιπλέον, αυτό το παθογόνο παρασιτεί, όπως στο εσωτερικό των πρωτόζων και των ανθρώπινων κυττάρων, μια διαδικασία η οποία απαιτεί πρόσφυση, εισβολή, και διάφορες αλληλεπιδράσεις μέσα στο φαγόσωμα του βακτηρίου. Σύμφωνα με όλες αυτές τις συνθήκες, το βακτηριακό κύτταρο φάκελος του βακτηρίου είναι η πρωταρχική δομή μέσω της οποίας η *L.pneumophila* αλληλεπιδρά με αυτά τα διαφορετικά περιβάλλοντα. Παρόλο που οι ιδιότητες του κυτταρικού φακέλου καθορίζονται τελικά από το γονιδίωμα του βακτηρίου, γίνεται όλο και περισσότερο εμφανές, ότι η μοριακή ταυτότητα, οι χωρικές κατανομές και οι βιοχημικές δραστηριότητες πολλών συστατικών του κυτταρικού φακέλου του βακτηρίου, είναι ιδιαίτερα δυναμικές και ποικίλλουν ανάλογα με τις φάσεις ανάπτυξης της *L.pneumophila*, (διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες διαφοροποίησης), καθώς και κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης του παθογόνου με το ξενιστή.

Ως εκ τούτου, η έρευνα των φαινοτυπικών αλλαγών, οι οποίες λαμβάνουν χώρα, καθώς τα βακτήρια προσαρμόζονται στις διαφορετικές συνθήκες, υπόσχεται πολλά για την κατανόηση αυτού του παθογόνου. Πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια στο κυτταρικό φάκελο του βακτηρίου εξυπηρετούν ρόλους σήμανσης και διάρθρωσης, ενώ μέχρι πρόσφατα ο κύριος στόχος της βιοϊατρικής έρευνας ήταν η ταυτοποίηση και η ανάλυση των πρωτεϊνών. Δια του παρόντος έχουμε μάθει ότι ήδη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες μπορεί να έχουν απροσδόκητες λειτουργίες, γεγονός που υποδηλώνει την ανάγκη για πιο ενδελεχείς έρευνες. Με βάση την τρέχουσα πληροφόρηση, υπάρχει επίσης αυξημένη συνειδητοποίηση ότι λιπίδια, τόσο της υποδοχής του ξενιστή και του βακτηρίου, επιβλέπουν την κίνηση ή τον προγραμματισμό της κίνησης

του παθογόνου και την ευαισθησία του κάθε ξενιστή σε μόλυνση. Έτσι, η αναγνώριση αυτών των μοναδικών λιπιδίων καθώς και των βιολογικών τους δραστηριοτήτων, αντιπροσωπεύουν ελπιδοφόρους ορίζοντες στην κατανόηση της βιολογίας της μόλυνσης της *L. pneumophila*.

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων που συμβάλουν στην παθογένεια της *L.pneumophila*, συμπεριλαμβανομένου τα συστήματα απέκκρισης τύπου II και IV, το σύστημα IV pil και άλλα τα οποία βρίσκονται υπό διερεύνηση. Υπάρχουν ομοιότητες της παθογένειας της *L.pneumophila*, σε κάποια σημεία με την παθογένεια του *Mycobacterium*, *Toxoplasma*, *Leishmania* και της *Coxiella*. Ο μηχανισμός της παθογένειας του βακτηρίου, μπορεί να προτείνει νέες στρατηγικές για την αντιμετώπιση πολλών μολυσματικών ασθενειών. Ως εκ τούτου, η λοιμογόνος δύναμη της *L.pneumophila* καθορίζεται επιλεκτική από τις πιέσεις του περιβάλλοντος, όπου ο αποικισμός σε αμοιβάδες και η διαβίβαση της σε νέο εξειδικευμένο πολλαπλασιασμό, είναι υψίστης σημασίας (Hammer et al 2002).

Υπάρχουν στοιχεία ότι η λοιμογόνος δύναμη (τοξικότητα) αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση της *Legionella* σε αερολύματα, με τα πιο λοιμογόνα στελέχη να επιβιώνουν περισσότερο από τα λιγότερο λοιμογόνα ομόλογα στελέχη τους. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ένδειξη μετάδοσης της Νόσου των Λεγεωνάριων ή του Pontiac πυρετού, από άνθρωπο σε άνθρωπο. Κάθε φορά δεν είναι εφικτό, να προβλεφθεί αν μια πηγή θα προκαλέσει την Νόσο των Λεγεωνάριων. Ως εκ τούτου η πιθανότητα ότι μια πηγή θα προκαλέσει λοίμωξη εξαρτάται από των μικροβιακό φορτίο των βακτηρίων, τον τρόπο πολλαπλασιασμού, την ικανότητα σχηματισμού αερολύματος και από την αποτελεσματικότητα της διάδοσης. Τα συστήματα που σχηματίζουν αερολύματα και εμπλέκονται στην μετάδοση της Νόσου είναι οι πύργοι ψύξης τα συστήματα ύδρευσης μεγάλων κτιριακών συγκροτημάτων, οι αναπνευστικές συσκευές και οι βρύσες ζεστού νερού.

1.1.8. ΝΟΣΟΙ

Δύο κλινικά σύνδρομα προκαλούνται από τις λεγιονέλλες, πνευμονία και μια ελαφρά σαν γρίπη εμπύρετη νόσος που λέγεται Pontiac fever.

Πνευμονία ή Νόσος των Λεγεωναρίων.

Είναι μια βαρεία με υψηλή θνητότητα νόσος. Αρχίζει, μετά επώαση 5-10 ημερών, σαν μία οξεία λοιμώδης νόσος με κακουχία, μυαλγίες, και κεφαλαλγία. Ακολουθεί πυρετός, ρίγος και ελαφρός μη παραγωγικός βήχας. Μπορεί να συνυπάρχουν πόνος στο στήθος, κοιλιακοί πόνοι, διανοητική σύγχυση. Η βαρύτητα της νόσου επιτείνεται μέσα στις πρώτες 4-6 ημέρες, οπότε μπορεί να εμφανιστούν συμπτώματα πολυσυστηματικής συμμετοχής στη λοίμωξη με αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων, πνευμονικό απόστημα, μυοαιμοσφαιρινουρία, νευρολογικές και καρδιακές διαταραχές, shock, ενδαγγειακή πήξη και θάνατο.

Σε τέτοιες περιπτώσεις λεγιονέλλες απομονώθηκαν, εκτός από τους πνεύμονες και από το αίμα, τον ορό, την καρδιά και τον εγκέφαλο. Κατά την πορεία της νόσου δεν βρίσκεται η λεγιονέλλα στο αίμα εκτός από σπάνιες περιπτώσεις. Πτύελα αιμορραγικά εμφανίζονται σε αρκετές περιπτώσεις. Η θνητότητα από την πνευμονία αυτή είναι υψηλή στα άτομα υψηλού κινδύνου ήτοι σε άτομα με υποκείμενη νόσο ή ανοσοκαταστολή, νεφρομετασχευμένους κ.ά. μέχρι και 30%, ενώ είναι χαμηλή, μέχρι 7%, στους υγιείς.

Πυρετός Pontiac.

Ονομάσθηκε έτσι από την πόλη όπου για πρώτη φορά αναγνωρίσθηκε. Συχνότερο αίτιό της είναι η *L. micdadei* καθώς και η *L. pneumophila* των οροτύπων 1-6 και η *L. feeleyi* οροτύπου 1. Κλινικά μοιάζει πολύ με τη γρίπη, με χρόνο επώσεως 1-2 ημέρες, με πυρετό, μυαλγίες αλλά χωρίς πνευμονία. Είναι νόσος αυτοϊάσιμη.

1.1.9. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην επιβίωση του βακτηρίου είναι σημαντική. Έχει απομονωθεί σε συστήματα ζεστού νερού θερμοκρασίας έως και 66°C. Σε θερμοκρασίες πάνω από 70°C τα βακτήρια καταστρέφονται σχεδόν ακαριαία (Dennis et al 1984, Dennis, R.1988b). Μελέτες απέδειξαν πως μειώθηκε ο πληθυσμός των βακτηρίων σε θερμοκρασίες πάνω από 44 °C-45 °C, ενώ η θερμοκρασία των 48.4°C με 50.0°C αποτελεί την ανώτερη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου (Kusnetsov et al 1996). Διάφορες μελέτες των στελεχών του βακτηρίου *L.pneumophila* έδειξαν πως ο χρόνος που απαιτείται για να σκοτωθεί το 90% του πληθυσμού των βακτηρίων σε μια σταθερή θερμοκρασία και υπό σταθερές συνθήκες, είναι 80-124 λεπτά στην θερμοκρασία των 50°C και 2 λεπτά στους 60°C.

Τονίζεται ιδιαίτερα πως η θερμοκρασία του νερού αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα στον αποικισμό, στον πολλαπλασιασμό και στον κίνδυνο μόλυνσης, του βακτηρίου στα συστήματα νερού. Είναι σχετικά εύκολο να απομονωθούν περιβαλλοντικά στελέχη από πολλές υδάτινες πηγές σε θερμοκρασίες μεταξύ 30°C και 70°C. Για παράδειγμα, έχουν απομονωθεί στελέχη βακτηρίου από παγωμένα ποτάμια, λίμνες, θερμικές πηγές, ακόμα και από πηγές που βρίσκονται κοντά σε ηφαίστειο (Tison DL & Seidler RJ 1983).

