

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEGIONELOZELOR

36.1. DATE GENERALE

36.1.1. O minidefiniție

Legionelele sunt mici bacili, ocazional cu forme filamentoase. Au perete de tip gram-negativ, dar fixează prost coloranții de anilină. Nesporulați. Uzual mobili prin unul sau mai mulți flageli subpolari. Aerobi, cultivă numai pe medii suplimentare cu L-cisteină și săruri de fier. Catalazopozitivi, oxidazonegativi sau slab pozitivi. Inactivi asupra carbohidraților.

36.1.2. Repere taxonomice

Sunt încadrați în familia *Legionellaceae*, genul *Legionella*, care în prezent reunește 35 de specii cu 55 serogrupe definite prin antigenul somatic lipopolizaharidic. Cu ajutorul anticorpilor monoclonali în cadrul serogrupelor au fost definite serovaruri, care sunt markeri epidemiologici utili, dar puțin accesibili.

36.1.3. Habitat

Habitatul natural al legionelelor sunt sursele și rezervoarele naturale sau artificiale de apă, unde stabilesc relații complexe cu microbiocenozele proprii acestor biotopuri: cianobacteriile sau algele verzi le furnizează nutrienți prin transformarea CO₂ în compuși organici; amoebele le ingeră în număr mare și le mențin viabile în aerosoli. Căldura (35—45°C) le favorizează multiplicarea. Produc cantități mari de glicocalix, care le favorizează persistența și acumularea în tuburi și conducte de cauciuc, sticlă, chiar siliconate. Suprafețele de oțel inoxidabil și de cupru le sunt mai puțin favorabile, dar fierul, zincul și aluminiul le favorizează creșterea. În apa distilată supraviețuiesc și un an. Au fost izolate din nămol, noroi și apa de ploaie, dar niciodată din sol și pulberi.

Sunt transmise prin aerosolii produși de instalațiile de condiționare a aerului, nebulizatoare, ploaie.

36.1.4. Factori de patogenitate

Legionelele sunt bacterii *facultativ intracelulare*. Afectarea mai multor organe în cursul legionelezelor sugerează intervenția unor toxine, dintre care mai importante apar:

■ O *citotoxină termostabilă*, care protejează legionelele de efectul bactericid al polimorfonuclearelor neutrofile prin deprimarea formării de super-oxid, a fost identificată la mai multe specii de *Legionella*. Este letală pentru embrionii de găină și culturile celulelor ovariene ale hamsterilor de China.

■ O *protează*, produsă de *Legionella pneumophila*, inoculată intranasal la cobai produce efecte similare cu cele din boala legionarilor umană: zone alveolare de hemoragie și edem cu moartea a 25% din animale în 30 minute și a 25% până la 24 ore; restul de 50% din supraviețuitori dezvoltă după 24 ore leziuni pneumonice fibrinopurulente confluente.

■ *Hemolizinele* produse de legionele lizează eritrocitele mai multor specii (om, iepure, oaie, cobai), dar cel mai puternic efect îl au asupra eritrocitelor de câine.

Endotoxina pare a avea un efect limitat în patogenia legionelelor.

36.1.5. Receptivitatea la legioneleze

Receptivitatea la infecția aerogenă cu legionele este mai mare și evoluția îmbolnăvirilor mai gravă după vârsta de 50 ani și la imunosupresați. Plăgile, inclusiv cele postoperatorii, în contact cu apa contaminată pot fi poartă de intrare pentru legionele.

Tabelul 36.1. Speciile de *Legionella* patogene pentru om

Specii	Număr de serogrupe	Izolare de la om	Răspuns imun la om	Boala cauzată la om
<i>L.antis</i>	1	+	+	Pn
<i>L.bozemanii</i>	2	+	+	Pn
<i>L.cincinnatiensis</i>	1	+	...	Pn
<i>L.dumoffii</i>	1	+	+	Pn
<i>L.feeleii</i>	2	+	+	SG1:Pn, FP SG2:Pn
<i>L.gormanii</i>	1	+	+	Pn
<i>L.hackeliae</i>	2	+	...	Pn
<i>L.longbeachae</i>	2	+	+	Pn
<i>L.maceachernii</i>	1	+	...	Pn
<i>L.micdadei</i>	1	+	+	Pn, FP
<i>L.pneumophila</i>	15	+	+	Pn, FP
<i>L.wadsworthii</i>	1	+	+	Pn

Abrevieri: SG — serogrup; FP — febră de Pontiac; Pn — pneumonie; ... — lipsa informațiilor.

