

Legioonalaistaudin in vitro -diagnostiikka

TkK-tutkielma
Turun Yliopisto
Bioteknologian laitos
Biotekniikka
maaliskuu 2024
Nuutti Pietarinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Turun Yliopisto
Bioteknologian laitos
NUUTTI Pietarinen, Legioonalaistaudin *in vitro* -diagnostiikka
TkK, 20 s.
Biotekniikka
maaliskuu 2024

Turun Yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check-järjestelmällä.

Legioonalaistauti on harvinainen sairaus. Siitä huolimatta se aiheuttaa toiseksi eniten vakavia keuhkokuumeetapauksia. Taudinaiheuttaja on gramnegatiivinen *Legionella*-sauvabakteeri ja erityisesti *L.pneumophila* serotyyppi 1, joka aiheuttaa 90 % kaikista taudin tartunnoista. *Legionella* esiintyy luonnossa makeassa vedessä, mutta vain pieninä pitoisuuksina. Ihmisen luomat keinotekoiset vesijärjestelmät ovat bakteerille otollisia kasvupaikkoja. Tauti leviää bakteerin saastuttamasta vedestä aerosoleina. Taudin luonteen ja vakavuuden takia nopea ja luotettava *in vitro* -diagnostiikka on elintärkeää potilaiden kannalta.

Tutkielmassa keskityttiin erityisesti virtsan antigeenipikatesteihin (UAT), serologiseen testaukseen, polymeerasiketjureaktioon (PCR), silmukavälitteiseen isotermiseen monistustekniikkaan (LAMP), soluviljelyyn ja massaspektrometriaan.

Virtsan antigeenitestit (UAT) suoritetaan kajoamattomalla virtsanäytteellä. Testit ovat tyypiltään immunokromatografisia (ICT), jotka tunnetaan myös nimellä lateraalivirtaustesti (LF). UAT:t käyttävät pääosin monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat spesifisesti *L.pneumophila* serotyyppi 1:den lipopolysakkarideja, jolloin ne ovat pääosin rajoittuneita havaitsemaan ainoastaan serotyyppi 1:stä. Uusimmat UAT testit havaitsevat lipopolysakkaridien lisäksi 50S ribosomaalista L7/L12 proteiinia, jolloin ne kykenevät havaitsemaan loputkin 15:sta *L.pneumophila* serotyyppiä. Virtsanantigeenitestit ovat nopeasti suoritettavia ja testitulokset ovatkin havaittavissa jopa 15 minuutissa. PCR ja LAMP tekniikoissa on potentiaalia, mutta ne vaativat lisää tutkimustyötä

Nopean ja luotettavan *in vitro* -diagnostiikan avulla potilaiden hoito voitaisiin aloittaa varhaisessa vaiheessa ja voitaisiin välttää teho-osastolle joutuminen sekä vähentää taudin kuolleisuusastetta.

Avainsanat:

legioonalaistauti, *Legionella pneumophila*, virtsan antigeeni testi (UAT), serologinen määrittäminen, lipopolysakkaridi (LPS) ja ribosomaalinen L7/L12 proteiini.

Sisällysluettelo

1	Johdanto	2
2	Virtsan antigeenitesti (UAT)	4
2.1	<i>Legionella pneumophila</i> LPS (Lipopolysakkaridit)	4
2.2	50S Ribosomaalinen L7/L12 proteiini.....	6
2.3	Kaupalliset UAT kitit.....	7
2.3.1	Novel kit (LAC-116).....	7
2.3.2	BinaxNOW Legionella (Binax).....	7
2.3.3	Biotest legionella urinary antigen EIA (Biotest AG, Dreieich, Germany)	9
2.3.4	Binax <i>Legionella</i> urinary antigen EIA kitti.....	9
2.3.5	The ribotest ® Legionella (Asahi Kasei Pharma Corporation, Tokyo, Japan)	10
2.4	UAT hyödyt ja rajoitteet	10
3	Serologinen testaus	11
4	PCR (Polymeraasi ketjureaktio)	13
5	LAMP (Silmukavälitteinen isoterminen monistustekniikka)	14
6	Soluviljely.....	15
7	Massaspektrometria.....	17
8	Johtopäätökset.....	18
9	Kirjallisuus	19

1 Johdanto

Legionella on aerobinen gramnegatiivinen sauvabakteeri (Brady ja Sundareshan 2023). Sen eri lajeja on tunnistettu 58 ja serotyyppejä 78. Näistä 78 serotyypistä vähintään 24:n on mahdollista aiheuttaa alahengitystieinfektioita ihmisille (Bai ja muut 2023). *Legionella pneumophila* laji sisältää 15 erilaista serotyyppiä. Serotyyppi 1 on yleisin, jonka jälkeen tulevat 4 sekä 6 (Boer ja Yzerman 2004). Arvioilta noin 90 % legioonalaistaudin tartunnoista aiheuttaa *L.pneumophila*:n yleisin serotyyppi 1 (Brady ja Sundareshan 2023).