Η *L.pneumophila* επιβιώνει και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 25°C και 45°C και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 32°C-42°C (Yee 1982). Οι μελέτες έδειξαν πως η πιο συχνή θερμοκρασία απομόνωσης στελεχών *Legionella* ήταν μεταξύ 35°C και 45°C, ενώ η μεγαλύτερη ανάπτυξη των βακτηρίων παρατηρήθηκε στις θερμοκρασίες μεταξύ 37°C και 42°C. Καθώς η θερμοκρασία πέφτει κάτω από τους 37°C μειώνεται ο ρυθμός αναπαραγωγής των βακτηρίων και κάτω από τους 20°C υπάρχει μικρή ή καθόλου αύξηση των βακτηρίων. Τα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται. Η *L.pneumophila* είναι αρκετά θερμοανθεκτική και είναι ικανή να επιβιώσει για αρκετές ώρες σε θερμοκρασίες της τάξης

των 50°C (Yu VL.2000). Η ανάπτυξη του βακτηρίου μπορεί να ενισχυθεί με την παρουσία CO₂ συγκέντρωσης 2.5%-5%, ενώ σε συγκεντρώσεις CO₂ πάνω από 10% προκαλείται αναστολή ανάπτυξης του βακτηρίου (EPA 1985, Winn WC Jr. 1993).

1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ - ΓΕΝΙΚΑ

Η μικροβιολογική διάγνωση της νόσου περιλαμβάνει μεγάλο φάσμα μεθόδων με ποικίλη ευαισθησία. Προκειμένου να βελτιωθούν οι διαγνωστικές μέθοδοι, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή εργαστηριακών κλινικών δοκιμών, από τα κατάλληλα μικροβιολογικά εργαστήρια. Παρά τις δυνατότητες των ανοσολογικών και μοριακών γενετικών μεθόδων, η διάγνωση της Νόσου των Λεγεωνάριων είναι κυρίως αποτελεσματική μόνο για την ανίχνευση της *L.pneumophila* υποομάδα 1 (sgl). Η εξειδίκευση και η ευαισθησία των διάφορων διαγνωστικών μεθόδων για τα υπόλοιπα είδη *Legionella* απέχει πολύ από την τελειότητα. Βέβαια τα διαγνωστικά τεστ από το 1995 έως σήμερα, έχουν εξελιχθεί σε μεγάλο βαθμό.

Η επιλογή της διαγνωστικής μεθόδου κάθε φορά και η αξιολόγηση των εξετάσεων απαιτεί συγκεκριμένες γνώσεις ενώ απαραίτητη κρίνεται η γνώση των μειονεκτημάτων και πλεονεκτημάτων σε κάθε μια από αυτές. Τα δείγματα που απομονώνονται συχνότερα είναι αυτά που προέρχονται από την αναπνευστική οδό. Τα δείγματα από βιοψίες πνεύμονα, έχουν την μεγαλύτερη διαγνωστική απόδοση αλλά είναι και τα σπανιότερα. Βρογχοσκοπικά δείγματα έχουν μεγαλύτερη διαγνωστική απόδοση από τα δείγματα πτυέλων. Στα περισσότερα δείγματα χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα για την ανίχνευση πιθανών βακτηρίων *L.pneumophila* και *L.longbeachae*.

1.2.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στο παρελθόν, πριν από την ανάπτυξη καλλιεργητικών υλικών *in vitro*, τα βακτήρια της *Legionella*, μπορούσαν να αναπτυχθούν από την απομόνωση τους από ινδικά χοιρίδια και αυγά ορνίθων (McDade JE., Shepard CC., et al 1977). Η καλλιεργητική μέθοδος θεωρείται ως «ο

χρυσός κανόνας» για την διάγνωση λόγω της μεγάλης ειδικότητας που παρουσιάζει η μέθοδος στην απομόνωση των ειδών *Legionella*. Η πρωτογενής απομόνωση του βακτηρίου πραγματοποιείται σε συγκεκριμένο είδος καλλιεργητικού υλικού, BCYE άγαρ (buffered charcoal yeast extract), που περιέχει το αμινοξύ L-κυστεΐνη. Στο υλικό αυτό μπορούν να προστεθούν διάφορα συμπληρώματα που μειώνουν την βακτηριακή χλωρίδα και τους μύκητες, αυξάνοντας έτσι την εκλεκτικότητα του έναντι των ειδών *Legionella*. Τα συμπληρώματα περιλαμβάνουν, BCYE-άγαρ με anisomycin (Dournon 1988), καλλιεργητικό υλικό BMPAα με cefamandole, polymixin B, ή anisomycin (Edelstein 1981). Το εκλεκτικό συμπλήρωμα που χρησιμοποιείται περισσότερο από τα μικροβιολογικά εργαστήρια είναι το BCYE-άγαρ.

Τα έμπειρα μικροβιολογικά εργαστήρια χρησιμοποιούν πολλαπλά καλλιεργητικά υλικά έτσι ώστε να επιτύχουν την καλύτερη απόδοση στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Τα καλλιεργητικά τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 36°C (± 1 °C) για χρονικό διάστημα 14 ημερών και εξετάζονται κάθε δύο ή τρεις ημέρες. Η ανίχνευση μίας ή περισσότερων αποικιών είναι αρκετή για την επιβεβαίωση της διάγνωσης. Στην περίπτωση όμως που οι ασθενείς έχουν λάβει αντιβιοτικά ή εάν το δείγμα προς ανάλυση είναι μολυσμένο με άλλους μικροοργανισμούς, τότε η εμφάνιση των αποικιών *Legionella* στο καλλιεργητικό υλικό μπορεί να καθυστερήσει. Βέβαια το βακτήριο έχει απομονωθεί καλλιεργητικά από δείγματα αίματος του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος ασθενούς μετά από αρκετές μέρες θεραπείας με ερυθρομυκίνη (Ingram & Plouffe 1994). Αξιοσημείωτο είναι πως στην πρώιμη φάση της Νόσου των Λεγεωνάριων, ο μικρός αριθμός βακτηρίων που ζουν εκτός πνεύμονα και η ανασταλτική επίδραση της χλωρίδας του στοματικής κοιλότητας, μειώνουν την ευαισθησία της καλλιεργητικής μεθόδου.

Από την άλλη όμως, το σημαντικότερο πλεονέκτημα της καλλιεργητικής μεθόδου είναι η ικανότητα ανίχνευσης όλων των ειδών *Legionella*. Πρακτικά η αξία της μεθόδου υποβαθμίζεται λόγω του μεγάλου χρόνου επώασης (8-10 μέρες), της ειδικής εμπειρίας που απαιτεί και της χρήσης εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Η

διαγνωστική ευαισθησία της καλλιεργητικής μεθόδου εξαρτάται από την σοβαρότητα της ασθένειας. Σε ήπιες περιπτώσεις πνευμονίας φθάνει το 15%-25%, ενώ σε περιπτώσεις σοβαρής πνευμονίας ακολουθούμενη με αναπνευστική ανεπάρκεια, μπορεί να φθάσει και το 95%. Η καλλιεργητική μέθοδος είναι σημαντική για την διάγνωση της νόσου ιδιαίτερα σε νοσοκομειακές λοιμώξεις, σε ανοσοκοτασταλαμένους ασθενείς, σε περιπτώσεις που η νόσος οφείλεται σε άλλα είδη *Legionella*, εκτός της *L.pneumophila* υποομάδα 1 (sgl) και σε ασθενείς με σοβαρή πνευμονία.

1.2.2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Διάφορες μοριακές μέθοδοι είναι διαθέσιμες για γονοτυπικές αναλύσεις των κλινικών και των περιβαλλοντικών στελεχών *Legionella*. Οι κυρίως χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι η AFLP (Amplified fragment length polymorphism), PFGE (Pulsed field gel electrophoresis), Mab (monoclonal antibody typing), RFLP (Restriction fragment length polymorphism) και MLST (Multilocus sequence typing). Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται κάθε φορά από το δυναμικό του εργαστηρίου. Σε σύγκριση με τις μεθόδους DNA based-fragment (π.χ AFLP, PFGE, ή RFLP), η μέθοδος που στηρίζεται στην αλληλουχία DNA (όπως η τεχνική MLST), είναι πιο ισχυρή, αυτοδύναμη και παρέχει την δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων επιτρέποντας στα εργαστήρια να ανταλλάσουν μεταξύ τους πληροφορίες. Επιπλέον ο συνδυασμός δύο ή και περισσότερων τεχνικών αυξάνει την διακριτική ικανότητα.

