

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Sekvenační identifikace a typizace *Legionella* sp.  
a její využití v epidemiologii**

Diplomová práce

**Bc. Andrea Cignová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: **Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího magisterského studia pod vedením Prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. a RNDr. Vladimíra Drašara z Národní referenční laboratoře pro legionely ve Vyškově. Čerpala jsem z uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci 20. dubna 2012

Tato diplomová práce vznikla za podpory Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, který poskytl finanční prostředky a pracovní podmínky na oddělení molekulární biologie. Děkuji vedoucímu oddělení Mgr. Jakobovi Mrázkovi za vedení při práci v laboratoři a jeho podporu. Mé poděkování patří také celému kolektivu molekulární biologie a Mgr. Kamile Haluzové z oddělení biologických analýz.

Děkuji vedoucímu práce Prof. RNDr. Milanovi Navrátilovi, Csc. za rady a vedení při psaní této práce. RNDr. Vladimírovi Drašarovi děkuji za odborné konzultace, ochotu, poskytování bakteriálních kmenů a klinického materiálu.

Děkuji také mému manželovi za pomoc při počítačových úpravách a mým dětem za trpělivost po celou dobu studia.

# SOUHRN

Bakterie rodu *Legionella* se hojně vyskytují ve vodních ekosystémech, ale nalézány jsou také v půdě a kompostech. Odtud se dostávají do vodních systémů vytvořených člověkem, jako jsou průmyslové technologie nebo vodovodní systémy velkých budov. Úkolem preventivních opatření je zabránit jejich přenosu na vnímavé osoby. Dvacet čtyři druhů legionel může způsobit onemocnění člověka. Nejvýznamnější je *L. pneumophila* a její sérologická skupina 1, která tvoří více než 50 % všech nákaz v České republice. Použití molekulárně biologických metod k detailní typizaci kmenů legionel umožňuje epidemiologům potvrdit zdroj nákazy a nařídit jeho sanaci.

Taxonomická klasifikace legionel je založena na variabilitě genu *mip*. Jeho sekvenace je v současné době metodou volby. Sérologické metody s králičími polyklonálními séry nebo monoklonálními protilátkami mají řadu omezení a neumožňují rozlišení některých druhů, které jsou si geneticky velmi blízké. To je i případ skupiny PAB (*L. parisiensis* - *L. anisa* - *L. bozemanii*). Klasifikace založená na sekvenaci genu *mip* byla použita v naší kolekci 45 vzorků. 42 kmenů bylo izolováno z prostředí, jeden kmen z pacienta a dva vzorky byly biologický materiál. Potvrdilo se, že *L. anisa* v přírodě jasně dominuje a nemá výraznější klinický význam. Patogenní *L. bozemanii* byla prokázána v jediném kmeni z pacienta. Sekvenace *mip* byla použita také k identifikaci některých kmenů, které vykazovaly atypickou sérologickou reakci. Mezi těmito kmeny byly identifikovány čtyři doposud nepopsané kmeny a zřejmě se jedná o nové druhy legionel.

Sekvenační subtypizace *L. pneumophila* je mezinárodně standartizovaná a validovaná metoda k průkazu zdroje nákazy. Ten je potvrzen v případě shody sekvenačních typů nebo alelických profilů kmene legionely izolované z prostředí a kmene od pacienta. Sekvenační subtypizaci lze využít také k analýze zdravotního rizika, protože sekvenační typ *L. pneumophila* často charakterizuje virulenci kmene. V této diplomové práci jsou prezentovány epidemiologická šetření všech typů legionelóz, a to komunitních, nozokomiálních, cestovních i profesionálních. V souboru vyšetřovaných vzorků byla *L. pneumophila* původcem komunitních legionelóz v 47,2 %. Nejčastěji identifikovaný byl sekvenační typ ST62. Nezodpovězenou otázkou zůstává, kde je zdroj tohoto sekvenačního typu, který je z prostředí izolován vzácně. V Evropě rozšířený ST1, způsobující onemocnění zejména u oslabených a imunokompromitovaných lidí, byl původcem tří nozokomiálních nákaz ze čtyř šetřených a tvořil 39,3 % environmentálních izolátů.

# SUMMARY

Bacteria of the genus *Legionella* are commonly found in aquatic ecosystems but also in the soil and compost mixes. They get from these environments to man-made water systems such as industrial technologies or water distribution systems of large buildings. The main reason of preventive measures is to hamper their transmission onto susceptible persons. 24 *Legionella* species have been implicated to infect humans. The most important *L. pneumophila* sg. 1 causes more than 50 % of cases notified in the Czech Republic. The implementation of molecular biology methods to detailed typing of *Legionella* strains has enabled to confirm the source of infection and impose remedial measures.

The taxonomic classification of the genus *Legionella* is based mainly on the variability of the *mip* gene. Its sequencing has become currently the method of choice. Serological identifications using rabbit polyclonal or monoclonal antisera have a number of limitations that do not allow a correct identification of genetically related species. One of these is the group PAB (*L. parisiensis* - *L. anisa* - *L. bozemanii*). The *mip* sequencing was applied to the collection of 42 strains from environmental samples, one isolate from a patient and two clinical samples tested directly. *L. anisa* has been shown to dominate in water samples and its clinical importance appears low. *L. bozemanii* was confirmed from the patient. The *mip* sequencing was also used in case of the isolates whose serology patterns did not match type strains of particular species. Four possible „novel species candidates“ have been recognized.

*L. pneumophila* sequence-based typing (SBT) scheme is an internationally adopted and validated method for source tracking. The sequence types (ST) or allelic profiles of the environmental isolates must match this from a patient. SBT can be also utilized in risk assessments. There are sequencing types that differ substantially in their virulence.

Also the data coming from epidemiological investigations are presented here comprising the following sources: community acquired (CAP), nosocomial, travel associated and professional. *L. pneumophila* was detected in 47.2% as a cause of CAP. With ST62 prevailing. This ST is rarely encountered in water, which generates a question where its source can be. The most common ST1 in Europe has predominated also here among patients with impaired immunity or other serious underlying diseases. Three nosocomial infections were confirmed. Furthermore, ST1 was found in 39.3% among environmental isolates.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>10</b>
3.1	Rod <i>Legionella</i> .....	10
3.1.1	Genom <i>Legionella</i> sp. ....	11
3.1.2	Morfologie.....	12
3.2	Environmentální zdroje legionel .....	12
3.3	Patogeneze legionel .....	13
3.4	Metody detekce legionel.....	14
3.4.1	Kultivace .....	14
3.4.2	Sérologie.....	15
3.4.3	Detekce močového antigenu .....	16
3.4.4	Přímá imunofluorescence .....	16
3.4.5	Detekce legionel pomocí PCR .....	17
3.5	Léčba .....	17
3.6	Identifikace a detailní typizace izolátů <i>Legionella</i> sp. ....	18
3.6.1	Sérologická typizace izolátů.....	18
3.6.2	Typizace izolátů molekulárními metodami.....	19
3.7	Typizace izolátů <i>Legionella pneumophila</i> .....	20
3.7.1	Typizace izolátů monoklonálními protilátkami .....	21
3.7.2	Sekvenační subtypizace bakteriálních kmenů.....	23
3.7.3	Sekvenační subtypizace respiračních vzorků.....	24
3.7.4	Výhody a nevýhody SBT <i>L. pneumophila</i> .....	25
3.8	Epidemiologie legionelóz .....	25
3.8.1	Klasifikace legionelóz .....	26
3.8.2	Podhlášenost legionelóz .....	27
3.8.3	Důvody a následky epidemií.....	27
3.8.4	Cestovní legionelózy - TALD .....	28
3.9	Prevence legionelóz a nápravná opatření .....	28
3.10	Eliminace legionel z distribuční sítě pitné vody.....	29

<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>31</b>
4.1	Materiál.....	31
4.2	Izolace bakteriální DNA.....	33
4.3	PCR amplifikace genu <i>mip</i> k identifikaci <i>Legionella</i> sp. ....	34
4.4	PCR amplifikace vybraných lokusů k subtypizaci bakteriálních kmenů <i>Legionella pneumophila</i> .....	35
4.5	PCR amplifikace vybraných lokusů k subtypizaci <i>Legionella pneumophila</i> z klinického materiálu .....	36
4.6	Elektroforéza PCR produktů .....	38
4.7	Purifikace PCR produktů.....	39
4.8	Sekvenační reakce amplifikovaných genů .....	39
4.9	Použité chemikálie.....	40
4.10	Použité roztoky .....	40
4.11	Použité laboratorní přístroje .....	41
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>42</b>
5.1	Sekvenační identifikace <i>Legionella</i> sp. ....	42
5.2	Sekvenační subtypizace <i>Legionella pneumophila</i> .....	44
5.2.1	SBT <i>Legionella pneumophila</i> komunitních legionelóz.....	46
5.2.2	SBT <i>Legionella pneumophila</i> cestovních legionelóz.....	48
5.2.3	SBT <i>Legionella pneumophila</i> nozokomiálních legionelóz .....	49
5.2.4	SBT <i>Legionella pneumophila</i> profesionálních legionelóz .....	49
5.2.5	SBT <i>Legionella pneumophila</i> k hodnocení rizika.....	50
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Použité zkratky .....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>58</b>
<b>10</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>64</b>

# 1 ÚVOD

Bakterie rodu *Legionella* se přirozeně vyskytují ve vlhké půdě, přírodních a umělých vodních ekosystémech. Od objevení legionel v roce 1977 v USA bylo popsáno 54 druhů, přičemž minimálně 24 z nich může vyvolat onemocnění člověka. Nejčastější agens legionelózy je *Legionella pneumophila*, která způsobuje až 90 % všech infekcí. *L. pneumophila* lze rozdělit do 16 séro skupin, z nichž *L. pneumophila* séro skupina 1 vyvolává přes 84 % legionelózy na světě. Nejčastějším zdrojem nákazy je inhalace aerosolu obsahujícího legionely. Onemocnění způsobené legionelami – legionelóza může probíhat v mírnější formě podobné chřipce, zvané pontiacká horečka nebo jako legionářská nemoc s projevy těžké pneumonie s vysokou úmrtností. Mezi rizikové faktory patří zejména věk nad 50 let, imunosuprimovaní pacienti a lidé s jiným základním onemocněním. Tento fakt dělá z legionel typického původce nozokomiálních a komunitních legionelóz. Vzhledem k časté izolaci *L. pneumophila* sg. 1 z prostředí bylo nutné zavést typizační techniky umožňující rozlišit izolované kmeny k určení zdroje nákazy. Studie zabývající se srovnáváním různých genotypizačních metod *L. pneumophila* uvádí sekvenační subtypizaci jako metodu s největší diskriminací, dobrou reprodukovatelností, interpretací a umožňuje mezilaboratorní srovnání. V současnosti je tento nástroj využíván k vyšetřování zdrojů cestovních, komunitních, nozokomiálních a profesionálních legionelóz. Subtypizace *L. pneumophila* je založená na sekvenování fragmentů sedmi vybraných genů *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* a *neuA*. Sekvenační typ nebo alelický profil určíme porovnáním s databází alelických variant genů, které jsou k dispozici na webových stránkách [www.ewgli.org](http://www.ewgli.org). Tento systém identifikace byl vyvinut členy Evropské pracovní skupiny pro legionelové infekce (The European Working Group for Legionella Infections – EWGLI), která byla založena v roce 1986 v Londýně. Jejím hlavním cílem je spolupráce při řešení mikrobiologické a epidemiologické problematiky spojené s legionelózami.

Tato práce se zabývá identifikací druhů legionel sekvenací genu *mip* v případech, kdy nelze sérologickými testy některé druhy rozlišit nebo určit. Dále sekvenační subtypizací klinických a environmentálních kmenů *L. pneumophila*, které byly získávány z různých zdrojů za účelem epidemiologického šetření případů legionelózy. Sekvenační subtypizace *L. pneumophila* byla také využita při analýze zdravotního rizika, protože sekvenační typ často charakterizuje virulenci kmene.



## 2 CÍLE PRÁCE

- 1) Vypracování rešerše na téma 'Sekvenační identifikace a subtypizace *Legionella* sp. a její využití v epidemiologii'.
- 2) Izolace DNA z bakteriálních kmenů *Legionella* sp. a klinických vzorků.
- 3) PCR amplifikace vybraných genů a jejich sekvenování.
- 4) Analýza sekvencí pomocí EWGLI databáze a epidemiologické hodnocení získaných dat.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Rod *Legionella*

Legionely byly poprvé objeveny v roce 1977 v souvislosti s epidemií v hotelu Bellevue ve městě Philadelphia, při které se v roce 1976 nakazilo 221 účastníků sjezdu amerických legií. Na následky těžké pneumonie nakonec podlehl 34 postižených. Zdrojem infekce byl aerosol z chladicí vody klimatizačního systému hotelu (Fraser a kol., 1977). Vývoj kultivačních technik umožnil identifikaci dalších druhů *Legionella* sp. vyvolávající pneumonie u člověka. Bakteriální izoláty, které byly během let 1940 – 1960 identifikovány jako rickettsia, byly pomocí nových identifikačních metod určeny jako *Legionella* sp. (Fields a kol., 2002). Nejzávažnějším druhem je *Legionella pneumophila*, kterou lze rozdělit do 16 sérologických skupin. Všechny mají klinický význam, i když ne stejně velký. Nejčastějším původcem onemocnění se závažným průběhem je *L. pneumophila* sg. 1 (sg. 1 - séro skupina 1), způsobující až 84 % legionelóz (Newton a kol., 2010). V České republice je to však jen 50 % (Drašar, osobní sdělení). *L. pneumophila* se dále člení na 3 hlavní podskupiny: Pontiac, Olda a Bellingham. Pontiac představuje podskupinu s největším rizikem nákazy a může vyvolat onemocnění i u zdravého člověka (Watkins a kol., 1985). Mezi další významné druhy patří *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. maceachernii*, *L. dumoffii* a *L. longbeachae*, které představují 2 až 7 % legionelových nákaz ve světě. V Austrálii a Novém Zélandu způsobuje legionelózu v 30 % *L. longbeachae* (Newton a kol., 2010). V ČR byly v roce 1988 izolovány a popsány dva druhy *L. moravica* a *L. brunensis*. *L. brunensis* byla objevena téměř v centru Brna z chladicí věže obchodního domu (Wilkinson a kol., 1988). Druh nazvaný *L. nagasakiensis* byl popsán v lednu 2012. Kmen byl izolován v USA z biologického materiálu 66 leté ženy s pneumonií, studniční vody v Japonsku a chladicí věže v Austrálii (Yang a kol., 2012). Další tři druhy *L. cardiaca*, *L. massiliensis* a *L. tunisiensis* čekají na uveřejnění ve vědeckých časopisech. V současné době je do rodu *Legionella*, náležícího do čeledi *Legionellaceae*, zařazeno 54 druhů s celkem 74 séro skupinami. Tento počet není jistě konečný, protože mnoho dalších druhů čeká na popis. Přehled druhů legionel popsáných k lednu 2012 uvádí (Tabulka č. 1).