Legionellaa esiintyy luonnossa makeassa vedessä (järvet, joet ja purot), mutta yleensä sen pitoisuus luonnollisissa olosuhteissa on pieni (Steinert ja muut 2002). Suurimmat määrät bakteeria löydetään 30–40 asteisesta vedestä (Steinert ja muut 2002). Keinotekoiset vesijärjestelmät ovat bakteereille optimaalisia lämpötilansa vuoksi. Ihmiset sairastuvatkin Legioonalaistautiin hengittämällä bakteerin saastuttamasta vedestä peräisin olevia aerosoleja (Baron 1996). Ihmiset voivat sairastua legioonalaistautiin toisellakin tavalla, tällöin saastunutta vettä pääsee elimistöön suoraan hengityksen mukana esimerkiksi vesisynnytyksessä (Bai ja muut 2023). Hengitysteihin päästessä bakteeri sitoutuu hengitysepiteelillä sijaitseviin soluihin ja alveolaarisiin makrofageihin, joissa se lisääntyy (Brady ja Sundareshan 2023). Bakteerin eksponentiaalinen lisääntyminen johtaa legioonalaistautiin. (Bai ja muut 2023)

Legioonalaistauti on harvinainen sairaus, joka aiheuttaa erittäin vakavaa keuhkokuumetta. Keuhkokuumeen lisäksi se saattaa aiheuttaa potilaille keskeisten elintoimintojen samanaikaista häiriintymistä. Se aiheuttaa vuosittain arvioilta noin 1–10 % kaikista avohoitokeuhkokuumeista ja on toiseksi suurin taudinaiheuttaja vakavissa keuhkokuumetapauksissa. Tauti voi aiheuttaa yhdessä viikossa hoitamattomille potilaille vakavan keuhkokuumeen lisäksi erittäin vakavia komplikaatioita. Esimerkiksi hengityksen totaalisen lamaantumisen, shokkitilan, äkillisen munuaisten vajaatoiminnan ja monielinhäiriön. Sairaalahoidossa olevista potilaista jopa 44 % vaativat hoitoa teho-osastolla ja taudin kuolleisuusaste on 10–15 %. Taudin luonteen sekä korkean kuolleisuusasteen vuoksi olisi tärkeää, että potilaat voitaisiin diagnosoida mahdollisimman nopeasti. On kuitenkin valitettavaa, että taudin

aikainen diagnosointi on edelleen haasteellista tarkkojen diagnostisten testien puutteesta. Ongelman ratkaisemiseksi on kehitelty erilaisia *in vitro* -diagnostisia menetelmiä. Tässä tutkielmassa käydään lävitse sekä vertaillaan *Legionellan* havaitsemiseen kehiteltyjä *in vitro* -diagnostisia menetelmiä. (Bai ja muut 2023)

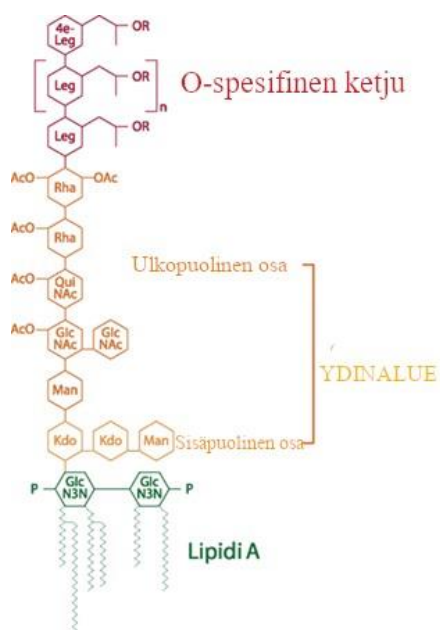
2 Virtsan antigeenitesti (UAT)

Virtsan antigeenitesti eli UAT (Urinary antigen test) on Legionella-taudin diagnosoinnissa yksi käytetyimmistä *in vitro* -diagnostisista menetelmistä. UAT:n etuja ovat sen nopea suoritus, alhainen hinta sekä näytteen oton helppous. Testien toimivuuteen ei myöskään vaikuta potilaan aikaisempi altistaminen antibiooteille. (Kim ja muut 2022)

Näytteenotto suoritetaan virtsanäytteellä eli luonnollisella eritteellä. Näytteenotto tapa on kajoamaton. Testiä suorittaessa virtsanäytteet asetetaan yleensä immunokromatografiseen testiin (ICT), joka tunnetaan myös nimellä lateraalivirtaustesti (LF). ICT/LF kykenee havaitsemaan virtsan antigeenejä jopa 15 minuutissa, mikäli potilaalla on ollut oireita vähintään yhden päivän ajan. ICT/LF toimii lateraalivirtauksen avulla ja sen spesifisyys on miltei 100 %. UAT:t ovat helposti uusittavissa, sillä testi on nopea suorittaa ja näyte tyyppi on luonnollinen (virtsanäyte). UAT:t käyttävät pääosin monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat spesifisesti *Legionella pneumophila* serotyypin 1 lipopolysakkarideja (LPS). LPS:ssät esiintyvät Gramnegatiivisten bakteerien soluseinissä (Pierre ja muut 2017). (Bai ja muut 2023)

2.1 *Legionella pneumophila* LPS (Lipopolysakkaridit)

LPS eli lipopolysakkaridit sijaitsevat bakteerin solukalvon ulkopinnalla ja ovat merkittäviä immunodominanteja antigeenejä. *L.pneumophila* LPS:ssät koostuvat kolmesta erillisestä osasta. Spesifisestä O-ketjusta, ydinalueesta (engl. core regionista) ja Lipidi A:sta O-ketju sekä ydinalue yhdessä muodostavat polysakkaridi alueen LPS:stä ja Lipidi A:n avulla molekyyli kiinnittyy kalvon ulkopintaan. (Kuva 1.) (Shevchuk ja muut 2011)



Kuva 1. *L. pneumophila* lipopolysakkaridin (LPS) kemiallinen rakenne. Rakenne kuvaa LPS:n erilaisia alueita. O-spesifinen ketju, ydinalue, joka koostuu ulkopuolisesta osasta, sisäpuolisesta osasta sekä Lipidi A. (Shevchuk ja muut 2011).