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, γνωστή ως αντίδραση PCR, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του DNA του βακτηρίου σε πτύελα, αίμα και ούρα. Αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την ανίχνευση λοιμώξεων που προκαλούνται από τα γνωστά είδη *Legionella*. Διάφορες δοκιμές PCR έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση του βακτηρίου, χρησιμοποιώντας ειδικές DNA αλληλουχίες για την *Legionella pneumophila*, όπως το γονίδιο 5S rRNA, το γονίδιο 16S rRNA, ή το γονίδιο *imp*. Η ανίχνευση του DNA του βακτηρίου μπορεί να γίνει και σε άλλα δείγματα αλλά με χαμηλότερη ευαισθησία (30%-86%). Η ευαισθησία της μεθόδου σε κλινικά δείγματα από το κατώτερο

αναπνευστικό σύστημα είναι ίση ή μεγαλύτερη με εκείνη της καλλιεργητικής μεθόδου. Η μέθοδος παρέχει αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα και ανιχνεύει όλα τα είδη και υποομάδες του βακτηρίου *Legionella*. Έχουν αναφερθεί ψευδώς θετικά αποτελέσματα τόσο σε in-house μεθόδους όσο και σε εμπορικές μεθόδους. Αρκετές έρευνες αναφέρουν την χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (Real Time PCR), για την ταχεία ανίχνευση των ειδών *Legionella* σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Η ταχύτητα και η άμεση ποσοτικοποίηση της μεθόδου Real Time PCR μπορεί να προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της καλλιεργητικής και άλλων μοριακών τεχνικών. Ωστόσο η καλλιεργητική μέθοδος υπήρξε η καλύτερη μέθοδος ανίχνευσης πολλαπλών ειδών *Legionella* σε ιστό πνευμόνων. Βέβαια από την άλλη πλευρά η τεχνική της Real Time PCR σε συνδυασμό με την τεχνική άνοσο μαγνητικού διαχωρισμού αποτελεί μια ακριβή και ευαίσθητη μέθοδο για την ταχεία ποσοτικοποίηση της *Legionella pneumophila* σε δείγματα νερού (Yanez et al 2005). Η μέθοδος Real Time PCR είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να αποτελέσει την καλύτερη μέθοδο ανίχνευσης του βακτηρίου σε περιβαλλοντικά δείγματα και σε δείγματα από τεχνητά συστήματα νερού δεδομένου ότι δεν υπάρχουν άλλα βακτήρια που να παρεμβαίνουν στην ανίχνευση του βακτηρίου στόχου.

1.2.3. ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μικροσκοπική μέθοδος του άμεσου ανοσοφθορισμού DFA, (Direct Immunofluorescence Assay), είναι μια ταχεία μέθοδος ανίχνευσης του βακτηρίου σε βρογχικές εκκρίσεις και σε ιστολογικά δείγματα. Παρόλο που είναι γρήγορη, έχει περιορισμένη ευαισθησία και απαιτεί μεγάλο αριθμό βακτηρίων για την απεικόνιση. Η ευαισθησία της μεθόδου ποικίλλει αλλά είναι σταθερά μικρότερη από εκείνη της καλλιεργητικής. Η μέθοδος ανίχνευσης του άμεσου ανοσοφθορισμού μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα βακτήρια και μύκητες. Τα περισσότερα εργαστήρια έχουν περιορίσει την χρήση της μεθόδου DFA

λόγω των προβλημάτων που παρουσιάζει (Edelstein 2007, Murdoch 2003).

Η πιο αξιόλογη εναλλακτική μέθοδος όσο αφορά την μικροβιολογική διάγνωση της νόσου αποτελεί η μέθοδος ταχείας ανοσοχρωματογραφίας μεμβράνης (ICT, Binax Now Legionella Urinary Antigen) κατά την οποία πραγματοποιείται η ανίχνευση του αντιγόνου του βακτηρίου *Legionella* υποομάδα 1 στα ούρα. Τα αντιγόνα που ανιχνεύονται στα ούρα αποτελούν συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου της *Legionella* και ανιχνεύονται ήδη από την πρώτη ημέρα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και μπορεί να παραμείνουν για μήνες παρά την θεραπευτική αγωγή.

Τα δύο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα τεστ που έχουν εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα όσο αναφορά την *L.pneumophila* υποομάδας 1 (sgl), είναι το ICT Binax Now Legionella Urinary Antigen και το EIA Binax Legionella Urinary Antigen EIA. Η ευαισθησία της μεθόδου EIA Binax φθάνει το 70%-90%, ενώ η ειδικότητα της μπορεί να φθάσει και το 100% για την ανίχνευση *L.pneumophila* (sgl). Η μέθοδος ICT Binax είναι απλή, δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό, ούτε ιδιαίτερη εμπειρία, ενώ έχει παρόμοια ευαισθησία και ειδικότητα με αυτή της EIA Binax. Η μέθοδος ICT Binax δίνει αποτελέσματα εντός 15 λεπτών και η μέθοδος EIA Binax εντός 3 ωρών. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως το αποτέλεσμα δεν επηρεάζεται από τη λήψη αντιβιοτικών. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι αφορά αποκλειστικά τη *L.pneumophila* υποομάδας 1 (sgl), καθώς η ευαισθησία για τα είδη εκτός από τους *L.pneumophila* υποομάδας 1 φθάνει μόλις το 29-31 %. Ειδικότερα, δεν έχει εμπορική διαθεσιμότητα για την αξιόπιστη ανίχνευση της *L.longbeachae* στα ούρα. Το μειονέκτημα αυτό δεν υποβαθμίζει την αξία της μεθόδου, δεδομένου πως η *L.pneumophila* υποομάδας 1 (sgl), ευθύνεται για το 90% των περιπτώσεων.

Στην διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές, όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα άλλα εκτός των ούρων. Εξαιρεση αποτελούν δύο αναφορές, μία για ανίχνευση αντιγόνου *Legionella* σε βρογχικές κρίσεις άνδρα θετικού για HIV και μία παλαιότερη περίπτωση ανίχνευσης αντιγόνου σε πλευριτικό υγρό με ραδιομετρική μέθοδο.

Την ευρύτερη χρησιμοποιούμενη μέθοδο αποτελεί ο ορολογικός έλεγχος με προσδιορισμό των αντισωμάτων IgG και IgM. Η τεχνική του έμμεσου άνοσο φθορισμού IFA (Indirect immunofluorescent assays) και η τεχνική ELISA ή EIA (enzyme-linked immunosorbent assays), αποτελούν τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον ορολογικό έλεγχο ανίχνευσης του βακτηρίου. Η IFA αποτελεί πρότυπη δοκιμή αναφοράς και είναι έγκυρη για την *L.pneumophila* και την *L.longbeachae*.

Η μέθοδος βασίζεται στην ορομεταστροφή, με τετραπλασιασμό του τίτλου αντισωμάτων. Όταν ο τίτλος αντισωμάτων είναι 1/128 και μεγαλύτερος, τόσο για τα IgG όσο και για τα IgM αντισώματα δείχνει πρόσφατη ή παρελθούσα μόλυνση. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το μεγάλο χρονικό διάστημα λήψης αποτελεσμάτων (3-10 εβδομάδες). Ο προσδιορισμός τόσο των αντισωμάτων IgG και όσο και των IgM είναι απαραίτητος για την χρήση της μεθόδου, ενώ επίσης ένα σημαντικό ποσοστό (13%-40%) των ασθενών με αποδεδειγμένη λοίμωξη δεν αναπτύσσουν ανιχνεύσιμα αντισώματα.

Πίνακας 2. Σύγκριση διάφορων διαγνωστικών μεθόδων για την ανίχνευση του βακτηρίου Legionella

Διαγνωστικά τεστ	Προέλευση Δείγματος	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)	Εργαστηριακός Χρόνος	Σχόλια
Καλλιεργητική Μέθοδος	Αναπνευστικό σύστημα (Πτύελα & Βρογχικές εκκρίσεις)	< 10-80%	100	3-7 ημέρες	Ανιχνεύει όλα τα είδη και τις υποομάδες. Είδη (εκτός από <i>L. Pneumophila</i>) ανιχνεύονται μετά από 10 ημέρες επώασης.
Μέθοδος Άμεσου Ανοσοφθορισμού (DFA)	Αναπνευστικό σύστημα (Πτύελα & Βρογχικές εκκρίσεις)	25-70	>95	<4 ώρες	Λιγότερο Ευαίσθητη από την καλλιέργεια

Ανίχνευση Αντιγόνου (EIA, ICT)	Ούρα	70-90	>95	< 3 ώρες	Αξιόπιστη μόνο για την ανίχνευση της <i>L. pneumophila</i> sg I)
PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράση ς)	Αναπνευστι κό σύστημα (Πτύελα & Βρογχικές εκκρίσεις)	80-100	> 90	<4 ώρες	Ανίχνευση όλων των ειδών και υποομάδων
PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράση ς)	Ορός	30-50	> 90		
	Ορός	46-86	> 90		
Ορολογική Εξέταση	Ορός	60-80	> 95	3-10 εβδομάδες	Εξέταση δειγμάτων (από ασθενείς με οξεία φλεγμονή, ασθενείς που έχουν αναρρώσει) Παραπλανητική η ερμηνεία ενός μόνο δείγματος

Πηγή: Murdoch 2003

1.3.1. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΣΕ ΥΠΟΓΕΙΑ ΥΔΑΤΑ

Το υδάτινο περιβάλλον αποτελεί το φυσικό περιβάλλον επιβίωσης και ανάπτυξης του βακτηρίου. Παρά το γεγονός ότι η παροχή νερού πολλών εκατομμυρίων ανθρώπων σε όλο τον κόσμο στηρίζεται σε υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες, λίγα είναι γνωστά για την παρουσία του βακτηρίου της *Legionella* σε αυτά. Τα ευρήματα από δείγματα νερού και βιομεμβράνης που ελήφθησαν από διάφορες πηγές υπόγειων υδάτων έδειξαν παρουσία του βακτηρίου, αν και ο αριθμός των αποικιών παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις. Τα είδη *Legionella* που απομονώθηκαν από υπόγεια νερά, σύμφωνα με μια μελέτη επτά ετών ήταν η *L.pneumophila*, η *L.oakridgensis*, η *L.sainthelensi* και η *L.londiniensis*. Πρόσφατη έρευνα σε Καναδά και Η.Π.Α απομόνωσε το

βακτήριο *Legionella* από νερό και βιομεμβράνη (29,1% και 28,2% αντίστοιχα) προερχόμενα από υπόγεια ύδατα, χωρίς όμως να είναι γνωστό ότι υπήρχε άμεση συσχέτιση με επιφανειακά ύδατα. Το βακτήριο απομονώθηκε από κρύα και ζεστά υπόγεια νερά, με τα περισσότερα στελέχη να επωάζονται σε θερμοκρασία 30°C από την συνηθισμένη θερμοκρασία ανάπτυξης των 35°C. Τα είδη της *Legionella* που εντοπίστηκαν περιλαμβάνουν γνωστά παθογόνα είδη του βακτηρίου αλλά και είδη που δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί ως ανθρώπινα παθογόνα. Το βακτήριο είναι ευρέως διαδεδομένο στα υπόγεια ύδατα και έχει την δυνατότητα διασποράς σε δημόσια συστήματα παροχής νερού. Σε αντίθεση με μελέτες και αναφορές που αποδεικνύουν την παρουσία του βακτηρίου σε υπόγεια ύδατα, υπάρχουν και μελέτες που δεν ανίχνευσαν το βακτήριο σε υπόγεια νερά. Παράδειγμα αποτελεί μια παλιά μελέτη σε δείγματα νερού προερχόμενα από πηγάδια, στα οποία δεν ανιχνεύθηκε το βακτήριο της *Legionella* (Campo et al 1988).