36.1.6. Legionelozele

Din cele 35 specii de *Legionella*, cunoscute în prezent, numai pentru 12 a fost argumentată clinic, microbiologic și serologic patogenitatea la om (tabelul 36.1). Patogenitatea naturală pentru animale este necunoscută. Principalul agent etiologic al infecțiilor este *Legionella pneumophila*, specie cu 15 serogrupe, dintre care serogrupul 1 determină cele mai multe infecții.

Principalele două boli produse de legionele sunt:

■ *Boala legionarilor*, care are o incubatie de 5—6 zile și se manifestă ca o pneumonie, în general severă (focare fibrinopurulente extensive, cu tendință de excavare la imuno-deprimati, reacție pleurală), cu manifestări multisistemice (digestive, renale, hepatice, psihice). Boala evoluează mortal la 15—20% din pacienți.

■ *Febra de Pontiac* este tot o infecție respiratorie acută, dar fără pneumonie. Are incubatie scurtă de cca 36 ore și evoluează benign, cu febră, cefalee, mialgii, spre vindecare spontană după 5—6 zile.

Mai rar legionelozele se manifestă ca *pericardite*, *abcese la nivelul punctelor de hemodializă*, *peritonite*, *infecții ale plăgilor*.

Uneori, după vindecarea clinică, persistă o *infecție latentă* cu *Legionella*, care întreține mulți ani un titru ridicat al anticorpilor.

36.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A LEGIONELOZELOR

36.2.1. Diagnosticul direct (microbiologic)

36.2.1.1. Prelevate patologice

În funcție de forma clinică a infecției se prelevă și se examinează: aspirat transtraheal, spălătură bronșică, biopsii pulmonare, exsudat pleural, pericardic (dacă există). Sputa asigură șanse minime de izolare a legionelelor. Din probe de sânge heparinat, se separă prin centrifugare leucocitele, care sunt lizate și însămânțate pe mediul de izolare, puri din exsudate din abcese și plăgi.

Pentru depistarea antigenică a legionelelor infectante se prelevă probe de urină.

36.2.1.2. Microscopia directă

Colorația Gram este practic inutilă, colorația Giménez sau colorația Dieterle prin impregnație argentică dau rezultate nesatisfăcătoare.

Indicată este *colorația imunofluorescentă directă*, care are sensibilitatea de 40—50%, dar specificitatea de 95%.

36.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Se epuizează prelevatele necontaminate pe o placă cu geloză BCYE (*Biftered Charcoal Yeast Extract*), care prin conținutul în clorhidrat de L-cisteină și pirofosfat feric satisface necesitățile nutritive specifice legionelelor, iar prin cărbunele activat previne oxidarea fotochimică în extractul de levură. Pentru izolări din prelevate contaminate rezultate mai bune decât utilizarea unui mediu selectiv prin adaos de antibiotice (polimixină B, cefazolin, vancomicină) dă decontaminarea chimică prin acidifierea probelor la pH 2 înainte de cultivare. Pentru hemoculturi se folosește mediul CYE difazic adăugat cu L-cisteină și pirofosfat feric.

Singura carboxifilă este *L.gormanii*. Pentru a-i asigura izolarea, se incubează culturile la 37°C în atmosferă cu 2,5% CO₂ (borcan cu lumânare). Concentrații de CO₂ peste 5% sunt inhibitorii pentru legionele.

Etapa II. Se urmăresc culturile 7 zile. Primele colonii apar abia după 2—3 zile de incubare. În subculturi legionelele cresc mai rapid: în 1—2 zile.

Inițial coloniile sunt punctiforme și cultura poate fi observată în ariile confluențe. Diametrul lor crește progresiv și ajunge la 1—2 mm după 3 zile și la 3—4 mm după o săptămână. Sunt rotunde, cu margini ușor neregulate, convexe, strălucitoare, verzui. Examinat cu lupa, în transparență, au aspect reticulat de «sticlă tăiată». Se repică 2—3 colonii pe un mediu clar, e.g. geloză Feeley-Gorman, pentru a obține cultura pură cu caracterele necesare identificării.

Etapa III. Se identifică izolatele pe baza următoarelor caractere:

■ **Microscopice.** Legionelele apar ca bacili gramnegativi polimorfi de 0,3—0,9 μm grosime și 2—20 μm lungime palid colorați. Pe frotiurile colorate Dieterle sau Giménez se fixează mai intens colorantul. În primele subculturi *L.pneumophila* prezintă granule sudanofile de β-hidroxitiriat, care umflă corpul bacililor.

