

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biologie**

Problematika bakterií rodu *Legionella* ve vodách

Bakalářská práce

Autor:	Karolína Stuchlíková
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce:	Ing. Vladimír Dvořák, Ph.D.
Oponent práce:	RNDr. Vladimír Klaban



## Zadání bakalářské práce

**Autor:** Karolína Stuchlíková

**Studium:** S15BI043BP

**Studijní program:** B1501 Biologie

**Studijní obor:** Systematická biologie a ekologie

**Název bakalářské práce:** **Problematika bakterií rodu Legionella ve vodách**

**Název bakalářské práce AJ:** The issue of Legionella bacteria in water

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

Bakalářská práce se věnuje problematice bakterií rodu Legionella ve vodách. Cílem práce je na základě literární rešerše podat všeobecné poznatky o výskytu, charakteristických znacích, rozmnožování a nebezpečnosti rodu. Dále se práce zaměří na epidemiologickou situaci v České republice, zdravotní rizika a prevenci před bakteriální nákazou. Dalším cílem práce je popsat a prakticky ověřit možnosti laboratorní diagnostiky.

Brenner DJ. 1986. Classification of Legionellaceae. Current status and remaining questions. *Isr J Med Sci* 22:620-32. Den Boer JW, Yzerman EPF. 2004. Diagnostic of Legionella infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:871-878. Edelstein PH: Legionnaires' Disease: History and Clinical Findings. In: Heuner K, Swanson M [eds.] (2008). Legionella Molecular Microbiology. Norfolk, US: Caister Academic Press, 1-4. ISBN 978-1-904455-26-4. Fields BS, Benson RF, Besser RE. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15:506-26.

**Garantující pracoviště:** Katedra biologie,  
Přírodovědecká fakulta

**Vedoucí práce:** Ing. Vladimír Dvořák, Ph.D.

**Oponent:** RNDr. Vladimír Klaban

**Datum zadání závěrečné práce:** 23.10.2015

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama a uvedla veškeré použité prameny a literaturu.

V Hradci Králové dne .....

.....

Karolína Stuchlíková

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat Ing. Vladimíru Dvořákovi, Ph.D. za vstřícnost, odborné vedení, cenné rady a připomínky při vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala mé rodině a blízkým, kteří mě podporovali nejen během psaní bakalářské práce, ale i po celou dobu studia a bez kterých by tato práce nikdy nevznikla.

Také děkuji firmě EMPLA AG spol. s r. o. za poskytnutí pracovních podmínek pro vypracování praktické části bakalářské práce.

## **Anotace**

STUHLÍKOVÁ, K. *Problematika bakterií rodu Legionella ve vodách*. Hradec Králové, 2018. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Vladimír Dvořák. 66 s.

Bakalářská práce se věnuje problematice bakterií rodu *Legionella* ve vodách. Cílem práce je na základě literární rešerše podat všeobecné poznatky o výskytu, charakteristických znacích, rozmnožování a nebezpečnosti rodu. Dále se práce věnuje epidemiologické situaci v České republice, zdravotním rizikům a prevenci před bakteriální nákazou. Dále jsou zde popsány a prakticky ověřeny možnosti laboratorní diagnostiky.

## **Klíčová slova**

voda, bakterie, *Legionella*

### **Annotation**

STUHLÍKOVÁ, K. *Problems of Legionella bacteria in water*. Hradec Králové, 2018. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Vladimír Dvořák. 66 p.

Bachelor thesis is focused on problem of bacteria *Legionella* in water. The aim of the thesis is based on literary research to give general knowledge of the occurrence, characteristic features, reproduction, and hazards of the genus. Furthermore, epidemiologic situation in the Czech Republic, health risks and the prevention of bacterial infection is described here. There are also described and practically verified possibilities of laboratory diagnostics.

### **Keywords**

water, bacteria, *Legionella*

# Obsah

ÚVOD.....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE .....	10
1.1 Historie onemocnění .....	10
1.1.1 Legionářská nemoc .....	11
1.1.2 Pontiacká horečka .....	11
1.2 Výskyt a nebezpečnost bakterií rodu <i>Legionella</i> .....	12
1.3 Stavba buňky bakterie <i>Legionella</i> .....	14
1.3.1 Optimální podmínky, rozmnožování a růst kolonie .....	15
1.3.2 Životní cyklus.....	15
1.4 Taxonomie .....	16
1.4.1 Porovnání vybraných druhů.....	19
1.5 Metody detekce rodu <i>Legionella</i> .....	20
1.5.1 Kultivace .....	21
1.5.2 Přímá imunofluorescence.....	22
1.5.3 Detekce močového antigenu.....	22
1.5.4 Detekce specifických protilátek v séru .....	24
1.5.5 Detekce nukleových kyselin pomocí PCR.....	24
1.5.6 Nepřímá imunofluorescence .....	25
1.6 Patogeneze .....	25
1.7 Léčba a antibiotická rezistence .....	26
1.8 Situace v České republice .....	26
1.9 Nápravná opatření v budovách a rozvodech vody .....	27
2 PRAKTICKÁ ČÁST PRÁCE.....	29
2.1 Metodika.....	29
2.2 Odběr vzorků.....	29
2.3 Zpracování v laboratoři.....	29
2.4 Příprava kultivačních médií a činidel .....	30
2.4.1 Tlumivé kultivační médium (BCYE) .....	30
2.4.2 Tlumivý roztok ACES.....	31
2.4.3 Konečné kultivační médium .....	31
2.4.4 Tlumivé kultivační médium (BCYE – Cys).....	32
2.4.5 Selektivní kultivační médium (GVPC médium) .....	32
2.4.6 Kyselý tlumivý roztok .....	33

2.4.7	Pageho solný roztok:.....	33
2.4.8	Kontrola jakosti média.....	34
2.5	Přístroje a pomůcky.....	34
2.6	Kultivace.....	34
2.7	Vyhodnocení.....	35
3	VÝSLEDKY .....	36
4	DISKUSE .....	40
	ZÁVĚR.....	43
	POUŽITÉ ZKRATKY.....	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46
	Seznam obrázků, grafů a tabulek: .....	59
	PŘÍLOHY .....	61
	a) Tabulky .....	61



## ÚVOD

Bez vody by nemohl existovat život. Setkáváme se s ní mnohokrát za den ať už v přírodě, práci či škole, využíváme ji k hygieně a v neposlední řadě se stala nezbytnou složkou naší potravy. Voda je tedy od pradávna nedílnou součástí života, a proto bychom si měli dávat pozor na to, co obsahuje. A právě voda a vlhká půda jsou místa, odkud se lze nakazit bakterií *Legionella*. Nebezpečné je vdechnutí malých kapének aerosolu, ve kterých se bakterie dostanou až do dolních cest dýchacích, kde působí. Proto je důležité dbát na prevenci a kontrolu vodních rozvodů, nádrží a ostatních míst, kde dochází ke stagnaci vody a bakterie se tak mohou snadno přemnožit. Nejvíce nebezpečné jsou teploty v rozmezí 20 – 45 °C, jež představují ideální prostředí pro množení bakterií *Legionella*.

*Legionella* se řadí mezi rod patogenních bakterií, které způsobují onemocnění člověka a v mimořádných situacích může skončit až úmrtím. Ve světě je nejvíce onemocnění způsobeno druhem *Legionella pneumophila*, v České republice však byla zjištěna nákaza druhem *Legionella bozemanii*.

Je důležité se touto problematikou zabývat, neboť v posledním desetiletí se počet hlášených infekcí tímto rodem více než 14x zvýšil a je pravděpodobné, že počet bude dále stoupat.

Práce je pojata tak, že v rámci teoretické části je popsána problematika bakterií rodu *Legionella* ve vodách. Je zde objasněna historie onemocnění, dále možné nemoci a jejich léčba. Práce je zaměřena na výskyt bakterií *Legionella*, životní cyklus a stavbu buňky s orientací na její vzhled. V práci je uvedeno také taxonomické zařazení se zaměřením na porovnání vybraných druhů, metody detekce a patogeneze bakterií. V závěru teoretické části je popsána prevence a jsou rovněž také uvedeny rizikové faktory, nápravná opatření v budovách a rozvodech vody, v nichž došlo k výskytu rodu *Legionella*.

Práce je doplněna o experimentální část, která je založena na vlastních odběrech vody v budovách v Hradci Králové a Liberci a následném posouzení vzorků. Je zde uvedena metodika práce a vyhodnocení vzorků doplněné o autorské fotografie.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE

## 1.1 Historie onemocnění

Jak uvádějí Osterholm et al. (1983), první zmínka o epidemii způsobené bakterií rodu *Legionella* pochází již roku 1957 z Minnesoty. Tehdy se u 87 z cca 30 000 obyvatel objevila pneumonie (zápal plic). Zdroj epidemie nebyl nikdy dlouho nalezen a pneumonie se v dalších letech neprojevila. V roce 1979 byla na přeživších provedena studie a dokázalo se, že nakažení lidé měli v těle zvýšený počet protilátek *Legionella pneumophila* než lidé, kteří nakaženi nebyli. Vědci se domnívají, že nákaza tehdy pocházela z chladicí věže.

O 8 let později, v roce 1965, byl objeven v psychiatrické léčebně Washiongonu D.C. další případ nákazy. Z 6000 lidí bylo nakaženo 81. V úvahu připadají dvě možnosti, a to buď narušení systémů pitné vody a následná kontaminace vodovodních systémů během výkopových prací pro stavbu systému na postřík travníků, nebo patogen v půdě (Mermel et al., 1995).

Další událost se stala v roce 1968 v Michiganu, v němž 144 lidí onemocnělo pontiackou horečkou, nikdo však nejevil známky pneumonie. Příčina onemocnění byla vysledována k úniku vody z odpařovacího kondenzačního systému, kterým se voda dostala do cirkulujícího vzduchu. Po vypnutí klimatizačního zařízení došlo k eliminaci rizika vzniku choroby, kdežto zapnutí způsobilo opětovný výskyt choroby (Glick et al., 1978).

Terranova et al. (1978) popisují další známou událost před epidemií ve Philadelphii z roku 1974 ze stejného hotelu, kde 2 roky nato vypukla epidemie, po níž byla nemoc pojmenována. Pneumonie se projevila u 20 nakažených z 1500 a 2 lidé na ni zemřeli. Zdrojem nákazy se stal hotelový systém pitné vody (Edelstein, 2008).

K dalšímu ataku bakterie rodu *Legionella* došlo ve Philadelphii v létě roku 1976 během konference, na níž byl přítomno přibližně 4000 amerických legionářů. Fraser et al. (1977) uvádějí, že se nemoc rozšířila vzdušnou cestou z hotelové klimatizace. Z celkového počtu 182 nakažených jich 29 zemřelo. Termín „legionářská nemoc“ poprvé použilo Centrum pro kontrolu chorob (CDC – Center for Disease Control) v roce 1977 jako oficiální název proběhlé

epidemie (Lattimer et Ormsbee, 1981). Neschopnost vyšetřovatelů z CDC rychle určit původce epidemie vedla k mnoha spekulacím, např. že se jednalo o podvod, dále o chemický vojenský experiment, jenž se nezdařil, anebo také o hoax vytvořený pro podporu CDC a pro očkování proti prasečí chřipce (Edelstein, 2008).

Onemocnění vyvolané bakterií *Legionella* se může projevit ve dvou formách. Lehčí forma čili pontiacká horečka je respirační infekce, která se obejde bez speciální léčby a svým průběhem může připomínat obyčejnou chřipku. Závažnější forma je tzv. legionářská nemoc, kdy nejhorším a také nejdůležitějším klinickým příznakem je těžká pneumonie. Pneumonie může způsobit dechovou nedostatečnost vyžadující intenzivní péči, která může skončit až řízenou ventilací (Klaban, 2005).

### **1.1.1 Legionářská nemoc**

Edelstein (2008) definuje legionářskou nemoc jako pneumonii vyvolanou bakterií *Legionella spp.*, která může nebo nemusí být spojena s extrapulmonární infekcí a symptomy onemocnění mohou být poměrně různorodé. Mezi nejčastější se řadí horečka, která může být doprovázena anorexií, ztuhlostí, bolestí svalů a hlavy. Případný kašel může obsahovat krvavé nebo hnisavé sputum. Odhadem u 30 % nakažených se může projevit průjem a zvracení a 50 % může pociťovat známky duševní zmatenosti. Inkubační doba se pohybuje v rozsahu 2 – 10 dní, přičemž nemoc propuká 3 – 6 dní po nákaze (Joseph et al., 2006). Přibližně 70 % pacientů s nepoškozenými přirozenými obrannými mechanismy se bez specifické léčby uzdravuje po 5 – 7 dnech od doby, kdy se u nich nemoc projevila. Smrt obvykle nastává jako důsledek selhání dýchání (Edelstein, 2008). Míra úmrtnosti je přibližně 10 %, u imunosuprimovaných osob může vystoupat až na 30 % (Shadoud et al., 2015).

### **1.1.2 Pontiacká horečka**

Pontiacká horečka představuje krátkodobé horečnaté onemocnění nejisté etiologie. Není jasné, zda je nemoc způsobena inhalací bakterií rodu *Legionella*, jiným rodem bakterie než *Legionella*, či kombinací obou. Nakazit se lze téměř kdekoli, kde je možný výskyt nakažlivých bakterií v aerosolu, avšak nejčastěji se objevuje v hotelech, lázních a restauracích.

Doba inkubace po expozici kontaminovaného aerosolu se pohybuje od 4 – 120 hodin. Mezi dominantní příznaky nemoci patří horečka, bolest hlavy, svalů a celková únava. Dále nemocní mohou trpět na bolest kloubů, kašel, dušnost či bolesti břicha.

Pneumonie se běžně nevyskytuje, avšak v jednom případě byla zaznamenána (Castor et al., 2005). Spekuluje se, že nakažení byli vystaveni velmi vysoké koncentraci toxinů v aerosolu (Edelstein, 2008).

## 1.2 Výskyt a nebezpečnost bakterií rodu *Legionella*

*Legionella* je běžně vyskytující se bakterie, kterou můžeme nalézt ve vodních zdrojích v přírodě, jako jsou řeky a jezera, v deštných pralesech (Fallon, 1999) a dále také ve vlhkých půdách (Fields et al., 2002). Anand se spoluautory (Anand et al, 1983) uvádějí, že se *L. pneumophila* množí v místech, kde neprobíhá fotosyntéza. Avšak na základně studie, kterou provedli Tison et al. (1980), bylo dokázáno, že růst tohoto druhu je možný i na povrchu, kde dochází k uvolňování produktů cyanobakterií a aktivní fotosyntéze, což potvrzuje i studie provedená v roce 2009 (Taylor et al., 2009). Dále se vyskytuje i v člověkem vytvořených umělých vodních systémech, kterými jsou např. teplovodní potrubí v budovách, nádrže chladicích věží klimatizačních systémů, vířivé lázně a sprchy nebo biofilm a nečistoty v trubkách (Fallon, 1999).

Bakterie patřící do rodu *Legionella* mohou v přírodě využívat produktů metabolismu jiných organismů, např. *Flavobacterium brevis*, který vylučuje sirnou aminokyselinu cystein. Tuto aminokyselinu potom mohou bakterie *Legionella* využívat ve vodním prostředí (Klaban, 2018).

Ve vhodných podmínkách mohou bakterie z rodu *Legionella* přežívat v cystách améb, kde jsou chráněny před vyschnutím. Po fagocytozé akantamébou se množí v cytoplazmě, kde po zhruba 36 - 48 hodinách zaplňují většinu obsahu cytoplazmy améby (Barker et Brown, 1994). Konečná fáze infekce nastává v podobě rozptýlení mnoha pohyblivých buněk do prostředí. Fields et al. (2002) uvádějí, že se bakterie *Legionella* dokáží množit ve 14 druzích améb, dvou druzích obrvených prvoků a v jednom druhu řasy se slizovitým obalem. V nepřítomnosti prvoků byl jejich výskyt dokumentován pouze v laboratořích na živných médiích.

Jak uvádějí Barker et Brown (1994), bakterie mohou přežít v druzích *Hartmannella*, *Naegleria a Acanthamoeba* – *A. castellanii* (Bozue et Johnson, 1996), *A. polyphaga* (Barker et al., 1992).

Nebezpečí představuje vdechnutí aerosolu obsahujícího kapénky z rodu *Legionella*. Čím jsou kapénky aerosolu menší, tím jsou nebezpečnější. Kapénky s průměrem menším, než 5  $\mu\text{m}$  se snadněji dostávají do dolních cest dýchacích. Cesta průniku do organismu přes respirační trakt je nejčastějším způsobem onemocnění člověka (Joseph et al., 2006). Uvádí se, že nemoc není přenosná z člověka na člověka, avšak Borges et al. (2016) tvrdí, že byl objeven první případ přenosu legionářské nemoci z člověka na člověka, konkrétně přenos *L. pneumophila subsp. fraseri sg. 1*.