1.3.2. ΜΕΤΑΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η *Legionella pneumophila* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο Gram-αρνητικό βακτήριο που παρασιτεί σε πρωτόζωα υδάτινων περιβαλλόντων. Όταν η *L.pneumophila* εισέρχεται στο ανθρώπινο αναπνευστικό σύστημα μέσω της εισπνοής του μολυσμένου νερού με βακτήρια, τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αναπαραχθούν μέσα στα κυψελιδικά μακροφάγα. Το σύστημα Dot/Icm είναι ένα είδος απέκκρισης, που απαιτείται για την ενδοκυτταρική αναπαραγωγή του βακτηρίου. Παρά το γεγονός ότι μια σοβαρή μορφή πνευμονίας, γνωστή ως νόσος των Λεγεωνάριων, μπορεί να προκύψει από την αναπαραγωγή της *L.pneumophila* στα μακροφάγα κύτταρα του ξενιστή, οι περισσότερες λοιμώξεις, κατά πάσα πιθανότητα, περιέχονται και αποβάλλονται από το ανοσοποιητικό σύστημα χωρίς καμία εξέλιξη της νόσου. Πειραματική έρευνα, δείχνει πως η *L.pneumophila* μετατρέπεται από μια αναπαραγωγική μορφή σε μια μεταδοτική μορφή, όταν τα θρεπτικά συστατικά περιορίζονται από το περιβάλλον (Swanson & Hammer 2000).

Για να ευδοκιμήσει, το παράσιτο πρέπει να προσαρμόσει το φαινότυπο του με τον περιβάλλοντα χώρο. Όταν το βακτήριο εισπνέεται στους πνεύμονες, μια ανάλογη στρατηγική προφανώς προάγει την αποικισμό του στα κυψελιδικά μακροφάγα και την βλάβη στους ιστούς, χαρακτηριστική της Νόσου των Λεγεωνάριων. Επομένως το παθογόνο ταξιδεύει στα φαγοκύτταρα για τη δημιουργία ενδοκυτταρικής αναπαραγωγής. Για να γίνει αυτό, το μικρόβιο εναλλάσσεται μεταξύ της φάσης της αντιγραφής και της μεταδοτικής φάσης (Byrne & Swanson 1998).

1.3.3. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η λεγιονέλλα της πνευμονίας καθώς και οι άλλες απομονώνονται από τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών καθώς και από τη λάσπη των. Απομονώνονται επίσης από το ζεστό και κρύο νερό οικιακής χρήσεως, από το νερό πύργων ψύξεως, νερού των συστημάτων κλιματισμού, από τις βάνες και τις ντουσιέρες. Παρ' όλα αυτά δεν είναι μικρόβιο ελεύθερο του νερού. Επιζεί και πολλαπλασιάζεται στο υγρό περιβάλλον εφόσον στο νερό υπάρχουν μονοκύτταροι οργανισμοί, ιδιαίτερα αμοιβάδες, αλλά και άλλα πρωτόζωα όπως τα μαστιγοφόρα, τα φωτοσυνθετικά μικρόβια, άλγες κ.ά. Είναι μικρόβιο που παρασιτεί στα κύτταρα των ελεύθερων αυτών μικροοργανισμών, στο δε σώμα του ανθρώπου στα μακροφάγα και άλλα μονοπύρηνα κύτταρα.

Αμοιβάδες του γλυκού νερού φορείς λεγιονελλών είναι οι ακανθαμοιβάδες, οι ναγλέριες, οι χαρτμανέλλες και η ακιναμοιβάδα και άλλα πρωτόζωα. Ο άνθρωπος μολύνεται από την εισπνοή σταγονιδίων νερού μολυσμένου με λεγιονέλλα σε μεγάλους αριθμούς που εκπέμπονται σαν αεροσταγονίδια από τους πύργους καταψύξεως, από τις βάνες παροχής νερού, από τις «κεφαλές» των ντους, νερό οδοντιατρικής καρέκλας κ.ά. Σε όλες σχεδόν της επιδημίες που μελετήθηκαν η πηγή βρέθηκε να είναι το νερό και ο τρόπος μεταδόσεως η εισπνοή σταγονιδίων.

Η πρώτη επιδημία λεγιονελλώσεως έγινε το καλοκαίρι του 1976 στη Φιλαδέλφεια των ΗΠΑ. Αρρώστησαν οι σύνεδροι ενός συνεδρίου των παλαιών πολεμιστών ή λεγεωνάριων που είχαν καταλύσει σε ξενοδοχεία. Από τους πολυάριθμους συνέδρους προσβλήθηκαν 221 και από αυτούς πέθαναν 34. Η νόσος ήταν πνευμονία. Από τους πνεύμονες θανόντων ο McDade και οι συνεργάτες του απομόνωσαν το απαιτητικό Gram αρνητικό βακτηρίδιο σαν αίτιο της νόσου, το ονόμασαν Λεγιονέλλα, τη δε νόσο που προκαλεί νόσο των Λεγεωνάριων. Από τότε έχουν περιγραφεί και άλλες επιδημίες. Σε όλες σχεδόν πηγή μόλυνσεως φέρεται να είναι το νερό, ζεστό και κρύο, της βρύσης, του θερμοσίφωνα, των ψυκτικών πύργων. Στο ζεστό νερό των 35° - 43° C μπορεί να ζήσει και να πολλαπλασιασθεί η λεγιονέλλα. Αλλά το νερό στους θερμοσίφωνες ανεβαίνει και στους 45° - 50°

C. Μέχρι 50° C ζουν οι αμοιβάδες και μαζί με αυτές και οι λεγιονέλλες. Οι επιδημίες λεγιονελλώσεως συμβαίνουν σχεδόν κατά κανόνα μεταξύ των ενοίκων μεγάλων ξενοδοχείων, νοσοκομείων, μεγάλων κτιριακών συγκροτημάτων, εργοστασίων με κεντρικό σύστημα κλιματισμού. Η λεγιονέλλα βρίσκεται στο νερό των πύργων ψύξεως του νερού. Στην Ελλάδα έχουν απομονωθεί λεγιονέλλες από το νερό αυτό σε ξενοδοχεία. Υπάρχουν και σποραδικά κρούσματα. Η συχνότητα των λεγιονελλώσεων δεν είναι γνωστή κυρίως γιατί δεν απομονώνεται από τις συνήθεις καλλιέργειες των πτυέλων. Από οροεπιδημιολογικές μελέτες στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι νοσούν από λεγιονέλλωση 25.000 περίπου άτομα κατ' έτος. Στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται για Pontiac πυρετό, δηλαδή γριπποειδή εμπτύρετη νόσο από τη *L. micdadei*.

Λεγιονέλλες βρέθηκαν στο νερό οδοντιατρικής καρέκλας, που έρχεται από το ψυκτικό της σύστημα και σχηματίζει, κατά την έξοδό του, αεροσταγονίδια. *L. pneumophila* και *L. bozemanii* απομονώθηκαν από το νερό αυτό σε μια εκπαιδευτική οδοντιατρική μονάδα.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση της *Legionella pneumophila* σε πόσιμα νερά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο του 2008, τον Νοέμβριο του 2009 και από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας, Μακεδονίας και Ηπείρου (πίνακας 3). Συλλέχθηκαν συνολικά 33 δείγματα εκ των οποίων τα 26 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης (Δ.Υ), τα 4 ήταν εμφιαλωμένα νερά που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο (ΕΜΦ.), τα 2 ήταν από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων (Ε.Ε.Τ.) και το 1 προέρχονταν από εν λειτουργία μηχανήμα ψύκτη νερού (Ψ.Ν). Τα 4 τελευταία, συλλέχτηκαν το 2011, από ντουζ οπιτιών ασθενών που είχαν νοσήσει από Λεγιονέλλα. Από αυτά, το 1 ήταν ζεστό άμεσο νερό (μόλις τρέξει) θερμοκρασίας 41°C , τα 2 κρύο άμεσο νερό θερμοκρασίας 22°C και 22,5°C το καθένα και το τέταρτο ήταν επιστροφής από boiler (αφού είχε τρέξει) θερμοκρασίας 59°C. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε πλαστικά αδιαφανή δοχεία χωρητικότητας 4 λίτρων τα οποία πριν την κάθε χρήση πλένονταν με απιονισμένο νερό. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν με ισοθερμικό δοχείο εντός 12 ωρών από τη δειγματοληψία και αμέσως χωρίς άλλη καθυστέρηση πραγματοποιήθηκε η περαιτέρω επεξεργασία τους.