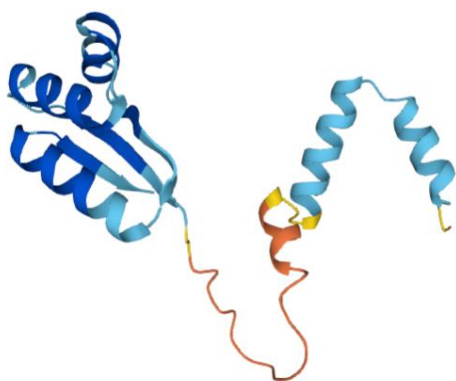
O-ketju *L. pneumophila* LPS:ssä on epätavallinen homopolymeeri sokeri, jonka rakenne on 5-asetaminodino-7-asetamido-8-*O*-asetyyli-3,5,7,9-tetradekso-L-glysero-D-galakto-ei ulosoninen happo (engl. 5-acetaminodino-7-acetamido-8-*O*-acetyl-3,5,7,9-tetradecoxy-L-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (Shevchuk ja muut 2011)). Siitä puuttuu täysin vapaat hydroksyyli ryhmät, jonka vuoksi se on erittäin hydrofobinen molekyyli. (Kuva 1.) (Shevchuk ja muut 2011)

Ydinalue koostuu ulkopuolisesta- sekä sisäisestä osasta. Sen ulkopuolinen osa on oligosakkaridi, joka koostuu ramnoosista (Rha), mannoosista (Man), asetyyliquinosamiini (engl. acetylquinosamine (Shevchuk ja muut 2011)) (QuiNAc) ja asetyyli-glukosamiini (engl. acetylglucosamine (Shevchuk ja muut 2011)) (GlcNAc). Ulkopuolisessa osassa esiintyy myös hydrofobisia ominaisuuksia. Sisäpuolista osaa on rakenteellisesti kuvattu 3-deoksi-D-manno-oct-2-ulosoninen happo (engl. 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid) (Kdo) disakkaridiksi $[[\alpha\text{-Kdo-(2}\alpha\text{4)-}\alpha\text{-Kdo-(2}\alpha\text{6)}]$, joka on yhdistynyt Lipidi A:han. Sisäpuolinen osa on myös välttämätön mikrobikasvun kannalta. (Kuva 1.) (Shevchuk ja muut 2011)

L.pneumophila serotyyppi 1:den LipidiA:lle on ominaista se, että se koostuu epätavallisen pitkästä ketjusta sekä haaroittuneista rasvahapoista. *L.pneumofilan* lipidiA:n erottaa muista gramnegatiivista bakteereista sen rakenteellinen tehtävä. Sen rakenteellinen tehtävä on kiinnittää LPS bakteerin solukalvolle. (Kuva 1.) (Shevchuk ja muut 2011)

2.2 50S Ribosomaalinen L7/L12 proteiini

50S ribosomaalinen proteiini L7/L12 on *L.pneumophila* bakteereissa esiintyvä proteiini ja sen geeni on *rplL*. Sen tehtävä on muodostaa osa ribosomaalista vartta (engl. ribosomal stalk). Ribosomaalinen varsi auttaa ribosomia olemaan vuorovaikutuksessa GTP-sidottujen translaatio tekijöiden kanssa ja on täten tärkeässä roolissa tarkkaa translaatiota. (Kuva 2.) (UniProt n.d.) ("rplL - Large ribosomal subunit protein bL12—Legionella pneumophila (strain Lens) | UniProtKB | UniProt" ei pvm.)



Kuva 2. Legionella pneumophila serotyyppi 1 (kanta Lens) 50S ribosomaalinen proteiini L7/L12 rakenne. ("rplL - Large ribosomal subunit protein bL12—Legionella pneumophila (strain Lens) | UniProtKB | UniProt" ei pvm.)

Ribosomaalinen L7/L12 on uusi biomarkkeri. Sitä tutkitaan jatkuvasti ja erityisesti sen hyödyntämistä *Legionellan havaitsemisessa* (Bai ja muut 2023). Tällä hetkellä ainakin kaksi kaupallista UAT kittiä on julkaistu (Ribotest, LAC-116), jotka hyödyntävät L7/L12 proteiinia.

2.3 Kaupalliset UAT kitit

Taulukko 1. Kaupallisesti saatavilla olevat *Legionella* virtsan antigeeni testit

Yritys	Tuotenimi	Testityyppi	Herkkyyys	Spesifisyys
Alere	BinaxNOW <i>Legionella</i> urinary antigen card	ICT ^a	84 %	100 %
Alere	Binax <i>Legionella</i> urinary antigen EIA	EIA ^b /ELISA ^c	63.76 %	100 %
Asahi Kasei Pharma Corp.	The ribotest <i>Legionella</i>	ICT ^a	Ei tietoa	Ei tietoa
Asahi Kasei Pharma Corp.	The novel kit (LAC-116)	ICT ^a	79 %	Ei tietoa
Biotest AG	Biotest <i>Legionella</i> urinary antigen EIA	EIA ^b /ELISA ^c	66.66 %	100 %