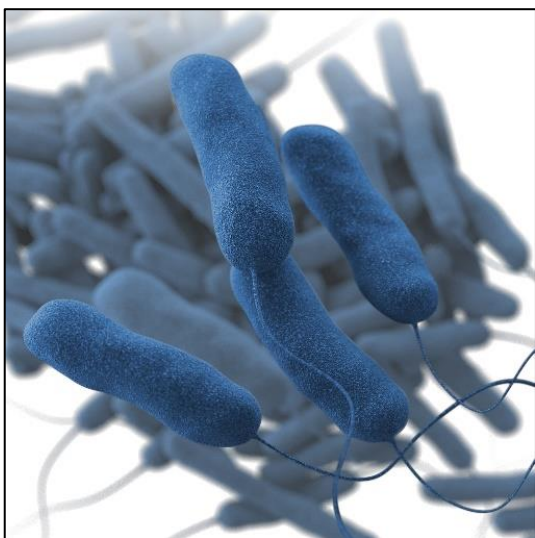
Franzin et al. 2001 popsali případ, kdy k nákaze došlo u novorozence pouze 7 dní po porodu. Novorozenec byl infikován po vleklém porodu do vody nejspíše vdechnutím kontaminované vody do dutiny nosohltanu. Nejprve byl po 4 dnech od porodu propuštěn z nemocnice, avšak o 3 dny později byl znovu přijat s horečkou a dechovou nedostatečností. Za 26 až 33 dní od projevení příznaků byly zjištěny protilátky proti *L. pneumophila sg. 1*. Při následné kontrole vodního prostředí v nemocnici byla objevena *L. pneumophila sg. 1* v centrální nádrži teplé vody a také ve sprchové hlavici teplé vody v místnosti s porodní vanou. Další případ nákazy novorozence po domácím porodu do vody popsali Nagai et al., 2003. Za 8 dní po porodu dítě zemřelo a při následné pitvě byla v plicní tkáni prokázána *L. pneumophila sg. 6*.

Významnou roli při vzniku onemocnění hraje odolnost jedince, životospráva, choroby a také predispoziční faktory. Velikost rizika může být posouzena na základě RR (Rate Ratio), což představuje vyjádření relativního rizika, které znamená kolikrát větší je riziko vzniku následků u exponovaných osob oproti osobám neexponovaným. Nejrizikovějším faktorem je AIDS s RR 41,9, dále jsou to nádory, zejména hematologické malignity s RR 22,4. Konečné stádium při selhávání ledvin má RR 21,4 a plicní nádory 6,78. RR při diabetu je 1,99 a kouření 1,83. Zajímavé je, že mužské pohlaví má RR 1,46 oproti ženskému pohlaví (Šašek, 2011).

Infekční dávka je velmi variabilní. V závislosti na odolnosti jedince a virulenci bakterií *Legionella* se uvádí rozpětí 10 až 10<sup>5</sup> bakterií, kterých je potřeba, aby došlo k nákaze jedince (Šašek, 2011).

### 1.3 Stavba buňky bakterie *Legionella*

Bednář et al. (1996) charakterizují bakterie rodu *Legionella* jako nesporeující aerobní gramnegativní tyčinky. Svoji velikostí 2 – 6 µm do délky a 0,3 – 0,9 µm do šířky se řadí mezi štíhlé tyčinky často tvořící i vlákna. Ve stěně jsou rozvětvené 2,3 - dihydroxy - mastné kyseliny, jež jsou charakteristické pouze pro tento rod a jiné známé bakterie je neobsahují. Jejich tělo obsahuje 2 a více polárních bičíků, což je činí pohyblivé. Neoxidují ani nefermentují glukózu ani další běžné cukry (Klaban, 2005). Rozpoznávacím znakem některých druhů je jejich fluorescence pod UV světlem a také antigenní struktura. Na obrázku (Obr. 1) je vyobrazena vnější stavba bakterie *Legionella*, na dalším obrázku (Obr. 2) lze pak pozorovat schopnost fluorescence pod UV světlem.



**Obr. 1:** Bakterie *L. pneumophila*



**Obr. 2:** Kolonie *Legionella spp.* rostoucí na agaru, osvětlené UV světlem pro zvýšení kontrastu

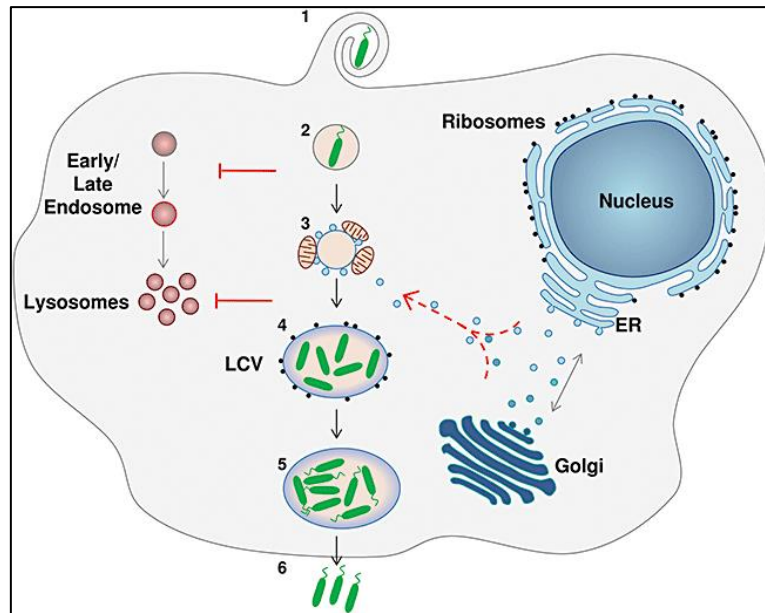
### 1.3.1 Optimální podmínky, rozmnožování a růst kolonie

Optimální podmínky pro růst a výskyt bakterií tohoto druhu představuje teplota vody v rozmezí 20 – 45 °C. Pokud teplota vody přesáhne hranici 60 °C, organismus hyne, naopak při poklesu teploty vody pod 20 °C dochází k zastavení množení. Zde mohou přežívat ve spící formě, a jakmile dosáhne teplota vody vhodné úrovně, mohou se opět pomnožit. Dle údajů ze studie, kterou provedli Skaliy et McEachern (1979), čtyři kmeny bakterií přežily od 69 do 139 dní v destilované vodě a od 408 do 415 dní ve vodě z vodovodu. Ideální hodnota pH kolísá mezi 5,0 – 8,5 (Legionella, 2017). Mezi vhodné podmínky pro život bakterií *Legionella* se řadí také přítomnost nutričních látek. Jejich zdrojem běžně vyskytující se organismy vodních systémů jako améby a řasy (Joseph et al., 2006).

Při teplotě 55 °C bakterie umírá do 6 hodin, při 60 °C umírá během 32 minut, při 66 umírá do 2 minut. Pokud teplota dosáhne 72 °C, nastane jev termické desinfekce a bakterie okamžitě hyne (Legionella, 2017).

### 1.3.2 Životní cyklus

Životní cyklus bakterie rodu *Legionella* začíná přichycením a následným proniknutím do hostitelské buňky (1), jak je vidět na obrázku níže (Obr. 3). Bezprostředně po vniknutí se vakuola obsahující bakterie *Legionella* (LCV – *Legionella* Containing Vacuole) vyhýbá spojení s endozomy a lysozomy, aby nedošlo k absorbování a následnému ohraničení membránou (2). Během první hodiny vakuola obsahující bakterie interaguje s mitochondrií a dochází k replikaci (3) a současně k nasedání vezikul na stěnu vakuoly. V následujícím kroku se formuje vakuola, jež je obklopena ribozomy (4). V této fázi také dochází k několika replikacím, kdy na konci bakterie obsahují bičík (5). Životní cyklus je dokončen, když bakterie *Legionella* unikají z hostitele do prostředí, kde započínají nový infekční cyklus v sousedních buňkách (6) (Franco et al., 2009).



**Obr. 3:** Intracelulární životní cyklus bakterie *L. pneumophila*

## 1.4 Taxonomie

Objevení a izolace bakterií rodu *Legionella* způsobující legionářskou nemoc vedlo k vytvoření bakteriální čeledi *Legionellaceae*. Ze strany některých vědců bylo navrhováno, aby na základě nízké hodnoty hybridizace DNA byly rozmístěny mezi rody *Legionella*, *Tatlockia* a *Fluoribacter* (Garrity et al., 1980). Druhy *L. bozemanii*, *L. dumoffii* a *L. gormanii* měly původně patřit k rodu *Fluriobacter*, kdežto *L. maceachernii* a *L. micdadei* k rodu *Tatlockia* (Klaban, 2011). Avšak na základě příbuznosti DNA, která je mezi jednotlivými druhy *Legionella* 70 %, bylo přistoupeno k čeledi *Legionellaceae*. Až do současnosti je používána Brennerova klasifikace (Brenner, 1986). Dle Parka (Park et al., 2004) *Candidatus Legionella jeonii* ještě nebyla zařazena do rodu *Legionella* a zatím se uvádí pouze jako kandidát na zařazení do tohoto rodu.

Přehled shrnující doposud objevené druhy rodu *Legionella* je v následující tabulce (Tab. 1). Z celkového počtu 66 doposud známých druhů bakterií *Legionella* byla popsána nebezpečnost pro člověka u 23 druhů. U 21 druhů byla nebezpečnost pro člověka vyloučena a u dalších 22 druhů nebyla nebezpečnost potvrzena ani vyvrácena. Jednotlivé druhy se od sebe liší také počtem séroskupin. Zatímco většina druhů má pouze jednu séroskupinu, pro *L. pneumophila* je uváděno až 16 séroskupin. Pro ostatní druhy, které v tabulce níže neobsahují číselnou hodnotu, není zatím znám počet séroskupin. Při vypracování tabulky byly využity tyto zdroje: Fields et al., 2002; WHO, 2002; DSMZ, 2017; Lück, 2008; Palmer et al., 2016 a Edelstein et al., 1985.



### Taxonomie rodu *Legionella*:

Doména: *Bacteria*

Oddělení: *Proteobacteria*

Třída: *Gammaproteobacteria*

Řád: *Legionellales*

Čeleď: *Legionellaceae*

Rod: *Legionella*

**Tab. 1:** Přehled druhů bakterií rodu *Legionella*

Druh	Původce onemocnění u člověka	Počet sg.
<i>L. adalaidensis</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. anisa</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. beliardensis</i>	ne	1
<i>L. birminghamensis</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. bozemanii</i>	<b>ano</b>	2
<i>L. brunensis</i>	ne	1
<i>L. busanensis</i>	nezjištěno	1
<i>L. cardiaca</i>	nezjištěno	-
<i>L. cherrii</i>	nezjištěno	1
<i>L. cincinnatiensis</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. clemsonensis</i>	<b>ano</b>	-
<i>L. drancourtii</i>	nezjištěno	1
<i>L. dresdenensis</i>	nezjištěno	-
<i>L. drozanskii</i>	ne	1
<i>L. dumoffii</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. erythra</i>	<b>ano</b>	2
<i>L. fairfieldensis</i>	ne	1
<i>L. fallonii</i>	ne	1
<i>L. feeleii</i>	<b>ano</b>	2
<i>L. geestiana</i>	ne	1
<i>L. gormanii</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. gratiana</i>	ne	1
<i>L. gresilensis</i>	ne	1
<i>L. hackeliae</i>	<b>ano</b>	2
<i>L. israelensis</i>	nezjištěno	1
<i>L. jamestowniensis</i>	ne	1
<i>Candidatus L. jeonii</i>	nezjištěno	1
<i>L. jordanis</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. lansingensis</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. londiniensis</i>	ne	2
<i>L. longbeachea</i>	<b>ano</b>	2
<i>L. lytica</i>	ne	1
<i>L. maceachernii</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. impletisoli</i>	nezjištěno	-
<i>L. indianapolisensis</i>	<b>ano</b>	-
<i>L. massiliensis</i>	nezjištěno	-
<i>L. micdadei</i>	<b>ano</b>	1

<i>L. moravica</i>	ne	1	<i>L. rubrilucens</i>	nezjištěno	1
<i>L. nagasakiensis</i>	nezjištěno	-	<i>L. sainthelensi</i>	<b>ano</b>	2
<i>L. nautarum</i>	ne	1	<i>L. santicrucis</i>	ne	1
<i>L. norrlandica</i>	nezjištěno	-	<i>L. saoudiensis</i>	nezjištěno	-
<i>L. oakridgensis</i>	<b>ano</b>	1	<i>L. shakespearei</i>	ne	1
<i>L. parisiensis</i>	<b>ano</b>	1	<i>L. spiritiensis</i>	ne	1
<i>L. pneumophila</i>	<b>ano</b>	16	<i>L. steelei</i>	nezjištěno	-
<i>L. pneumophila subsp. frasei</i>	nezjištěno	-	<i>L. steigerwaltii</i>	nezjištěno	1
<i>L. pneumophila subsp. pascullei</i>	nezjištěno	-	<i>L. taurinensis</i>	ne	1
<i>L. pneumophila subsp. pneumophila</i>	nezjištěno	-	<i>L. thermalis</i>	nezjištěno	-
<i>L. quateirensis</i>	nezjištěno	-	<i>L. tusconensis</i>	<b>ano</b>	1
<i>L. quinlivanii</i>	ne	2	<i>L. tunisiensis</i>	nezjištěno	-
<i>L. rowbothamii</i>	ne	1	<i>L. wadsworthii</i>	<b>ano</b>	1
			<i>L. waltersii</i>	ne	1
			<i>L. worsleiensis</i>	ne	1
			<i>L. yabuuchiae</i>	nezjištěno	-

V tabulce (Tab. 3) v příloze je znázorněno porovnání jednotlivých druhů v reakcích na katalázu, oxidázu, ureázu,  $\beta$ -laktamázu, redukci nitrátu a hydrolýzu hippurátu. Dle dostupných informací pouze druh *L. worsleiensis* vykazuje negativní reakci v testu na katalázu. V reakci na ureázu má podle dostupných informací pozitivní reakci pouze druh *L. saoudiensis*. Dále je zde popsáno, zda daný druh vykazuje autofluorescenci či nikoli. U 19 druhů je autofluorescence potvrzena, přičemž nejčastější zbarvení je modro-bílé. U druhů je také uvedeno, kde byl vzorek izolován a také o jaký druh se jedná. Pokud byl vzorek izolován z více míst, je uvedeno vždy jen jedno. Nejvíce druhů bylo izolováno v Severní Americe společně s Americkými Panenskými ostrovy, dále pak ve Spojeném království Velké Británie a Severního Irsku. 42 vzorků pochází z vodního prostředí, 12 vzorků bylo izolováno z člověka (plíce, srdce), 5 vzorků bylo izolováno z půdy a u 3 vzorků nebyl původ dohledán. U míst, kde je v tabulce znak hvězdičky nebyly informace dohledány.

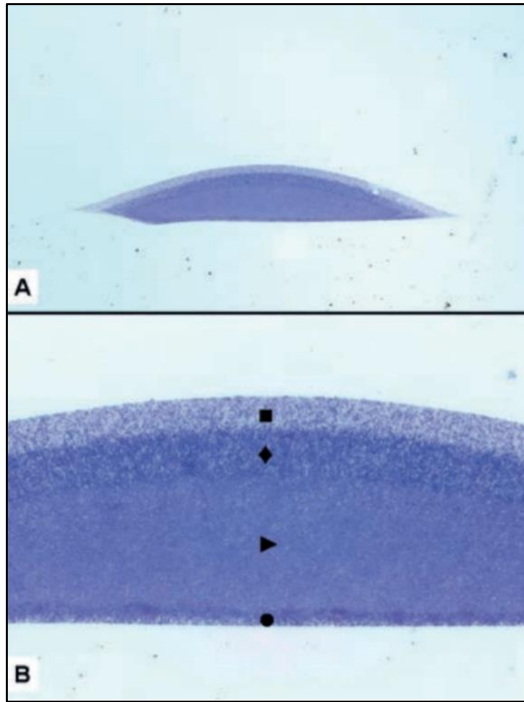
### 1.4.1 Porovnání vybraných druhů

Některé druhy bakterií *Legionella* jsou rozděleny do séroskupin (sérotypů). Bakterie v jedné séroskupině se vyznačují společnými antigenními vlastnostmi, tedy se vůči nim tvoří různé typy protilátek, kdy je specifita séroskupiny založena na chemickém složení lipopolysacharidu (Helbig et al., 2002). Jednotlivé séroskupiny se od sebe také mohou lišit v patogenitě, virulenci či odolnosti vůči vnějšímu prostředí (Gate2Biotech, 2018). Lück (2008) uvádí, že nejvíce séroskupin obsahuje druh *L. pneumophila*, jejichž počet činí nejméně 16. Zároveň obsahuje také 3 podskupiny: *L. pneumophila subsp. fraseri*, *L. pneumophila subsp. pasculleia* a *L. pneumophila subsp. pneumophila*. Ostatní druhy rodu *Legionella* nepřesahují 2 séroskupiny, jak je uvedeno v tabulce (Tab. 1).

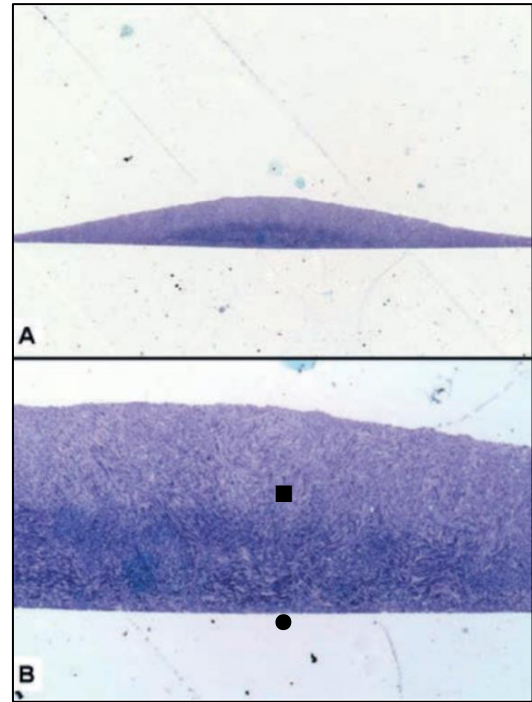
Přibližně 75 % infekcí vyvolaných bakterií *Legionella* způsobuje *L. pneumophila* séroskupiny 1, 20 – 30 % je zapříčiněno jinými séroskupinami *L. pneumophila*, kdežto 5 – 10 % infekcí je způsobeno ostatními druhy (McNally et al., 2000; Helbig et al., 2002; Yu et al., 2002; Doleans et al., 2004).