Ως θετικός μάρτυρας για την PCR καθώς και για τον έλεγχο της ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε στέλεχος *L.pneumophila* σε καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό GVPC.

Πίνακας 3 : Δείγματα πόσιμου νερού

A/ A	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜΕΡΟ- ΜΗΝΙΑ	ΤΟΠΟΣ	ΝΟΜΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥ ΣΗ
1	NTR 1	23-6-08	ΤΥΡΝΑΒΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Ε.Ε.Τ
2	PL 2	24-6-08	ΠΑΛΑΜΑΣ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	Δ.Υ
3	AGK 3	25-6-08	ΑΓΙΟΚΑΜΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
4	AG 4	26-6-08	ΑΓΙΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
5	ARM 5	27-6-08	ΑΡΜΕΝΙΟ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
6	KR 6	28-6-08	ΚΑΡΔΙΤΣΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	Δ.Υ
7	SX 7	28-6-08	ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Ψ.Ν
8	BRT 8	29-6-08	ΒΡΥΟΤΟΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
9	SER 9	30-6-08	ΣΕΡΡΕΣ	ΣΕΡΡΩΝ	Δ.Υ
10	KAT 10	30-6-08	ΚΑΤΕΡΙΝΗ	ΠΙΕΡΙΑΣ	Δ.Υ
11	KAL11	1-7-08	ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	ΤΡΙΚΑΛΩΝ	Δ.Υ
12	ITEA 12	1-7-08	ΙΤΕΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	Δ.Υ
13	OMRF 13	2-7-08	ΟΜΟΡΦΟΧΩΡΙ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
14	GIAN 14	2-7-08	ΓΙΑΝΟΥΛΗ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
15	IOAN 15	4-7-08	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	Δ.Υ
16	BIPE 16	4-7-08	ΒΙΠΕ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Ε.Ε.Τ
17	AVRA 17	5-7-08	ΕΜΦΙΑΛ. AVRA		ΕΜΦ.
18	SAM 18	5-7-08	ΕΜΦ. ΣΑΜΑΡΙΝΑ		ΕΜΦ.
19	ZAG 19	5-7-08	ΕΜΦ. ΖΑΓΟΡΙ		ΕΜΦ.
20	LAR 20	6-7-08	ΚΕΝΤΡΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
21	LOUT 21	6-7-08	ΕΜΦ. ΛΟΥΤΡΑΚΙ		ΕΜΦ.
22	BOL 22	7-7-08	ΒΟΛΟΣ	ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	Δ.Υ
23	KOZ 23	7-7-08	ΚΟΖΑΝΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	Δ.Υ
24	SKAL 24	8-7-08	ΣΚΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	Δ.Υ
25	NEAP 25	8-7-08	ΝΕΑΠΟΛΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	Δ.Υ
26	THES 26	9-7-08	ΘΕΡΜΗ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	Δ.Υ
27	R1	8-11-09	Κρυόβρυση	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
28	R2	8-11-09	Καρυά	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
29	R3	8-11-09	Σικαμινέα	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
30	5336	5-10-11	ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
31	5338	18-10-11	ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
32	5323	2-11-11	ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
33	5334	16-12-11	ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ

2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

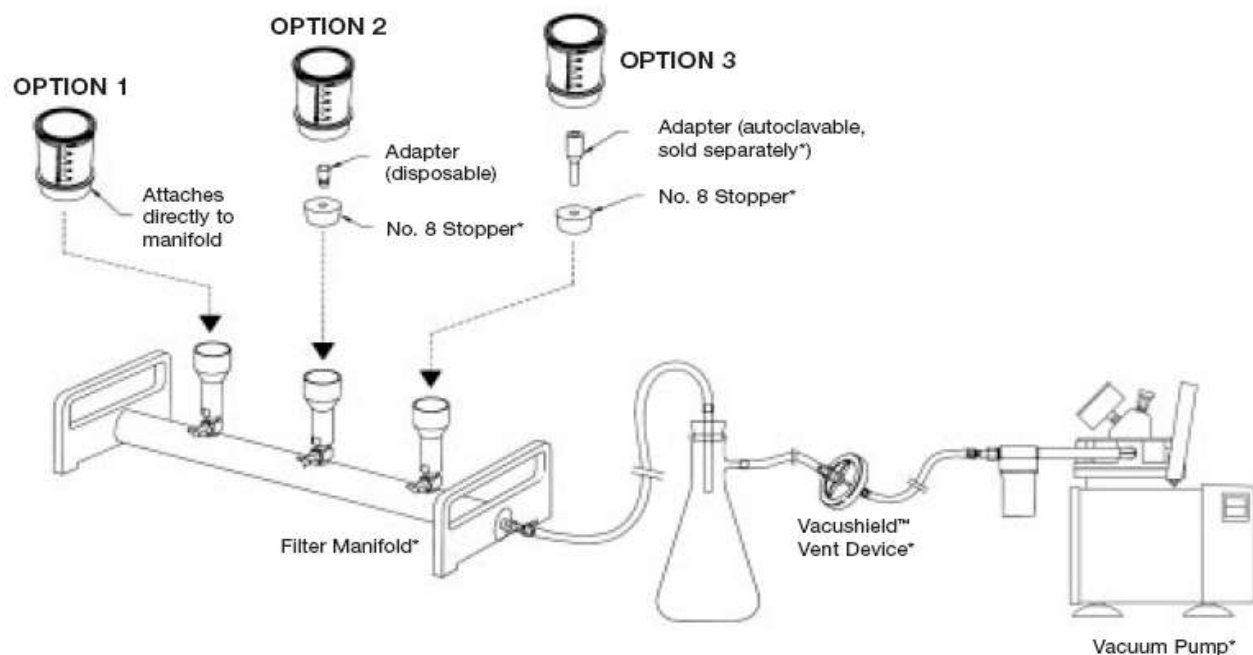
Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης βακτηρίων σε μεγάλο όγκο νερού στα δείγματά μας, αναπτύχθηκαν μέθοδοι συγκέντρωσής τους, πριν την απομόνωσή τους. Για τον παραπάνω σκοπό χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο έκλουσης-προσρόφησης σε ηλεκτροαρνητικά φίλτρα. Ο θάλαμος βιολογικής προστασίας επιπέδου 2 (Biological Safety Cabinet Level 2, BSCL2) χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δειγμάτων.

2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ – ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του PH στο 3,8 με την προσθήκη 3N HCl, σε 4 λίτρα δείγματος νερού. Τα βακτήρια, με τη προσθήκη $Mg_2Cl \cdot 6H_2O$ σε τελική συγκέντρωση 0,05M, φορτίστηκαν θετικά, παρουσία του Mg^{2+} (Merck, Germany) και στην συνέχεια, το νερό υποβλήθηκε σε αργή ανάδευση έως και την πλήρη διαλυτοποίηση.

Κατόπιν, φιλτραρίστηκε ξεχωριστά το κάθε δείγμα σε ένα ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF-Millipore), το οποίο είχε διάμετρο 47mm και μέγεθος πόρου 3μm και ήταν τοποθετημένο σε μία συσκευή αρνητικής πίεσης (εικόνα 4), προκειμένου να προσροφηθούν στην επιφάνεια του φίλτρου τα βακτήρια. Το κάθε δείγμα χρειάστηκε διαφορετικό χρόνο για να φιλτραριστεί.

Στη συνέχεια, αφού αφαιρέθηκε από τη συσκευή το συγκεκριμένο φίλτρο, μεταφέρθηκε σε τριβλίο petri, στο οποίο υποβλήθηκε σε έκλυση 2 φορές. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με 10 ml διαλύματος, αποτελούμενο από Tris 0.05M με PH=9 , εμπλουτισμένου με 3% BSA για χρονικό διάστημα 10 λεπτών, κατά το οποίο εκτελούνταν αργή ανάδευση. Τέλος, το φίλτρο μετά την αφαίρεση του φυλάχτηκε στους 4 °C και το, προκύπτον από τις παραπάνω διαδικασίες, διάλυμα με τη βοήθεια 3N HCl ρυθμίστηκε σε PH 7.



Εικόνα 6 : Συσκευή φιλτραρίσματος των δειγμάτων του νερού.

2.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ ΜΕ PEG

Για την επίτευξη της συγκέντρωσης του υπερκείμενου, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της συγκέντρωσης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει:

Προσθήκη στο διάλυμα, που προέκυψε μετά την έκλουση, σε τελική συγκέντρωση 0,5M 10% w/v PEG6000 και NaCl (Sigma, USA). Στη συνέχεια, στους 4°C ανάδευση όλη την νύχτα.

Την επόμενη ημέρα, με την κατανομή του διαλύματος σε σωληνάρια των 2ml και την φυγοκέντρωση στους 4 °C, στις 11.000 rpm, για μια 1 ώρα, δημιουργείται ίζημα σε κάθε σωληνάριο.

Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου και την διάλυση του ιζήματος σε PBS (phosphate buffer saline), προκύπτει από το κάθε δείγμα νερού (των 4 λίτρων) ένα διάλυμα τελικού όγκου 2 ml. Αυτά τα διαλύματα μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση του DNA, φυλάσσονται στους -20 °C.