**Tabulka č. 1:** Přehled druhů legionel. Červeně jsou označeny druhy, které jsou spojovány s onemocněním člověka.

Druhy	Reference	Druhy	Reference
<i>L. adelaidensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. lansingensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. anisa</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. londoniensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. beliardensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. longbeachae</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. birminghamensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. lytica</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. bozemanii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. maceachernii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. brunensis</i>	Wilkinson <i>et al.</i> , 1988	<i>L. micdadei</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. busanensis</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012	<i>L. moravica</i>	Wilkinson <i>et al.</i> , 1988
<i>L. cincinnatiensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. nagasakiensis</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>L. drancourtii</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012	<i>L. nautarum</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. dresdenensis</i>	Lück <i>et al.</i> , 2010	<i>L. oakridgensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. drozanskii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. parisiensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. dumoffii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. pneumophila</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. erythra</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. quateirensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. fairfieldensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. quinlivanii</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>L. fallonii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. rowbothamii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. feeleii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. rubrilucens</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>L. geestiana</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. sainthelensi</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. genomospecies</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. santicrucis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. gormanii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. shakespearei</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. gratiana</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. spiritensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. gresilensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. steigerwaltii</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>L. hackeliae</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. taurinensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. cherrii</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012	<i>L. tucsonensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. impletisoli</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012	<i>L. wadsworthii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. israelensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. waltersii</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. jamestowniensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. worsleiensis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002
<i>L. jordanis</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002	<i>L. yabuuchiae</i>	Yang <i>et al.</i> , 2012

### 3.1.1 Genom *Legionella* sp.

Genom legionel je tvořen jedním cirkulárním chromozómem o průměrné velikosti 3,5 Mb kódující přibližně 3000 genů a obsahem GC cca 38 %. Některé druhy obsahují také plazmidovou DNA.

Kompletní genomová DNA byla sekvenována u sedmi kmenů *L. pneumophila* a *L. longbeachae* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=legionella%20>). Mnoho genů kóduje proteiny s eukaryotickými motivy, které legionely získaly horizontálním přenosem během intracelulárního parazitismu v protozoích a lidských makrofázích (Cazalet a kol., 2004)

### 3.1.2 Morfologie

Legionely jsou gramnegativní štíhlé tyčky, tvořící často i vlákna. Rozměry kolísají od 0,3 až 0,9  $\mu\text{m}$  šířky a 2 až 6  $\mu\text{m}$  délky. Při nutriční nedostatečnosti však mohou dosáhnout až 20  $\mu\text{m}$  délky. Mají jeden až tři bičinky umožňující pohyb, jsou aerobní a netvoří spory. V bakteriální stěně jsou obsaženy 2,3-dihydroxy mastné kyseliny, které jsou charakteristické pro tento rod. Vnější buněčná membrána obsahuje lipopolysacharid, který je imunodominantním antigenem čeledi Legionellaceae (Bednář a kol., 1996).

## 3.2 Environmentální zdroje legionel

Legionely jsou intracelulární parazité sladkovodních prvků a lze je nalézt prakticky ve všech přírodních vodních zdrojích, ale také ve vlhké půdě. Jejich množství je však obvykle nízké. Vysoké počty legionel se vyskytují v nedostatečně udržovaných, lidmi vytvářených vodních systémech. V suchém prostředí nepřežívají (Newton a kol., 2010). Legionely byly nalezeny také v sedimentech slaných jezer a mořské vodě, kde parazitují v amébách (Gast a kol., 2011). Intracelulární replikace v eukaryotních hostitelích je pravděpodobně jediná cesta, jak se tato bakterie může v prostředí rozmnožovat. Legionely se množí v řadě druhů améb a třech druzích ciliátů, ale zcela zásadní roli v přenosu legionel mají měňavky. V biofilmech vodních systémů byla proliferace *L. pneumophila* popsána v přítomnosti měňavky *Hartmannella vermiformis*. Legionely mohou využívat i cyst měňavek rodu *Acanthamoeba*, kde jsou chráněny před působením biocidů (Storey a kol., 2004). V prostředí chudém na živiny se legionely nemnoží, ale díky biofilmu v něm mohou dlouhou dobu perzistovat (Murga a kol., 2001). Dnes je již všeobecně akceptován názor, že právě biofilmy a prvoci hrají stěžejní roli v přežívání těchto bakterií ve vodních systémech (Storey a kol., 2004). Ideálním povrchem pro mikrobiální kolonizaci jsou stěny potrubí vodovodních sítí. Legionely mohou proniknout do pitné vody během její výroby, stát se součástí biofilmu a za vhodných podmínek se množit. Vážný problém v rozvodných sítích představuje především odtrhávání kousků biofilmu s potencionálními patogeny od substrátů, protože pak se mohou dostat ke spotřebiteli v infekční dávce. V biofilmu jsou mikroorganismy chráněny před působením dezinfekce, navíc se dezinficiens na tuto organickou hmotu chemicky váže, čímž klesá jeho reziduální koncentrace ve vodě a jeho šíření na větší vzdálenosti v síti je omezeno (Rulík a kol., 2011). Legionely mohou být izolovány z vody o teplotě od 6 °C do 64 °C. Pod 20 °C se však nemnoží a schopnost přežít až 64 °C je způsobena ochranou v biofilmech. Optimální teplota růstu je 25 °C až 45 °C, proto je častá kolonizace legionel v teplé vodě

(Hosein a kol., 2005). Nejčastějšími druhy legionel izolovaných z vodovodních rozvodů jsou *L. anisa* a řada saprofytických druhů *L. spiritensis*, *L. erythra*, *L. rubrilucens* a *L. brunensis*. Z klinického materiálu jsou izolovány jen vzácně *L. anisa* a *L. erythra* (Doleans a kol., 2004). Kromě vodovodních rozvodů mohou být legionely přítomny v systémech klimatizace, chladicích věžích, zvlhčovačích vzduchu, vířivkách, zavlažovacích systémech v zahradnictví, ozdobných fontánách atd. a zvýšené riziko nákazy nastává při tvorbě aerosolů (Stout a Yu, 1997).

### 3.3 Patogeneze legionel

Všechny legionely jsou potencionálně patogenní, i když onemocnění způsobené některými druhy nebylo doposud popsáno. Převážnou většinu legionelóz způsobuje celosvětově rozšířený druh *L. pneumophila* sg. 1 (Fields a kol., 2002). V České republice jsou to také *L. pneumophila* sg. 3 a sg. 6 (Drašar, osobní sdělení). Do organismu vstupují inhalační cestou infikovaným aerosolem. Čím jsou kapénky menší, tím jsou nebezpečnější. Kapénky s průměrem menším než 5 $\mu$ m se snadněji dostanou do dolních cest dýchacích. Přenos legionel z člověka na člověka nebyl doposud zaznamenán (Carol a kol., 2006). Možná cesta nákazy je také aspirace kontaminované vody, ale tento způsob je charakteristický spíše pro nozokomiální nákazy (Hosein a kol., 2005). Po vstupu do plic jsou bakterie fagocytovány v alveolární tkáni monocyty a makrofágy. Zabránění vstupu fagozómu do standardní lysozomální dráhy zprostředkovává sekreční systém IV, nazývaný také Dot/Icm systém. Vzniká vakuola obsahující legionelu (LCV – Legionella-containing vacuole), která přechodně fúzuje s mitochondriemi a zachycuje váčky produkované endoplazmatickým retikulem, jejichž obsah využívá pro svoji potřebu. Během několika hodin interakce LCV s váčky endoplazmatického retikula dochází k replikaci DNA, tvorbě nových bakterií a lýzi vakuoly vedoucí ke smrti hostitelské buňky. Byly popsány druhy legionel, které nevyužívají LVC mechanismus replikace, ale množí se v cytoplazmě (Newton a kol., 2010).

Infekce mohou probíhat s příznaky obdobnými chřipce, zvané pontická horečka nebo jako těžké pneumonie, zvané legionářská nemoc. Byly popsány také případy s pozitivním kultivačním nálezem nebo sérologickým průkazem bez jakýchkoliv příznaků onemocnění například u brusičů skla. Není známo, zda prodělaná legionelóza vede k trvalé imunitě. Morčata imunizovaná umrtvenými legionelami jsou imunní k intraperitoneální infekci, podléhají však infekci inhalační (Bednář a kol., 1996).

**Pontická horečka** je lehká forma onemocnění, při které nedochází k postižení plic. Projevuje se horečkou, zimnicí, myalgiemi, bolestmi hlavy a nevolností. Inkubační doba je dlouhá 1 až 2 dny a do pěti dnů dochází ke spontánnímu uzdravení. (Kaufmann a kol., 1981).

**Legionářská nemoc** je onemocněním podstatně závažnějším, a pokud není zahájena rychlá antibiotická terapie, často končí smrtelně. Predisponováni jsou pacienti se sníženou imunitou, staří lidé, kuřáci, muži nad 50 let, lidé oslabení jiným základním onemocněním. Inkubační doba trvá 2 až 10 dnů, po které se náhle objevuje horečka a rychle se vyvíjí mnohočetná ložisková bronchopneumonie. Do plicních alveolů proniká edémová tekutina a ukládá se v nich fibrin. K dalším příznakům patří třesavka, úporná bolest na prsou, suchý kašel, zchvácenost, myalgie, bolesti hlavy, stav zmatenosti, může se objevit zvracení a průjem. Postiženy jsou také ledviny, játra, centrální nervový systém a gastrointestinální systém. Úmrtnost činí 15 až 20 %, ovšem u imunokompromitovaných osob je mnohonásobně vyšší (Stout a Yu, 1997).

### **3.4 Metody detekce legionel**

Přestože jsou legionely známé přes třicet let, neexistuje žádná diagnostická metoda, která by dokázala rychle, s dostatečnou citlivostí a specifitou identifikovat všechny známé původce legionelóz u člověka. K základním diagnostickým metodám patří kultivace, sérologie, detekce močového antigenu a přímá imunofluorescence. Rychlý rozvoj nastal také v metodách detekce nukleových kyselin pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), i když standardizovaný test není ve všech zemích komerčně dostupný (Murdoch, 2003). Všechny metody mají určitá omezení, proto je doporučováno použít více postupů, a to zejména v případech akutního zápalu plic s podezřením na legionářskou nemoc (Fields a kol., 2002). Za „zlatý standard“ je stále považována kultivace etiologického agens, ale data z roku 2009 z 29 evropských zemí ukazují, že pouze 9,3 % legionelóz je z důvodu náročné kultivace legionel takto diagnostikováno. Zbylých 81,7 % je diagnostikováno na základě detekce legionelového antigenu v moči, která je rychlá a snadno proveditelná (Mentasti a kol., 2011).

#### **3.4.1 Kultivace**

Legionely lze izolovat z těchto klinických materiálů: sputum, tracheální aspirát (TAS), bronchoalveolární laváž (BAL), krev, bioptický a sekční materiál - nejčastěji z plic, přičemž citlivost kultivace je dána typem materiálu, ale také praktickými zkušenostmi mikrobiologické laboratoře. Ke kultivaci se používá agarová půda označována BCYE, která je složena

**Obrázek č. 1:** Kultura *Legionella* sp. na BCYE agaru.  
([http://www.emlab.com/s/services/legionella\\_testing\\_lab.html](http://www.emlab.com/s/services/legionella_testing_lab.html))



**Obrázek č. 2:** Fluorescence *Legionella* sp. v UV záření.  
([http://www.emlab.com/s/services/legionella\\_testing\\_lab.html](http://www.emlab.com/s/services/legionella_testing_lab.html))



z kvasničného extraktu (poskytuje esenciální aminokyseliny), cysteinu, z pyrofosfátu železitého a aktivního uhlí k detoxikaci peroxidů. pH 6,8-7,0 udržuje speciální pufr (ACES). Závislost na cysteinu je hlavní znak určující příslušnost k čeledi. Půda může být doplněna antibiotiky (cefamandol, polymyxin B, vankomycin) k potlačení doprovodné flory (Maiwald a kol., 1998). Byly popsány tři druhy legionel schopny růstu na cystein deficientním mediu, ale pouze po pasáži z primokultury. K primární izolaci kmene je přítomnost cysteinu nutná (Yang a kol., 2012). Legionely se kultivují na půdě BCYE při optimální teplotě 35 °C až 42 °C. Kolonie jsou šedé, lesklé, mají charakteristický vzhled broušeného skla, jsou okrouhlé, ostře ohraničené o průměru cca 1 mm, ale během 5 až 7 dnů se splývavě rozrůstají do velikosti až 4 mm (Obrázek č. 1). Neoxidují a nefermentují glukosu ani běžné glycidy, štěpí želatinu. *L. pneumophila* štěpí hippurát (kromě sg. 4 a sg. 15). Většina druhů produkuje hnědý pigment na půdě s tyrosinem (Fields a kol., 2002). K rozpoznání některých druhů přispívá jejich autofluorescence po ozáření UV světlem (Obrázek č. 2). Modrobíle světélkují např.