^aICT, Immunokromatografinen testi; ELISA, Entsyymi-immunologinen määrittäminen; EIA, Entsyymi-immunologinen testi

2.3.1 Novel kit (LAC-116)

Asahi Kasei Pharma Corporation (Tokyo, Japan) kehitti uudenlaisen virtsan antigeenitestin 11.05.2015. Tämä hybridi kitti kykenee havaitsemaan *L.pneumophila* serotyypin 1:den lipopolysakkarideja (LPS) ja ribosomaalisen L7/L12 proteiinin, joka esiintyy jokaisessa 15 *L. pneumophila* serotyypissä. Testi on tyypiltään immunokromatografinen (ICT). Testikitti on suunniteltu havaitsemaan *Legionella* lajeja mukaan lukien *L.pneumophila* serotyypit 1–15, *L.dumoffii* ja *L. bozemanai*. (Ito ja muut 2021)

2.3.2 BinaxNOW Legionella (Binax)

BinaxNOW *Legionella* on nopea immunokromatografinen testi (ICT) kvalitatiiviseen *L.pneumophila* serotyyppi 1:den antigeenin havaitsemiseen virtsasta. (T. G. Harrison ja muut 2001)



Kuva 3. BinaxNOW *Legionella* testikortti. (“*Legionella* Antigen, Random, Urine—Seattle Children’s Hospital” ei pvm.)

Testikortin testiliuska sisältää testiviivan (engl. Patient line), kontrolliviivan (engl. Control line) sekä konjugaattityynyn. Testiviivalla käytetyt vasta-aineet ovat polyklonaalisia jäniksen anti-*Legionella pneumophila* serotyypin 1:den vasta-aineita, jotka ovat kiinnitetty nitroselluloosakalvolle. Kontrolliviivassa käytetyt vasta-aineet ovat vuohen-anti-jänis IgG vasta-aineita (engl. Goat-anti-rabbit IgG). Kontrolliviivan vasta-aineet ovat kiinnitetty samalle kalvolle eri kohtaan. Molempiin testin vasta-aineisiin on kiinnitetty visualisoivia partikkeleita, jotka ovat kuivattu konjugaattityynylle. Konjugaattityyny ja testi- sekä kontrolliviivat sisältävä kalvo on yhdistetty muodostamaan testiliuskan. Näytekaivo on suunniteltu pitämään sisällään sivelytikun, joka sisältää virtsanäytettä. Testiliuska ja näytekaivo on kiinnitetty vastakkaiselle puolelle kirjanmuotoiseen testikorttiin. (“*Legionella* Antigen, Random, Urine—Seattle Children’s Hospital” ei pvm.)

Virtsanäytteessä kastettu sivelytikku asetetaan näytekaivoon, jonka jälkeen lisätään tuotteen mukana tullutta reagenssia. Tämän jälkeen kirjan muotoinen testikortti suljetaan, jolloin näyte tulee kontaktiin testikortin kanssa. Näytteet kulkevat testikortilla lateraalivirtauksen avulla. Näytteen kulkeutuessa testiviivalle *L. pneumophila* serotyyppi 1 virtsan antigeeni, joka on kiinnittynyt testiviivalla sijaitseviin immobilisoiuihin anti-*L. pneumophila* serotyyppi 1 vasta-aineisiin, reagoi vielä sitoen visualisoiuihin konjugoituihin vasta-aineisiin muodostaen testiviivan. Immobilisoidut vuohen-anti-jänis IgG myös kiinnittyy visualisoivaan konjugaattiin muodostaen kontrolliviivan. Positiivinen testituloks on havaittavissa visuaalisesti 15 minuutissa tai vähemmässä ajassa riippuen antigeenin konsentraatiosta

virtsanäytteessä. ("Legionella Antigen, Random, Urine—Seattle Children's Hospital" ei pvm.)

Testi ja kontrolliviivat ovat havaittavissa viivoilla, jotka ovat pinkin tai liilan värisiä. Positiivisessa testituloksessa molemmat kontrolli sekä testiviiva on näkyvissä taas, kun negatiivisessa testituloksessa on havaittavissa ainoastaan kontrolliviiva. Mikäli ei testikortilla näy lainkaan kontrolliviivaa on testikortti virheellinen ja tuloksia ei voida käyttää. ("Legionella Antigen, Random, Urine—Seattle Children's Hospital" ei pvm.)

2.3.3 Biotest legionella urinary antigen EIA (Biotest AG, Dreieich, Germany)

Biotest legionella urinary antigen EIA kitin toiminta mekanismi on perinteinen kaksipuoleinen ELISA, joka käyttää polyklonaalista jäniksen antiseerumia kaappaamaan liukoisen antigeenin sekä peroksidaasileimattuja vasta-aineita visualisoimaan antigeenejä. Kitti on suunniteltu havaitsemaan *L.pneumophila* 1 serotyypin lisäksi muitakin serotyyppiä sekä muita *Legionella* lajeja. 1998 suoritetussa tutkimuksessa todettiin kitin herkkyudeksi normaalissa virtsassa 66.66 % sekä väkevöidyssä virtsassa 86.66 % (Taulukko 1) (Domínguez ja muut 1998). (T. Harrison ja muut 1998)

2.3.4 Binax *Legionella* urinary antigen EIA kitti

Binax *Legionella* urinary antigen EIA oli ensimmäisiä kaupallisia EIA kittejä *L. pneumophilaa* vastaan. Kitin on raportoitu olevan herkkä ja spesifinen, mutta ainoastaan *L.pneumophila* serotyyppi 1:den havaitsemiseen. (T. Harrison ja muut 1998)