Pro porovnání byly vybrány druhy *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. micdadei* a *L. dumoffii*.

Gómez-Lus et al. (2013) ve své studii uvádějí strukturní rozdíly mezi *L. pneumophila* a *L. bozemanii* při kultivaci na tuhém agaru GVPC, kdy byly hlavní odlišnosti pozorovány ve stratifikaci. Vnitřní struktura kolonií po třídní kultivaci ukázala poměrné rozdíly. U *L. bozemanii* (Obr. 4) byly patrné 4 vrstvy (bazální, centrální, střední a svrchní), kdežto u *L. pneumophila* (Obr. 5) vrstvy pouze 2 (bazální a svrchní). Po patnáctidenní kultivaci se počet sjednotil na 3 vrstvy. *L. bozemanii* byla také shledána agresivnější co se týče pronikání do agaru.



**Obr. 4:** *L. bozemanii* – průřez kolonií po třídní kultivaci, 400x zvětšeno



**Obr. 5:** *L. pneumophila* – průřez kolonií po třídní kultivaci, 400x zvětšeno

Na porovnání virulence mezi *L. pneumophila* a *L. micdadei* se zaměřili Joshi et Swanson (1999) ve své srovnávací analýze. Při práci byly použity série kvantitativních fenotypových testů zkoumajících růst makrofágů, konjugaci, osmotickou rezistenci, přežití a cytotoxicitu. Výsledky testů ukázaly, že *L. micdadei* je méně virulentní než *L. pneumophila*.

Další porovnávací test provedli Hébert et al. (1984) mezi *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. bozemanii* a *L. dumoffii*. Tyto čtyři druhy sdílejí několik ultrastrukturních rysů, např. cytoplazmatické vakuoly a gramnegativní buněčnou stěnu. Dle studie jediný rozdílný rys patří *L. micdadei*, která se vyznačuje přítomností elektron-transparentní vrstvy mezi vnější membránou a slizovitým pouzdrém nad buněčnou stěnou.

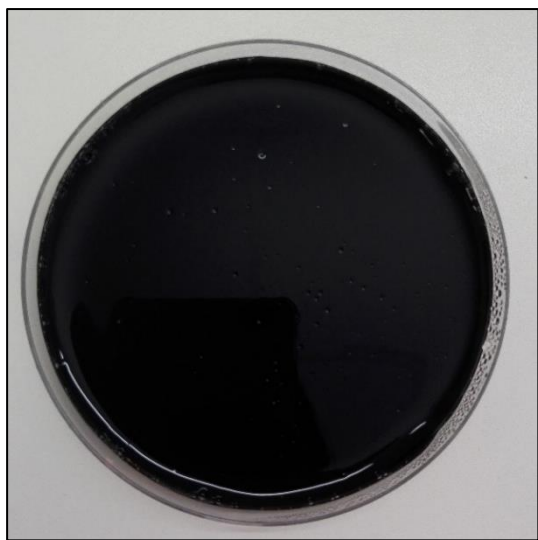
### 1.5 Metody detekce rodu *Legionella*

Mezi laboratorní metody k detekci bakterií tohoto druhu se řadí kultivace, přímá imunofluorescence, detekce močového antigenu, detekce specifických protilátek v séru a detekce nukleových kyselin pomocí PCR. Pro co nejpřesnější výsledek se nejčastěji používá kombinace výše zmíněných metod. Je důležité, aby test byl schopen včas diagnostikovat legionářskou nemoc s vysokou specifičností klinicky významných druhů *Legionella* a v klinicky významném časovém rámci (Murdoch et al., 2003).

### 1.5.1 Kultivace

Kultivace patří mezi základní diagnostickou metodu v dokazování bakterií *Legionella*. Pro růst se nejčastěji používá agarová půda BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract – pufrovaný kvasničný extrakt,), jejíž fotografie je níže na obrázku (Obr. 6) nebo půda GVPC (Glycin, Vankomycin hydrochlorid, Polymyxin B sulfát, Cykloheximid). BCYE je půda bohatá na železo a L-cystein, což jsou látky, které bakterie rodu *Legionella* potřebují ke svému růstu (Murdoch et al., 2003). Petriho misky se kultivují dnem vzhůru při  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 dní, přičemž podmínky kultivace jsou pro obě půdy stejné.

Pro kontrolu presumptivních kolonií bakterií *Legionella* se využívá půlená Petriho miska s BCYE agarem, která je na obrázku (Obr. 7). Na jedné polovině misky je obsažen agar s cysteinem, druhá polovina misky cystein neobsahuje. Pokud nejsou k dispozici půlené Petriho misky, lze také využít dvojici misek, kdy na jedné je agar obsahující cystein a na druhé je agar bez cysteinu. V obou případech je důležité řádně označit misku/polovinu misky obsahující cystein od té, ve které se cystein nenachází. Presumptivní kolonie se naočkují na oba agary a kultivují se 2 dny při teplotě  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při následné kontrole bakterie rodu *Legionella* rostou pouze na půdě s cysteinem, kdežto na půdě bez cysteinu se nenacházejí.



**Obr. 6:** Petriho miska s agarovou půdou BCYE



**Obr. 7:** Půlená Petriho miska s půdami BCYE+ a BCYE -

Bakterie rodu *Legionella* jsou napohled hladké s celistvým okrajem a svým charakterem připomínají broušené sklo. Barevnost jednotlivých druhů se může lišit v závislosti na druhu. Můžeme je nalézt v bílo-šedo-modro-purpurovém zbarvení, ale také růžové,

červené či hnědé. Při pozorování pod UV lampou mohou vykazovat modrou/bílou (př.: *L. bozemanii*, *L. anisa*, *L. gratiana*) nebo mdle zelenožlutou (*L. pneumophila*) autofluorescenci (ČSN ISO 11731, 2002).

Jak uvádějí Fields et al., (2002), pufrovaný kvasničný extrakt je základem pro většinu médií používaných k růstu rodu *Legionella*. Živné půdy mohou být suplementovány pro snadnější rozlišení jednotlivých druhů. Pokud dojde k doplnění bovinního sérového albuminu a indikátorových barviv k BCYE agaru, lze identifikovat druhy *L. micdadei* a *L. bozemanii*. Naopak pokud kultivační médium obsahuje cefamandol, dojde k inhibici růstu druhů, které nevytváří  $\beta$ -laktamázu, jako jsou např. *L. micdadei* a *L. bozemanii* (Murdoch et al., 2003). Do živných půd se dále přidávají antimikrobiální látky pro zastavení růstu jiných organismů z důvodu dlouhé doby kultivace a aktivní uhlí v tomto případě slouží k odstranění toxických peroxidů.

### **1.5.2 Přímá imunofluorescence**

Metoda přímé imunofluorescence (Direct Fluorescent Antibody, DFA) byla poprvé použita k detekci rodu *Legionella* v sekretu dýchacích cest a vzorků plicní tkáně, přičemž dochází ke zjišťování antigenu ve zkoumané tkáni (Fields et al., 2002). Výhodou tohoto testu je jeho časová dostupnost, kdy jsou výsledky známy již během 2 - 4 hodin. Avšak tato metoda je velmi náročná a vyžaduje odborné znalosti (Pierre et al., 2017). I po uplynutí několika dní od zahájení léčby mohou být bakterie *Legionella* stále detekovány v sekretu dýchacích cest (Murdoch et al., 2003).

### **1.5.3 Detekce močového antigenu**

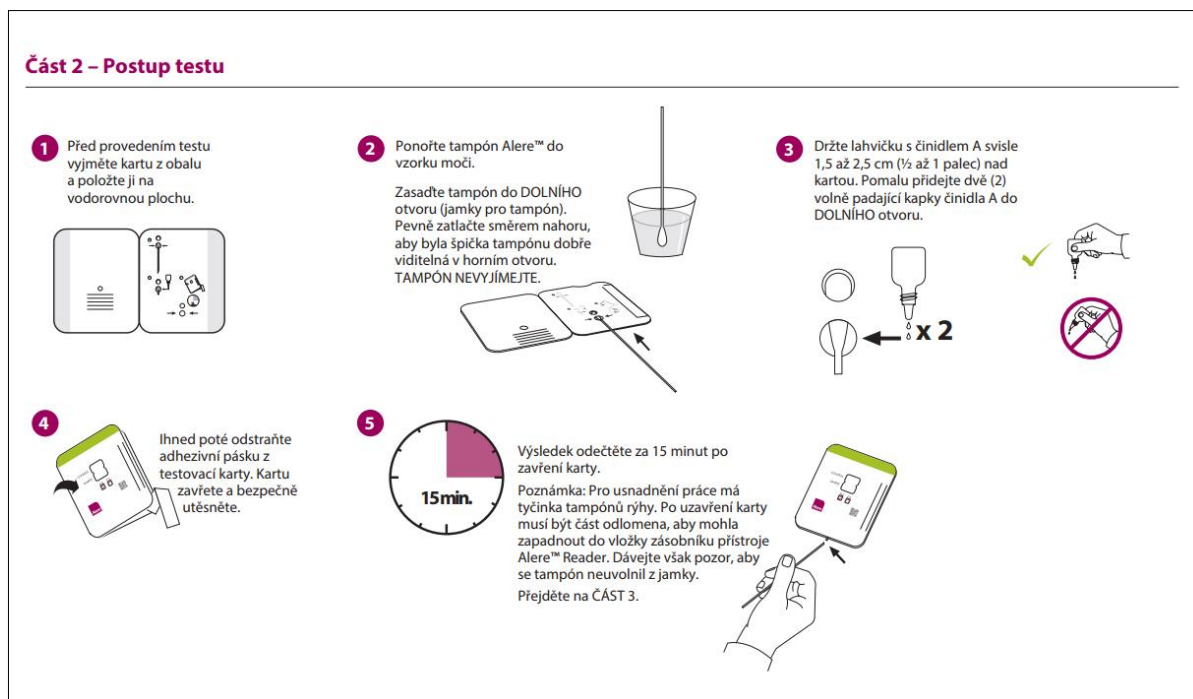
Jak uvádějí Kashuba et Ballow (1996), na základě detekce močového antigenu lze v moči pacientů s legionářskou nemocí najít specifický rozpustný antigen, který vylučuje minimálně 80 % nakažených. Antigen lze prokázat od 1 do 3 dnů od projevení prvních příznaků a přetrvává několik dní až týdnů (Tronel et Hartemann, 2008). Kohler et al. (1984) uvádějí, že v jednom případě přítomnost antigenu byla dokázána i po více než 300 dnech od projevení prvotních příznaků. Princip detekce je založen na imunoanalýze ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Mezi hlavní výhody detekce legionářské nemoci z moči patří snadný odběr vzorků, kdy dvacetinásobným až padesátinásobným zvýšením koncentrace moči lze zvýšit citlivost testu o 25 % (Murdoch et al., 2003). Citlivost testu se pak zvýší až na 100 %,

přičemž byla hlášena 100 % specifita pro tyto metody (Kashuba et Ballow, 1996). Další pozitivum spočívá v tom, že je metoda využitelná i při testování pacientů, kteří již byli léčeni antibiotiky před odebráním vzorku. Nevýhody zahrnují schopnost spolehlivě detekovat pouze močový antigen *L. pneumophila* sg. 1 (Den Boer et Yzerman, 2004). Fields et al. (2002) tvrdí, že takto nemusí být prokázáno až 40 % případů nákazy bakterií *Legionella*.

Tilton (1979) byl první, kdo pomocí metody ELISA v roce 1979 identifikoval močový antigen pacienta se sérologicky prokázanou legionářskou nemocí.

Na obrázku (Obr. 8) je zobrazen komerční test Alere Binax NOW® *Legionella* pro enzymovou imunoanalýzu v moči vyvinutý firmou Alere s.r.o., který je principem použití podobný domácímu těhotenskému testu. Výsledky tohoto imunochromatického testu lze získat do 15 minut. Testy lze vyhodnotit vizuálně nebo za pomoci přístroje Alere™ Reader, aby se předešlo případné neobjektivitě. Výrobce uvádí citlivost pro sérologickou skupinu *L. pneumophila* 97,7 %, specifitu 100 % a přesnost 99 % (Alere, 2017). Guerrero et al. (2004) avšak tvrdí, že test Alere Binax NOW® je méně sensitivní než testování pomocí ELISA.



**Obr. 8:** Pracovní postup testu Alere Binax NOW® *Legionella*

#### 1.5.4 Detekce specifických protilátek v séru

Tato metoda se zabývá průkazem specifických protilátek a antigenů (Fields et al., 2002). Jak uvádějí Wilkinson et al. (1979), produkované protilátky jsou obecně směsí lidského imunoglobulinu IgA, IgG a IgM a mohou reagovat s antigenem *L. pneumophila*. IgM je využíván při infekční sérologii, neboť se objevuje v průběhu nemoci. Z důvodu možnosti přetrvávání protilátek IgM delší dobu nepatří detekce specifických protilátek v séru mezi spolehlivé testy v měření akutní infekce (Rojas et al., 2005). Dle Den Boera a Yzermana (Den Boer et Yzerman, 2004) je ve většině případů v průběhu 3 - 4 týdnů zjištěn čtyřnásobný vzestup protilátek ve vyšetřovaném krevním séru.

Protilátky IgA, IgG a IgM mohou být séro skupinově specifické nebo mohou reagovat s antigenem společným pro *L. pneumophila*. Proto nelze spolehlivě určit séro skupinu nebo druhy rodu *Legionella* způsobující infekci (Wilkinson, 1983). Hlášená senzitivita sérologických testů se pohybuje mezi 41 % - 94 % (Den Boer et Yzerman, 2004).

#### 1.5.5 Detekce nukleových kyselin pomocí PCR

Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) představuje další možnost detekce bakterií rodu *Legionella* a je také jedním z mála testů, které jsou schopny identifikovat všechny doposud známé druhy (Murdoch et al., 2003). Tuto metodu lze využít při analýze klinických vzorků jako je moč, krev nebo sputum z dýchacích cest a také při analýze vzorků vod. Jak již z názvu vyplývá, test je založen na detekci bakteriálních nukleových kyselin. Bakterie *Legionella* není přirozenou součástí lidské mikroflóry, a proto nález její DNA ve vzorku značí infekci (Levin, 2009).

Byly také zaznamenány falešně pozitivní výsledky s druhy rodů *Gemella*, *Acinetobacter* nebo s neidentifikovatelnými bakteriemi. Stále také existují problémy spojené s obtížným rozlišením falešně pozitivních testů od selhání použité metody (Diederer, 2008).

Existuje také možnost testování real-time PCR, při kterém je hlavní výhodou jeho časová nenáročnost. Na rozdíl od klasické PCR metody zde dochází k zaznamenání časné fáze reakce za použití fluorescenčního barviva k označení produktu. Při tradiční metodě se využívají agarové gely a k vyhodnocení dochází v koncovém bodu reakce. Pro vizualizaci se zde používá ethidium bromid a UV světlo (ThermoFisher Scientific, 2018).



Dle Fieldse et al. (2002) je stanovení bakterií *Legionella* z vody pomocí polymerázové řetězové reakce těžko reprodukovatelné, a proto se stále nejvíce využívá metoda kultivace. Při PCR je výsledek udáván v genomových jednotkách (GU) na 1 litr a je zde stále nutnost přepočtu na kolonie tvořící jednotky (CFU, česky KTJ) v 1 ml. Počet genomových jednotek bývá obvykle vyšší než počet kolonií tvořící jednotky, a to z důvodu přítomnosti životaschopných buněk s velmi nízkou metabolickou aktivitou a neschopností kultivace (Tronel et Hartemann, 2008).

### **1.5.6 Nepřímá imunofluorescence**

Další možnou metodou detekce je nepřímá imunofluorescence (Indirect Fluorescent Antibody, IFA), Metoda je založena na zjišťování přítomnosti protilátek v séru, které je použito jako možný zdroj primární protilátky. Vazba specifických protilátek ze séra se projevuje fluorochromem značenou sekundární protilátkou proti primární protilátce. Je uváděno, že citlivost a specifita metody nepřímé imunofluorescence je vyšší oproti citlivosti metody přímé imunofluorescence (Trebichavsky, 2009).

## **1.6 Patogeneze**

Legionelová infekce se rozvíjí po inhalaci aerosolu, kdy jsou bakterie ukryté uvnitř drobných kapének vody. Votava et al., (2007) tvrdí, že jedním z faktorů virulence jsou fimbrie, pomocí nichž bakterie adherují na respirační epitel. Dále se mohou v alveolárních epiteliích a makrofázích množit. Pomocí adsorpce komplementu se naváží na příslušný receptor na povrchu buňky, která je pohltná. Uvnitř buňky dochází k blokování spojení fagosomu s lysozomem, ve fagosomu se nadále množí a posléze svými enzymy parazitovaný makrofág zahubí. Teprve až po vzniku buněčné imunity jsou specifické T-lymfocyty schopné svými cytokiny aktivovat makrofágy a zajistit vypořádání se s bakteriemi *Legionella*.

Bakterie rodu *Legionella* pohlčené monocyty uvnitř buňky přežívají jako intracelulární parazité, přičemž není známo, jak dlouho intracelulární fáze trvá. Přetrvávající vylučování skupinového antigenu močí naznačuje, že stav intracelulárního parazitismu může trvat dlouho. Avšak chronická legionelóza ani chronické nosičství není známo (Fallon, 1999).