■ **De cultivare.** Sunt strict aerobe. Nu cultivă pe geloză-sânge, ci numai pe mediu special îmbogățit, formând colonii cu aspectul descris mai sus. Examinat în camera obscură sub radiație ultravioletă coloniile unor specii sunt fluorescente (tabelul 36.2).

■ **Biochimice.** Unele caractere sunt pozitive (mobilitatea, catalaza), altele negative (reducerea nitraților, ureaza, fermentarea carbohidraților), iar altele variabile cu specia (pigmentogeneza pe mediu adăugat cu tirozină, oxidaza, hidroliza hipuratului, producerea de β-lactamază) (tabelul 36.2).

■ **Structura antigenică** este identificată prin colorație imunofluorescentă sau aglutinare cu seruri specifice de specie și serogrup. Utilizarea anticorpilor monoclonali evită reacțiile încrucișate intra- sau interspecifice în cadrul genului *Legionella* sau cu alte genuri (*Yersinia pestis*, *Pseudomonas fluorescens* etc.).

■ **Identificarea acizilor grași din structura peretelui celular sau a ubiquinonelor din membrana citoplasmică** se face prin cromatografie gaz-lichid, metodă inaccesibilă încă majorității laboratoarelor.

Etapa IV. Se analizează și interpretează rezultatele testelor de identificare și se completează buletinul de analiză. Dacă specificitatea izolării este de 100%, sensibilitatea nu depășește 80%.

Tabelul 36.2. Caractere diferențiale ale speciilor de *Legionella* patogene pentru om

Caractere	<i>L. ani-sa</i>	<i>L. bo-zema-nii</i>	<i>L. cin-cin-nati-ensis</i>	<i>L. du-mof-fii</i>	<i>L. fe-leli</i>	<i>L. gor-ma-nii</i>	<i>L. hae-cke-liae</i>	<i>L. lon-gbe-achae</i>	<i>L. ma-cea-cher-nii</i>	<i>L. mic-da-dei</i>	<i>L. pne-umo-phila</i>	<i>L. wad-swor-thii</i>
Creștere pe geloză-sânge	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Creștere pe geloză BCYE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Autofluorescență	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—
Granule sudanofile	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Mobilitate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—
Brunificare pe mediul cu tirozină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—
Catalază	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducerea nitraților	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acid din carbohidrați	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Oxidază	+	V	—	—	—	—	+	+	+	+	V	—
β -Lactamază	+	V	...	+	—	+	+	V	—	—	+	+
Hidroliza hipuratului	—	—	—	—	V	—	—	—	—	—	+	—

Simboluri: În coloana «Autofluorescență»: «+» — alb-albastru, «—» — absentă; în alte coloane: «+» — 90% din tulpini pozitive; «—» — $\geq 90\%$ din tulpini negative; ... — lipsa informațiilor; V — reacții variabile.

36.2.1.4. Detectarea antigenilor de *Legionella* în probele de urină

Se face prin ELISA, metoda radioimunologică sau latex-aglutinare. La o specificitate și sensibilitate asemănătoare, detectarea antigenului urinar permite un diagnostic mai rapid decât izolarea legionelelor.

36.2.2. Diagnosticul serologic

Se prelevă probe de ser precoce (în prima săptămână de boală) și tardiv (după 15, apoi după 30 zile de la prima recoltă). Se urmăresc anticorpii prin imunofluorescență indirectă. Semnificative pentru diagnostic sunt titruri peste 1:128 (*L.pneumophila*) sau 1:256 (alte specii) ori o creștere mai mare de 4 ori a titrului în serurile tardive față de serul precoce.

36.2.3. Biopreparate și medicamente pentru diagnosticul de laborator și tratamentul legionelozelor

- Seruri imune anti-*Legionella* cu specificitate de specie și serogrup pentru identificarea antigenică a izolatelor prin aglutinare sau imunofluorescență.
- Seturi de reactivi pentru identificarea antigenilor solubili de *Legionella* prin ELISA, RIA sau latex-aglutinare.
- Antigen pentru serodiagnostic prin imunofluorescență indirectă.
- Antibioticul de elecție pentru terapia legionelozelor: eritromicina, asociată în cazurile foarte grave cu rifampicină.