Kitin toiminta mekanismi on samanlainen kuin Biotest legionella urinary antigen EIA:lla. 1998 suoritetussa tutkimuksessa testikitin herkkyudeksi määriteltiin 63,76 % normaalissa virtsassa sekä 88,88 % väkevöidyssä virtsassa. (Taulukko 1) (Domínguez ja muut 1998)

2.3.5 The ribotest® Legionella (Asahi Kasei Pharma Corporation, Tokyo, Japan)

The ribotest® *Legionella* on erittäin uusi 2019 julkaistu UAT, joka kykenee havaitsemaan kaikki Legionellan serotyypit. Se on testityypiltään ICT ja käyttää vasta-aineita, jotka tunnistavat *L.pneumophilan* ribosomaalista L7/L12 proteiinia sekä *L.pneumophila* serotyypin 1 lipopolysakkarideja. (Taulukko 1) (Nakamura ja muut 2021)

2.4 UAT hyödyt ja rajoitteet

Virtsanäytteistä otettujen UAT:den herkkyys vaihtelee 55–80 % välillä. Eniten vaihteluun vaikuttaa sairauden vakavuusaste. Mikäli potilaalla esiintyy ainoastaan lieviä tai kohtuullisia oireita on erittäin todennäköistä, että pelkkä UAT antaa väärän negatiivisen johtuen virtsasta tutkittavan antigeenin vähäisestä konsentraatiosta. UAT:iden herkkyyttä voidaan nostaa väkevöimällä virtsaa ja vähentämällä virtsanäytteen säilöntäaikaa. (Bai ja muut 2023)

Noin 8 % Legioonalaistaudin potilaista ei eritä virtsaan antigeeniä lainkaan ja noin 60 % erittää ajoittain. Ajoittaisen vaihtelun vuoksi negatiivisen UAT:n jälkeen ei voida välittömästi sulkea Legioonalaistautia pois. Negatiivisen UAT:n jälkeen testi voidaan suorittaa potilaalla uudestaan, jolloin testitulokset voi muuttua negatiivisesta positiiviseen ajoittaisen erittymisen takia. (Bai ja muut 2023)

UAT:eita suorittaessa täytyy huomioida, että pitkittynyt antigeenin erittyminen virtsaan voi johtaa väärään positiiviseen testitulokseen. Tutkimusten mukaan virtsan antigeenit voivat säilyä potilaan virtsassa useista päivistä jopa vuosiin. Pitkittynyt virtsan antigeeni positiivisuus voi johtua vaikeasta perussairaudesta tai immuunipuutoksesta. Perussairauden tai immuunipuutoksen omaavilla potilailla matala infektio jatkuu pitkään, jolloin antigeeniä erittyy edelleen virtsaan. (Bai ja muut 2023)

3 Serologinen testaus

Serologinen testaaminen *Legionella* infektiioon on arvokas epidemiologinen työkalu, mutta sillä on pieni vaikutus kliiniseen päätöksen tekoon. Tämä johtuu pitkästä testausajasta. Serologinen testi tulee positiiviseksi vasta viikkojen päästä infektiosta, sillä vasta-aineiden muodostuminen potilaiden elimistöön voi alkaa vasta usean viikon jälkeen tartunnasta. Legioonalaistaudissa kehon tuottamat vasta-aineet ovat yleensä sekoitus IgA, IgM ja IgG vasta-aineita. Serologiset testit havaitsevat kaikkia vasta-aine tyyppisiä. Pelkkä tietyn spesifisen IgM vasta-aineen mittaaminen antaa epätarkan tuloksen akuutissa infektiossa, sillä IgM vasta-aineet voivat esiintyä elimistössä pitkään taudin jälkeen. (Murdoch 2003)

Useimmissa tapauksissa vasta-aineen nelinkertainen lisääntyminen tiitterissä havaitaan yleensä 3–4 viikossa, mutta joissakin tapauksissa voi kestää yli 10 viikkoa. Toipilasvaiheen seerumi näytteen liian aikainen kerääminen voi johtaa väärään negatiiviseen testitulokseen. Väärät negatiiviset testitulokset johtuvat todennäköisesti siitä, että 20–30 % *Legionella*-taudin potilaista ei tuota havaittavaa vasta-aine reaktiota. (Murdoch 2003)

Serologisten testien suosio on vuosien aikana tippunut alhaiseksi. Akuutin- ja toipilasvaiheen seeruminäytteet otetaan 4–8 viikkoa erillään toisistaan ja serologisen testi tuloksen riippuessa vasta-aineen nelinkertaisesta lisääntymisestä tiitterissä. Näytteiden oton välisen pitkänajan vuoksi potilaan mahdollinen hoidon tarve on jo mennyt ohitse. Piilevät sairaudet sekä immunosuppressio voi viivästyttää tai jopa estää vasta-aineen nelinkertaisen kasvun tiitterissä. (Mercante ja Winchell 2015)