Snížená obranyschopnost organismů může mít za následek vyšší vnímavost k infekcím které pak mají těžší průběh než sporadické případy, kdy imunita není oslabena. Vyšší výskyt onemocnění legionelózou u starých osob je zapříčiněn právě sníženou

obranyschopností organismu (Fallon, 1999). Kromě starých osob jsou více ohroženi kuřáci, lidé léčení kortikosteroidy a také příjemci transplantátů. Votava et al. (2007) píše, že úmrtnost u těchto osob se pohybuje kolem 25 %.

## 1.7 Léčba a antibiotická rezistence

Dle Fieldse et al. (Fields et al., 2002) úspěšná terapie spočívá především v rozpoznání nemoci a zahájení včasné a vhodné antibiotické léčby. K léčbě je nutno užít antibiotika pronikající do makrofágů (Votava et al., 2007). V minulosti byl k léčbě využíván především erythromycin. Ten je na počátku onemocnění s těžším průběhem podáván intravenózně a při ustoupení horečky se pokračuje v perorálním podávání (Klaban, 2005).

Fields et al. (2002) dále uvádějí, že se v současnosti častěji přistupuje k léčbě azithromycinem a fluorochinolony, které mají dobrou účinnost proti bakteriím *Legionella* a navíc mají méně vedlejších účinků než erythromycin. Dále se k léčbě může používat levofloxacin, rifampicin, ciprofloxacin nebo tetracyklin. Kromě podávání příslušných antibiotik je nutné léčit i ostatní příznaky nemoci, doplňovat tekutiny a sledovat funkce jater a ledvin.

Obecně se předpokládá, že u *L. pneumophila* není vyvinuta rezistence k antibiotikům (Burdet et al., 2014; Jespersen et al., 2010). Avšak u pacienta s legionářskou nemocí, který byl léčen ciprofloxacinem, byl izolován kmen *L. pneumophila*, který je rezistentní na fluorochinolon. Davies et Davies (2010) vedli spekulace, že to může být zapříčiněno uvolňováním antibiotik v přírodě a následně může být podpořen vznik bakteriálních linií rezistentních vůči antibiotické léčbě, což však u rodu *Legionella* nebylo zatím prokázáno. Tato rezistence k ciprofloxacinu je důsledkem jednobodové mutace v genu (*gyrA*) (Shadoud et al., 2015).

## 1.8 Situace v České republice

Klaban (2011) uvádí, že v České a Slovenské republice byla zjištěna infekce pouze druhem *L. bozemanii*. *L. bozemanii* zároveň s *L. moravica* pocházejí svým původem z České republiky, kde byly poprvé izolovány. Státní zdravotní ústav v Ostravě (Státní zdravotní ústav, 2018) uvádí počty infekcí způsobených bakterií *Legionella* v letech 2008 – 2017 na území České republiky, které jsou v tabulce (Tab. 2.) společně

s přepočtem na 100 000 obyvatel. Z tabulky je patrný meziroční nárůst infekcí, až na rok 2012, kdy byl počet nakažených o 2 nižší než v roce 2011.

**Tab. 2:** Hlášené infekce v České republice v letech 2008 - 2017

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Hlášené infekce	15	25	42	58	56	67	110	120	147	218
Přepočet na 100 000 obyvatel	0,1	0,2	0,4	0,6	0,5	0,6	1,0	1,1	1,4	2,1

V roce 2016 byla zjištěna přítomnost druhu *Legionella* v jednom z hotelů ve Zlíně. Místní hygienici byli informováni o smrti zahraniční osoby, která zde pobývala krátkou dobu před svojí smrtí. Po vyšetření vody hygienici nařídili uzavření budovy. Provozní však nařízení ignoroval a došlo tak k nákaze další osoby. Čin byl vyhodnocen jako ublížení na zdraví a provozní byl odsouzen na 4 roky odnětí svobody (Třeška, 2016).

Ke konci roku 2017 byla Hygienickou stanicí hlavního města Prahy potvrzena přítomnost bakterií *Legionella* ve dvou objektech v Praze. V jednom případě byl doporučený hygienický limit 100 KTJ/100ml překročen 16x, v druhém objektu 4x. Pro případ bytových domů není uveden závazný hygienický limit *Legionella spp.* a hovoří se pouze o doporučené hodnotě počtu kolonií tvořící jednotky a vlastníkům objektů bylo pouze doporučeno provedení chemické dezinfekce rozvodů teplé vody prostřednictvím odborné firmy (Čermák, 2017).

### 1.9 Nápravná opatření v budovách a rozvodech vody

V momentě, kdy dojde ke zjištění bakterií rodu *Legionella* v rozvodech vody, mělo by se předejít jejich dalšímu pomnožení a vyhnout se tvorbě aerosolu. Kvůli jejich nízkému patogennímu potenciálu obvykle postačuje snížení počtu bakterií *Legionella* ve vodním oběhu. Dle Evropských směrnic pro kontrolu a prevenci legionářské nemoci (Joseph et al., 2006) a Státního zdravotního ústavu (Šašek, 2011) je možné zabránit množení rodu *Legionella* pomocí následujících kroků:

- Vyvarovat se teplotám vody v rozmezí 20 °C až 50 °C ve všech místech systému, neboť teplota je zde velmi důležitým faktorem při kontrole rizika.

V případě, že není možno z nejrůznějších důvodů zabránit uvedeným teplotám, je nutno přistoupit k dezinfekčním opatřením, mezi něž patří např. krátkodobé přechlorování nebo proplachy vodou zahřátou na vyšší teplotu, případně také instalace ionizátorů, z nichž se do oběhu uvolňují ionty stříbra a mědi (Votava et al., 2007). Dezinfekce musí být s přihlédnutím ke konkrétnímu případu kontinuální nebo přerušovaná s vhodnou frekvencí tak, aby zajistila parametry stanovené právním předpisem.

- Zamezit stagnaci vody v rozvodech a rezervoárech. Pouhé odtáčení vody s frekvencí 1x týdně, pokud je její spotřeba nulová nebo nízká, představuje preventivní krok. Už toto jednoduché opatření omezuje množení, jejich výsledný počet ve vodě a následně generovaném aerosolu, neboť stagnace může podpořit růst biofilmu, který může vytvářet vhodné podmínky pro růst rodu *Legionella*. Stagnace může nastat nejen v systému jako celku, ale i jeho dílčích částech, které představují například bojler a zásobníky vody.
- Vyhnout se v systému použití nevhodných materiálů, které mohou poskytovat živiny bakteriím, např. těsnění z přírodní gumy, tmely, barvy.
- V naléhavém případě ochrany imunosuprimované osoby je možné minimalizovat počet bakterií *Legionella* na jednom konkrétním výtokovém místě (nejčastěji u sprchy v koupelně nebo vodovodní baterie) pomocí speciálního filtru s membránou o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$ . Je nutné filtr pravidelně vyměňovat každých 14 dnů.

Mělo by dojít k vypracování a dodržení schématu, které bude obsahovat podrobnosti o programu chemického ošetření vody včetně popisu údajů účinnosti dle výrobců, koncentrací, vyžadovaných kontaktních časů a dále také schéma provádění kontrolního opatření.

Je doporučeno pověřit externí firmu na hodnocení rizika a činnost kontrolních opatření systému, a to periodicky, nejméně však jednou za 2 roky.

## 2 PRAKTICKÁ ČÁST PRÁCE

Praktická část práce je zaměřena na detekci přítomnosti bakterií rodu *Legionella* ve vzorcích vody, odebraných ve vybraných budovách v Hradci Králové a v Liberci. Jednotlivé vzorky byly označeny číslicemi 1 – 5. Veškeré zpracování v laboratoři a vyhodnocení vzorků bylo provedeno v laboratoři firmy EMPLA AG spol. s r. o. podle níže uvedené metodiky.

### 2.1 Metodika

Metoda na stanovení rodu *Legionella* je velmi náročná, proto jsem půl roku docházela do laboratoře, kde jsem si tuto metodu společně s potřebnými dovednostmi osvojovala.

Mikrobiologický rozbor byl proveden dle normy ČSN ISO 11731 Jakost vod – Stanovení bakterií rodu *Legionella* – Část 2: Metoda přímé membránové filtrace pro vody s malým počtem bakterií a tento postup je možné tak kdykoli zopakovat. Pro celkový počet 5 vzorků (10 x 100 ml) byly nejprve použity půdy GVPC a později BCYE+ a BCYE- (ČSN ISO 11731, 2002).

Při zpracování celé práce bylo dbáno na dodržení Metodických pokynů pro vypracování a obhajoby vysokoškolských kvalifikačních prací PŘF UHK a citace jsou v souladu s nařízením pro vypracování dle Applied and Environmental Microbiology.

### 2.2 Odběr vzorků

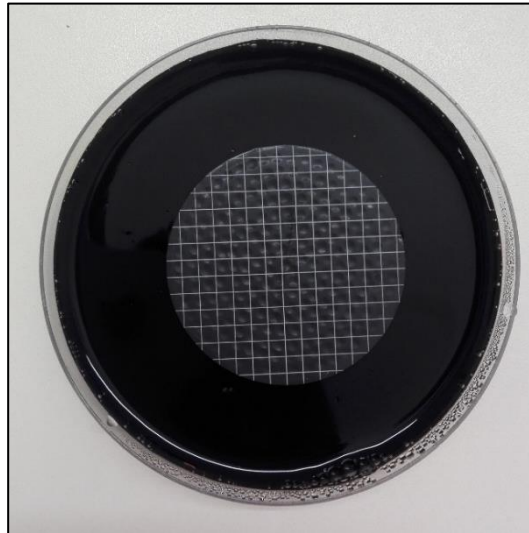
Ke sběru vzorků byly využity čisté PET lahve o objemu 0,5 l. Z každé budovy byl odebrán jeden vzorek vody. Při odběru vzorků byla vylita původní voda z PET lahví a odběr byl proveden po odpuštění určitého množství teplé vody.

### 2.3 Zpracování v laboratoři

100 ml každého vzorku bylo podtlakově zfiltrováno přes sterilní membránový filtr s velikostí pórů 0,4  $\mu\text{m}$  a po prosátí vzorku bylo odsávání přerušeno. Do nálevky filtračního zařízení bylo přidáno 30 ml  $\pm$  5 ml kyselého tlumivého roztoku, jenž se nechal působit po dobu 5 minut pro omezení růstu doprovodné mikroflóry a bakteriálních druhů. Následně byl tlumivý roztok zfiltrován přes membránový filtr, který byl následně pomocí podtlakové filtrace promyt 20 ml  $\pm$  5 ml Pageho solného roztoku. Po rozebrání filtračního zařízení byl membránový filtr se záchytem mikroorganismů opatrně přenesen sterilní pinzetou na Petriho misku s předem připraveným sterilním GVPC agarem.

Membránový filtr byl položen horní stranou vzhůru na živné médium (Obr. 9) a bylo dbáno na to, aby pod filtrem nezůstaly žádné vzduchové bubliny, které by mohly omezit růst bakterií rodu *Legionella*. Každý vzorek byl pro vyšší přesnost výsledků zpracován dvakrát (2 x 100ml) a vzorek byl označen písmeny *a* a *b* (1a, 1b, 2a, 2b...).

Před začátkem zpracování dalšího odebraného vzorku bylo celé filtrační zařízení promyto sterilní destilovanou vodou a použitá pinzeta byla vyměněna za novou, sterilní pinzetu.



**Obr. 9:** Membránový filtr na živné půdě

## **2.4 Příprava kultivačních médií a činidel**

Při přípravě kultivačních médií a činidel byly použity chemikálie zaručené analytické jakosti a kultivační média byla připravena dle pokynů výrobce.

### **2.4.1 Tlumivé kultivační médium (BCYE)**

Toto kultivační médium obsahuje aktivní uhlí a kvasničný extrakt.

Pro přípravu bylo použito:

- 10,0 g kvasničného extraktu (pro bakteriologii) a 12,0 g agaru
- 2,0 g aktivního uhlí
- 1 g  $\alpha$ -ketoglutarátu draselného
- 10,0 g ACES tlumivého roztoku (N-2-acetamido-2-aminoethansulfonová kyselina)
- 2,8 g hydroxidu draselného (KOH) v pecičkách
- 0,4 g monohydrátu L-cystein hydrochloridu
- 0,25 g difosforečnanu [ $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ ] tetraželezitého

Vše bylo doplněno destilovanou vodou do 1000 ml.

### **Roztok cysteinu a difosforečnanu tetraželezitého:**

0,4 g monohydrátu L-cysteinu hydrochloridu bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Dále bylo rozpuštěno 0,25g difosforečnanu tetraželezitého v 10 ml destilované vody. Oba roztoky byly dekontaminovány membránovou filtrací filtrem z esteru celulózy s průměrnou velikostí póru 0,2  $\mu\text{m}$  a byly uchovávány v čistých sterilních nádobách při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  nejdéle 3 měsíce.

### **2.4.2 Tlumivý roztok ACES**

Pro přípravu byl do 500 ml destilované vody přidán ACES v granulích a rozpuštěn na vodní lázni při teplotě  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Do jiné nádoby bylo odměřeno 480 ml destilované vody, přidáno 2,8 g hydroxidu draselného a rozpuštěno za mírného míchání. Tlumivý roztok ACES byl připraven smícháním obou roztoků. Pokud není dodržen postup rozpouštění jednotlivých složek, může tlumivý roztok ACES způsobit denaturaci kvasničného extraktu.

### **2.4.3 Konečné kultivační médium**

K 980 ml tlumivého roztoku ACES bylo postupně přidáno aktivní uhlí, kvasničný extrakt a  $\alpha$ -ketoglutarát. Rozpuštěním 5,6 g hydroxidu draselného (KOH) v 1 litru destilované vody byl připraven roztok o koncentraci 0,1 mol/l. Dále byl připraven roztok kyseliny sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) o koncentraci 0,1mol/l opatrným přidáním 5,3 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\rho = 1,84\text{ g/ml}$ , čistoty 95 % až 98 %) k 1 litru destilované vody. Tento roztok hydroxidu draselného nebo kyseliny sírové byl použit k úpravě hodnoty pH na  $6,8 \pm 0,2$ . Dále byl přidán agar, roztok se promíchal a autoklávoval při teplotě  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 minut  $\pm 1$  min. Po autoklárování je dovoleno ochladit roztok ve vodní lázni na teplotu  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakonec byly asepticky přidány roztoky L-cysteinu a difosforečnanu tetraželezitého. Při přidávání musí být roztok dobře promíchán.

Hotové kultivační médium bylo plněno po 20 ml do Petriho misek o průměru 90 mm. Hodnota pH konečného média musí být  $6,8 \pm 0,2$  při teplotě  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Plotny se uchovávají při teplotě  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  v plastových sáčcích ve tmě nejdéle 4 týdny.

#### 2.4.4 Tlumivé kultivační médium (BCYE – Cys)

Toto kultivační médium obsahuje aktivní uhlí a kvasničný extrakt, avšak neobsahuje L-cystein. Příprava tohoto kultivačního média je stejná jako příprava tlumivého kultivačního média s aktivním uhlím a kvasničným extraktem BCYE (1.4.1), ale vynechá se L-cystein.

#### 2.4.5 Selektivní kultivační médium (GVPC médium)

Toto kultivační médium je stejné jako BCYE až na to, že jsou zde navíc přidány jako suplement tři antibiotika a glycin.

##### **Selektivní suplement:**

Konečné koncentrace v GVPC médiu musí být:

- |                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| • glycin prostý amonných iontů | 3 g/l       |
| • polymyxin B-sulfát           | 80 000 IU/l |
| • vankomycin hydrochlorid      | 0,001 g/l   |
| • cykloheximid                 | 0,08 g/l    |

##### **Příprava suplementu s antibiotiky:**

Odpovídající množství (obvykle 200 mg) polymyxinu B-sulfátu bylo přidáno ke 100 ml destilované vody. Koncentrace polymyxin B-sulfátu má být 14 545 IU/ml. Roztok byl promíchán a dekontaminován membránovou filtrací filtrem z esteru celulózy s průměrnou velikostí póru 0,2  $\mu\text{m}$ . Roztok byl odměřen po 5,5 ml do sterilních nádobek a uchováván při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před použitím bylo nutno rozmrazit při laboratorní teplotě.

Ke 20 ml destilované vody bylo přidáno 20 mg vankomycin hydrochloridu, roztok byl promíchán a dekontaminován membránovou filtrací za použití filtru z esteru celulózy s průměrnou velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$ . Roztok byl odměřen po 1 ml do sterilních nádobek a uchováván při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před použitím bylo nutno rozmrazit při laboratorní teplotě.

Do 100 ml destilované vody byly přidány 2 g cykloheximidu a roztok byl dekontaminován membránovou filtrací pomocí filtru z esteru celulózy s průměrnou velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$ .



### **Příprava GVPC média:**

Při přípravě GVPC média bylo postupováno stejně, jako při přípravě média BCYE, ale navíc bylo přidáno 3 g glycinu (prostého amonných iontů). Hodnota pH byla upravena na konečnou hodnotu  $6,8 \pm 0,2$ .

Po přidání L-cysteinu a železa byl ke konečnému médiu přidán určitý objem každého z dříve uvedených tří suplementů s antibiotiky a roztok byl dobře promíchán.

#### **2.4.6 Kyselý tlumivý roztok**

Nejdříve byl připraven roztok kyseliny chlorovodíkové (HCl) koncentrace 0,2 mol/l. a poté roztok chloridu draselného (KCl) koncentrace 0,2 mol/l. Kyselý tlumivý roztok byl připraven smícháním 3,9 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové a 25 ml roztoku chloridu draselného. Hodnota pH byla upravena na  $2,2 \pm 0,2$  přidáním roztoku hydroxidu draselného (KOH) koncentrace 1 mol/l. Výsledný roztok byl uchováván v uzavřených nádobách ve tmě při standardní laboratorní teplotě nejdéle 1 měsíc.