2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (Casas et al. 1995), για την εκχύλιση του βακτηριακού DNA. Η διαδικασία αυτής της μεθόδου είναι η εξής:

Αρχικά τοποθετούνται, σε σωληνάρια (eppendorf) των 2ml, 300 µl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25 mM sodium citrate (Merck, Germany) .

Στην συνέχεια προστίθενται 10µl γλυκογόνου (100 mg/ml) (-20°C) και 100 µl δείγματος.

Με στόχο την λύση των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηριακών σωματιδίων για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων, ακολουθεί ισχυρή ανάδευση (vortex) του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Έπειτα ακολουθεί πρόσθεση 400µl ισοπροπανόλης (-20°C), ακολουθεί vortex και τοποθέτηση του μίγματος για 20 λεπτά τουλάχιστον, στους -20°C.

Εν συνεχεία ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.

Στο εναπομένον ίζημα, προστίθεται 500µl αιθανόλης 70% και ακολουθεί vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος.

Τέλος, μετά από 10 λεπτά φυγοκέντρηση στις 14000rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου, επαναδιαλύεται το ίζημα σε 100µl διπλά απιονισμένου νερού (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών.

2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενόματος με τη χρήση των ειδικών εκκινητικών μορίων (primers) .

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση όλων των λεγιονέλλων που στοχεύουν στο 16S rRNA γονίδιο, (Πίνακας 4) (Wullings B. A. and van der Kooij D.).

Εκκινητές (Primers)	Πολικότητα	Θέση	Αλληλουχία 5' -3'
Leg 225	sense	225-244	AAGATTAGCCTGCGTCCGAT
Leg 858	antisense	880-858	GTCAACTTATCGCGTTTGCT

Πίνακας 4 εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση όλων των λεγιονέλλων

Στη συνέχεια ακολούθησε PCR για την ανίχνευση των *Legionella pneumophila* με χρήση εκκινητών που στοχεύουν στο mip γονίδιο (Πίνακας 5):

Εκκινητές (Primers)	Πολικότητα	Θέση	Αλληλουχία 5' -3'
LmipL920	sense	920-940	GCTACAGACAAGGATAAGTTG
LmipR 1548	antisense	1548-1569	GTTTTGTATGACTTTAATCA

Πίνακας 5 εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση των Legionella pneumophila

Το γονίδιο mip (macrophage infectivity potentiator-ισχυροποιητής μολυσματικότητας μακροφάγων), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί παράγοντα μολυσματικότητας διότι διευκολύνει την είσοδο της *Legionella* στις αμοιβάδες και τα μακροφάγα, παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα αλληλουχίας μεταξύ των ειδών *Legionella* και χρησιμοποιείται για την ειδική ανίχνευση της *Legionella pneumophila* με τη μέθοδο PCR. Έχουν περιγραφεί δοκιμασίες PCR για την ανίχνευση του *Legionella pneumophila* μέσω της ανίχνευσης του

γονιδίου mip σε δείγματα νερού και σε κλινικά δείγματα (Deborah A. Wilson, Belinda Yen-Lieberman et al, 2006).

Το μείγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 3μl DNA, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Reaction Buffer I 10x – GeneOn), 6μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs) 10mM, 1μl εκκινητικών μορίων 25pmol το καθένα, 0,25 μl MgCl₂ 100mM, 0,5μl (2,5 unit) Maximo Taq DNA πολυμεράσης (GeneOn) και αποσταγμένο και αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών νερό (Sigma Aldrich, St Louis MO), έως τελικού όγκου 50μl.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή σε συνθήκες, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 6 για κάθε ζεύγος εκκινητών.

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
Leg 225- Leg 858	95 °C για 5 min 95 °C για 30sec 51 °C για 20sec 72 °C για 40sec 72 °C για 5 min <div>40 κύκλοι</div>
LmipL920-LmipR 1548	95 °C για 5 min 95 °C για 20sec 55 °C για 20sec 72 °C για 20sec 72 °C για 5 min <div>40 κύκλοι</div>

Πίνακας 6 Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για κάθε ζεύγος εκκινητών

2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε

τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Από κάθε προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμείχθηκαν με 2μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης), μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK) και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 120V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne).

2.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας της PCR με τους εκκινητές LmipL 920 - LmipR 1548 καθώς και για τον έλεγχο ευαισθησίας κλωνοποιήθηκαν τα προϊόντα της αντίδρασης για το δείγμα 5336 καθώς και του θετικού μάρτυρα.

Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, είναι τα εξής:

- i) ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR,
- ii) η αντίδραση λιγάσης,
- iii) η παραγωγή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων,
- iv) ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων και
- v) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει, στον φορέα.

Αντίδραση λιγάσης: Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο TOPO Vector (Invitrogen), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη, στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με το TOPO TA Cloning (Invitrogen) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου – CaCl₂): Μεταφέρουμε βακτηριακά κύτταρα από το απόθεμα γλυκερόλης στους -80°C, υπό ασηπτικές συνθήκες σε

1 ml αποστειρωμένης καλλιέργειας LB Broth και επωάζονται στους 37°C στις 210 στροφές/min για όλη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα, μεταφέρουμε την καλλιέργεια αυτή σε 50 ml LB Broth και ακολουθεί επώαση στους 37°C στις 210 στροφές/min για 2h. Γίνεται έλεγχος της ανάπτυξης των κυττάρων, μετρώντας την απορρόφηση της καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα OD600. Όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450 – 0,550 A, τότε σταματάμε την κυτταρική ανάπτυξη, τοποθετώντας τα στον πάγο για 10 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 10 ml παγωμένου CaCl₂ 0,1 M. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Τέλος, επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 2 ml παγωμένου CaCl₂ 0,1 M.

Μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων: Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200 μl δεκτικών κυττάρων σε eppendorf των 0,5 ml. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης και ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τα δείγματα στον πάγο για 30 min, μετά τα τοποθετούμε σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για 2 min. Ακολουθεί η μεταφορά 200 μl μετασχηματισμένων κυττάρων σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml με 800 μl LB Broth και επωάζουμε στις 180 στροφές/min στους 37°C για 1h. Επιστρώνουμε 200 μl κάθε καλλιέργειας σε τριβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 100 μgr/ml αμπικιλίνη και προσθέτουμε 12 μl X – Gal (50 mg/ml, Promega, USA). Ακολούθησε επώαση των τριβλίων στους 37°C για όλη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα συλλέχθηκαν 2 – 3 λευκές (ανασυνδυασμένες) αποικίες από κάθε τριβλίο και μεταφέρθηκαν σε 3 ml LB Broth με 100 μl/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C στις 210 στροφές/min για όλη τη νύχτα (overnight). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του Nucleospin Plasmid (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI:

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης του DNA στον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιούμε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2 μl πλασμιδιακού DNA, 2 μl 10 x Buffer, 1 μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Takara, Japan) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20 μl. Το μίγμα επωάζεται για 1h στους 37°C. Όλο το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αгарόζης 2%, αφού προστεθούν 3 μl 10x Loading Buffer. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts περίπου για 1 h.

2.7 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Τα κλωνοποιημένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία CEMIA (CEMIA, Greece). Για την αντίδραση αλληλούχισης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές αλληλουχίες των T7 και SP6 του πλασμιδιακού φορέα, που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA. Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με αλληλουχίες στελεχών βακτηρίου, με τη βοήθεια του BLAST.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αφού ολοκληρώθηκαν οι μέθοδοι συγκέντρωσης των βακτηρίων *Legionella pneumophila* από τα δείγματα του νερού σε τελικό όγκο 2 ml, ακολούθησαν μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση των βακτηρίων λεγιονέλλας που περιελάμβαναν τα στάδια της εκχύλισης, της PCR, και της ηλεκτροφόρησης.

3.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ ΓΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ *LEGIONELLA* ΚΑΙ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκε PCR για *Legionella* και PCR για *Legionella pneumophila* (πίνακας 7). Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής: Από τα 33 δείγματα τα 4 βρέθηκαν θετικά και για τις 2 PCR. Αυτά τα δείγματα είχαν συγκεντρωθεί από σπίτια ασθενών, που νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομείο για *Legionella pneumophila*.

Στα υπόλοιπα 29 δείγματα πόσιμου νερού που εξετάστηκαν με τις μεθόδους και τις τεχνικές που περιγράφησαν παραπάνω δεν ανιχνεύτηκε *Legionella pneumophila*.