*L. bozemanii*, *L. anisa*, *L. parisiensis*, *L. cherrii*, *L. steigerwaltii*, *L. dumoffii* a *L. gormanii*. Červeně světélkují *L. erythra* a *L. rubrilucens* (Ratcliff a kol., 1997).

### 3.4.2 Sérologie

K diagnostickým účelům lze také využít tvorbu specifických protilátek třídy IgG a IgM. K průkazu specifických protilátek proti jednotlivým druhům a sérotypům legionel se používají metody mikroaglutinace, ELISA a nepřímá imunofluorescence (Murdoch, 2003). Novinkou je rychlý imunochromatografický test ImmuView *Legionella* Blood test společnosti SSI Diagnostica určený k detekci IgM protilátek proti *L. pneumophila* sg. 1 a sg. 3 v séru

nebo krvi pacienta. V ČR tyto séroskupiny způsobují až 70 % legionelózy (Drašar, osobní sdělení). Nevýhodou je nutnost konfirmace s jiným testem. Na legionelovou infekci se usuzuje při vysokém titru protilátek nebo ze signifikantního vzestupu hladiny protilátek v séru v rozmezí dvou až tří týdnů. Sérologický průkaz protilátek má řadu omezení, které si je třeba uvědomit. Jsou to zejména nespecifické reakce s jinými bakteriálními druhy vyvolávající pneumonie. Dále skutečnost, že čtyřnásobný vzestup protilátek je dokumentován pouze u 70 až 80 % pacientů s legionelózou a k sérokonverzi může dojít po více než 2 měsících po proběhlé infekci (Fields a kol. 2002).

### 3.4.3 Detekce močového antigenu

Specifický rozpustný antigen vylučovaný močí pacientů s legionářskou nemocí lze prokázat již po třech dnech od prvních příznaků. Doba vylučování antigenu je značně individuální. U některých pacientů se vytrácí po 4 dnech antibiotické terapie, u jiných může v moči přetrvávat i několik měsíců. Detekce močového antigenu je rychlá a dostupná metoda umožňující zahájení adekvátní antibiotické terapie. Dostupné komerční soupravy jsou validovány pouze pro stanovení *L. pneumophila* sg. 1. Toto omezení způsobuje, že až 40 % legionelózy způsobených jinými sérotypy a druhy zůstává neodhaleno. Testy jsou založeny na principech enzymové imunoanalýzy ELISA. Citlivost kvalitních testů se pohybuje kolem 97 % a specifita je 100%. Soupravy mohou detekovat i jiné séroskupiny a druhy legionel, nejsou však pro tyto účely určeny a validovány (Murdoch, 2003). Studie porovnávající soupravy k detekci močového antigenu firem Biotest a Binax uvádí, že souprava firmy Binax detekovala více pozitivních vzorků močí u pacientů s non – *L. pneumophila* sg. 1 legionelózou (Benson a kol., 2000). Firma Binax vyrábí také test Binax Now založený na imunochromatografické detekci antigenu v moči. K provedení testu není nutné laboratorní vybavení a výsledek je k dispozici do 15 minut. Nezávislé testy však uvádí pouze 80% citlivost a specifitu 97 %, proto je nutná konfirmace ELISA testem (Fields a kol., 2002).

### 3.4.4 Přímá imunofluorescence

Jedna z prvních metod k detekci legionel ve vzorcích plicní tkáně a respiračních sekretech byla přímá imunofluorescence využívající fluorescenčně značených protilátek. Přímou imunofluorescencí (DFA) mohou být legionely detekovány v respiračních sekretech i několik dní po zahájení antibiotické léčby. DFA lze také využít k identifikaci bakteriálních kmenů legionel. Fluorescenčně značené protilátky jsou však dostupné pro *L. pneumophila*



a jen některé druhy legionel. Problémy při detekci způsobují také druhy bakterií rostoucí v kokultivaci s protozoa stejně jako legionely (LLAP– Legionella-like amoebal pathogen), které mohou být přítomny v biologickém materiálu pacientů s pneumonií (Fields a kol., 2002).

### 3.4.5 Detekce legionel pomocí PCR

Amplifikace specifického fragmentu nukleové kyseliny izolované z biologického nebo environmentálního materiálu pomocí PCR je jedna z mála diagnostických metod, která je schopna detekovat všechny známé druhy legionel. Počátky detekce legionel PCR metodou však neměly velký úspěch, protože testy vykazovaly vysokou nespecificitu. Stanovení legionel z vody pomocí PCR je obtížně reprodukovatelné, proto je stále kultivace metodou číslo jedna (Fields a kol., 2002). K identifikaci *Legionella* sp. jsou využívány geny kódující 5S rRNA, 16S rRNA, *mip* a intergenová oblast 23S rRNA - 5S rRNA (Stølhaug a Bergh, 2006). První komerčně dostupný test byl určen pouze k detekci legionel z environmentálních vzorků a byl založen na amplifikaci 5S rRNA k určení *Legionella* sp. a *mip* k detekci *L. pneumophila*. Převážná většina dnešních komerčních testů je založena na amplifikaci 16S rRNA a jsou vysoce citlivé a specifické. Nicméně falešně pozitivní výsledky s druhy rodů *Acinetobacter*, *Gemella* nebo neidentifikovanými proteobakteriemi byly zaznamenány (Fields a kol., 2002). Aplikace real-time PCR využívající fluorescenčně značených průb, umožňuje rychlou detekci v reálném čase, a také omezuje nespecifické reakce (Mentasti a kol., 2011). Získání klinického materiálu může být nakonec největším problémem. Produkce sputa je obvykle malá a k získání klinického materiálu (tracheálního aspirátu, BAL či biopsie) je nutné provést invazivní zákrok (Murdoch, 2003). V našich laboratořích přímý průkaz legionel pomocí PCR není stále rutinně zaveden a je prováděn spíše ojediněle.

## 3.5 Léčba

Terapie legionářské nemoci musí být zahájena rychlou a vhodnou antibiotickou léčbou. U imunokompromitovaných a hospitalizovaných pacientů je to hlavně azithomycin a levofloxacin, v lehčích případech erytromycin nebo tetracyklin. Betalaktamová antibiotika nejsou účinná, protože většina legionel produkuje betalaktamázy (Fields a kol., 2002).

### 3.6 Identifikace a detailní typizace izolátů *Legionella* sp.

Termínem typizace je obvykle označována diferenciací druhů na poddruhy a nižší taxony. Podle detekovaného markeru jsou typizační metody rozdělovány na fenotypové a genotypové. Detailní typizace izolovaných bakteriálních kmenů *Legionella* sp. je využívána k přesné charakterizaci kmenů získaných z klinických a environmentálních vzorků. Identifikace druhu, případně jeho séroskupin, se uplatňuje při stanovení původce onemocnění. Typizace kmenů je využívána k určení zdroje nákazy, a také při hodnocení rizik k epidemiologickým účelům (Carr a kol., 2010). Legionely byly charakterizovány na základě specifických proteinových fingerprintů získaných pomocí SDS-PAGE nebo PAGE (Fields a kol., 2002).

Základem identifikace izolátů je hodnocení fenotypových znaků, mezi které patří kultivační vlastnosti (růst na BCYE půdě, neroste na krevním agaru), vzhled kolonií, případně fluorescence v UV záření. Biochemické vlastnosti (produkce oxidázy, katalázy, beta-laktamázy atd.) jsou značně variabilní, proto mají při rutinní identifikaci omezené uplatnění. Identifikace založená na odlišnosti obsahu buněčných mastných kyselin a ubichinonů je využívána, ale provedení analýzy je značně komplikované a některé druhy mají stejné profily (Ratcliff a kol., 1998). Sérologické metody jsou díky jednoduchému provedení nejvíce užívanou technikou, i když mají také určitá omezení (Fields a kol., 2002). Poslední možností typizace je využití molekulárních metod, přičemž „zlatým standardem“ v identifikaci druhů legionel je sekvenace genu *mip* (Ratcliff a kol., 1998). Slibně se vyvíjí také identifikace legionel pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která je rychlá a na rozdíl od sekvenace méně finančně nákladná (Gaia a kol., 2011). K identifikaci nového druhu je nutné kombinovat více metod, mezi které patří kultivace, hodnocení fenotypových vlastností izolátu, sérotypizace, stanovení profilů mastných kyselin, sekvenace genů *mip* a 16S rRNA a určení fylogenetické příbuznosti s ostatními druhy (Yang a kol., 2012).

#### 3.6.1 Sérologická typizace izolátů

Sérologická typizace izolátů *Legionella* sp. vyžaduje identifikační séra, která ovšem nejsou pro všechny druhy a séroskupiny komerčně dostupná. Jedinou možností je jejich výroba pomocí imunizace laboratorních zvířat. Tato příprava králíčích hyperimunních sér je nákladná a problematická, tudíž je jejich využívání výhradně v rukou referenčních laboratoří. Firmy OXOID a Duopath nabízí soupravy k identifikaci druhů legionel na základě latex aglutinace pro *L. pneumophila* sg. 1 a sg. 2-14 a pro některé další druhy legionel. Pro běžnou

laboratorní praxi je tato identifikace obvykle dostačující. Detailní sérologická typizace je rychlá a levná, ale nevýhody značně převyšují možnost rutinního používání. K hlavním nevýhodám patří:

- Je potřeba mít sbírku hyperimunních sér všech typových kmenů legionel a sérologických skupin.
- Časté jsou zkřížené reakce mezi druhy legionel, proto je nutné vzájemné testování všech kmenů a séroskupin.
- Nutnost provedení křížových titrací s různými koncentracemi protilátek.
- Výsledky nejsou akceptovatelné u mezinárodních soudů.
- Některé druhy nelze sérologicky rozlišit (Drašar, osobní sdělení):

*L. parinsiensi* - *L. anisa* - *L. bozemanii* (PAB)

*L. spiritensis* - *L. tauricensis*

*L. sainthelensi* - *L. santicrucis*

*L. brunensis* sg. 1 - *L. brunensis* sg. 2

### 3.6.2 Typizace izolátů molekulárními metodami

Jestliže při identifikaci bakteriálních kmenů selžou dostupné, relativně jednoduché a finančně méně nákladné fenotypizační analýzy, další možností je aplikace molekulárně-biologických metod. Genotypové analýzy vykazují jednoznačně větší diskriminační schopnost než fenotypové analýzy a jejich velkou výhodou je, že výsledky nejsou ovlivněny stářím kultury ani kultivačními podmínkami. Rozvoj a dostupnost sekvenační analýzy vedl k využívání této metody k identifikaci bakteriálních druhů, tedy i legionel, na základě sekvence variabilních oblastí genomu. Počítačová analýza dat a vyhodnocení v dostupných databázích nabízí možnost standardizace (Ratcliff a kol., 1998).

#### 3.6.2.1 Sekvenační identifikace *Legionella* sp.

Velmi rozšířená je identifikace bakteriálních druhů založená na hybridizaci nebo PCR amplifikaci 16S rRNA oblastí chromozómu. Výhodou je možnost detekce všech bakteriálních druhů pomocí univerzálních sond či primerů. Druhovú identifikace rodu *Legionella* je však založena na variabilitě genu *mip* (Ratcliff a kol., 1998). Porovnáváním vhodnosti obou těchto cílových oblastí k rozlišení druhů legionel bylo zjištěno, že gen *mip* je vhodnější (Ratcliff a kol., 1998, Stølhaug a Bergh, 2006). Při párovém srovnávání jednotlivých druhů byl zjištěn u *mip* průměrný rozdíl mezi druhy 20 %, kdežto u genu 16S rRNA jen 6 %. Gen *mip*

(macrophage infectivity potentiator) kóduje 24 kDa vnější membránový protein, patřící do rodiny proteinů FK506, který umožňuje vazbu na membránu fagocytující buňky a hraje důležitou úlohu v intracelulárním buněčném cyklu legionel. Jeho velikost se pohybuje od 232 do 251 aminokyselin v závislosti na druhu legionely. Rozdíl způsobuje přítomnost hypervariabilních úseků, jejichž velikost může být až 51bp. Gen *mip* je geneticky stabilní a bez známek rekombinace. U fylogeneticky rozdílných druhů nebyly totožné nebo téměř totožné sekvence genu *mip* nalezeny (Ratcliff a kol., 1998).

Sekvenční identifikace je založena na amplifikaci a oboustranné sekvenaci fragmentu genu *mip* o velikosti 661bp - 715bp (délka závisí na přítomnosti hypervariabilních inzertů). Standardizovaný protokol dostupný na [www.ewgli.org](http://www.ewgli.org) a databáze dostupná na [http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/mip/mip\\_id.cgi](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/mip/mip_id.cgi) umožňuje jednotnou identifikaci. Druh je určen na základě procentuální shody sekvence *mip* analyzovaného kmene se sekvencemi genů *mip* všech druhů a kmenů legionel v databázi. Identifikace je validní, jestliže je shoda s daným druhem alespoň 95 % a rozdíl s dalším nejbližším druhem je větší než 2 %. Omezením této metody je nemožnost identifikace *L. geestiana*, protože s použitím primerů uvedených v protokolu nedochází k amplifikaci produktu (Ratcliff a kol., 1998). Fylogenetický strom 54 druhů legionel založený na podobnosti sekvence genu *mip* je uveden v (Příloha č. 3).

Detailnější rozlišení druhů legionel umožňuje sekvenace genu *rpoB* kódujícího  $\beta$  podjednotku RNA polymerázy B (Ko a kol., 2002). Dalšími geny vhodnými k typizaci druhů jsou *gyrA* kódující podjednotku gyrázy A (Feddersen a kol., 2000) a *rnpB* kódující endoribonukleázu P (Rubin a kol., 2005).