#### **Roztok kyseliny chlorovodíkové:**

Do 1 l destilované vody bylo přidáno 17,4 ml koncentrované HCl ( $\rho=1,18$  g/ml, koncentrace 35,4%). Nakonec byl roztok sterilizován autoklávem při teplotě  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 31 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu  $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ .

#### **Roztok chloridu draselného:**

V 1 l destilované vody bylo rozpuštěno 14,9 g KCl. Roztok byl sterilizován autoklávem při teplotě  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 31 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu  $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ .

#### **2.4.7 Pageho solný roztok:**

- |   |          |
|---|----------|
| • Chlorid sodný (NaCl)  | 0,120 g  |
| • Síran hořečnatý (MgSo <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O)          | 0,004 g  |
| • Chlorid vápenatý (CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O)          | 0,004 g  |
| • Hydrogenfosforečnan sodný (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )     | 0,142 g  |
| • Dihydrogenfosforečnan draselný (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | 0,136 g  |
| • Destilovaná voda  | 1 000 ml |

Výše uvedené chemikálie byly postupně přidány do destilované vody. Po rozpuštění byl roztok dobře promíchán a autoklávován při teplotě  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu  $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ .

### 2.4.8 Kontrola jakosti média

Při sterilizaci je nutné vyvarovat se prodloužení doby zahřívání nebo zahřívání na příliš vysokou teplotu, neboť by mohlo dojít k ovlivnění nutričních vlastností média BCYE. Rozdíly v jakosti jednotlivých výrobních šarží složek média může ovlivnit jeho vlastnosti. Proto by se u každé nově připravené várky měla posoudit jakost média ověřením růstu *L. pneumophila* sg 1.

### 2.5 Přístroje a pomůcky

V praktické části byly využity tyto přístroje a pomůcky:

- Petriho misky o průměru 90 mm
- Inkubátor vytemperovaný na  $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$
- UV lampa emitující záření vlnové délky  $360\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$
- Podtlakový filtrační přístroj s podtlakovým čerpadlem, hadičkami a nálevkou
- Černé nitrocelulóзовé membránové filtry o průměru 50 mm s nominálním průměrem pórů  $0,4\text{ }\mu\text{m}$
- Sterilní pinzeta se zaoblenými hroty
- Laboratorní sklo
- PET lahve o objemu 0,5 l
- Binokulární stereomikroskop

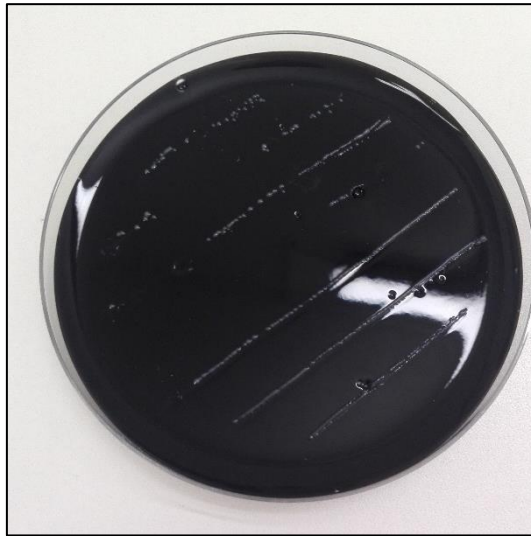
### 2.6 Kultivace

Každá naočkovaná Petriho miska s GVPC agarem byla označena číslem vzorku. Uzavřené misky byly poté obráceny dnem vzhůru a kultivovány v termostatu po dobu 10 dnů při teplotě  $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . K zajištění vlhké atmosféry v termostatu byla na dno umístěna miska s vodou, která byla v případě nutnosti dolévána. Po desetidenní kultivaci byly vzorky prohlédnuty a zhodnoceny presumptivní kolonie bakterií *Legionella*, které jsou zobrazeny na obrázcích 15 - 24 v závěru. Celkově bylo na dokazovací půdy BCYE+ a BCYE- naočkováno 62 presumptivních kolonií (vzorek 1a=6 kolonií, vzorek 1b= 6 kolonií, vzorek 2a=10 kolonií, vzorek 2b=10 kolonií, vzorek 3a=4 kolonie, vzorek 3b=2 kolonie, vzorek 4a=6 kolonií, vzorek 4b=12 kolonií, vzorek 5a=0 kolonií a vzorek 5b=0 kolonií). Presumptivní kolonie byly dále kultivovány při teplotě  $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  po dobu 3 dnů. Na každou Petriho misku byl pro kontrolu také naočkován rod *Legionella*.

## 2.7 Vyhodnocení

Bylo provedeno pečlivé porovnání rozdílů jednotlivých přeočkovaných kultur v růstu na médiu bez suplementu a na médiu se suplementem. Vyhodnocení bylo provedeno pouhým okem a také binokulární lupou. Všechny vzorky byly porovnány s kontrolou, která byla naočkována na každou Petriho misku z čistého kmene *L. pneumophila* (Obr. 10). Bakterie *Legionella* by se měly vyskytovat pouze na půdě obsahující cystein, na půdě s absencí cysteinu nerostou.

Z celkových 62 presumptivních přeočkovaných kolonií nebyla ani jedna potvrzena.



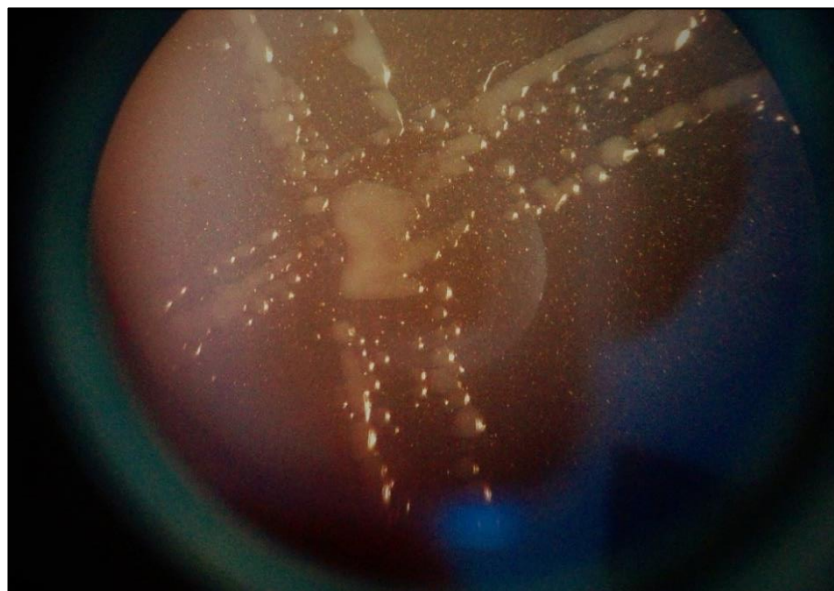
**Obr. 10:** Kmen *L. pneumophila*

### 3 VÝSLEDKY

Bylo provedeno dvojité zpracování 100 ml každého vzorku z jednotlivých budov. Po zpracování vzorků v laboratoři podtlakovou filtrací přes speciální membránové filtry o velikosti pórů 0,4  $\mu\text{m}$  a následné celkové době kultivace 13 dní byly zjištěny výsledky praktické části.

Po desetidenní kultivaci byly spočítány presumptivní kolonie *Legionella* (vzorek 1a=6, vzorek 1b=6, vzorek 2a=10, vzorek 2b=150-200, vzorek 3a=4, vzorek 3b=2, vzorek 4a=13, vzorek 4b=100, vzorek 5a=0 a vzorek 5b=0) a z toho bylo přeočkováno 62 kolonií.

Po provedení potvrzovacího testu, při délce kultivace 3 dny, nebyla ani jedna kolonie ze vzorků vod 1 - 5 potvrzena jako rod *Legionella* a všechny vzorky byly tedy hodnoceny jako negativní. Výsledky byly vizuálně kontrolovány pouhým zrakem a dále ještě pod binokulární lupou. Na obrázcích (Obr. 11 a 12) je možno vidět kmen *L. pneumophila*, který byl naočkován na každou Petriho misku, kde se nacházely naočkované presumptivní kolonie. Tato kontrola sloužila k potvrzení, zda daný organismus spadá do rodu *Legionella* či nikoli. Bakterie rodu *Legionella* potřebují ke svému růstu cystein, který byl obsažen v půdě BCYE+, ale nebyl přítomen v půdě BCYE-.

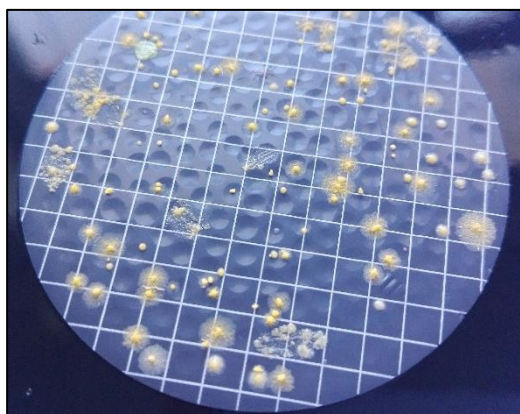


**Obr. 11:** Kontrola – kmen *L. pneumophila* pod binokulární lupou

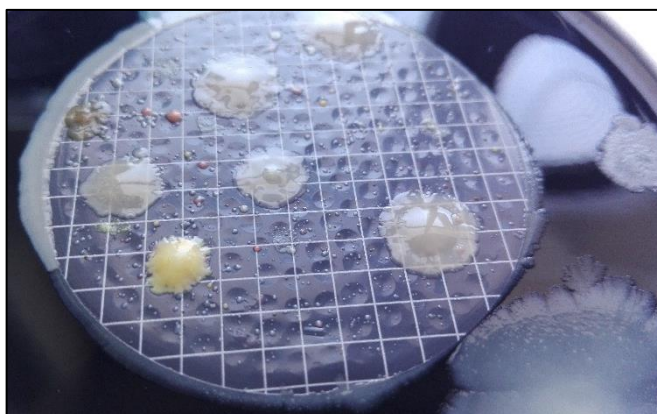


**Obr. 12:** Kontrola – kmen *L. pneumophila*

Jednotlivé fotografie (Obr. 15 – 24) dokumentující doprovodnou mikroflóru včetně presumptivních kolonií jsou obsaženy ve vs. Při určování presumptivních kolonií byly z výběru vyřazeny všechny kolonie, které dosahovaly velikosti větší než 2 mm. Těchto kolonií bylo stále mnoho, jak je možné vidět na obrázcích (Obr. 13 a 14), i přes promytí filtru kyselým roztokem.



**Obr. 13:** Doprovodná mikroflóra

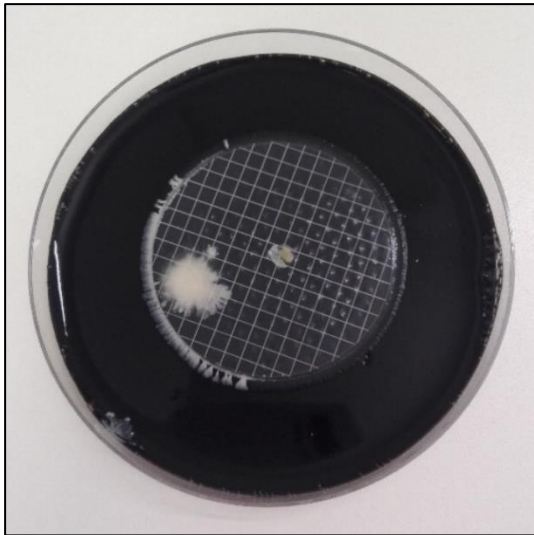


**Obr. 14:** Doprovodná mikroflóra

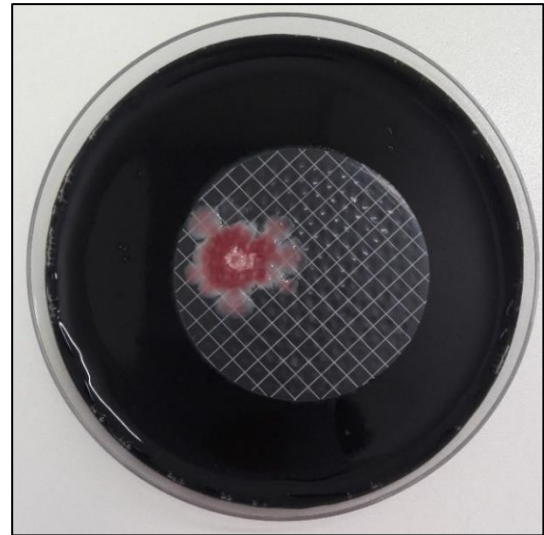
Jako presumptivní kolonie k přeočkování byly vybírány napohled hladké kolonie s celistvým okrajem, jež svým charakterem připomínaly broušené sklo. Byly voleny kolonie hnědé, růžové a červené barvy, ale také bílé, modré, šedé a purpurové.

Na obrázcích níže (Obr. 15 – 24) je možno vidět narostlé kultury před přeočkováním na dokazovací půdy. Je zde také možné pozorovat doprovodnou mikroflóru ve velikých koloniích, i přes přidání kyselého tlumivého roztoku, který se nechal působit na filtr po dobu 5 minut. Rod *Legionella* tvoří po 7 až 8 dnech kolonie o maximální velikosti cca 2 mm, proto je snadno rozeznatelný od ostatní doprovodné mikroflóry.