*Πίνακας 7 : Αποτελέσματα ανίχνευσης για όλες τις λεγιονέλλες και για την *Legionella pneumophila* στα δείγματα νερού*

Δείγμα	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Leg	L. Pneu
		Leg 225-Leg 858	LmipL-LmipR
NTR 1	23-6-08	-	-
PL 2	24-6-08	-	-
AGK 3	25-6-08	-	-
AG 4	26-6-08	-	-
ARM 5	27-6-08	-	-
KR 6	28-6-08	-	-
SX 7	28-6-08	-	-
BRT 8	29-6-08	-	-
SER 9	30-6-08	-	-

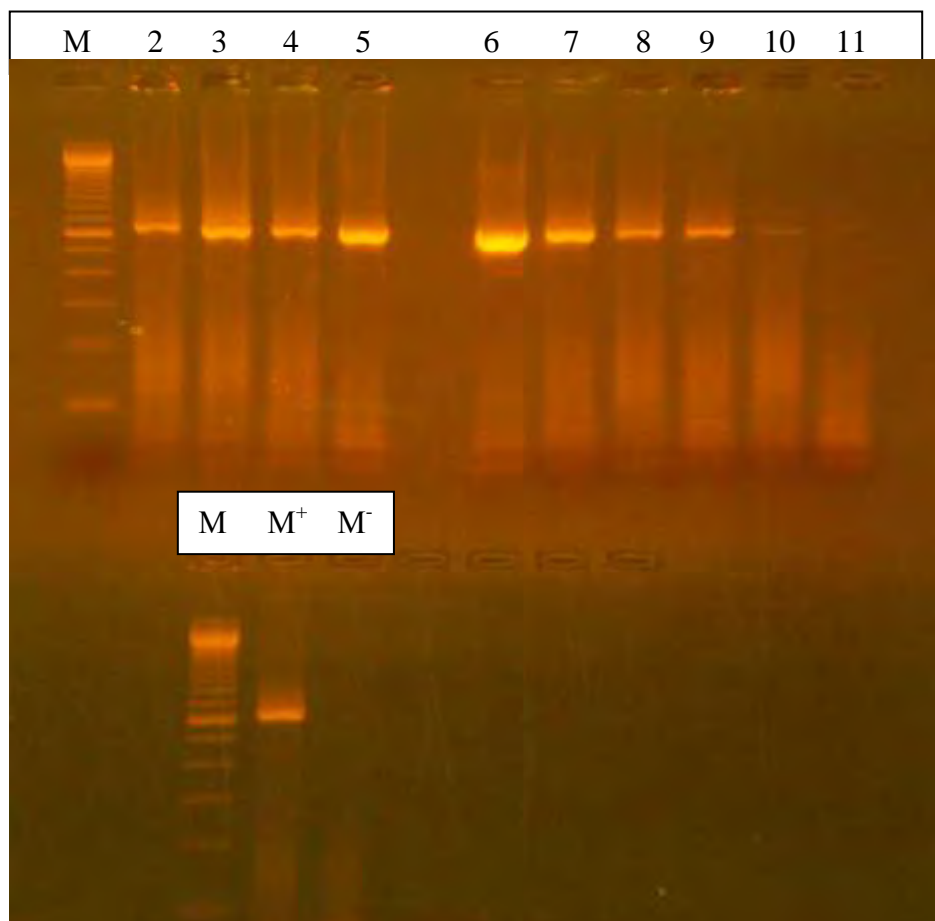
KAT 10	30-6-08	-	-
KAL11	1-7-08	-	-
ITEA 12	1-7-08	-	-
OMRF 13	2-7-08	-	-
GIAN 14	2-7-08	-	-
IOAN 15	4-7-08	-	-
BIPE 16	4-7-08	-	-
AVRA 17	5-7-08	-	-
SAM 18	5-7-08	-	-
ZAG 19	5-7-08	-	-
LAR 20	6-7-08	-	-
LOUT 21	6-7-08	-	-
BOL 22	7-7-08	-	-
KOZ 23	7-7-08	-	-
SKAL 24	8-7-08	-	-
NEAP 25	8-7-08	-	-
THES 26	9-7-08	-	-
R1	8-11-09	-	-
R2	8-11-09	-	-
R3	8-11-09	-	-
5336	5-10-11	+	+
5338	18-10-11	+	+
5323	2-11-11	+	+
5334	16-12-11	+	+
Σύνολο θετικών δειγμάτων		4	4
Ποσοστό θετικών		12,12%	12,12%

Για να αποκλεισθεί η περίπτωση η μη ανίχνευση *Legionella pneumophila* στο πόσιμο νερό αυτών των δειγμάτων να μην οφείλεται στην απουσία της, αλλά στην έλλειψη ευαισθησίας των τεχνικών ανίχνευσης που ακολουθήθηκαν πραγματοποιήθηκε και έλεγχος ευαισθησίας της μεθόδου.

3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ PCR

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου και των PCR με τους εκκινητές LEG και Lmip έγιναν τα εξής: κλωνοποίηση της ζώνης από το θετικό μάρτυρα και εφαρμογή των PCR σε διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του πλασμιδίου. Η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε μέσω PCR ως η τελευταία αραιώση που έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία για τα LEG primers ήταν 10^{-5} , ενώ για τα Lmip primers 10^{-4} .

Στην εικόνα (7) παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα gel ηλεκτροφόρησης PCR με τους εκκινητές (primers) Leg 225-Leg 858 για τα δείγματα 5336, 5338, 5323, 5334 καθώς και για τον έλεγχο ευαισθησίας.



Εικόνα 7 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με ζεύγος εκκινητικών μορίων τα Leg 225-Leg 858. M: μάρτυρας μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK)), 2-5: δείγματα 5336, 5338, 5323, 5334 αντίστοιχα, 6-11: διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του πλασμιδίου από 10^{-1} έως 10^{-6} , M+: θετικός μάρτυρας, M-: αρνητικός μάρτυρας (νερό).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι λεγιονέλλες ανήκουν στην Οικογένεια των Legionellaceae η οποία περιλαμβάνεται στην ομάδα των Αεροβίων/Μικροαεροφίλων Gram αρνητικών Βακτηριδίων και Κόκκων κατά τη νέα ταξινόμηση των μικροβίων στο Bergey's Manual of Systemic Bacteriology.

Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, αζυμωτικά, απαιτητικά, που έχουν ανάγκη από κυστεΐνη και ενώσεις σιδήρου, για την ανάπτυξή τους, αερόβια, κινούμενα. Απομονώνονται από τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, αλλά και από τα νερά της υδρεύσεως και τα όργανα του ανθρώπου. Δεν αποικίζουν το σώμα του ανθρώπου αλλά προκαλούν νόσο κυρίως του αναπνευστικού. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ένδειξη μετάδοσης της Νόσου των Λεγεωνάριων ή του Pontiac πυρετού, από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην επιβίωση του βακτηρίου είναι σημαντική. Έχει απομονωθεί σε συστήματα ζεστού νερού θερμοκρασίας έως και 66°C. Σε θερμοκρασίες πάνω από 70°C τα βακτήρια καταστρέφονται σχεδόν ακαριαία.

Η *L.pneumophila* επιβιώνει και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 25°C και 45°C και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 32°C-42°C. Καθώς η θερμοκρασία πέφτει κάτω από τους 37°C μειώνεται ο ρυθμός αναπαραγωγής των βακτηρίων και κάτω από τους 20°C υπάρχει μικρή ή καθόλου αύξηση των βακτηρίων. Τα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες και αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται.

Η λεγιονέλλα της πνευμονίας καθώς και οι άλλες απομονώνονται από τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών καθώς και από τη λάσπη των. Απομονώνονται επίσης από το ζεστό και κρύο νερό οικιακής χρήσης, από το νερό πύργων ψύξεως, νερού των συστημάτων κλιματισμού, από τις βάνες και τις ντουσιέρες. Λεγιονέλλες βρέθηκαν στο νερό οδοντιατρικής καρέκλας κατά την έξοδό του (αεροσταγονίδια).

Η μικροβιολογική διάγνωση της νόσου περιλαμβάνει μεγάλο φάσμα μεθόδων με ποικίλη ευαισθησία. Η διάγνωση της Νόσου των Λεγεωνάριων είναι κυρίως αποτελεσματική μόνο για την ανίχνευση της *L.pneumophila* υποομάδα 1 (sg1). Η εξειδίκευση και η ευαισθησία των διάφορων διαγνωστικών μεθόδων για τα υπόλοιπα είδη *Legionella* απέχει πολύ από την τελειότητα.

Η καλλιεργητική μέθοδος θεωρείται ως «ο χρυσός κανόνας» για την διάγνωση λόγω της μεγάλης ειδικότητας που παρουσιάζει η μέθοδος στην απομόνωση των ειδών *Legionella*. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της καλλιεργητικής μεθόδου είναι η ικανότητα ανίχνευσης όλων των ειδών *Legionella*. Πρακτικά όμως η αξία της μεθόδου υποβαθμίζεται λόγω του μεγάλου χρόνου επώασης (8-10 μέρες), της ειδικής εμπειρίας που απαιτεί και της χρήσης εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων.

Από τις άλλες μεθόδους οι μοριακές και ειδικά η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) με τις παραλλαγές της, χρησιμοποιούνται πολύ γιατί έχουν μεγάλη ευαισθησία, ανιχνεύουν όλα τα είδη *Λεγιονέλλας*, αλλά το κυριότερο ο εργαστηριακός χρόνος είναι πολύ μικρός, μικρότερος από 4 ώρες.

Έτσι σε θετικά αποτελέσματα μπορεί να απαγορευτεί άμεσα η χρήση αυτού του νερού, να εξαλειφθεί κάθε έκθεση σε αυτό: π.χ. απαγόρευση χρήσης ντους, υδρομασάζ κλπ. Συγχρόνως θα πρέπει άμεσα να ληφθούν μέτρα προστασίας των ανθρώπων π.χ. να απολυμανθεί το δίκτυο να αλλάξουν τις εστίες μόλυνσης (βρύσες, ψεκαστήρες κλπ).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σκοπός αυτής της πειραματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανίχνευση και μοριακό χαρακτηρισμό της *Legionella pneumophila* σε πόσιμο νερό (δίκτυα νερού, εμφιαλωμένα, ψύκτες κλπ).

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν 33 δείγματα πόσιμου νερού, από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, προκειμένου να ανιχνευτούν όλα τα είδη των λεγιονέλλων και ειδικά η *Legionella pneumophila*. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων βρέθηκαν 4 θετικά δείγματα. Αυτά είχαν συγκεντρωθεί από σπίτια ανθρώπων που νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομείο για *Legionella pneumophila*.