### **3.7 Typizace izolátů *Legionella pneumophila***

Převážnou většinu infekcí způsobuje *L. pneumophila* sg. 1, proto bylo nutné zavést typizační techniky, které by jednoznačně identifikovaly jejich kmene izolované z prostředí a z klinického materiálu pacienta (Harrison a kol., 2009, Borchardt a kol., 2008). Rozlišení na základě fenotypových znaků umožňují monoklonální protilátky. Podle použité sady protilátek lze *L. pneumophila* sg. 1 rozlišit na 8 až 10 podskupin. Molekulárně-biologické metody jako např. ribotypizace, PFGE, RFLP, REA, AFLP, AP-PCR jsou různě časově i finančně náročné, ne všechny jsou dobře reprodukovatelné a vhodné pro standardizaci. Porovnáváním vhodnosti typizačních metod k epidemiologickému šetření cestovních legionelóz se zabývala evropská skupina EWGLI (Fry a kol., 1999). Důležitou podmínkou je univerzálnost metody s možností

vzájemného poskytování výsledků, nikoliv bakteriálních izolátů, mezi laboratořemi. Štěpení genomové DNA restričními enzymy a následné rozdělení pomocí PFGE spolu s AFLP analýzou byly prvními užívanými metodami k typizaci legionel (Bernander a kol., 2003). AFLP byla vyhodnocena jako vhodnější metoda pro epidemiologické šetření legionelóz (Valsangiacomo a kol., 1995) a v roce 1996 přijala EWGLI tuto metodu jako mezinárodní standard k šetření cestovních legionelóz. Každoročně EWGLI organizovala mezilaboratorní monitoring o správnosti provádění této metody. Mezilaboratorní porovnávací studie však ukázaly, že problémem není provedení metody, nýbrž jednotná interpretace dat (Fry a kol., 2002). S vývojem sekvenačních technologií byla vyvinuta typizace na základě variability nukleotidové sekvence vybraných genů (Gaia a kol., 2003, 2005, Ratzow a kol., 2007). V současnosti ELDSNet využívá k šetření cestovních legionelóz sekvenační subtypizaci a na webových stránkách [www.ewgli.org](http://www.ewgli.org) jsou zveřejněny standardizované protokoly. Mezilaboratorní srovnávání je organizováno každý rok v říjnu. Kombinací sekvenační typizace a typizace pomocí monoklonálních protilátek lze dosáhnout indexu diskriminace  $D > 0,98$ , přičemž  $D$  hodnota vhodná k epidemiologickým účelům je uváděna 0,95 (Gaia a kol., 2005). Srovnávací studie tří genotypizačních metod PFGE, AFLP a SBT při epidemii legionelózy v Římě potvrdila, že SBT je nejvhodnější metodou k epidemiologickému šetření zdroje nákazy (Scaturro a kol., 2005).

### 3.7.1 Typizace izolátů monoklonálními protilátkami

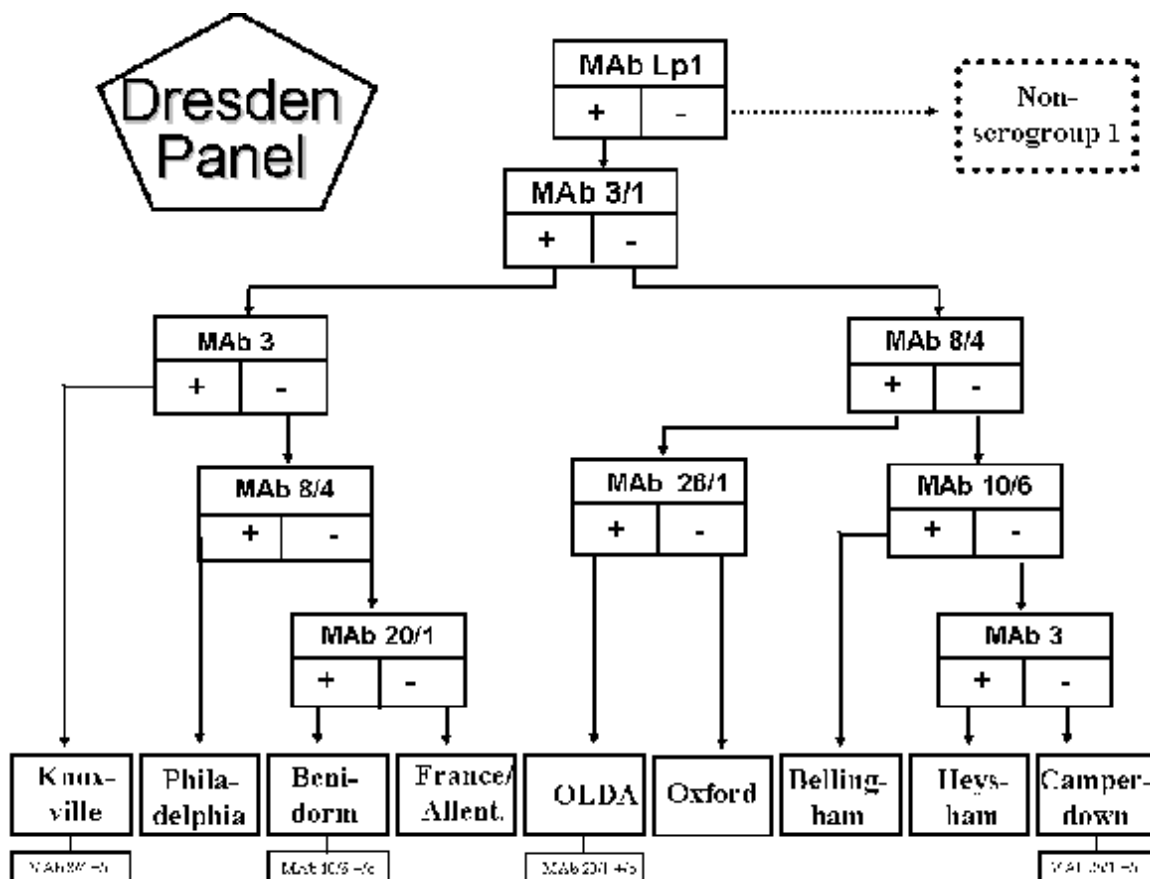
Rychlou a dobře reprodukovatelnou technikou je subtypizace pomocí monoklonálních protilátek (MAbs) umožňující testovat velké série vzorků. MAbs se specificky vážou k jedinému epitopu lipopolysacharidu v buněčné stěně. Standardizované subtypizační schéma bylo vyvinuto v roce 1986 a umožňuje pomocí 7 MAbs rozdělení *L. pneumophila* sg. 1 na 10 podskupin (Tabulka č. 2) (Joly a kol., 1986).

**Tabulka č. 2:** Klasifikace podskupin *L. pneumophila* sg. 1 pomocí monoklonálních protilátek (dle Joly a kol., 1986).

I. PONTIAC	II. OLDA	III. BELLINGHAM
Philadelphia	Oxford	Bellingham
Knoxville	Camperdown	
Allentown	Heysham	
France	Olda	
Benidorm		

Tato metoda byla později dále rozpracována v Drážďanech, kde bylo vyvinuto 98 MAbs, které rozliší *L. pneumophila* na 64 fenotypů. Panel těchto specifických protilátek s názvem „Dresden Legionella LPS MAb panel“ je užitečným nástrojem k typizaci *Legionella* sp. i subtypizaci *L. pneumophila* sg. 1 (Helbig a kol., 1997). *L. pneumophila* sg. 1 lze sedmi MAbs drážďanského panelu rozlišit na 9 podskupin (Obrázek č. 3).

**Obrázek č. 3:** Typizace *L. pneumophila* sg. 1 pomocí monoklonálních protilátek (dle Helbig a kol., 1997).



Pozitivní reakce s protilátkou MAb Lp1 znamená, že se jedná o *L. pneumophila* sg. 1. Kmeny reagující s MAb 3/1 protilátkou patří do nejvirulentnější podskupiny Pontiac. Vyřazovacím principem +/- reakce se určí konkrétní podskupina. V laboratorní praxi mohou být MAbs použity v metodách ELISA i nepřímé imunofluorescenci. ELISA má lepší reprodukovatelnost, zejména při zkřížených reakcích a subtypizaci. Jestliže je MAb subtypizace použita při epidemiologickém šetření legionelóz a výsledná podskupina *L. pneumophila* sg. 1 je z různých prostředí shodná, je nutné provést další genotypizační analýzy (Bernander a kol., 2003).

### 3.7.2 Sekvenační subtypizace bakteriálních kmenů

Sekvenační subtypizace (SBT - Sequence-Based Typing) *L. pneumophila* byla poprvé použita v roce 2003 a k typizaci byly vybrány lokusy tří genů *flaA*, *mompS* a *proA*. Výsledkem studie bylo, že je to vhodná metoda k epidemiologickému šetření zdrojů nálezů a má potenciál stát se novou standardizovanou metodou (Gaia a kol., 2003). Pro zvýšení diskriminační schopnosti byly o dva roky později přidány další tři geny, a to *pilE*, *asd* a *mip*. Sekvenační subtypizace, založená na kombinaci alelických variant lokusů 6 genů, byla přijata skupinou EWGLI k šetření cestovních legionelóz (Gaia a kol., 2005). Vzhledem k tomu, že velká většina typovaných kmenů *L. pneumophila* sg. 1 měla shodný alelický profil, byla v roce 2007 subtypizace doplněna sedmým genem *neuA* (Ratzow a kol., 2007).

Konečná podoba SBT je založená na PCR amplifikaci a oboustranné sekvenaci lokusů sedmi vybraných genů. Internetová databáze k subtypizaci *L. pneumophila*, dostupná na [www.ewgli.org](http://www.ewgli.org), umožňuje vložením sekvencí všech genů do databáze zjistit sekvenační typ (ST – Sequence Type) nebo alelický profil. ST je číslo, které je generováno na základě kombinace alelických variant sedmi genů, a to v tomto daném pořadí: *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* a *neuA*. Např. ST 1 je kombinace čísel 1, 4, 3, 1, 1, 1, 1 a ST 23 je kombinace čísel 2, 3, 9, 10, 2, 1, 6. Pokud výsledná kombinace alel v databázi neexistuje, pak je výsledkem alelický profil. Dotyčná osoba může požádat správce databáze o přidělení ST pro danou kombinaci alel. U některých kmenů *L. pneumophila* nedochází s použitím standardních primerů uvedených v protokolu k amplifikaci fragmentu alely *neuA*. Pak je výsledný profil uváděn v podobě 11, 14, 16, 31, 15, 13, F. V roce 2011 byla publikována práce, ve které byly navrženy degenerované primery k amplifikaci *neuA*. To umožňuje určit ST u kmenů, u kterých byl výsledkem subtypizace pouze alelický profil (Farhat a kol., 2011). Informace o jednotlivých alelách uvádí (Tabulka č. 3 a Tabulka č. 4).

**Tabulka č. 3:** Charakteristika alel pro SBT *L. pneumophila* (počet typů alel a diverzita jsou platné k 30. 3. 2012). (upraveno podle: [http://www.hpabioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpabioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php))

Alela	Kódovaný protein	Počet typů alel	Diverzita
<i>flaA</i>	podjednotka flagelinu	33	0,8553
<i>pilE</i>	pilin IV typu	44	0,8077
<i>asd</i>	aspartat-B-semialdehyd dehydrogenáza	53	0,8535
<i>mip</i>	makrofágový infekční faktor	55	0,8709
<i>mompS</i>	hlavní vnější membránový protein	70	0,8892
<i>proA</i>	zinková metaloproteáza	42	0,8121
<i>neuA</i>	N-acyl-neuramin cytidylyl transferáza	41	0,8126

**Tabulka č. 4:** Délky PCR produktů a velikosti porovnávaných sekvencí v databázi EWGLI k SBT *L. pneumophila*. (upraveno podle: [http://www.hpabioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpabioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php))

Alela	Délka PCR produktu (bp)	Označení GeneBank	Amplifikovaná oblast genu	Velikost porovnávané sekvence (bp)
<i>flaA</i>	245	X83232	653-834	182
<i>pilE</i>	459	AF048690	103-435	333
<i>Asd</i>	575	AF034213	538-1010	473
<i>mip</i>	558	AJ496269	117-518	402
<i>mompS</i>	648	AF078136	523-874	352
<i>proA</i>	480	M32884	1134-1538	405
<i>neuA</i>	459	AJ007311	229-582	354

Díky standardizovanému protokolu a společné databázi lze výsledky porovnávat po celém světě. Přenosnost dat mezi laboratořemi různých zemí je důležitým předpokladem vyšetřování cestovních legionelóz (Gaia a kol., 2003). Lidé nakažení během pobytu v zahraničí jsou obvykle hospitalizováni s legionářskou nemocí až po návratu do své země. Epidemiologické šetření potenciálních zdrojů nákazy je provedeno nejen v místě bydliště pacienta, ale také v místech, kde se v inkubační době vyskytoval, tedy i v ubytovacím zařízení v zahraničí. Výsledky SBT jsou také akceptovatelné v případech soudních sporů, kdy turista nebo rodina žaluje hotel a požaduje odškodnění.

### 3.7.3 Sekvenační subtypizace respiračních vzorků

Klasické SBT schéma je určeno k subtypizaci bakteriálních izolátů *L. pneumophila*. V laboratoři Dr. Ginevra amplifikovali genové fragmenty pomocí nested PCR a podařilo se jim určit ST u vzorků, které nebylo možné podle původního protokolu subtypizovat. Z 28 kultivačně negativních vzorků se nepodařilo sekvenovat pouze čtyři. Využití nested PCR významně napomáhá k epidemiologickému šetření legionelóz v případech neúspěšné kultivace klinického materiálu (Ginevra a kol., 2009).



### 3.7.4 Výhody a nevýhody SBT *L. pneumophila*

Výhody a nevýhody SBT *L. pneumophila* jsou shrnuty v (Tabulka č. 5).