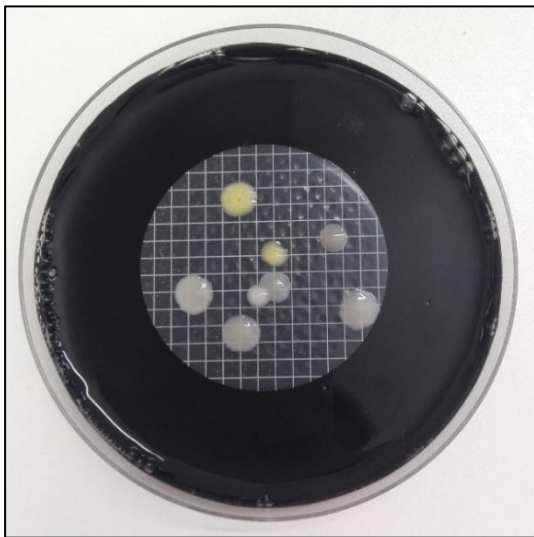




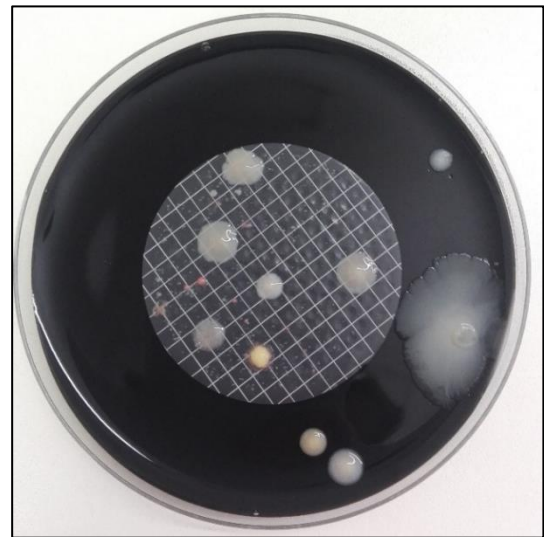
Obr. 15: Vzorek 1a před očkováním



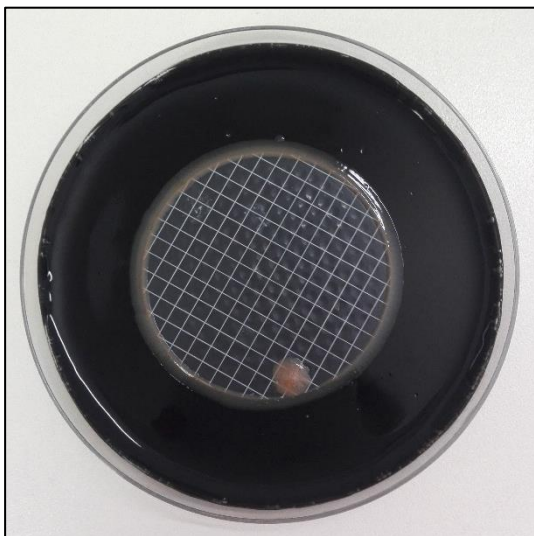
Obr. 16: Vzorek 1b před očkováním



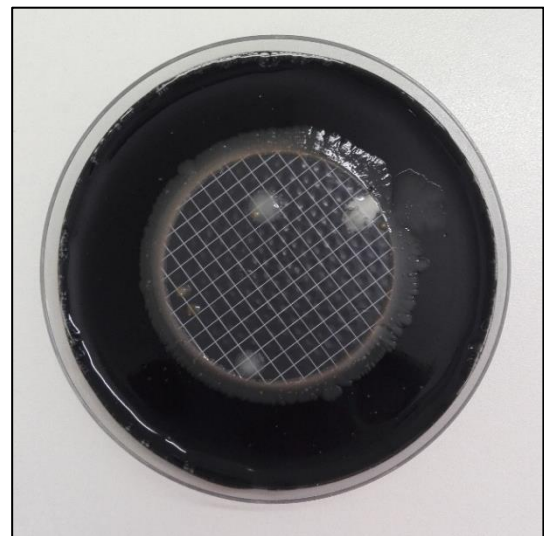
Obr. 17: Vzorek 2a před očkováním



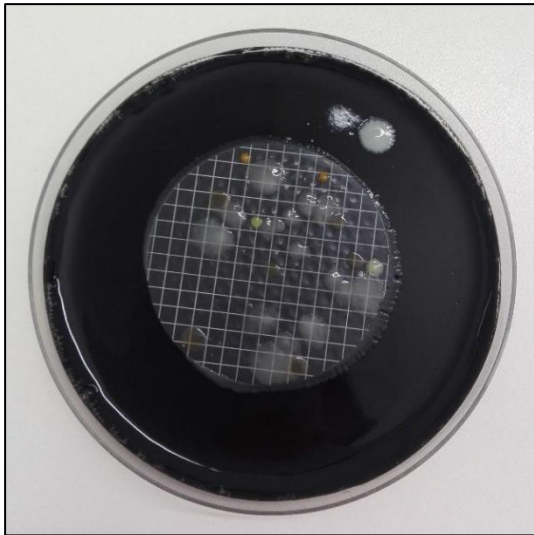
Obr. 18: Vzorek 2b před očkováním



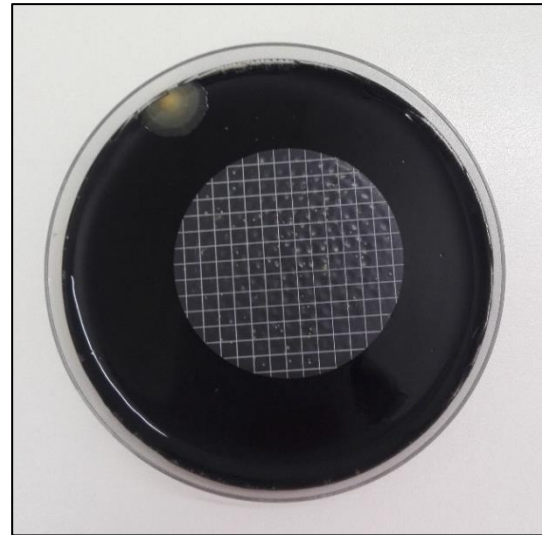
Obr. 19: Vzorek 3a před očkováním



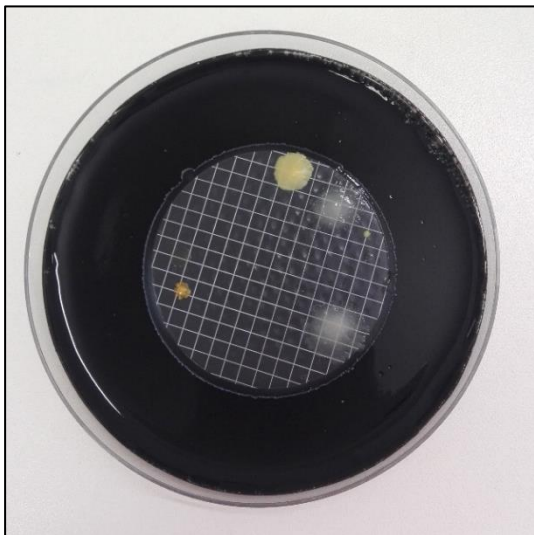
Obr. 20: Vzorek 3b před očkováním



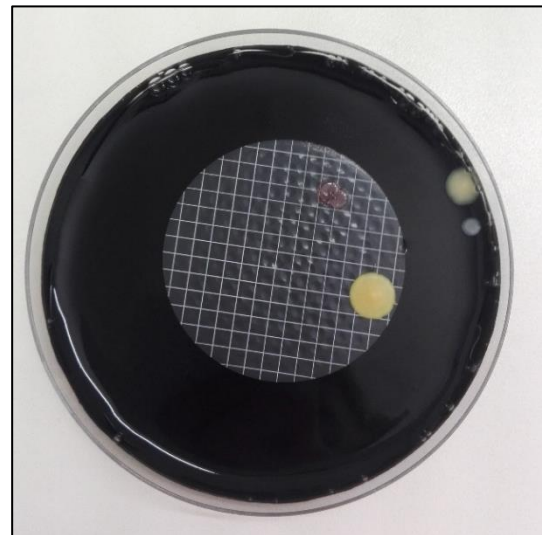
Obr. 21: Vzorek 4a před očkováním



Obr. 22: Vzorek 4b před očkováním



Obr. 23: Vzorek 5a před očkováním



Obr. 24: Vzorek 5b před očkováním

## 4 DISKUSE

Pro vypracování praktické části byl zvolen postup, jak uvádí norma ČSN ISO 11731 Jakost vod – Stanovení bakterií rodu *Legionella* a použity půdy GVPC, BCYE+ a BCYE-. Vzhledem k faktu, že metoda stanovení rodu *Legionella* ve vodách je velmi náročná, musí být striktně dodržen vybraný pracovní postup. V různých literaturách se uvádí odlišný postup při stanovování, avšak v této práci byla zvolena výše popsaná metoda.

Bakterie z rodu *Legionella* se obvykle vyskytují ve vlhké půdě, ve vodách v přírodě a lidských sídlech. Přežití nevhodných podmínek jim usnadňuje schopnost přečkat v cystách améb, kde jsou chráněny před vyschnutím.

V odborných člancích je možné nalézt několik rozporuplných tvrzení. Obecně se uvádí, že legionářská nemoc není přenosná z člověka na člověka, avšak oproti tomu Borges et al. (2016) tvrdí, že došlo k objevení případu, kdy byla bakterie *L. pneumophila subsp. fraseri* sg. 1. přenesena z člověka na člověka. Na základě detekce močového antigenu může docházet k dlouhému přetrvávání v hostitelské buňce, ale Fallon (1999) píše, že není známý případ chronického nosičství. K nákaze nedochází pouze v dospělém věku, ale jsou známé případy, kdy se nakazilo několik novorozenců při porodu do vody (Franzin et al., 2001; Nagai et al., 2003).

Nebezpečí nákazy představuje vdechnutí aerosolu, který obsahuje drobné bakterie rodu *Legionella*. Díky svoji velikosti jsou schopné dostat se dolních cest dýchacích, kde adherují na respirační epitel. Snížená imunita organismu může zapříčinit vyšší citlivost k bakteriím *Legionella* a ostatním mikroorganismům a způsobené nemoci mohou mít těžší průběh. Muži jsou také 1,46x náchylnější k nákaze bakteriemi z rodu *Legionella* než ženy (Šašek, 2011).

Při zpracování praktické části této bakalářské práce nebyla v žádném vzorku prokázána přítomnost bakterie *Legionella*. Nadále by však v budovách měly probíhat kontroly z důvodu možného objevení této bakterie. Kontroly by se všeobecně měly provádět hlavně v budovách se staršími rozvody vody a dále v budovách s malým odběrem teplé vody. Doporučuji kontroly provádět jednou za půl roku, nejméně však jednou za dva roky. Ve starších budovách by se neměly kontroly omezit pouze na rod *Legionella*, ale věnovat

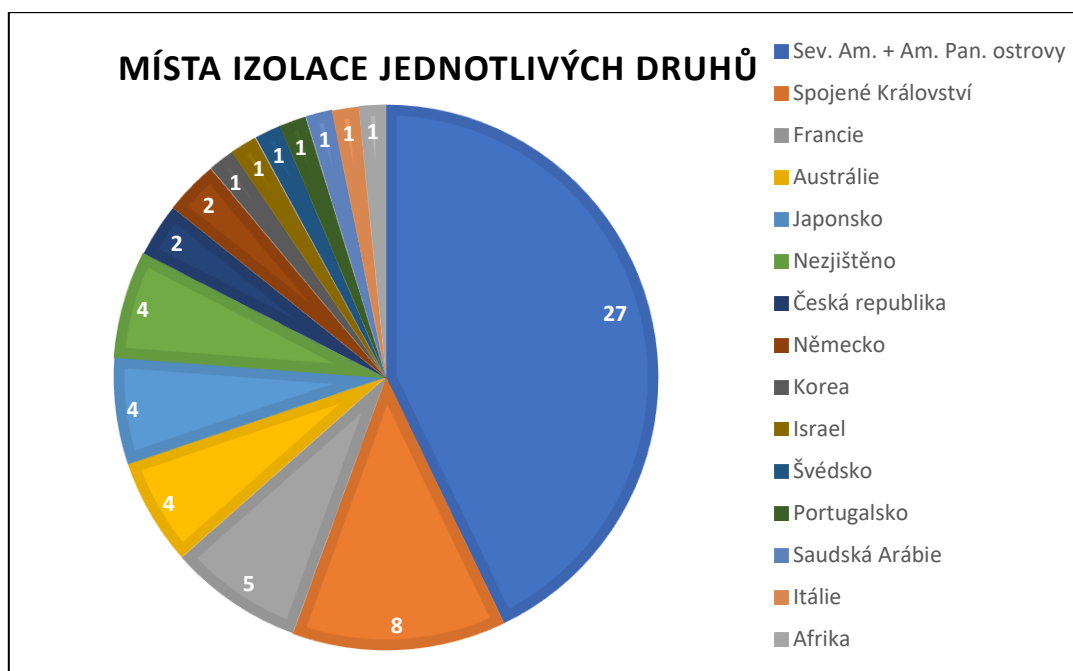


se také dalším rodům jako *Staphylococcus*, *Pseudomonas* a jiné, neboť jsou to také patogeny pro člověka.

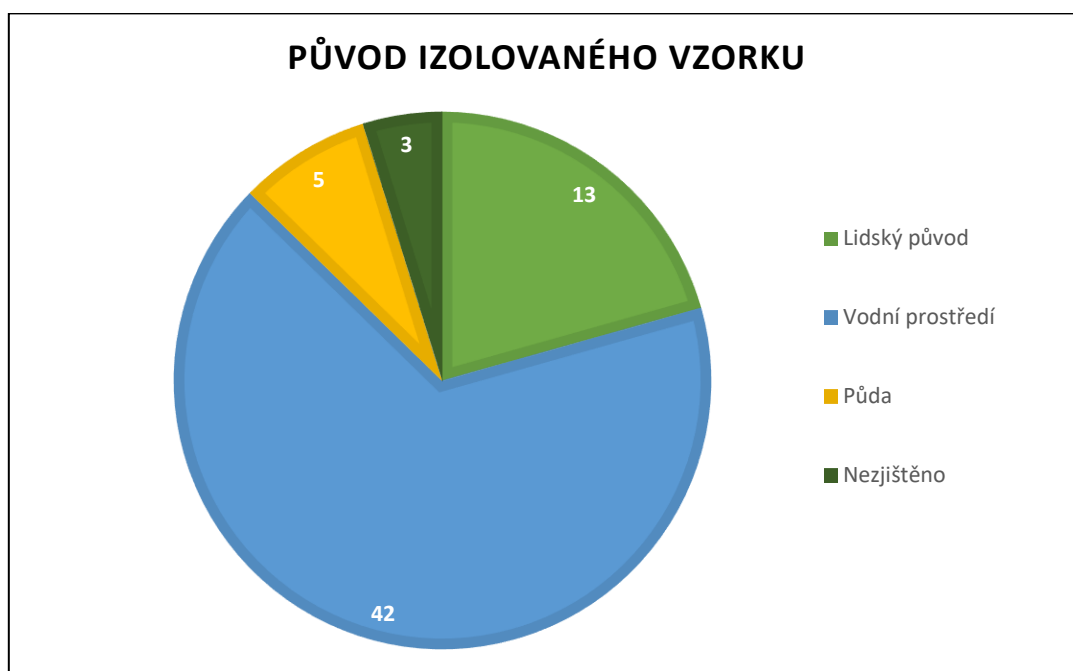
Místům se sezónním odběrem teplé vody a v budovách škol je důležité věnovat zvýšenou pozornost. Pokud dochází ke stagnaci teplé vody, může snáze dojít k namnožení bakterií *Legionella*, neboť v místech s teplou vodou se obvykle vyskytují. Více by se také měly kontrolovat místa s teplou vodou, se kterými může člověk přijít do styku. Například vířivky, lázně, masážní vany, rekreační zařízení nebo termální prameny, kde je vysoký výskyt rodu *Legionella*.

V příloze a) jsou uvedeny všechny doposud známé druhy patřící do rodu *Legionella*. U jednotlivých druhů je popsáno místo nálezu, kdy nejvíce druhů (27) pochází ze Severní Ameriky a Spojeného království Velké Británie a Severního Irska (8), jak je uvedeno v grafu (Graf 1). V dalším grafu (Graf 2) je také uveden původ vzorku, a to nejčastěji vodní prostředí (42), nebo byl druh izolován ze vzorku pocházejícího z člověka (13). U druhů, které vykazují autofluorescenci je popsána barva, jež je možná vidět pod UV zářením vlnové délky  $360 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ . V tabulce jsou také uvedeny reakce na oxidázu, katalázu,  $\beta$ -laktamázu, ureázu, redukci nitrátu a hydrolýzu hippurátu.

**Graf 1:** Místa izolace jednotlivých druhů



**Graf 2:** Původ izolovaného vzorku



Při konzultaci s odborníkem z Národní referenční laboratoře pro *Legionelly*, RNDr. Vladimírem Drašarem mi bylo sděleno, že bakterie rodu *Legionella* kolonizují velké budovy jako nemocnice, školy, hotely, sídliště anebo třeba domovy důchodců (Drašar V. *in litt.*, 2018). Také mi byla doporučena literatura z CDC Atlanta, PHE Londýn a NRL Drážďany, které jsem nastudovala a čerpala z nich.

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje problematice bakterií rodu *Legionella* ve vodách. Cílem práce bylo shrnout dosavadní dostupné znalosti o rodu *Legionella*, jejím výskytu, charakteristických znacích, životním cyklu a rozmnožování. Je zde také popsána situace v České republice včetně možností ochrany před nákazou bakterií *Legionella*.

Organismy patřící do rodu *Legionella* se v přírodě nejčastěji vyskytují ve vodních plochách, nádržích, řekách a jezerech nebo také ve vlhké půdě. Avšak velmi často se také vyskytují v člověkem vytvořených systémech, jako jsou nádrže, vířivé vany nebo vodovodní potrubí. Nejvíce je můžeme nalézt v místech, kde se teploty pohybují v rozmezí 20 – 45 °C, což představuje ideální prostředí pro jejich množení a také v místech, kde dochází ke stagnaci vody a bakterie se tak mohou přemnožit.

Některé bakterie *Legionella* mohou způsobovat onemocnění člověka. Lehčí formu onemocnění představuje pontiacká horečka, kdy se nemoc projevuje bolestí hlavy a svalů, horečkou a celkovou únavou. Těžší formu onemocnění je legionářská nemoc, která získala své pojmenování na počest sjezdu amerických legionářů v roce 1976 ve Philadelphii. U nakaženého člověka dojde k rozvinutí zápalu plic, který nejčastěji doprovází horečka, zvracení, průjem nebo kašel obsahující krvavé či hnisavé sputum. K nákaze jak u pontiacké horečky, tak u legionářské nemoci dochází po vdechnutí aerosolu obsahujícího bakterie *Legionella*. Čím jsou kapénky aerosolu menší, tím více jsou nebezpečné. Klíčem k úspěšné léčbě je včasné rozpoznání nemoci a zahájení antibiotické léčby. Doposud byl zjištěn pouze jeden rezistentní druh vůči fluorochinolonu, a to *L. pneumophila*. V loňském roce bylo v České republice hlášeno dohromady 218 infekcí způsobených rodem *Legionella*.

Patogenní bakterie z rodu *Legionella*, které jsou schopny způsobit onemocnění člověka, by neměly unikat pozornosti veřejnosti ani odborníků, a proto jsou v práci navrženy nápravná opatření a prevence při předcházení nákazy a výskytu těchto bakterií. Mezi nejčastější nápravná opatření patří zamezení stagnace vody v rozvodech i jejich dílčích částech, dále vyhýbání se použití nevhodných materiálů, např. těsnění z přírodní gumy, barvy a tmely. Pokud již k výskytu bakterií *Legionella* dojde, je doporučeno použít dezinfekční opatření, mezi něž patří krátkodobé přechlorování nebo proplachy vodou

zahřátou na vyšší teplotu, či instalace ionizátorů, ze kterých se uvolňují ionty stříbra a mědi.

V praktické části bylo popsáno provedení vlastních odběrů vzorků v budovách měst Hradce Králové a Liberce a následné zjišťování přítomností bakterií z rodu *Legionella*. Po porovnání každého vzorku s kontrolou *L. pneumophila*, jež byla naočkována na každou Petriho misku, nebyl v ani jednom vzorku prokázán výskyt těchto bakterií, avšak při kultivaci bylo zjištěno veliké množství doprovodné mikroflóry.