Tutkijat ovat havainneet *Legionella* antigeenien ristireaktioita muiden patogeenien (esimerkiksi *Micrococcus pneumoniae* ja *Bacteroides fragilis*), toisen *Legionella* serotyypin tai lajin antigeenien välillä. Ristireagointi voi johtaa serologisen määrityksen spesifisyyden laskuun. Sen vaikutuksen vähentämiseksi tutkijat ovat yrittäneet käyttää spesifisiä diagnostisia antigeenejä kokosolun proteiinien (engl. whole cell protein) sijaan. Usean puhdistetun proteiinin valmistaminen suoritetaan katkaisemalla osittaisia geenisegmenttejä, jotka aiheuttavat ristireagointia ja täten parantaa spesifisyyttä huomattavasti. (Bai ja muut 2023)

Nykyisin käytössä olevat serologiset testaustavat ovat suoran fluoresoinnin vasta-ainetestit (DFA), Epäsuora immunofluoresointi (IFA), Entsyymi-immunologinen määrittely (ELISA) ja mikroagglunaatio testit. DFA testaa vasta-aineita ja IFA testaa antigeeni-vasta-aine komplekseja. EIA ja ELISA, jotka ovat suurimmassa käytössä testaavat antigeenejä tai vasta-aineita. (Bai ja muut 2023)

DFA:ta voidaan käyttää nopeaan diagnosointiin. Testissä värjätyt näytteet ovat sylkinäytteitä (engl. sputum), hengitystie-eritteitä, keuhkopussinestettä tai keuhkoista otetut koepaloja. DFA positiivisuus vähenee sylkinäytteestä nopeasti *Legionellan* vastaisen hoidon aloittamisen seurauksena. DFA testin suorittaminen vaatii ammattitaitoa sekä laboratorio olosuhteet. DFA testien herkkyys on noin 70 % ja spesifisyys noin 90 % *L.pneumophila* serotyypin 1:den havaitsemisessa. (Pierre ja muut 2017). (Cunha 2006)

Nykyisin serologista määrittelyä *Legioonalaistautia* vastaan käytetään pääosin epidemiologisissa tutkimuksissa ja vahvistavana testinä epäiltyyn Legioonalaistautiin, kun patogeenia ei voida muuten eristää. (Bai ja muut 2023)

4 PCR (Polymeraasi ketjureaktio)

Legioonalaistaudin diagnosoinnissa PCR (polymeraasi ketjureaktio) on nykyisin laajassa käytössä. Laajakäyttö Legionalaistaudin diagnosoinnissa perustuu sen ainutlaatuisiin ominaisuuksiin (Bai ja muut 2023). *Legionellan* soluviljelyä ei tarvitse suorittaa ennen PCR testin suorittamista. Tutkimukset ovat osoittaneet, että *Legionella* spesifinen PCR, joka on kohdistettuna 386 emäsparin kokoiseen osaan bakteerin 16S rRNA geeniä voidaan suorittaa jopa 4–8 tunnissa. Usein *Legionellaa* vastaan kehitetyt PCR tekniikat perustuvat ei-spesifisten muuttumattomien alueiden rRNA sekvensseihin. Muuttumattomien alueiden sekvensoinnilla kyetään tunnistamaan kaikki *Legionella* bakteerien alalajit. PCR testit ovat todella spesifisiä (95–100 %), jolloin positiivinen tuloksen seurauksena potilas on ohjattava *Legionella*-spesifiseen antibiootti hoitoon. Yksi tärkeimmistä PCR ominaisuuksista on se, että sen rajoittuneisuus ei liity patogeenin aktiivisuuteen. Se siis mahdollistaa *Legionella:n* DNA:n havaitsemisen vahingoittuneista tai jopa kuolleista bakteereista. (Bai ja muut 2023).

Tällä hetkellä on useita erilaisia PCR:ään pohjautuvia tekniikoita kehityksen alla. Yksi kehityksessä olevista tekniikoista on mPCR (multiplex polymerase chain reaction). mPCR:n kehittäminen mahdollistaisi usean patogeenin havaitsemisen samanaikaisesti. Lisäksi on kehitetty multiplex real-time PCR (rt-PCR) nopeaan *Legionella* lajien tunnistamiseen. The FilmArray (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT) on yksi moninkertaisista PCR alustoista, joka on suunniteltu nopeuttamaan patogeenien tunnistaminen positiivisista verinäytteistä tehdyistä soluviljelmistä. rt-PCR käyttö ei vaadi laajaa teknistä osaamista ja sen käsittelyaika on erittäin lyhyt 1 h. (Bai ja muut 2023).

Legioonalaistautia vastaan kehitettyjä PCR tekniikoita rajoittaa eniten tehokkuuden standardoinnin puute sekä raporttien niukkuus. Herkkyys kaupallisissa PCR kiteissä vaihtelee paljon (17–100 %). PCR:n kyky havaita vahingoittuneita sekä kuolleita patogeeneja voi myös johtaa taudin hoidossa antibioottien toimivuuden aliarviointiin. (Bai ja muut 2023).