**Tabulka č. 5:** Výhody a nevýhody SBT *L. pneumophila*.

Výhody	Nevýhody
Jednoznačná identifikace kmene	Drahé přístrojové vybavení a chemikálie
Použití k epidemiologickému šetření zdroje nákazy	Pracné provedení
Výsledky akceptovatelné u soudu	Zaškolený personál
Mezilaboratorní celosvětová spolupráce	Výsledky akceptovatelné jen od akreditovaných laboratoří

## 3.8 Epidemiologie legionelóz

V České republice patří legionelóza mezi povinně hlášené nemoci. Řídí se vyhláškou MZ č.233/2011 Sb., o systému epidemiologické bdělosti (surveillance) pro vybrané infekce, ve znění vyhlášky MZ č. 275/2010 Sb. V případě podezření na onemocnění legionelózou má osoba poskytující péči provést odběr biologického materiálu k laboratornímu průkazu etiologie a zajistit jejich transport do vyšetřující laboratoře. Vykultivované kmeny, případně biologický materiál, má vyšetřující laboratoř předat do Národní referenční laboratoře pro legionely (NRL) k identifikaci a typizaci nebo zpracování. Epidemiologické šetření zajišťuje orgán ochrany veřejného zdraví, zejména s cílem určit rezervoár infekce a cestu přenosu. Vyhláška klasifikuje případy onemocnění na pravděpodobné a potvrzené. Bez vzájemné spolupráce lékařů, mikrobiologů a epidemiologů nelze dosáhnout kvalitních výsledků surveillance.

**Pravděpodobný případ** splňuje alespoň jedno z následujících laboratorních kritérií:

- Čtyřnásobný nebo vyšší vzestup protilátek proti *L. pneumophila* jiných sérologických skupin než sg. 1 nebo jiných druhů potvrzený nepřímou fluorescencí nebo mikroaglutinací.
- Vysoký titr protilátek proti *L. pneumophila* sg. 1 nebo dalších sérologických skupin nebo druhů.
- Průkaz legionel v respiračních sekretech a plicní tkáni pomocí přímé fluorescence s monoklonálními protilátkami.
- Průkaz legionel v biologickém materiálu pomocí PCR.

**Potvrzený případ** splňuje jedno nebo více následujících laboratorních kritérií:

- Izolace legionel z biologického materiálu kultivací.
- Čtyřnásobný nebo vyšší vzestup specifických protilátek proti *L. pneumophila* sg. 1 potvrzený nepřímou fluorescencí, mikroglutinací nebo ELISA testem.
- Průkaz specifického antigenu v moči validovanou diagnostickou soupravou.

### 3.8.1 Klasifikace legionelóz

Pro účely národního systému epidemiologické bdělosti jsou legionelózy klasifikovány do 4 skupin.

- 1) **Nozomiální** (HAI - Hospital Acquired Infection): pacient se nakazil ve zdravotnickém zařízení (inhalátory, nebulizátory, respirátory, inkubátory, vodovodní rozvody). Zvýšené riziko nákazy je spojováno např. s imunosupresí pacientů po transplantacích, dále s onkologickými onemocněními pacientů užívajících kortikoidy nebo podstupující radioterapii a v neposlední řadě se základním onemocněním, se kterým byl pacient hospitalizován.
- 2) **Cestovní** (TALD - Travel Associated Legionnaires' Disease): pacient se nakazil při pobytu v hotelu nebo jiném zařízení hromadného ubytování v ČR nebo v zahraničí, kde pobýval 2 až 10 dnů před objevením se klinických příznaků onemocnění (hotely, výletní lodě, lázeňská zařízení, wellness rekreační střediska).
- 3) **Profesionální**: nákazy získané při výkonu povolání v provozech, kde se používá voda a tvoří se aerosol (sklárny, zubní lékařství, výroby autoskel, zrcadel, výroby plastů, zemědělství, zahradnictví, práce v dolech, myčky aut, čištění výměníků vody). Popisovány jsou také nákazy získané při výkopových pracích nebo při výrobě zahradních substrátů, protože legionely jsou přítomny také ve vlhké půdě. Pracovníci v rizikových provozech jsou povinni používat ochranné pracovní pomůcky (např. respirátory).
- 4) **Komunitní** (CAP - Community Acquired Pneumonia): nákazy z ostatních rezervoárů. Zdroj nákazy může být všude, kde je voda - vodovodní rozvody velkých budov, klimatizace, chladicí věže, venkovní fontány, vířivé vany.

### 3.8.2 Podhlášenost legionelóz

Legionářská nemoc je z několika důvodů málo diagnostikovaná a málo hlášená (Carol a kol., 2006):

- Je-li u pacienta diagnostikována pneumonie, obvykle je ihned zahájena léčba. Pokud se léčí antibiotiky, které jsou proti legionelám účinné, pacient se obvykle uzdraví bez další potřeby zjišťovat příčinu pneumonie.
- Některé diagnostické metody na legionářskou nemoc mohou vykazovat nižší senzitivitu a specifitu, což může vést k falešně negativním výsledkům.
- Soupravy detekující močový antigen jsou validovány k detekci *L. pneumophila* sg. 1, infekce vyvolané jinými séroskupinami či druhy nemusí být diagnostikovány.
- Pacienti se závažnými vedlejšími chorobami včetně imunosuprese jsou legionářskou nemocí více ohroženi. Pokud tito pacienti zemrou, může být úmrtí přičítáno jejich závažnému stavu bez diagnostiky legionářské choroby.

### 3.8.3 Důvody a následky epidemií

Důvodem proč se epidemie legionelóz stále vyskytují je špatná údržba vodních systémů, které mohou být potencialem zdrojem infekce. Nedbalost a neznalost lidí jsou tedy hlavním důvodem, ale také fakt, že se lidé před onemocněním sami chránit nemohou. V západních zemích má jakékoliv zjištěné pochybení odpovědné osoby dalekosáhlé dopady. Když v roce 1985 v anglické nemocnici ve Staffordu proběhla velká epidemie, byla ustanovena vyšetřovací komise a obžalováni byli nejen odpovědní pracovníci nové nemocnice, ale i projektanti a dodavatelé technologií pro vodu a klimatizaci. Bylo zaznamenáno přes 100 případů a 22 z nich na následky legionelózy zemřelo (O'Mahony a kol., 1990).

První zaznamenaná epidemie legionelózy v ČR byla v roce 1998 v pražském Institutu klinické a experimentální medicíny - IKEM, kde zemřelo 7 osob po transplantacích. Teprve tato epidemie vedla Ministerstvo zdravotnictví k vytvoření pokynů, které nařizují kontrolu kvality vody na přítomnost legionel a stanovila přípustné limitní koncentrace ve vodě.

Častým zdrojem velkých epidemií jsou chladicí věže průmyslových podniků nebo centrálně klimatizovaných budov, kdy se kontaminovaný aerosol šíří na velkou vzdálenost a postihne tak stovky lidí. Chladicí věž nově otevřeného akvária v Melbourne v Austrálii byla v roce 2000 příčinou velké epidemie, kdy se nakazilo 125 návštěvníků a 4 z nich nákazu nepřežilo (Greig a kol., 2004). Ve Španělsku byla chladicí věž zdrojem zatím největší

popsané epidemie. Bylo nakaženo více než 800 lidí, ale jen jeden postižený zemřel (García-Fulgueiras a kol., 2003).

V Nizozemí byla dokumentována velká epidemie v roce 1999 spojená s každoročně pořádanou květinovou výstavou. Zdrojem legionel byly dva „whirpools“ kolem přístupové cesty, které nebyly správně ošetřeny. Nakazilo se 181 návštěvníků a 21 z nich podlehl těžkému zápalu plic. Důvodem takto velké úmrtnosti při epidemii v Nizozemí na rozdíl od Austrálie a Španělska může být způsobena několika důvody. Prvním důvodem může být větší virulence kmene legionely, dále způsob a rychlost stanovení diagnózy a v neposlední řadě vhodný výběr antibiotik. V Holandsku je běžné u pacientů s pneumonií předepisování beta-laktamových antibiotik. V neposlední řadě je možným důvodem rozdílné fungování surveillance v jednotlivých zemích. Způsob a rychlost epidemiologického šetření a následná opatření k zabránění šíření nákazy má významný podíl na rozsahu epidemie (Fields a kol., 2002).

### **3.8.4 Cestovní legionelózy - TALD**

Legionelózy spojené s cestováním tvoří zvláštní skupinu, protože do epidemiologického šetření může být zapojeno i několik států. Aby bylo možné tyto nákazy sledovat a řídit, vznikla v roce 1987 při skupině EWGLI epidemiologická síť EWGLINet pro dohled nad legionářskou nemocí spojenou s cestováním. V současnosti funguje EWGLINet pod názvem ELDSNet (European Legionnaires' Disease Surveillance Network) a je řízen z centra ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) ve Stockholmu. Při epidemiích v hotelových zařízeních je maximálně nakažena desítka lidí, což je na rozdíl od chladicích věží poměrně málo, nicméně publicita spojená s vyšetřováním může poškodit pověst hotelu. Informace o TALD v Evropě lze nalézt na webových stránkách [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org).

## **3.9 Prevence legionelózy a nápravná opatření**

Prevencí před onemocněním legionelózou je omezení tvorby aerosolů, minimalizace výskytu legionel v rozvodech studené a zejména teplé vody na přijatelnou úroveň. Hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu, četnost a rozsah kontroly pitné vody stanovuje vyhláška MZ č. 252/2004 Sb. Limit legionel v teplé vodě stanovený vyhláškou je 100 KTJ/100 ml (KTJ – kolonie tvořící jednotky) po odpuštění vody po dobu 1 minuty. Pro nemocnice a jiná zdravotnická a ubytovací zařízení platí jako mezní hodnota. Pro ostatní odběratele pitné vody

platí jako doporučená hodnota, o kterou je nutné pomocí technických opatření usilovat. Pro oddělení nemocnic, kde jsou hospitalizováni pacienti se sníženou imunitou, se považuje limitní hodnota 0 KTJ/50 ml. Takový požadavek nelze splnit, proto jediné řešení je buď nevyužívat síť pitné vody ani k pití ani k hygieně a současně se vyhnout aerosolům ze zařízení ve styku se sítí nebo napájenému ze sítě. Další možnost představuje vybavit všechny výtoky (baterie, sprchy) filtry Aquasafe s porozitou 0,2  $\mu\text{m}$  nebo UV lampou (polychromatickou s dávkou 30  $\text{mJ}/\text{m}^2$ ). Nebo pro přípravu malých objemů používat var či výdejní automaty, zařízení, udržující horkou vodu kolem 82 °C. Vhodnějším kritériem rizikovosti vzniku legionelózy než pouhá denzita legionel (v KTL/objem) je procento pozitivita výtokových míst rozvodné sítě pitné vody v budově, hlavně teplé (Kool a kol., 1999).

EWGLI vydala Evropské směrnice pro kontrolu a prevenci legionářské nemoci popisující standardizované postupy, které lze aplikovat při prevenci a zjišťování legionelóz spojených s cestováním (Carol a kol. 2006). Jejich cílem je sjednotit tyto postupy mezi členskými státy ELDSNet. Pokud se doporučení ve specifických aspektech kontroly a prevence od směrnic v jednotlivých státech liší, pak platí národní zákony. Odpovědná osoba je povinna provádět pravidelné kontroly a sledovat dodržování primárních opatření zabraňujících růstu legionel, mezi které patří:

- Důkladné oddělení oběhů teplé a studené vody. Udržovat teplotu cirkulující horké vody mezi 50 °C až 60 °C. Teplota studené vody by neměla přesáhnout 25 °C.
- Dostatečná cirkulace teplé vody s vyloučením tzv. mrtvých koutů, udržování potrubí prostých kalu a usazenin.
- Modifikace rozvodů nebo nové instalace nesmí vytvářet trubkové rozvody s přerušovaným nebo nulovým průtokem vody.
- Pravidelné čištění a desinfekce vodovodních rozvodů, chladicích věží, klimatizačních zařízení, vodních filtrů a teplovodních bojlerů.
- Kontrola nádrží na skladování vody a jejich uzávěrů.

### **3.10 Eliminace legionel z distribuční sítě pitné vody**

Praxe ukázala, že úplná eliminace legionel z vodovodní sítě je nemožná. Je tomu tak z důvodů biologických i technických. Maximum čeho lze dosáhnout, je jejich redukce na přijatelnou úroveň, a to navíc jen krátkodobě. Dlouhodobější efekt vykáže jen kontinuální eradikace založená na tepelné, chemické či nejlépe kombinované dezinfekci. Dále je nutno

řešit systém provozních, technických event. i stavebních opatření (Stout a kol., 1992). Dezinfekci vodovodních potrubí lze provést hyperchlorací, monochloraminem, dioxidem chlóru obvykle v kombinaci s teplotním šokem, který je prováděn krátkodobým proplachem vody o teplotě 70 až 80 °C (Carol a kol., 2006). Dezinfekce ozonem a UV zářením je vhodné používat v kombinaci s jinými způsoby eradikace, protože legionely v biofilmech nedokáží odstranit. Vhodnou metodou k odstranění legionel v biofilmech je ionizace ionty mědi nebo stříbra, protože hubí také protozoa a řasy rezistentní k chlóru (Biurrun a kol., 1999).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

Experimentální část byla provedena s bakteriálními kmeny *Legionella* sp. v čistých kulturách a klinickými materiály pacientů s legionelózou. Odběry vzorků vod a jejich kultivace byla provedena dle akreditovaných standardních operačních postupů a koncentrace legionel ve vodě byla stanovena podle ČSN ISO 11701. Bakteriální kultury i klinický materiál poskytl RNDr. Vladimír Drašar vedoucí Národní referenční laboratoře pro legionely ve Vyškově, zřizované Zdravotním ústavem se sídlem v Ostravě. Vzorky určené k identifikaci *Legionella* sp. pomocí sekvenování genu *mip* jsou uvedeny v (Tabulka č. 6). Bakteriální kmeny a klinický materiál k sekvenační subtypizaci (SBT) *L. pneumophila* jsou uvedeny v (Tabulka č. 7).