## POUŽITÉ ZKRATKY

ACES	tlumivý roztok (N-2-acetamido-2-aminoethansulfonová kyselina)
BCYE	Pufrovaný kvasničný extrakt (Buffered Charcoal Yeast Extract)
CDC	Centrum pro kontrolu chorob (Center for Disease Control)
CFU/KTJ	Kolonie tvořící jednotky (Colony Forming Units)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GU	Genomová jednotka (Genome Units)
GVPC	Glycin, Vankomycin hydrochlorid, Polymyxin B sulfát, Cykloheximid
IFA	Nepřímá imunoflourescence (Indirect Fluorescent Antibody)
IgA	Imunoglobulin A
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IU	Mezinárodní jednotka (International Unit)
LCV	Vakuola obsahující bakterie <i>Legionella</i> ( <i>Legionella</i> Containing Vacuole)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RR	Velikost rizika (Rate Ratio)
sg.	Séroskupina (sérogroup)
subsp.	Poddruh (subspecies)
UK	Spojené království Velké Británie a Severního Irska

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Anand CM, Skinner AR, Malic A, Kurtz JB. 1983.** Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg Camb* 91:167-178.
2. **Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, Daneshvar MI, Pruckler JM, Ratcliff RM, Harrison TG, Weyant RS, Birtles RJ, Raoult D, Halablab MA. 2001.** *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1151-1160.
3. **Bajrai LH, Azhar EI, Yasir M, Jardot P, Barrassi L, Raoult D, Scola BL, Pagnier I. 2016.** *Legionella saoudiensis* sp. nov., isolated from a sewage water sample. *Int. J Syst Evol Microbiol* 66:4367-4371.
4. **Barker J, Brown MRW. 1994.** Trojan Horse of the microbial world: protozoa and the survival of bacteria pathogens in the environment. *Microbiol* 140:1253-1259.
5. **Barker J, Brown MRW, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P. 1992.** Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: Physiological Status and Susceptibility to Chemical Inactivation. *Appl Environ Microbiol* 58(8): 2420-2425.
6. **Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. 1996.** *Lékařská mikrobiologie*: Marvil, s.r.o. Praha. ISBN: 8594031505280.
7. **Benson RF, Thacker WL, Daneshvar MI, Brenner DJ. 1996.** *Legionella waltersii* sp. nov. and an Unnamed *Legionella* Genomospecies Isolated from Water in Australia. *Int J Syst Bacteriol* 46(3):631-634.
8. **Benson RF, Thacker WL, Lanser JA, Sangster N, Mayberry WR, Brenner DJ. 1991.** *Legionella adelaidensis*, a New Species Isolated from Cooling Tower Water. *J Clin Microbiol* 29(5):1004-1006.

9. **Benson RF, Thacker WL, Waters RP, Quinlivan PA, Mayberry WR, Brenner DJ, Wilkinson HW. 1989.** Legionella quinlivanii sp. nov. isolated from water. Curr Microbiol 18(3):195-197.
10. **Bercovier H, Steigerwalt AG, Derhi-Cochin M, Moss CW, Wilkinson HW, Benson RF, Brenner DJ. 1986.** Isolation of Legionella from Oxidation Ponds and Fishponds in Israel and Description of Legionella israelensis sp. nov. Int J Syst Bacteriol 36(3):368-371.
11. **Berger S. 2018.** Gideon guide to medically important bacteria. Los Angeles: Gideon Informatics ISBN: 978-4988-1698-4.
12. **Brenner DJ. 1986.** Classification of Legionellaceae. Current status and remaining questions. Isr J Med Sci 22:620–32.
13. **Brenner DJ, Steigerwalt AG, Gorman GW, Weaver RE, Feeley JC, Cordes LG, Wilkinson HW, Patton CH, Thomason BM, Sasseville KRL. 1980.** Legionella bozemanii sp. nov. and Legionella dumoffii sp. nov.: Classification of Two Additional Species. Curr Microbiol 4(1980):111-116.
14. **Brenner DJ, Steigerwalt AG, Gorman GW, Wilkinson HW, Bibb WF, Hackel M, Tyndall RL, Campbell J, Feeley JC, Thacker WL, Skaliy P, Martin WT, Brake BJ, Fields BS, McEachern HV, Corccoran LK. 1985.** Ten New Species of Legionella. Int J Syst Evol Microbiol 35(1):50-59.
15. **Borges V, Nunes A, Sampaio DA, Vieira L, Machado J, Simões MJ, Gonçalves P, Gomes JP. 2016.** Legionella pneumophila strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires´disease: a unique mosaic genetic backbone. [online]. 2016: 6:26261 [cit. 2018-03-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep26261>.

16. **Bornstein N, Marmet D, Surgot M, Nowicki M, Meugnier H, Fleurette J, Ageron E, Grimont F, Grimont PAD, Thacker WL, Benson RF, Brenner DJ. (1989).** Legionella Gratiana Sp Nov. isolated from French SPA warter. Res Microbiol 140(7):541-552.
17. **Bozue JA, Jonhson W. 1996.** Interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii: Uptake by Coiling Phagocytosis and Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion. Infect Immun 64:668-673.
18. **Burdet C, Lepeule R, Duval X. 2014.** Quinolones versus macrolides in the treatment of legionellosis: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 69:2354–2360.
19. **Campocasso A, Boughalmi M, Fournous G, Raoult D, Scola BL. 2012.** Legionella tunisiensis sp. nov. and Legionella massiliensis sp. nov., isolated from environmental water samples. Int J Syst Evol Microbiol 62:3003-3006.
20. **Castor ML, Wagstrom EA, Danila RN, Smith KE, Naimi TS, Besser JM, Peacock KS, Juni BA, Hunt JM, Bartkus JM, Kirkhorn SR, Lynfield R. 2005.** An outbreak of Pontatic fever with respiratory distress among workers performing high-pressure cleanin at a sugar-beet processing plant. J Infect Dis 191:1530-1537.
21. **Čermák M. 2017.** Informace k výskytu Legionelly v teplé vodě. Hygienická stanice hlavního města Prahy [online]. [cit. 22. 3. 2018]. Dostupné z: [http://www.hygp Praha.cz/obsah/legionella\\_475\\_1\\_1.html](http://www.hygp Praha.cz/obsah/legionella_475_1_1.html).
22. **ČSN ISO 11731. 2002.** Jakost vod – Stanovení bakterií rodu *Legionella* – Část 2: Metoda přímé membránové filtrace pro vody s malým počtem bakterií. Praha: Český normalizační institut.
23. **Davies J, Davies D. 2010.** Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev 74:417–433.



24. **Den Boer JW, Yzerman EPF. 2004.** Diagnostic of Legionella infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:871-878.
25. **Dennis PJ, Brenner DJ, Thacker WL, Wait R, Vesey G, Steigerwalt AG, Benson RF. 1993.** Five New Legionella Species Isolated from Water. *Int J Syst Bacteriol* 43(2):329-337.
26. **Diederer BMW. 2008.** Legionella spp. and Legionnaires' disease. *J Clin Infect* 56:1-12.
27. **Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, Jarrad S. (2004).** Clinical and environmental distribution of Legionella strains in France are different. *J Clin Microbiol* 42:458-460.
28. **DSMZ [online]. (2017)** [cit. 5. 12. 2017]. Dostupné z: [https://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial\\_nomenclature\\_info\\_mm.php?genus=Legionella&show\\_genus\\_info=1](https://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?genus=Legionella&show_genus_info=1).
29. **Edelstein PH: Legionnaires' Disease: History and Clinical Findings. In: Heuner K, Swanson M [eds.] (2008).** Legionella Molecular Microbiology. Norfolk, US: Caister Academic Press, 1-4. ISBN 978-1-904455-26-4.
30. **Edelstein PH, Edelstein MA, Shephard LJ, Ward KW, Ratcliff RM. (2012).** Legionella steelei sp. nov., isolated from human respiratory specimens in California, USA, and South Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1776-1771.
31. **Edelstein PH, Pryor EP. (1985).** A New Biotype of Legionella dumoffii. *J Clin Microbiol* 21(4):641-642.
32. **Fallon RJ: Legionely. In: Greenwood D, Slack RCB, Peutherer JF. (1999).** Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Praha: Grada, 331-335. ISBN 80-7169-365-0.

33. **Fields BS, Benson RF, Besser RE. (2002).** Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15:506–26.
34. **Franco IS, Schuman HA, Charpentier X. (2009).** The perplexing functions and surprising origins of Legionella pneumophila type IV secretion effectors. *Cell Microbiol* 11:1435-1443.
35. **Franzin L, Scolfaro C, Canodi D, Valera M, Tovo PA. (2001).** Legionella pneumophila Pneumonia in a Newborn after Water Birth: A New Mode of Transmission. *Clin Infect Dis* 33(9):e103-e104.
36. **Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS. (1977).** Legionnaires' Disease. *N Engl J Med* 297:1189–1197.
37. **Garrity GM, Brown A, Vickers ARM. (1980).** Tatlockia and Fluoribacter: Two New Genera of Organisms Resembling Legionella pneumophila. *Int J Syst Bacteriol* 30:609–614.
38. **Gate2Biotech [online]. (2018)** [cit. 28. 1. 2018]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/dictionary.php?word=513>.
39. **Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW Jr, Kassanoff I. (1978).** Pontiac Fever - An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiological aspects. *Am J Epidemiol* 107:149-160.
40. **Gómez-Lus ML, Corcuera MT, Gómez-Lus R, Sánchez-Serrano C, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, Prieto J. (2013).** Dinámica estructural de colonias/biofilm de Legionella pneumophila y Legionella bozemanii. *Rev Esp Quimioter* 26(3):214-219.

41. **Gorman GW, Feeley JC, Steigerwalt A, Edelstein PH, Moss CW, Brenner DJ. (1985).** Legionella anisa: a New Species of Legionella Isolated from Potable Waters and a Cooling Tower. Appl Environ Microbiol 49(2): 305-309.
42. **Guerrero C, Toldos CM, Yague G, Ramirez C, Rodriguez T, Segovia M. (2004).** Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartel's enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW Immunochromatographic test) for detection of Legionella pneumophilla serogroup 1 antigen in urine. J Clin Microbiol 42:457-468.
43. **Hébert GA, Callaway CS, Ewing EP Jr. (1984).** Comparison of Legionella pneumophila, L. micdadei, L. bozemanii and L. dumoffii by Transmission Electron Microscopy. J Clin Microbiol 19(2):116-121.
44. **Helbig JH, Bermamder S, Castellani P, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Lück PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG. (2002).** Pan-European study on culture-proven Legionnaires' Disease: Distribution of Legionella pneumophilla serogroups and monoclonal subgroups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21:710-716.
45. **Ishizaki N, Sogawa K, Inoue H, Agata K, Edagawa A, Miyamoto H, Fukuyama M, Furuhashi K. (2016).** Legionella thermalis sp. nov., isolated from hot spring water in Tokyo, Japan. Microbiol Immunol 60:203-208.
46. **Jespersen S, Søgaard OS, Schønheyder HC, Fine MJ, Ostergaard L. (2010).** Clinical features and predictors of mortality in admitted patients with community - and hospital-acquired legionellosis: a Danish historical cohort study. BMC Infect Dis 10:124.
47. **Joseph C, Lee J, Wijnigaarden J, Drasar V, Pastoris MC. (2006).** Evropské směrnice pro kontrolu a prevenci legionářské nemoci. [cit. 2017-12-05]. Dostupné z: [http://www.unichem.cz/download/EU\\_Smernice\\_070123.pdf](http://www.unichem.cz/download/EU_Smernice_070123.pdf).

48. **Joshi AD, Swanson MS. (1999).** Comparative Analysis of Legionella pneumophila and Legionella micdadei Virulence Traits. Infect Immun 67(8):4134-4142.
49. **Kashuba ADM., Ballow CH. (1996).** Legionella urinary antigen testing: Potential impact on diagnosis and antibiotic therapy. Diagn Microbiol Infect Dis 24:129–139.
50. **Klaban V. (2005).** Ilustrovaný mikrobiologický slovník. Praha: Galén. ISBN 80-7262-341-9.
51. **Klaban V. (2011).** Ekologie mikroorganismů, ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-770-7.
52. **Klaban V. (2018).** Obecná a environmentální mikrobiologie. Hradec Králové: Gaudeamus. ISBN: 978-80-7435-673-5.
53. **Kohler RB, Winn WC, Wheat LJ. (1984).** Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. J Clin Microbiol 20:605–607.
54. **Kuroki H, Miyamoto H, Fukuda K, Iihara H, Kawamura Y, Ogawa M, Wang Y, Ezaki T, Taniguchi H. (2007).** Legionella impletisoli sp. nov. and Legionella yabuuchiae sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. Syst Appl Microbiol 30(4):273-279.
55. **Lattimer GL, Ormsbee RA. (1981).** Legionnaires' Disease, p. 176. New York, Basel: Marcel Dekker 67-68.
56. **Legionella [online]. (2017).** [cit. 2017-12-05]. Dostupné z: <https://legionella.cz>.
57. **Levin AS. (2009).** Nosocomial legionellosis: prevention and management. Expert Rev Anti Infect Ther 7:57-68.

58. **Lück CP: Diagnostic and clinical Disease Treatment. In: Heuner K, Swanson M. [eds.] (2008).** Legionella Molecular Microbiology. Norfolk, US: Caister Academic Press, 1-4. ISBN 978-1-904455-26-4.
59. **Lück PCh, Jacobs E, Röske I, Schröter-Bobsin U, Dumke R, Gronow S. (2010).** Legionella dresdenensis sp. nov., isolated from river water. Int J Syst Evol Microbiol 60:2557-2562.
60. **McNally C, Hackman B, Fields BS, Plouffe JF. (2000).** Potential importance of Legionella species as etiologies in community-acquired pneumonia (CAP). Diagn Microbiol Infect Dis 38:79–82.
61. **Mermel LA, Josephson SL, Giorgio CH, Dempsey J, Parenteau S. (1995).** Association of Legionnaires' Disease with Construction: Contamination of Potable Water? Infec Control Hosp Epidemiol 16(2):76–81.
62. **Murdoch DR, Weinstein MP, Reller LB. (2003).** Diagnosis of Legionella Infection Clin Infect Dis 36:64–69.
63. **Nagai T, Sobajima H, Iwasa M, Tsuzuki T, Kura F, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. (2003).** Neonatal Sudden Death Due to Legionella pneumonia Associated with Water Birth in a Domestic Spa Bath. J Clin Microbiol 41(5):2227-2229.
64. **Osterholm MT, Chin TDY, Osborne DO, Dull HB, Dean AG, Fraser DW, Hayes PS, Hall WN. (1983).** A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. Am J Epidemiol 117:60–67.
65. **Pagnier I, Croce O, Robert C, Raoult D, Scola BL. (2014).** Genome Sequence of Legionella massiliensis, Isolated from a Cooling Tower Water Sample. Genome Announc. [online]. 2014: 2(5):e01068-14. [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323728>.

66. **Palmer A, Painter J, Hassler H, Richards VP, Bruce T, Morrison S, Brown W, Kozak-Muiznieks NA, Lucas C, McNealy TL. (2016).** *Legionella clemsonensis* sp. nov.: a green fluorescing *Legionella* strain from a patient with pneumonia. *Microbiol Immunol* 60(10):694-701.
67. **Palusinska-Szys M, Kalitynski R, Russa R, Dawidowicz AL, Drozanski WJ. (2008).** Cellular envelope phospholipids from *Legionella lytica*. *Microbiol Lett* 293(2):239-246.
68. **Park MY, Ko KS, Lee HK, Park MS, Kook YH. (2003).** *Legionella busanensis* sp. nov., isolated from cooling tower water in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:77-80.
69. **Park M, Yun ST, Kim MS, Chun J, Ahn TI. (2004).** Phylogenetic characterization of *Legionella*-like endosymbiotic X-bacteria in *Amoeba proteus*: a proposal for 'Candidatus *Legionella jeonii*' sp. nov. *Environ Biol* 6:1252-1263.
70. **Pearce MM, Theodoropoulos N, Mandel MJ, Brown E, Reed KD, Cianciotto NP. (2012).** *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:2946-2954.
71. **Pierre DM, Baron J, Yu VL, Stout JE. (2017).** Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16:59.
72. **Presti FL, Riffard S, Meugnier H, Reyrolle M, Lasne Y, Grimont PAD, Grimont F, Benson RF, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Etienne J, Freney J. (2001).** *Legionella gresilensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1949-1957.
73. **Presti FL, Riffard S, Meugnier H, Reyrolle M, Lasne Y, Grimont PAD, Grimont F, Vandenesch F, Etienne J, Fleurette J, Freney J. (1999).** *Legionella taurinensis* sp. nov., a new species antigenically similar to *Legionella spiritensis*. *Int J Syst Bacteriol* 43:397-403.

74. **Relich RF, Schmitt Bh, Raposo H, Barker L, Blosser SJ, May M. (2018).** *Legionella indianapolisensis* sp. nov., isolated from a patient with pulmonary abscess. *Int J Infect Dis*: 69:26-28.
75. **Rizzardi K, Winiecka-Krusnell J, Ramliden M, Alm E, Andersson S, Byfors S. (2015).** *Legionella norrlandica* sp. nov., isolated from the biopurification systems of wood processing plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:598-603.
76. **Rodgers FG: Morphology of Legionella. In: Katz SM. [eds.] (2018).** *Legionellosis*. Department of Pathology Hahnemann University School of Medicine Philadelphia, Pennsylvania: CRC Press ISBN 978-1-351090-89-6.
77. **Rojas A, Navarro MD, Fornés FE, Serra E, Simarro E, Rojas J, Ruiz J. (2005).** Value of serological testing for diagnostic of Legionellosis in outbreak patients. *J Clin Microbiol* 43(8):4022-4025.
78. **Scola BL, Birtles RJ, Greub G, Harrison TJ, Ratcliff RM, Raoult D. (2004).** *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:699-703.
79. **Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebei C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. (2015).** Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. *EBioMedicine* [online]. 2015; 2(9):1179-1185 [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: [http://www.ebiomedicine.com/article/S2352-3964\(15\)30072-4/fulltext](http://www.ebiomedicine.com/article/S2352-3964(15)30072-4/fulltext).
80. **Skaliy P, McEachern HV. (1979).** Survival of the Legionnaires' Disease Bacterium in Water. *Ann Intern Med* 90:662.
81. **Státní zdravotní ústav (2018).** Infekce v ČR – EPIDAT. [online]. [cit. 22. 3. 2018]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>.