Ορισμένα προβλήματα που δυσκολεύουν την ανίχνευση των βακτηρίων στο νερό έπρεπε να ληφθούν υπόψη.

Τα 4 δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά, ήταν από ντούς και μπόιλερ. Το γεγονός αυτό συμπίπτει με τα ευρήματα άλλων ερευνών, οι οποίες κατέδειξαν ότι η λεγιονέλλα απομονώνεται σε τέτοια συστήματα. Δηλαδή, συστήματα τα οποία σχηματίζουν αερολύματα, όπως π.χ. πύργοι ψύξης, συστήματα ύδρευσης μεγάλων κτηριακών συγκροτημάτων, αναπνευστικές συσκευές, βρύσες ζεστού νερού, συστήματα κλιματισμού, οδοντιατρικές καρέκλες, «κεφαλές» ντούς. Αυτά τα συστήματα συντελούν στην μετάδοση της νόσου λόγω των σταγονιδίων νερού, μολυσμένων αμοιβάδων με λεγιονέλλες, που εκτοξεύουν, με την εισπνοή των οποίων μολύνεται ο άνθρωπος.

Πράγματι, τα αποτελέσματα της έρευνάς μας συμπίπτουν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών στο ίδιο θέμα, που παρατίθενται στην βιβλιογραφία.

Από τα 4 δείγματα, τα οποία βγήκαν θετικά, το 1 ήταν ζεστό άμεσο (μόλις τρέξει) νερό από το ντουζ, θερμοκρασίας 41°C, τα 2 κρύο άμεσο από ντουζ θερμοκρασίας 22°C και 22,5°C το καθένα και το άλλο ήταν επιστροφής από boiler θερμοκρασίας 59°C.

Στην διαθέσιμη βιβλιογραφία μας υπάρχει το δεδομένο ότι είναι εύκολο να βρεθεί η λεγιονέλλα σε θερμοκρασίες από 25 °C έως 45 °C. Όμως έχει αποδειχθεί ότι είναι ανθεκτική για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Στην δική μας περίπτωση τα δύο από τα τέσσερα θετικά δείγματα ήταν, όπως προαναφέρθηκε σε θερμοκρασία 22°C και 22,5°C.

Επίσης, το ένα από τα θετικά δείγματά μας ήταν σε θερμοκρασία 41°C, γεγονός που συμπίπτει με τα βέλτιστα θερμοκρασιακά όρια της βιβλιογραφίας. Τέλος, το ένα από τα τέσσερα θετικά δείγματά μας βρέθηκε σε θερμοκρασία 59°C. Σε πολλές προγενέστερες έρευνες, έχει δείχθει ότι η λεγιονέλλα είναι αρκετά θερμοανθεκτική και μπορεί να επιβιώσει για ώρες σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τις βέλτιστες. Το δεδομένο αυτό επιβεβαιώθηκε από την λήψη λεγιονέλλας στην θερμοκρασία των 59°C στην έρευνά μας.

Η υπάρχουσα νομοθεσία στην Ελλάδα έχει θεσπίσει τα εξής επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης Λεγιονέλλας στο κοινόχρηστο δίκτυο θερμού νερού:

Ο κίνδυνος μόλυνσης με Λεγιονέλλες είναι μικρός όταν η περιεκτικότητα με *Legionella pneumophila* στο δίκτυο είναι μικρότερη των 1000 ΜΣΑ/L (Μονάδες Σχηματιζόμενων Αποικιών ανά λίτρο). Αυτή η συγκέντρωση ορίζεται ως στάθμη στόχος.

Όταν η περιεκτικότητα με *Legionella pneumophila* στο δίκτυο είναι μεγαλύτερη των 1000 ΜΣΑ/L και μικρότερη των 10000 ΜΣΑ/L, τότε γίνεται επανεξέταση του νερού με νέα δειγματοληψία. Η καταμέτρηση θα πρέπει να επιβεβαιωθεί από την άμεση επανάληψη της δειγματοληψίας. Εάν μια παρόμοια μέτρηση διαπιστωθεί εκ νέου, θα πρέπει να ληφθούν διορθωτικές δράσεις.

Όταν η περιεκτικότητα με *Legionella pneumophila* στο δίκτυο φθάσει τα 10000 ΜΣΑ/L, τότε απαιτείται τεχνική επέμβαση για να εξαλειφθεί κάθε έκθεση σε αυτές: π.χ. απαγόρευση χρήσης ντουζ, υδρομασάζ κλπ. Συγχρόνως θα πρέπει άμεσα να απολυμανθεί το δίκτυο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας μας, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος μόλυνσης του πληθυσμού από λεγιονέλλα μέσω των συστημάτων οικιακής χρήσης ζεστού ή κρύου νερού. Κρίνεται σκόπιμο επομένως, η απαγόρευση που υπάρχει από τη νομοθεσία στην χρήση αυτών των συστημάτων από τον πληθυσμό, όταν ξεπερνιόνται τα όρια περιεκτικότητας με *Legionella pneumophila* στο δίκτυο ύδρευσης, να συνεχίσει να εφαρμόζεται πιστά και με ακρίβεια. Συγχρόνως θα πρέπει άμεσα να ληφθούν τεχνικά μέτρα προστασίας π.χ. να απολυμανθεί το δίκτυο να αλλάξουν τις εστίες μόλυνσης (βρύσες, ψεκαστήρες κλπ) . Η απαγόρευση αναθεωρείται μετά την εκτέλεση των έργων αφού επαναληφθούν οι έλεγχοι και βγουν αρνητικά τα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brenner DJ. 1987. Classification of Legionellae. *Semin in Respir Infect*, 4:190-205.
2. Byrne B., Swanson MS. 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* 66:3029-3034.
3. Campo AM., Apraiz D. 1988. Epidemiological study of the *Legionella pneumophila* presence in potable water in Alicante municipal waters of Alicante, Spain, *Aqua. The J of the Intern Wat Supp Asooc*, 3:116-119.
4. Cianciotto NP. 2001. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*, *Intern J of Medic Microbiol*, 5:331-343.
5. Dennis R. 1988b. Legionnaires' disease – preventative maintenance. *Jo of the Instit of Hospit Engineer*, 42 :14-15.
6. Edelstein PH. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J of Clinic Microbiol*, 14:298-303.
7. Edelstein PH, 2007. *Legionella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington: Americ Soc for Microbiol, 835-49.
8. EP. 1985. *Legionella Criteria Document*. United States Environmental Protection Agency, Office of Water. Washington, DC.
9. Fang GD., Yu VL., Vickers RM. 1989. Disease due to the Legionellaceae (other than *Legionella pneumophila*): Historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. *Medic (Baltimore)*, 68:116-132.
10. Fields BS., Benson RF., Besser RE. 2002. *Legionella* and Legionnaire's disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*, 15:506-526.
11. Gachon C., et al, 2004. "Real Time PCR: what relevance to plant studies ?". *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55, No. 402, Σελ 1445-1454.
12. Hammer BK., Tateda ES., Swanson S. 2002. A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Molecul Microbiol*, 44:107-118.

- 13.**Houghton S. et al, 2006. "RealTime PCR: Overview and applications". Surgery, Vol 139, No 1, Σελ. 1-5.
- 14.**Hunt M., 2006. "Real Time PCR Tutorial". University of South Carolina.
- 15.**Horwitz MA. 1993. Toward an understanding of host and bacterial molecules mediating pathogenesis. In: Barbaree JM, Breiman RF and Doufur AF, eds. Legionella: current status and emerging perspectives, Washington, DC. Amer Soc for Microbiol, 55-62.
- 16.**Igram JG., Plouffe JF. 1994. Danger of sputum purulence screens in culture of Legionella species. J of Clinic Microbiol, 32:209-10.
- 17.**Kusnetsov JM., et al. 1996. Growth, respiration and survival of Legionella pneumophila at high temperatures. J of Appl Bacteriol, 81:341-347.
- 18.**McCoy WF. 2005. Preventing Legionellosis. London, IWA Publishing.
- 19.**McDate JE. 2002. Legionnaires' Disease 25 Years Later: Lessons Learned. Legionella. R. Marre, Y. Abu Kwaik, C. Bartlett et al. Washington, D.C., ASM Press: 1-10.
- 20.**McDate JE., Shepard CC., et al. 1977. Legionnaires' disease : isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med, 297: 1197-1203.
- 21.**Murdoch DR. 2003. Diagnosis of Legionella infection. Clin Infect Dis, 36:64.
- 22.**Rowbotham TJ. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. J of Clinic Pathol, 33:1179-1183.
- 23.**Swanson M. Updated. 2007: University of Michigan Department of Microbiology and Immunology.
- 24.**Swanson MS., Hammer BK. 2000. Legionella pneumophila pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. Annu Rev Microbiol, 54:567-613.
- 25.**Tison DL., Seidler RJ. 1983. Legionella incidence and density in potable drinking water supplies. Appl and Environ Microbiol, 45:337-339.
- 26.**Wilson Deborah, Yen-Lieberman Belinda, 2006, Detection of Legionella pneumophila by Real-Time PCR for the mip Gene,41(7):3327-3330

- 27.** Winn WC Jr. 1993. Legionella and the clinical microbiologist. Infect Dis Clin North Am, 7:377-92.
- 28.** Yanez MA., Carrasco-Serrano C., et al. 2005. Quantitative detection of Legionella pneumophila in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA Gene. Appl Environ Microbiol, 71:3433-3441.