**Tabulka č. 6:** Přehled vzorků k identifikaci *Legionella* sp.

Číslo vzorku	Označení NRL	Materiál	Zdroj
Lsp1	Raš Běl - 7	rašelina	lázně
Lsp 2	LAT 2/1	rašelina	lázně
Lsp 3	LAT 3/1	rašelina	lázně
Lsp 4	Kun-A	rašelina	výrobní zeminy
Lsp 5	Kun-12	rašelina	výrobní zeminy
Lsp 6	Kun-13	rašelina	výrobní zeminy
Lsp 7	Toušeň 1	rašelina	výrobní zeminy
Lsp 8	Pac. Ku.	sputum	pacient
Lsp 9	Pac. To.	BAL	pacient
Lsp 10	Pac. Ja.	hemokultura	pacient
Lsp 11	PTAS	stěr	teplárny
Lsp 12	VNOL-5/2	voda	nemocnice
Lsp 13	VNOL-5/1	voda	nemocnice
Lsp 14	MOU-Fo	voda	nemocnice
Lsp 15	SV 1/4	voda	nemocnice
Lsp 16	FSK - 6/2	voda	VŠ koleje
Lsp 17	FSK - 6/4	voda	VŠ koleje
Lsp 18	CAMS-4	voda	kampus Přf
Lsp 19	CAM-47/1	voda	kampus Přf
Lsp 20	IQP-15	voda	hotel Thajsko
Lsp 21	VR-8	voda	hotel Český Krumlov
Lsp 22	OLT 8/2	voda	hotel Praha
Lsp 23	DGS-5/2	voda	hotel Praha
Lsp 24	RPMS 20	voda	hotel Španělsko
Lsp 25	VKV 3/1	voda	studie vlaky
Lsp 26	VKV 3/3	voda	studie vlaky

Číslo vzorku	Označení NRL	Materiál	Zdroj
Lsp 27	VKV 12/1	voda	studie vlaky
Lsp 28	VKV 12/3	voda	studie vlaky
Lsp 29	VKV 12/4	voda	studie vlaky
Lsp 30	VKV 11	voda	studie vlaky
Lsp 31	VKV 1/2	voda	studie vlaky
Lsp 32	VKV 1/3	voda	studie vlaky
Lsp 33	VKV 12/5	voda	studie vlaky
Lsp 34	VKV 19/2	voda	studie vlaky
Lsp 35	Bohu 2	voda	studie vlaky
Lsp 36	VKV 17/4	voda	studie vlaky
Lsp 37	Pen-2/1	voda	studie vlaky
Lsp 38	Pen-13/1	voda	studie vlaky
Lsp 39	PEAL 3926	voda	PEAL Praha
Lsp 40	PEAL 5377	voda	PEAL Praha
Lsp 41	AGC 4	voda	výrobní autoskel
Lsp 42	Liba-2	voda	mycí linka
Lsp 43	SZP 2/2	voda	neznámý
Lsp 44	Rob 7	voda	neznámý
Lsp 45	SS-9/2	voda	neznámý

Tabulka č. 7: Přehled vzorků k SBT *Legionella pneumophila*.

Legionelóza	Číslo vzorku	Označení NRL	Původ izolátu
Komunitní (CAP)	Lpn1	Pac. Ho.	KI
	Lpn2	Pac. Ko.	KI
	Lpn3	Pac. Di.	KI
	Lpn4	Pac.Hru.	KI
	Lpn5	Pac. Ha	KI
	Lpn6	Pac. Pe	KI
	Lpn7	Pac. Fa	KI
	Lpn8	Pac. Bro	KI
	Lpn9	Pac. Šve	KI
	Lpn10	Šve-2	EI panelový dům
	Lpn11	Pac. Plu	KM
	Lpn12	Pac. Kno.	KI
	Lpn13	Pac. Šta	KI
	Lpn14	JC-1	EI panelový dům
	Lpn15	JC-2	EI panelový dům
	Lpn16	Pac. Ji	KI
	Lpn17	Pac. To	KM
	Lpn18	Pac. Ola	KI
	Lpn19	Pac. Me	KM
	Lpn20	PEV-7	EI studna
	Lpn21	Pac. Pa	KI
	Lpn22	PD-4	EI panelový dům



Legionelóza	Číslo vzorku	Označení NRL	Původ izolátu
	Lpn23	594	EI OD Plzeň
	Lpn24	Pac. Fi	KI
	Lpn25	Fi-1	EI panelový dům
Nozokomiální (HAI)	Lpn26	Pac. Mi	KI Nemocnice
	Lpn27	Pac. Vla	KI
	Lpn28	HK 4913	EI odd. onkologie
	Lpn29	Pac. Vr	KM
	Lpn30	588-1	EI odd. rehabilitace
	Lpn31	586	EI odd. rehabilitace
	Lpn32	Pac. UI	KM
Cestovní (TALD)	Lpn33	68/1	EI hotel Španělsko
	Lpn34	68/2	EI hotel Španělsko
	Lpn35	Hotel L 1 Praha	EI hotel
	Lpn36	Hotel L 5 Praha	EI hotel
	Lpn37	Hotel O Praha	EI hotel
	Lpn38	BR-1	EI botel
	Lpn39	Pac. Hro	KI
	Lpn40	Seb-27	EI loď Španělsko
	Lpn41	Zün	EI hotel Španělsko
	Lpn42	FON-13	EI hotel
	Lpn43	FON-17	EI hotel
Profesionální	Lpn44	Pac. Ru	KI instalatér SRN
	Lpn45	Pac. Lá	KI instalatér
Hodnocení rizika (RA)	Lpn46	Pen-4	EI vlak
	Lpn47	VKV-17	EI vlak
	Lpn48	VKV-10/1	EI vlak
	Lpn49	VKV-10/3	EI vlak
	Lpn50	VKV-15/2	EI vlak
	Lpn51	VKV-6/1 Stu	EI vlak
	Lpn52	HOK-10	EI hematoonkologie
	Lpn53	FN B	EI transplantační jednotka kostní dřeň

Vysvětlivky: KI-klinický izolát, EI-environmentální izolát, KM-klinický materiál, barevně jsou označeny vzorky, u kterých byl analyzován KI i EI a pochází ze stejného epidemiologického šetření.

## 4.2 Izolace bakteriální DNA

Genomová DNA legionel byla izolována z čistých kultur *Legionella sp.* nebo z klinického materiálu. Čisté bakteriální kultury byly kultivovány dle standardního operačního postupu v referenční laboratoři. Pomocí bakteriologické kličky byla odebrána 1 kolonie a následně byla resuspendována v 500 µl fyziologického roztoku. Poté byla suspenze inkubována při 100 °C 10 minut a centrifugována při 14 000 rpm/3 minuty (centrifuga

Eppendorf 5415D). Získaný supernatant byl použit jako templát do PCR reakce a zbývající objem byl uložen při -20 °C pro další případné analýzy. Bakteriální DNA z klinického materiálu (sputum, BAL, TAS) byla izolována pomocí komerční soupravy QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) podle návodu výrobce.

### 4.3 PCR amplifikace genu *mip* k identifikaci *Legionella* sp.

K sekvenční identifikaci druhů legionel byl amplifikován fragment genu *mip* o velikosti 661 až 715bp. K PCR amplifikaci byl použit standardní protokol EWGLI dostupný na [www.ewgli.org](http://www.ewgli.org), který byl přizpůsoben materiálním a technickým podmínkám laboratoře. PCR amplifikace pomocí primerů **Leg-F** a **Leg-Rm13**, jejichž sekvence poskytl Dr. Norman Fry, proběhla ve 25 µl směsi připravené podle (Tabulka č. 8). Sekvence primerů k PCR amplifikaci jsou následující: **Leg-F** (5'-GGGRATTVTTTATGAAGATGARAYTGG-3') a **Leg-Rm13** (5'-CAGGAAACAGCTATGACTCRTTNGGDCCDATNGGNCCDCC-3'). Vlastní amplifikace probíhala podle následujícího teplotního profilu PCR reakce:

úvodní denaturace	94 °C 2 min
PCR amplifikace 40 x:	94 °C 30 s
	55 °C 1 min
	72 °C 1 min
závěrečná extenze	72 °C 2 min

**Tabulka č. 8:** Složení PCR reakční směsi k amplifikaci genu *mip*.

Složka	1 reakce [µl]
2x AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.)	12,5
primer Leg- F 10 pmol/µl (Metabion)	0,5
primer Leg-Rm13 10 pmol/µl (Metabion)	0,5
PCR voda	8
DNA templát	3,5
celkem	25

V případech, kdy se nepodařilo amplifikovat nebo sekvenovat gen *mip*, byla u některých vzorků provedena sekvenace fragmentu genu kódujícího 16S rRNA pomocí komerční soupravy MicroSeq®500 (Applied Biosystems Inc.). Získaná data byla vložena do databáze BLAST k identifikaci bakteriálního druhu.

#### 4.4 PCR amplifikace vybraných lokusů k subtypizaci bakteriálních kmenů *Legionella pneumophila*

PCR amplifikace vybraných lokusů genů *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* a *neuA* pro další sekvenování byla provedena jedнокrokovou PCR. Standardizovaný protokol pro SBT *L. pneumophila* (verze 4.2) byl přizpůsoben materiálním a technickým podmínkám laboratoře. Adresa webové stránky, na které lze standardizovaný protokol získat je [http://www.hpabioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpabioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php) (Mentasti a Fry, 2009). Sekvence primerů pro amplifikaci sedmi genových fragmentů jsou uvedeny v (Tabulka č. 9). 25 µl objemu reakční směsi bylo připraveno pipetováním 5 µl naředěné *Taq* DNA polymerázy (Tabulka č. 10), 17,5 µl reakční směsi (Tabulka č. 11) a 2,5 µl templátové DNA. Mikrozkušavky o objemu 0,2 ml s reakční směsí byly vortexovány a krátce centrifugovány. Amplifikace probíhala při následujícím teplotním profilu PCR reakce:

úvodní denaturace	94 °C 5 min
PCR amplifikace 35 x:	94 °C 30 s
	55 °C 30 s
	72 °C 30 s
závěrečná extenze	72 °C 10 min

**Tabulka č. 9:** Primery k SBT bakteriálního kmene *L. pneumophila*.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Annealing teplota
<i>flaA</i>	flaA-587F flaA-960R	GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G	55°C
<i>pilE</i>	pilE-35F pilE-453R	CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA GCT GGC GCA CTC GGT ATC T	55°C
<i>asd</i>	asd-511F asd-1039R	CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC	55°C
<i>mip</i>	mip-74F mip-595R	GCT GCA ACC GAT GCC AC CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C	55°C
<i>mompS</i>	mompS-450F mompS-1126R	TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C	55°C
<i>proA</i>	proA-1107F proA-1553R	GAT CGC CAA TGC AAT TAG ACC ATA ACA TCA AAA GCC	55°C
<i>neuA</i>	neuA-196F neuA-611R	CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC	55°C

**Tabulka č. 10:** Příprava *Taq* DNA polymerázy k SBT bakteriálního kmene *L. pneumophila*.

Složka	1 reakce [μl]
10 x PCR pufr	0,25
5U/μl <i>Taq</i> DNA polymerace (Invitrogen)	0,25
PCR voda	4,5
celkem	5

**Tabulka č. 11:** Složení PCR reakční směsi k SBT bakteriálního kmene *L. pneumophila*.

Složka	1 reakce [μl]
10 x PCR pufr	2,5
10 mM dNTPs (TopBio)	0,5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,3
primer F 10 pmol/μl (Metabion)	0,5
primer R 10 pmol/μl (Metabion)	0,5
PCR voda	12,2
celkem	17,5

#### 4.5 PCR amplifikace vybraných lokusů k subtypizaci *Legionella pneumophila* z klinického materiálu

PCR amplifikace vybraných lokusů genů *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* a *neuA* pro další sekvenování byla u vzorků z klinického materiálu, kde je nižší koncentrace DNA, provedena pomocí nested PCR. Byl použit nested SBT protokol k sekvenační subtypizaci *L. pneumophila* (verze 1.0), který je možné získat na webové adrese [http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php) (Mentasti a Fry, 2009). Sekvence primerů pro ´direct´ amplifikaci vzorků je uvedena v (Tabulka č. 12) a sekvence primerů pro ´nested´ amplifikaci vzorků s různými annealing teplotami jsou uvedeny v (Tabulka č. 13).

**Tabulka č. 12:** ´Direct´ primery k SBT *L. pneumophila* z klinického materiálu (Ginevra a kol, 2009).

Gen	Název primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Annealing teplota
<i>flaA</i>	flaA-L-N flaA-960R	TAT GCG TGA GCT TTC CGT TC CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G	50°C
<i>pilE</i>	pilE-L-N pilE-R-N	CGT TGG AAT CGG CTT GTC CGC ATT GGC AGA GGA ATC TA	50°C
<i>asd</i>	asd-1-N asd-2-N	CCC TGG AAG TGA ATC CTC AT TTG CAG TAT TTC AGC GAT CTG T	50°C
<i>mip</i>	mip-1-N mip-2-N	TGA AGA TGA AAT TGG TGA CTG C AAT AGG TCC GCC AAC GCT AC	50°C

Gen	Název primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Annealing teplota
<i>mompS</i>	mompS-450F mompS-R-N	TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C	50°C
<i>proA</i>	proA-L-N proA-R-N	CCG CTT CTC CAA CCA ATg a CAC TCA ACA TAC CGC AAC CA	50°C
<i>neuA</i>	neuA-F-N neuA-R-N	CCT TGC AGT CGT CTT GTT GT TTT CTG TTA GAG CCC AAT CG	50°C

**Tabulka č. 13:** 'Nested' primery k SBT *L. pneumophila* z klinického materiálu (Ginevra a kol, 2009).

Gen	Název primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Annealing teplota
<i>flaA</i>	flaA-587F flaA-R.N	GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG GGT ATC ACC TGC GGT TCC A	55°C
<i>pilE</i>	pilE-35F pilE-453R	CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA GCT GGC GCA CTC GGT ATC T	55°C
<i>asd</i>	asd-511F asd-1039R	CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC	62°C
<i>mip</i>	mip-74F mip-595R	GCT GCA ACC GAT GCC AC CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C	60°C
<i>mompS</i>	mompS-509F mompS-1015R	GAC ATC AAT GTG AAC TGG CAG AAG CTG CGA AAT CAG	55°C
<i>proA</i>	proA-1107F proA-1553R	GAT CGC CAA TGC AAT TAG ACC ATA ACA TCA AAA GCC	55°C
<i>neuA</i>	neuA-196F neuA-634R	CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC	55°C

'Direct' amplifikace probíhala v 50 µl reakční směsi, která byla připravena pipetováním 10 µl naředěné *Taq* DNA polymerázy (2,5 U/reakci) (Tabulka č. 14), 30 µl reakční směsi (Tabulka č. 15) a 10 µl templátové DNA. Amplifikace probíhala při následujícím teplotním profilu PCR reakce:

úvodní denaturace	94 °C 5 min
PCR amplifikace 35 x:	94 °C 30 s
	50 °C 30 s
	72 °C 40 s
závěrečná extenze	72 °C 10 min

**Tabulka č. 14:** Příprava *Taq* DNA polymerázy k SBT *L. pneumophila* z klinického materiálu.

Složka	1 reakce [μl]
10 x PCR pufr	0,5
5U/μl <i>Taq</i> DNA polymerace (Invitrogen)	0,5
PCR voda	9
celkem	10

**Tabulka č. 15:** Složení PCR reakční směsi pro 'direct' PCR.

Složka	1 reakce [μl]
10 x PCR pufr	5
10 mM dNTPs (TopBio)	1
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
primer F 10 pmol/μl (Metabion)	1
primer R 10 pmol/μl (Metabion)	1
PCR voda	19,5
celkem	30

PCR pro 'nested' amplifikaci probíhala v 50 μl a byla připravena pipetováním 10 μl naředěné *Taq* DNA polymerázy (1,5 U/reakci) (Tabulka č. 14), 35 μl reakční směsi (Tabulka č. 16) a 5 μl amplifikátů z 'direct' PCR.