82. **Šašek J. (2011).** Legionelóza a její prevence (Základní informace pro odbornou i laickou veřejnost). Státní zdravotní ústav [online]. [cit. 14. 3. 2018]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/Legionelozy\\_verejne\\_informace\\_2012.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/Legionelozy_verejne_informace_2012.pdf).
83. **Taylor M, Ross K, Bentham R. (2009).** Legionella, protozoa, and biofilms: Interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* 58:538–547.
84. **Terranova W, Cohen ML, Fraser DW. (1978).** 1974 outbreak of Legionnaires' disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. *Lancet* 2(312):122–124.
85. **Test pro detekci antigenu v moči Alere BinaxNOW® Legionella** (2017). [online]. [cit. 5. 12. 2017]. Dostupné z: [https://www.alere.com/cz/cs\\_cz/product-details/binaxnow-legionella.html](https://www.alere.com/cz/cs_cz/product-details/binaxnow-legionella.html).
86. **Thacker WL, Benson RF, Hawes L, Gidding H, Dwyer B, Mayberry WR, Brenner DJ. (1991).** Legionella fairfieldensis sp. nov. Isolated from Cooling Tower Waters in Austria. *J Clin Microbiol* 29(3):475-478.
87. **Thacker WL, Benson RF, Schiffman RB, Pugh E, Steigerwalt AG, Mayberry WR, Brenner DJ, Wilkinson HW. (1989).** Legionella tusconensis sp. nov. Isolated from a Renal Transplant Recipient. *J Clin Microbiol* 27(8):1931-1934.
88. **Thacker WL, Benson RF, Staneck JL, Vincent SR, Mayberry WR, Brenner DJ, Wilkinson HW. (1987).** Leginoella cincinnatiensis sp. nov. Isolated from a Patient with Pneumonia. *J Clin Microbiol* 26(3):418-420.
89. **Thacker WL, Dyke JW, Benson RF, Havlichek DH, Robinson-Dunn JB, Stiefel H, Schneider W, Moss CW, Mayberry WR, Brenner DJ. (1992).** Legionella lansingensis sp. nov. Isolated from a Patient with Pneumonia and Underlying Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Microbiol* 30(9):2398-2401.



90. **ThermoFisher Scientific. 2018.** Real-Time vs. Digital PCR vs. Traditional PCR [online]. [cit. 16. 1. 2018]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>.
91. **Tilton RC. (1979).** Legionnaires' Disease Antigen Detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Ann Intern Med* 90:697.
92. **Tison DL, Pope DH, Cherry WB, Fliermans CB. (1980).** Growth of *Legionella pneumophila* in Association with Blue-Green Algae (Cyanobacteria). *Appl Environ Microbiol* 39:456–459.
93. **Trebichavsky I: Metody imunohistochemie.** In: Bárta O, Dostál J, Faldyna M, Holáň V, Hořín P, Hruban V, Jeklová E, Knotek Z, Kopecný J, Koudela B, Krejčí J, Nechvátalová K, Ondráčková P, Plachý J, Pospíšil R, Pospíšil Z, Rybníkář A, Ryšánek D, Smola J, Šíma P, Tlaskalová H, Toman M, Trebichavská I, Veselský L. (2009). *Veterinární imunologie*. Praha: Grada Publishing, a.s.. ISBN 978-80-247-6762-8.
94. **Tronel H, Hartemann P. (2008).** Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella* spp. *Lett Appl Microbiol* 48(6):653-656.
95. **Třeška M. (2016).** *Legionella v České republice. Technická zařízení budov.* [online]. [cit. 22. 3. 2018]. Dostupné z: <https://voda.tzb-info.cz/120273-legionella-v-ceske-republice>.
96. **Verma UK, Brenner DJ, Thacker WL, Benson RF, Vesex G, Kurtz JB, Dennis PJJ, Steigerwalt AG, Robinson JS, Moss CW. (1992).** *Legionella shakespearei* sp. nov., Isolated From Cooling Tower Water. *Int J Syst Bacteriol* 42(3):404-407.
97. **Votava M, Broukal Z, Vaněk J. (2007).** *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře.* Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-03-0.

98. **Wilkinson HW, Farshy CE, Fikes BJ, Cruce DD, Yealy LP. (1979).** Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *Legionella pneumophila* and inhibition of titers against nonspecific, gram-negative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis. *J Clin Microbiol* 10:685-689.
99. **Wilkinson HW, Drasar V, Thacker WL, Benson RF, Schindler J, Potuznikova B, Mayberry WR, Brenner DJ. (1988).** *Legionella moravica* sp. Nov. and *Legionella brunensis* sp. Nov. Isolated from cooling-tower water.
100. **Wilkinson HW, Reingold AL, Brake BJ, McGiboney DL, Gorman GW, Broome CV. (1983).** Reactivity of serum from patients with suspected legionellosis against 29 antigens of legionellaceae and *Legionella*-like organism by indirect immunofluorescence assay. *J Infect Dis* 147:23-31.
101. **Wilkinson HW, Thacker WL, Benson RF, Polt SS, Brookings E, Mayberry WR, Brenner DJ, Gilley RG, Kirklin JK. (1987).** *Legionella birminghamensis* sp. nov. Isolated from a Cardiac Transplant Recipient. *J Clin Microbiol* 25(11): 2120-2122.
102. **World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. Second edition. Geneva, 2002.** ISBN 92-4-154535-6.
103. **Yang G, Benson RF, Ratcliff RM, Brown EW, Steigerwalt AG, Thacker WL, Daneshvar MI, Morex RE, Saito A, Fields BS. (2012).** *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:284-288.
104. **Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Cheresky A. (2002).** Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* 186:127-128.

## Seznam obrázků, grafů a tabulek:

**Obr. 1: Bakterie *Legionella pneumophila*.** [cit. 19. 12. 2017], dostupné z: <https://www.cdc.gov/legionella/resources/materials.html>.

**Obr. 2: Kolonie *Legionella sp.* rostoucí na agaru, osvětlené UV světlem pro zvýšení kontrastu.** [cit. 8. 12. 2017], dostupné z: <https://www.cdc.gov/about/facts/cdcdiscovery/legionnaires.html>.

**Obr. 3: Intracelulární životní cyklus bakterie *Legionella pneumophila*.** [cit. 9. 1. 2018], dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2009.01351.x>.

**Obr. 4: *L. bozemanii* – průřez kolonií po třídní kultivaci, 400x zvětšeno.** [cit. 9. 1. 2018], dostupné z: Gómez-Lus M. L., Corcuera M. T., Gómez-Lus R., Sánchez-Serrano C., Gómez-Aguado F., Alonso M. J., Prieto J. (2013). Dinámica estructural de colonias/biofilm de *Legionella pneumophila* y *Legionella bozemanii*. Rev. Esp. Quimioter. 26(3):214-219.

**Obr. 5: *L. pneumophila* – průřez kolonií po třídní kultivaci, 400x zvětšeno.** [cit. 9. 1. 2018], dostupné z: Gómez-Lus M. L., Corcuera M. T., Gómez-Lus R., Sánchez-Serrano C., Gómez-Aguado F., Alonso M. J., Prieto J. (2013). Dinámica estructural de colonias/biofilm de *Legionella pneumophila* y *Legionella bozemanii*. Rev. Esp. Quimioter. 26(3):214-219.

**Obr. 6: Petriho miska s agarovou půdou BCYE.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 7: Půlená Petriho miska s půdami BCYE+ a BCYE-.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 8: Pracovní postup testu Alere Binax NOW® *Legionella*.** [cit. 5. 12. 2017], dostupné z: [https://www.alere.com/cz/cs\\_cz/product-details/binaxnow-legionella.html](https://www.alere.com/cz/cs_cz/product-details/binaxnow-legionella.html).

**Obr. 9: Membránový filtr na živné půdě.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 10: Kmen *L. pneumophila*.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 11: Kontrola – kmen *L. pneumophila* pod binkuární lupou.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 12: Kontrola – kmen *L. pneumophila*.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 13: Doprovodná mikroflóra.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 14: Doprovodná mikroflóra.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 15: Vzorek 1a před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 16: Vzorek 1b před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 17: Vzorek 2a před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 18: Vzorek 2b před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 19: Vzorek 3a před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 20: Vzorek 3b před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 21: Vzorek 4a před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 22: Vzorek 4b před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 23: Vzorek 5a před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Obr. 24: Vzorek 5b před očkováním.** [foto K. Stuchlíková, 26. 2. 2018]

**Graf 1: Místa izolací jednotlivých druhů**

**Graf 2: Původ izolovaného vzorku**

**Tab. 1: Přehled druhů bakterií rodu *Legionella*.**

**Tab. 2: Hlášené infekce v České republice v letech 2008 - 2017**

**Tab. 3: Seznam druhů a jejich charakteristické vlastnosti**

# PŘÍLOHY

## a) Tabulky

V následujících tabulce (Tab. 3.) jsou uvedeny doposud známé druhy patřící do rodu *Legionella* společně s jejich charakteristickými vlastnostmi.

**Tab. 3:** Seznam druhů a jejich charakteristické vlastnosti

druh	místo odebrání vzorku	typ vzorku	kataláza	oxidáza	ureáza	reducké nitrátu	hydrolyza hippurátu	B-laktamáza	autofluorescence	autor
<i>L. adalaidensis</i>	Austrálie - Adelaide	Voda z chladicí věže	+	-	-	-	-	-	-	Benson et al., 1991
<i>L. anisa</i>	Sev. Am. - LA	Voda z vodovodu	+	+	-	-	-	+	Modro-bílá	Gorman et al., 1985
<i>L. beliardensis</i>	Francie - Lyon	Vzorek vody	+	r.	-	-	-	+	-	Presti et al., 2001
<i>L. birminghamensis</i>	Sev. Am. - Alabama	Biopsie plic	+	r.	-	-	-	+	Žluto-zelená	Wilkinson et al., 1987
<i>L. bozemanii</i>	Sev. Am.	Plicní tkáň	+	+	-	-	-	+	Modro-bílá	Rodgers, 2018
<i>L. brunensis</i>	Česká republika - Brno	Voda z chladicí věže	+	-	-	-	-	+	-	Wilkinson et al., 1988
<i>L. busanensis</i>	Korea - Busan	Voda z chladicí věže	+	+	-	-	+	-	-	Park et al., 2003

<i>L. cardiaca</i>	Sev. Am. - Chicago	Lidské srdce	+	*	-	-	+	+	-	Pearce et al., 2012
<i>L. cherri</i>	Sev. Am. - Minnesota	Tepelně upravená voda	+	-	-	-	-	+	Modrobílá	Brenner et al., 1985
<i>L. cincinnatiensis</i>	Sev. Am. - Cincinnati	Plicní tkáň	+	-	-	-	-	-	-	Thacker et al., 1987
<i>L. clemsonensis</i>	Sev. Am. - Ohio	Výplach plic	+	-	-	-	-	-	Zelená	Palmer et al., 2016
<i>L. drancourtii</i>	UK- Záp. Yorkshire	Vzorek vody	*	*	*	*	*	*	*	Scola et al., 2004
<i>L. dresdenensis</i>	Německo - Drážďany	Voda z řeky	+	-	-	-	-	*	Modrobílá	Lück et al., 2010
<i>L. drozanskii</i>	UK	Voda	+	-	*	*	*	*	-	Adeleke et al., 2001
<i>L. dumoffii</i>	Sev. Am. - New York	Voda z chladicí věže	+	-	-	-	-	+	Modrobílá	Brenner et al., 1980
<i>L. erythra</i>	Sev. Am.	Plicní tkáň	+	+	-	-	-	+	Červená	Brenner et al., 1985
<i>L. fairfieldensis</i>	Austrálie - Fairfield	Voda z chladicí věže	+	+	-	-	--	-	-	Thacker et al., 1991
<i>L. fallonii</i>	UK	Voda	+	+	*	*	*	*	-	Adeleke et al., 2001
<i>L. feeleii</i>	Sev. Am.	Chladicí kapalina brusného stroje	+	-	-	-	-/+	-	-	Brenner et al., 1985

<i>L. geestiana</i>	UK - Londýn	Voda	+	-	-	-	+	-	-	Dennis et al., 1993
<i>L. gormanii</i>	Sev. Am. - Atlanta	Půda z potoka	+	-	-	-	-	+	Modrobílá	Brenner et al., 1985
<i>L. gratiana</i>	Francie - Savoie	Voda z termálních lázní	+	-	*	*	*	*	Modrobílá	Bornstein et al., 1989
<i>L. gresiliensis</i>	Francie - Lyon	Termální voda	+	+	-	-	+	+	-	Presti et al., 2001
<i>L. hackeliae</i>	Sev. Am. - Ann Arbor	Plicní tkáň	+	-	-	-	-	+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. impletisoli</i>	Japonsko - Osaka	Půda	+	+	-	-	+	*	-	Kuroki et al., 2007
<i>L. indianapolisensis</i>	Sev. Am. - Indianapolis	Plicní tkáň	-	+	*	*	-	+	-	Relich et al., 2018
<i>L. israelensis</i>	Israel	Voda	+	-	-	-	-	+	-	Bercovier et al., 1986
<i>L. jamestowniensis</i>	Sev. Am. - Jamestown	Vlhká půda	+	-	-	-	-	+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. jordansis</i>	Sev. Am. - Bloomington	Voda z řeky	+	+	-	-	-	+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. lansingensis</i>	Sev. Am. - Lansing	Plicní tkáň	+	+	-	-	-	-	-	Thacker et al., 1992
<i>L. londiniensis</i>	UK - Londýn	Kancelářská budova chladič věže	+	-	-	-	-	+	-	Berger, 2018 Dennis et al., 1993

<i>L. longbeachea</i>	Sev. Am. - Kalifornie	Plicní tkáň	+	+	-	-	-	-/+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. lytica</i>	*	Půda	*	-	-	-	*	*	*	Palusinska-Szys, 2008
<i>L. maceachernii</i>	*	Voda	+	+	-	-	-	-	-	Brenner et al., 1985
<i>L. massiliensis</i>	Francie – Bouches du Rhone	Voda z chladicí věže	*	-	*	*	*	-	-	Campocasso et al., 2012 Pagnier et al., 2014
<i>L. micdadei</i>	Sev. Am. - Philadelphia	Vzorky vody	+	+	-	-	-	-	-	Brenner et al., 1985
<i>L. moravica</i>	Česká republika - Jihlava	Voda z chladicí věže	+	+	-	-	-	+	-	Wilkinson et al., 1988
<i>L. nagasakiensis</i>	Japonsko – prefektura Aomori	Termální voda	+	*	-	-	-	+	*	Berger, 2018 Yang et al., 2012
<i>L. nautaurum</i>	UK	Voda z vodovodu	+	+	-	-	-	+	-	Dennis et al., 1993
<i>L. norrlandica</i>	Švédsko - Pitea	Biopurifikační systém	*	-	*	*	*	*	-	Rizzardi et al., 2015
<i>L. oakridgensis</i>	Sev. Am. - Pensylvánie	Voda z chladicí věže	+	-	-	-	-	+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. parisiensis</i>	Francie – Paříž	Voda z chladicí věže	+	+	-	-	-	+	Modrobílá	Brenner et al., 1985
<i>L. pneumophila</i>	Německo	Vzorek vody	+	+ +/-	-	-	+	+	-	Brenner et al., 1988



<i>L. quarteirensis</i>	Portugalsko - Quarteira	*	+	-	-	-	-	+	-	Dennis et al., 1993
<i>L. quinlivanii</i>	Austrálie - Adelaide	Klimatizace v autobusu	+	-	-	-	-	-	Žluto- zelená	Benson et al., 1989
<i>L. rowbothamii</i>	*	Voda v průmyslové věži	+	-	*	*	*	*	Modro- bílá	Adeleke et al., 2001
<i>L. rubrilucens</i>	Sev. Am. - LA	*	+	-	-	-	-	+	+	Brenner et al., 1985
<i>L. sainthelensi</i>	Sev. Am. - Hora Svaté Heleny	Pramennitá voda	+	+	-	-	-	+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. santicrucis</i>	Americké Panenské ostrovy - St. Croix	Voda z vodovodu	+	+	-	-	-	+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. saoudiensis</i>	Saudská Arábie - Jeddah	Odpadní vody	*	*	+	*	-	+	Modrá	Bajrai et al., 2016
<i>L. shakespearei</i>	UK - Stratford nad Avonou	Voda z chladicí věže	+	+	-	-	-	+	-	Verma et al., 1992
<i>L. spiritiensis</i>	Sev. Am. - Spirit Lake	Voda z jezera	+	+	-	-	+	+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. steelei</i>	Sev. Am. Kalifornie	Dýchací cesty	+	+/-	-	-	+	+	Modro- bílá / žluto- zelená	Edelstein, 2012 Berger, 2018
<i>L. steigerwaltii</i>	Americké Panenské ostrovy - St. Croix	Voda z vodovodu	+	-	-	-	-	+	Modro- bílá	Brenner et al., 1985
<i>L. taurinensis</i>	Itálie - Turín	Voda z nemocnice	+	+	-	-	-	+	Červená	Presti et al., 1999

<i>L. thermalis</i>	Japonsko, Tokyo	Horká pramenitá voda	+	+	-	-	-	+	-	Ishizaki et al., 2016
<i>L. tusconensis</i>	Sev. Am. - Tuscon	Pleurální tekutina pacienta	+	-	-	-	-	+	Modro- bílá	Thacker, 1989
<i>L. tunisiensis</i>	Afrika - Tunisko	Vzorek vody	*	*	*	*	*	-	-	Campocasso et al., 2012
<i>L. wadsworthii</i>	Sev. Am. - LA	Sputum	+	-	-	-	-	+	-	Brenner et al., 1985
<i>L. waltersii</i>	Austrálie - Adelaide	Rozvody pitné vody	+	-	-	-	-	-	-	Benson et al., 1996
<i>L. worsleiensis</i>	UK - Worsley	Voda z chladicí věže	-	-	-	-	-	+	-	Dennis et al., 1993
<i>L. yabuuchiae</i>	Japonsko - Osaka	Půda	+	+	-	-	+	r.	-	Kuroki et al., 2007