5 LAMP (Silmukkavälitteinen isoterminen monistustekniikka)

LAMP eli silmukkavälitteinen isoterminen monistustekniikka on samankaltainen prosessi kuin PCR. LAMP:in erottava tekijä PCR:stä on se, että se vaatii vähemmän laitteistoa sekä testin suorittamiseen vaatima aika on lyhyempi. (Pierre ja muut 2017). LAMP testiin vaikuttaa vähemmän PCR testi tuloksiin vaikuttavat inhiboivat aineet (Pierre ja muut 2017). LAMP analyysi on myös vakaa, nopea sekä suhteellisen edullinen. LAMP:illä DNA:n tai RNA:n monistaminen tapahtuu jatkuvassa lämpötilassa minimaalisella määrällä syklejä tai ilman syklejä. Se optimoi DNA:n tai RNA:n ekstraktion sekä lämpötilan syklisen vaihtelun PCR:ssä (Bai ja muut 2023). LAMP:in kohteena voidaan käyttää 226 emäsparin kokoisen 16S rRNA geenin. Kyseinen geeni on todettu spesifiseksi, jokaiselle *Legionella* suvun lajille (Lu ja muut 2011). Kohde DNA tai RNA fragmentit voidaan monistaa jopa 10^9 – 10^{10} kertaiseksi yhdessä tunnissa isotermaalisissa olosuhteissa (60–65 °C). Tutkijat uskovat, että lisätutkimuksien avulla, että LAMP:in käyttö ei rajoittuisi pelkästään hyvin varusteltuihin sairaaloihin tai laboratorioihin vaan sitä pystyttäisiin suorittamaan jopa pienemmissä sairaaloissa tai kenttätestauksessa ilman tarvetta termosykliselle laitteelle. (Bai ja muut 2023)

6 Soluviljely

Legioonalaistaudin diagnosoinnissa soluviljely potilaalta kerätystä näytteestä on yleisesti käytössä oleva tekniikka. *Legionellaa* voidaan eristää useista erilaisista näytteistä, mutta käytetyimmät ovat sylkinäyte tai keuhkoputken tähystyksessä kerätty näyte. Sylkinäytteen tarkkuutta rajoittaa se, että vain alle puolet taudin potilaista erittää limaa yskimällä (Murdoch 2003). Soluviljelyn avulla voidaan tunnistaa kaikki tunnetut *Legionella* lajit sekä serotyypit (Pierre ja muut 2017). Pesäkkeet ovat monimuotoisia. Alkuvaiheessa ne ovat pieniä sekä pistemäisiä. Kasvaessa ne muuttuvat suuremmiksi ja pyöreiksi, joiden halkaisijat ovat noin 3-4 mm. Pesäkkeissä on yleensä valkoinen keskus sekä harmaavalkoisia alueita (Kuva 4.) (Bai ja muut 2023). Kasvualustana soluviljelyssä käytetään puskuroitua hiili-hiiva-uutetta (BCYE) agarია, johon on lisätty α -ketoglutaraattia. BCYE kasvualusta tarjoaa L-kysteiniä sekä rautaa, jotka ovat elintärkeitä *Legionellan* kasvunkannalta (Murdoch 2003).



Kuva 4. *Legionella* pesäkkeitä BCYE agarissa (”Thermo Scientific™ Legionella BYCE Medium without Cysteine—Products Home” ei pvm.)

Soluviljelyn herkkyys Legionalaistaudin diagnosoinnissa on noin 60–80 %. Heikko herkkyys johtuu bakteerin vaatimasta tarkasta kasvuolosuhteesta sekä pitkästä inkubaatio ajasta. Inkubaatioaika on 3–5 päivästä jopa kahteen viikkoon. Herkkyyttä heikentää myös potilaiden antibioottihoito ennen näytteenottoa, mutta jopa täydellisellä näytteellä ja spesifisen mediumin käytöllä *Legionellan* erottelu on erittäin vaikeaa. Erottelun mahdollistamiseksi soluviljelyn yhteydessä suoritetaan lisäkäsittelyä. (Bai ja muut 2023)

Lisäkäsittelyä on esimerkiksi bakteerien happoesikäsittely. Se vähentää bakteerien tausta flooraa ja johtaa pidempään inkubaatio aikaan. Inkubaatio ajan vähentämiseksi tutkijat kehittivät metodin, jossa soluviljelyä suoritetaan ensin normaalisti kolme päivää. Mikäli kolmenpäivän aikana tutkijat havaitsivat bakteerin ylikasvua. Soluviljely aloitetaan uudestaan selektiivisen happokäsittelyn jälkeen, joka hillitsee liikakasvua. Kyseisen tekniikan avulla on mahdollista erotella *Legionellaa* soluviljelyllä, mutta se voi siirtyä viljeltävästä tilasta elinkelpoiseen mutta ei viljeltävissä (VBNC) tilaan. VBNC tilassa bakteerin kasvunopeus vähentyy radikaalisti, jolloin bakteeria ei voida kasvattaa halutulla nopeudella. Nykyisin soluviljelyä hyödynnetään *in vitro* -diagnostiikassa laajasti tutkimuskäytössä sekä kliinisessä hoitotyössä. (Bai ja muut 2023)

7 Massaspektrometria

Legioonalaistaudin *in vitro* -diagnostiikassa yleisin käytettävä massaspektrometri tyyppi on MALDI-TOF-MS (matriisi-avusteinen laseri desorptio/ ionisaatio-lennonaikana). Massaspektrometria vaatii etukäteen viljellyt bakteeripesäkkeet. (Bai ja muut 2023)

Jokaisella bakteeri lajilla on sille ominaiset proteiini profiilit. Proteiini profiilien erottavana tekijänä käytetään MALDI-TOF-MS. Nykyisin MALDI-TOF-MS tietokantoihin on lisätty ainakin 22 *Legionella* lajia. Jokaisella *Legionella* lajilla on sille spesifinen spektri. (Bai ja muut 2023)