**Tabulka č. 16:** Složení PCR reakční směsi pro 'nested' PCR.

Složka	1 reakce [μl]
10 x PCR pufr	5
10 mM dNTPs (TopBio)	1
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
primer F 10 pmol/μl (Metabion)	1
primer R 10 pmol/μl (Metabion)	1
PCR voda	24,5
celkem	35

## 4.6 Elektroforéza PCR produktů

Pro ověření přítomnosti specifických PCR produktů byla provedena elektroforetická separace amplifikovaných genů v 2% agarózovém gelu v TBE 1x pufru. Agaróza byla rozpuštěna varem, následně byla ochlazena na cca 60 °C a poté bylo přidáno 2 μl ethidium bromidu o koncentraci 10 mg/ml. 5 μl PCR produktu bylo smícháno s 1,5 μl vzorkovacího pufru a pipetováno do ztuhlého gelu, převrstveného pufrům TBE 1x. Jako standard molekulové váhy byl použit 100bp ladder DNA (SIGMA-ALDRICH). Elektroforéza probíhala při napětí 100 V po dobu 40 minut. Pomocí UV transluminátoru a dokumentačního zařízení byl gel vyhodnocen.

## 4.7 Purifikace PCR produktů

Purifikace PCR produktů byla provedena pomocí ExoSAP-IT<sup>®</sup> (Affymetrix Inc.). Do 0,2 ml amplifikačních zkumavek bylo pipetováno 2  $\mu$ l ExoSAP-IT<sup>®</sup> a 5  $\mu$ l PCR produktu. Obsah byl opatrně promíchán pipetováním a krátce centrifugován. Inkubace probíhala při 37 °C 15 minut a následně při 80 °C 15 minut v termocykléru Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc.).

## 4.8 Sekvenační reakce amplifikovaných genů

Sekvenační reakce byla provedena v objemu 10  $\mu$ l a její složení uvádí (Tabulka č. 17). Byla použita komerční souprava BigDye Terminátor v1.1 Cycle Sequencing RR (Applied Biosystems Inc.). Primery použité k sekvenaci z obou stran PCR produktů jsou shodné s primery PCR (Tabulka č. 9 a Tabulka č. 13), kromě dvou následujících vyjímek. PCR produkt reprezentující gen *mip* *Legionella* sp. byl amplifikován pomocí primerů **Leg-FS** (5'-TTTATGAAGATGARAYTGGTCRCTGC3') a **M13-R** (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). V případě *L. pneumophila* byl gen *mompS* amplifikován pomocí primerů **mompS-450F** (5'-TTGACCATGAGTGGGATTGG-3') a **mompS-1015 R** (5'-CAGAAGCTGCGAAATCAT-3'). Do amplifikačních zkumavek o objemu 0,2 ml bylo pipetováno 6,5  $\mu$ l sekvenační reakční směsi a 3,5  $\mu$ l přečištěného PCR produktu. Sekvenační reakce probíhala při následujícím teplotním profilu:

úvodní denaturace	95 °C 5 min
amplifikace 25 x	95 °C 10 s
	50 °C 5 s
	60 °C 4 min
chlazení	4 °C trvale

**Tabulka č. 17:** Složení sekvenační reakční směsi.

Složka	1 reakce [ $\mu$ l]
2,5x BDTv1.1 Sequencing RR	2
5x BDTv1.1, 3.1 Sequencing Buffer	1
primer F nebo R 10 pmol/ $\mu$ l (Metabion)	0,3
PCR voda	3,2
PCR produkt	3,5
celkem	10

Neinkorporované BigDye terminátory byly odstraněny purifikací pomocí komerční soupravy Performa<sup>®</sup> DTR Gel Filtration Cartridges (EdgeBio). Do 96 jamkové desky bylo

pipetováno 10 µl Hi-Di Formamidu (Applied Biosystems Inc.) a celý objem přečištěného sekvenačního produktu. Kapilární elektroforéza byla provedena na přístroji 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc.) se čtyřmi 50 cm kapilárami s použitím polymeru 3130 POP-6<sup>TM</sup> (Applied Biosystems Inc.). Získaná data byla zpracována v programech Sequencing Analysis v5.2 a SeqScape v2.6 a vložena do databází ve formátu abi nebo fsta. Gen *mip* k identifikaci *Legionella sp.* byl vložen do databáze genů *mip* všech známých druhů a kmenů legionel a geny *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* a *neuA* k subtypizaci *L. pneumophila* byly vloženy do databáze alelických variant těchto genů.

## 4.9 Použité chemikálie

Agaróza (TopBio)

AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Master Mix, 250 U/ 5ml, 4316753 (Applied Biosystems Inc.)

BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1, 3.1, 5x Sequencing Buffer, 4336697 (Applied Biosystems Inc.)

BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, 4336774 (Applied Biosystems Inc.)

Buffer (10x) with EDTA, 402824 (Applied Biosystems Inc.)

Deionizovaná voda

Ethidium bromid, 10 mg/ml (TopBio)

ExoSAP-IT<sup>®</sup>, 78200 (Affymetrix Inc.)

FAST MicroSeq<sup>®</sup>500, 16S rDNA PCR Kit, 4370489 (Applied Biosystems Inc.)

Hi-Di Formamide Genetic Analysis Grade, 4311320 (Applied Biosystems Inc.)

MicroSeq<sup>®</sup>500, 16S rDNA Sequencing Kit, 434680 (Applied Biosystems Inc.)

PCR dNTP Mix (10mM každého – dATP, dCTP, dGTP, dTTP), P 041 (TopBio)

PCR Low Ladder Set, 07808-1SET (SIGMA-ALDRICH)

Polymer 3130 POP-6<sup>TM</sup>, 4363783 (Applied Biosystems Inc.)

*Taq* DNA polymeráza (5U/µl), 18038 (Invitrogen)

TBE 10x koncentrovaný, 1448210 (SIGMA-ALDRICH)

## 4.10 Použité roztoky

Agarózový 2% gel: 0,67 g agarózy, 35 ml TBE pufru 1x

Fyziologický roztok



## **4.11 Použité laboratorní přístroje**

Centrifuga Eppendorf 5415D (Eppendorf)

Centrifuga Hettich MIKRO 120 (Hettich)

Centrifuga-vortex Combi Spin FVL-2400N (BIOSAN)

Elektroforetický zdroj Apelex PS 304 (Apelex)

Genetický analyzátor 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.)

Izolátor nukleových kyselin QIAcube (QIAGEN)

Laboratorní váhy FA-200 (A&D)

Mikrovlnná trouba

Mikropipety Finnpiette 0,5 - 10  $\mu$ l, 10 - 100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l (Labsystems)

Mikropipety Biohit 0,5 - 10  $\mu$ l, 10 - 100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l (BIOHIT PLC.)

Minicentrifuga SPECTRAFUGE C1301 (Labnet International, Inc.)

PCR box Aura (BioAir)

PCR box DNA/RNA UV-dekontaminační box UTV-S-AR (BIOSAN)

Temperovaný blok Dri-block DB-2D (Techne)

Termocyklér DNA Engine<sup>®</sup> (BIO-RAD)

Termocyklér PTC-200 (MJ Research)

Termocyklér Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Inc.)

Transluminátor (Laver Scientific)

Třepačka Thermolyne 16700 (Barnstead International)

Výrobník deionizované a ultračisté vody GORO MID 50 (GORO, spol. s r.o.)

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Sekvenační identifikace *Legionella* sp.

Sekvenační identifikace *Legionella* sp. byla provedena u 45 analyzovaných vzorků (Tabulka č. 18). Bakteriálních kmenů environmentálního původu bylo 42, jeden bakteriální kmen byl kultivován ze sputa pacienta a ve 2 případech šlo o klinický materiál. Pomocí sekvenace genu *mip* byl identifikován druh legionely u 31 vzorků, ve 4 případech nebyl druh legionely určen z důvodu nízké procentuální shody s nejbližším druhem v databázi EWGLI (menší než 95 %) a zřejmě se jedná o zatím nepopsané kmeny legionel. Tyto kmeny a jejich sekvence byly zaslány autorovi metody a správci databáze druhů legionel Dr. Ratcliffovi (Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia) k analýze a potvrzení, že se jedná o doposud nepopsané druhy. U bakteriálního izolátu kultivovaného ze sputa pacienta (Pac. Ku) byla pomocí sekvenační analýzy genu *mip* identifikována pro člověka patogenní *L. bozemanii*.

U 10 kmenů nebyl sekvenací genu *mip* druh legionely určen. Čtyři *mip* negativní kmeny byly identifikovány pomocí sekvenace fragmentu genu kódujícího 16S rRNA a databáze BLAST. Tři kmeny z nich (LAT 2/1, LAT 3/1, PTAS) byly určeny jako jiné bakteriální druhy (*Pseudomonas* sp. 2x a *Stenotrophomonas maltophilia* 1x) a jeden kmen byl identifikován jako *L. geestiana* (VKV 1/2). Gen *mip* u *L. geestiana* se jediný s použitím standardních primerů neamplifikuje. Čtyři *mip* negativní kmeny nebyly dále analyzovány. Dva klinické materiály (Pac. To a Pac. Ja) se pomocí sekvenace *mip* nepodařilo určit. U vzorku Pac. To (BAL) došlo k amplifikaci *mip*, ale z důvodu nízké koncentrace DNA produktu se nepodařilo získat kvalitní sekvenci nutnou k identifikaci v databázi. Tento vzorek byl nakonec identifikován jako *L. pneumophila* ST213 pomocí nested SBT protokolu (viz kapitola 5.2.1). Amplifikace *mip* u Pac. Ja nebyla úspěšná.

Mezi 29 identifikovanými kmeny izolovanými z prostředí v České republice (voda, rašelina, stěr) bylo zastoupeno 9 druhů legionel. Sérologicky nerozlišitelné druhy *L. anisa*, *L. bozemanii* a *L. parisiensis* byly sekvenovány ve 13 případech. Nejčastěji identifikovaným druhem z nich byla *L. anisa* (12 vzorků – 41,4 %). Druhým nejvíce zastoupeným druhem byla *L. quateirensis* (7 vzorků – 24,1 %, z toho 3 z rašeliny). Zastoupení ostatních druhů (34,5 %) bylo následující *L. brunensis* (2 vzorky), *L. sainthelensi* (2 vzorky) a druhy *L. bozemanii*, *L. santicrucis*, *L. pneumophila* sg. 2, *L. quinlivanii* sg. 1 a *L. geestiana* byly identifikovány každý v jednom vzorku. Dva kmeny (VKV 12/1, VKV 12/5) byly v databázi identifikovány

jako L. 89-2081, oba byly izolovány z vody ve vlaku. L. 89-2081 je označení kmene legionely, která byla izolována v Japonsku a nebyla doposud popsána jako samostatný druh.

Dva kmeny byly izolovány v zahraničí. Kmen RPMS-20 pochází ze španělského hotelu a byl identifikován jako *L. jamestownniensis*. Kmen IQP-15 pochází z hotelu v Thajsku a byl identifikován jako doposud nepopsaný kmen.

U kmenů izolovaných v hotelích v České republice (VR-8, OLT-8/2, DGS-5/2) byly sekvenačně identifikovány druhy *L. bozemanii*, *L. brunensis* a *L. anisa*, přičemž *L. bozemanii* je klinicky významná.

V rašelině byly zastoupeny druhy *L. quateirensis*, *L. sainthelensi* a bakterie rodu *Pseudomonas* sp. Příklad výsledku identifikace druhu *L. brunensis* pomocí databáze genů *mip* je uveden v (Příloha č. 4). Přehled analyzovaných vzorků a jejich identifikace uvádí (Tabulka č. 18).