Massaspektrometrian käyttöä Legioonalaistaudin *in vitro* -diagnostiikassa rajoittaa moni eri tekijä. Ennen massaspektrometrian käyttöä täytyy olla jo valmiit erotellut bakteeri pesäkkeet, joista näyte kerätään. Toinen rajoittava tekijä on MALDI-TOF-MS:n rajoittuneisuus lajien spektrien määriin tietokannoissa. Mikäli tietokannasta ei löydy *Legionella* lajia ei sitä voida massaspektrometrillä havaitsemaan. Kolmas rajoittava tekijä on MALDI-TOF-MS erottelun rajoittuneisuus serotyypin tasolla. Sen erottelu perustuu serotyyppi tasolla lipopolysakkaridien sekä merkittävien ulkokalvoproteiinien eroissa eikä esimerkiksi ribosomaalisen proteiinien profilointiin. Erottelussa LPS:n ja ulkokalvoproteiinien käyttö johtaa siihen, että ei kyetä erottelemaan *Legionellan* serotyyppejä toisistaan. Massaspektrometrian käyttö yksin *in vitro* -diagnostisena menetelmänä ei riitä potilaiden diagnosointiin, mutta sitä on mahdollista käyttää tukemaan toisia diagnostisia menetelmiä. Massaspektrometrian kehittämisen kannalta on tärkeää, että tietokantoja saataisiin standardisoitua ja suuremmiksi. Tällä hetkellä tietokannat kattavat vain puolet *Legionella* lajeista. (Bai ja muut 2023)

8 Johtopäätökset

Legioonalaistaudin vastainen *in vitro* -diagnostiikan kehittäminen tarkemmaksi ja nopeammaksi on tärkeää tulevaisuudessakin. Vaikka tauti on harvinainen aiheuttaa se patogeeneistä toiseksi eniten vakavaa keuhkokuumetta ja sen aiheuttama tauti etenee erittäin nopeasti. Ilman oikeanlaista hoitoa tauti aiheuttaa erittäin vakavia oireita ja voi johtaa jopa kuolemaan. Taudin hoidonkannalta on elintärkeää oikea aikainen ja nopea diagnosointi.

Virtsan antigeenitestit ovat mullistaneet Legionaalitaudin *in vitro* -diagnostiikan ja ovatkin nykyään pitkälle kaupallistettuja sekä suuressa käytössä. UAT:t lisäävät potilaiden hoitomyönteisyyttä, sillä testit ovat todella käyttäjäystävällisiä. UAT:eita on myös suhteellisen edullista suorittaa. Eivätkä ne vaadi aina laboratorio olosuhteita. UAT:eita olisi tärkeä kehittää siten, että ne pystyisivät vielä luotettavammin tunnistamaan kaikki 15 *L.pneumophilan* serotyyppejä.

Massaspektrometrian hyödyntäminen tehokkaammin tulevaisuudessa Legionaalitautia vastaan vaatii paljon lisää tutkimustyötä sekä kehitystä. Spektritietokantojen täydentäminen puuttuvilla *Legionella* lajeilla on tärkeää, jotta voitaisiin tunnistaa loputkin *Legionella* lajit.

PCR sekä LAMP tekniikoiden käyttö tulevaisuudessa luotettavammin vaatii paljon lisää tutkimustyötä. Molemmat tekniikat ovat rajoittuneet standardisoinnin puutteesta. Lisätutkimustyön avulla tekniikoita voitaisiin kehittää eteenpäin, jolloin tulevaisuudessa potilaiden diagnosointi tapahtuisi nopeammin.

Sairaaloiden resurssit ovat yleensä erittäin tiukat ja hoitopaikat teho-osastoilla rajallisia. Mikäli *in vitro* -diagnostiikan kehittämisellä sekä tutkimisella voitaisiin ehkäistä legionaalitaudin aiheuttaman tehohoidon tarvetta. Niin rajalliset tehohoitopaikat pysyisivät vapaina ainakin legionaalitaudin kohdalta. Nopeamman ja tarkemman *in vitro* -diagnostiikan avulla voitaisiin vähentää teho-osasto hoidon tarvetta potilailla sekä vähentää taudin kuolleisuusastetta.

9 Kirjallisuus

- Bai, L., Yang, W. & Li, Y. (2023) Clinical and Laboratory Diagnosis of Legionella Pneumonia. *Diagnostics* **13**:280.
- Baron, S. (Toim.) (1996) *Medical Microbiology*. (4th p.). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>
- Boer, J. W. & Yzerman, E. P. F. (2004) Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires? Disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Brady, M. F. & Sundareshan, V. (2023) Legionnaires' Disease. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430807/>
- Cunha, B. A. (2006) The atypical pneumonias: Clinical diagnosis and importance. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **12 Suppl 3**:12–24.
- Domínguez, J. A., Galí, N., Pedroso, P., Fargas, A., Padilla, E., Manterola, J. M. & Matas, L. (1998) Comparison of the Binax Legionella Urinary Antigen Enzyme Immunoassay (EIA) with the Biotest Legionella Urin Antigen EIA for Detection of Legionella Antigen in both Concentrated and Nonconcentrated Urine Samples. *J Clin Microbiol* **36**:2718–2722.
- Harrison, T. G., Uldum, S. A., Lück, P. C. & Helbig, J. H. (2001) Detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA. *J Med Microbiol* **50**:509–516.
- Harrison, T., Uldum, S., Alexiou-Daniel, S., Bangsberg, J., Bernander, S., Drasar, V., ... Fehrenbach, F. (1998) A multileft evaluation of the Biotest legionella urinary antigen EIA. *Clin Microbiol Infect* **4**:359–365.