**Tabulka č. 18:** Výsledky sekvenační identifikace.

Označení NRL	Materiál	Zdroj	Druh - <i>mip</i>	% shody	Druh - 16S
Pac. Ku.	KI - sputum	pacient	<i>L. bozemanii</i>	99,83	
Pac. To.	KM - BAL	pacient	neurčeno		
Pac. Ja.	KM - hemokultura	pacient	negativní		
VNOL-5/2	voda	nemocnice	<i>L. anisa</i>	99,43	
VNOL-5/1	voda	nemocnice	<i>L. anisa</i>	100	
MOU-Fo	voda	nemocnice	<i>L. anisa</i>	100	
SV 1/4	voda	nemocnice	<i>L. santicrucis</i>	100	
Raš Běl - 7	rašelina	lázně	<i>L. sainthelensi</i>	100	
LAT 2/1	rašelina	lázně	negativní		<i>Pseudomonas</i> sp.
LAT 3/1	rašelina	lázně	negativní		<i>Pseudomonas</i> sp.
IQP-15	voda	hotel Thajsko	<i>L. unknown</i>	90,27	
VR-8	voda	hotel ČR	<i>L. bozemanii</i>	99,82	
OLT 8/2	voda	hotel Praha	<i>L. brunensis</i>	100	
DGS-5/2	voda	hotel Praha	<i>L. anisa</i>	100	
RPMS 20	voda	hotel Španělsko	<i>L. jamestownniensis</i>	100	
FSK - 6/2	voda	VŠ koleje	<i>L. anisa</i>	100	
FSK - 6/4	voda	VŠ koleje	<i>L. quateirensis</i> FSK-6/4	100	
CAMS-4	voda	kampus Přf	<i>L. anisa</i>	100	
CAM-47/1	voda	kampus Přf	<i>L. anisa</i>	100	
PTAS	stěr	teplárny	negativní		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Kun-A	rašelina	výrobní zeminy	<i>L. quateirensis</i>	99,29	
Kun-12	rašelina	výrobní zeminy	<i>L. quateirensis</i>	98,09	
Kun-13	rašelina	výrobní zeminy	<i>L. quateirensis</i>	99,13	

Označení NRL	Materiál	Zdroj	Druh - mip	% shody	Druh - 16S
Toušeň 1	rašelina	výrobná zeminy	negativní		
AGC 4	voda	výrobná autoskel	<i>L. unknown</i>	90,7	
Liba-2	voda	mycí linka	<i>L. quateirensis</i>	98,54	
PEAL 3926	voda	PEAL	<i>L. sainthelensi</i>	99,83	
PEAL 5377	voda	PEAL	<i>L. unknown</i>	83	
VKV 3/1	voda	studie vlaky	<i>L. anisa</i>	100	
VKV 3/3	voda	studie vlaky	<i>L. anisa</i>	99,83	
VKV 12/1	voda	studie vlaky	L. 89-2081	99,83	
VKV 12/3	voda	studie vlaky	negativní		
VKV 12/4	voda	studie vlaky	negativní		
VKV 11	voda	studie vlaky	<i>L. quateirensis</i>	98,43	
VKV 1/2	voda	studie vlaky	negativní		<i>L. geestiana</i>
VKV 1/3	voda	studie vlaky	negativní		
VKV 12/5	voda	studie vlaky	L.89-2081	99,83	
VKV 19/2	voda	studie vlaky	<i>L. brunensis</i>	100	
Bohumín 2	voda	studie vlaky	<i>L.pneumophila</i> sg.2	100	
VKV 17/4	voda	studie vlaky	L. unknown	82,4	
Pen-2/1	voda	studie vlaky	<i>L. anisa</i>	100	
Pen-13/1	voda	studie vlaky	<i>L. anisa</i>	100	
SZP 2/2	voda	neznámý	<i>L. quateirensis</i>	98,43	
Rob 7	voda	neznámý	<i>L. anisa</i>	100	
SS-9/2	voda	neznámý	<i>L. quinlivanii</i> sg.1	99,39	

## 5.2 Sekvenační subtypizace *Legionella pneumophila*

Sekvenační subtypizace *L. pneumophila* byla využita při šetření legionelóz komunitních (47,2 %), cestovních (20,8 %), nozokomiálních (13,2 %), profesionálních (3,7 %) a k hodnocení rizika (15,1 %). Celkem bylo subtypizováno 53 vzorků. Bakteriálních kmenů *L. pneumophila* kultivovaných z prostředí bylo 29 a bakteriálních kmenů kultivovaných z klinického materiálu pacientů bylo 20. Dále byla provedena nested SBT *L. pneumophila* u 4 klinických vzorků.

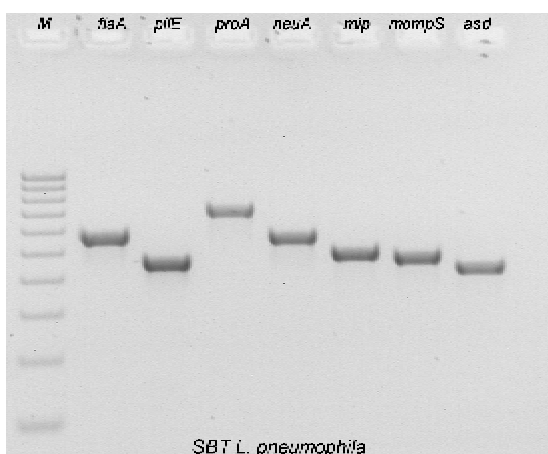
Převážnou část subtypizovaných kmenů tvořila *L. pneumophila* sg. 1 s výjimkami dvou kmenů *L. pneumophila* sg. 6 a jednoho kmene *L. pneumophila* sg. 3. Sérotypizace byla provedena v NRL pro legionely.

Bylo identifikováno 13 sekvenačních typů a 4 alelické profily (Tabulky č. 19, 20, 21, 22, 23). Dvěma alelickým profilům byl přidělen nový ST. Kombinaci alel 2,10,3,15,2,1,20 byl přidělen ST1090 a kombinaci alel 1,4,3,1,1,4,6 byl přidělen ST1011. Nested SBT *L. pneumophila* umožnila určit ST u čtyř klinických materiálů. Z 53 vzorků byla shoda klinických a environmentálních kmenů legionel prokázána v šesti případech. K amplifikaci

genu *neuA* nedošlo pouze u jednoho bakteriálního kmene legionely (kmenů Fi-1 a Pac. Fi) a výsledkem je alelický profil 2,10,3,28,9,4, F.

Pro ověření specifických PCR produktů sedmi genových fragmentů byla u všech vzorků provedena elektroforéza v 2% agarózovém gelu. Příklad agarózového gelu s produkty po jednokrokové PCR reakci z bakteriálních kmenů je na (Obrázku č. 4). Příklady agarózových gelů s PCR produkty po 'direct' a 'nested' PCR reakcích jsou na (Obrázku č. 5).

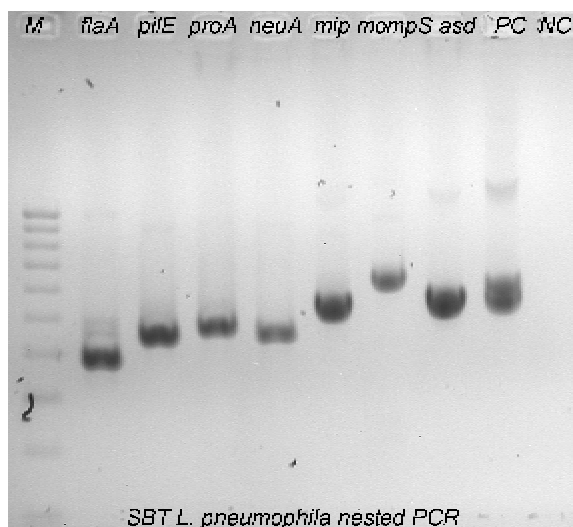
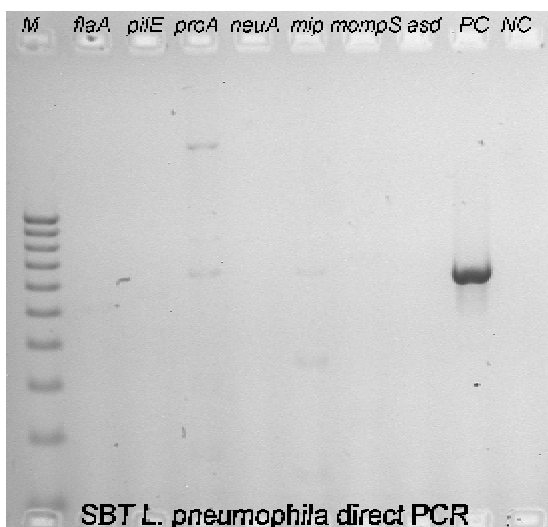
**Obrázek č. 4:** 2% agarózový gel s PCR produkty po jednokrokové PCR.



Velikost PCR produktů

<i>flaA</i>	390bp
<i>pilE</i>	460bp
<i>proA</i>	580bp
<i>neuA</i>	460bp
<i>mip</i>	560bp
<i>mompS</i>	710bp
<i>asd</i>	480bp

**Obrázek č. 5:** 2% agarózový gel s PCR produkty po 'direct' a 'nested' PCR. M-100bp ladder, PC-pozitivní kontrola *mip*, NC- negativní kontrola.



Vložením 'forward' a 'reverse' sekvencí všech sedmi genů jednotlivých vzorků do databáze k subtypizaci *L. pneumophila* byly získány protokoly (Obrázek č. 6). Každé alelické variantě daného genu je přiděleno číslo (exact match). ST je určen, jestliže daná kombinace alel v databázi existuje. Databáze vyhodnotí také kvalitu vložených dat, ověří délku sekvence a přítomnost markeru na počátku a konci sekvence. Stejná analýza byla provedena u 53 analyzovaných vzorků.

**Obrázek č. 6:** Příklad protokolu sekvenační subtypizace *L. pneumophila* získaný z EWGLI databáze.

Allele	Length	Average Quality	Start Marker?	End Marker?	Correct Size	Sequence ID's (Length)(Average Quality)	Closest Match	Exact Match	Quality Test Pass
flaA	391	90.00	yes	yes	yes	LEG_7SBT_2012-03-08_12011_fla_R.ab1(389)(59.70) LEG_7SBT_2012-03-08_12011_fla_F.ab1(337)(51.58)	0	2	yes
pilE	449	89.29	yes	yes	yes	LEG_7SBT_2012-03-08_12011_pil_R.ab1(409)(61.43) LEG_7SBT_2012-03-08_12011_pil_F.ab1(401)(59.20)	0	3	yes
asd	555	89.97	yes	yes	yes	LEG_7SBT_2012-03-09_12011_asd_R.ab1(528)(59.59) LEG_7SBT_2012-03-09_12011_asd_F.ab1(522)(61.77)	0	9	yes
mip	542	90.00	yes	yes	yes	LEG_7SBT_2012-03-08_12011_mip_R.ab1(527)(60.75) LEG_7SBT_2012-03-08_12011_mip_F.ab1(522)(63.15)	0	10	yes
mompS	689	90.00	yes	yes	yes	LEG_7SBT_2012-03-09_12011_momp_R.ab1(539)(62.54) LEG_7SBT_2012-03-09_12011_momp_F.ab1(671)(59.74)	0	2	yes
proA	467	90.00	yes	yes	yes	LEG_7SBT_2012-03-08_12011_pro_R.ab1(453)(60.45) LEG_7SBT_2012-03-08_12011_pro_F.ab1(452)(62.82)	0	1	yes
neuA	438	89.92	yes	yes	yes	LEG_7SBT_2012-03-08_12011_neu_R.ab1(423)(59.40) LEG_7SBT_2012-03-08_12011_neu_F.ab1(416)(54.09)	0	6	yes

Sequence Type match = ST 23

### 5.2.1 SBT *Legionella pneumophila* komunitních legionelóz

Z 20 případů komunitních legionelóz se podařilo prokázat shodu klinických a environmentálních kmenů *L. pneumophila* u čtyř pacientů, a to Pac. Šve, Pac. Šta, Pac. Pa a Pac. Fi (Tabulka č. 19). Ve všech případech byl zdroj nákazy prokázán v rozvedech teplé

nebo studené vody v panelových domech. U Pac. Šve byla prokázána shoda kmenů *L. pneumophila* sg. 6 ST 656. V případě Pac. Šta byla prokázána shoda alelických profilů 1,4,3,1,1,4,6 *L. pneumophila* sg. 1, a tomuto profilu byl přidělen ST 1011. U Pac. Pa byla prokázána shoda kmenů *L. pneumophila* sg. 1 ST1. Shodné alelické profily 2,10,3,28,9,4,F u *L. pneumophila* sg. 1 byly zjištěny také v případě Pac. Fi, kdy nedošlo k amplifikaci genu *neuA*, tudíž ST nebyl přidělen.

Mezi klinickými kmeny převažoval ST 62, který nebyl z rozvodů teplé nebo studené vody izolován v žádném z případů. Z klinických kmenů (Pac. Ho, Pac. Di, Pac. Ji) a environmentálního kmene PEV-7 byl určen ST23 s alelickým profilem 2,3,9,10,2,1,6. Dále byly určeny sekvenční typy ST1, ST68, ST213 a alelický profil 8,10,22,30,6,4,3 u Pac. Plu, který byl identifikován pomocí nested SBT protokolu z klinického materiálu. Nested SBT také umožnila určení ST213 u Pac. To a ST1 u Pac. Me.

**Tabulka č. 19:** Výsledky SBT *L. pneumophila* komunitních leginelóz. Červeně jsou označeny shodné klinické a environmentální kmeny.

Označení NRL	Klinický kmen identifikace			Označení NRL	Environnementální kmen identifikace		
	sérologie	ST	alelický profil		sérologie	ST	alelický profil
Pac. Šve	<i>L. pn. sg. 6</i>	ST 656	2,6,3,28,9,4,9	ŠVE-2	<i>L. pn. sg. 6</i>	ST 656	2,6,3,28,9,4,9
Pac. Šta	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST1011	1,4,3,1,1,4,6	JC-1	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST1011	1,4,3,1,1,4,6
				JC-2	<i>L. pn. sg. 3</i>	ST 728	2,10,3,28,9,4,3
Pac. Pa	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1	1,4,3,1,1,1,1	PD-4	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST1	1,4,3,1,1,1,1
Pac. Fi	<i>L. pn. sg. 1</i>	none	2,10,3,28,9,4,F	Fi-1	<i>L. pn. sg. 1</i>	none	2,10,3,28,9,4,F
Pac. Ho	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 23	2,3,9,10,2,1,6	-	-	-	-
Pac. Ko	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1	1,4,3,1,1,1,1	-	-	-	-
Pac. Di	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 23	2,3,9,10,2,1,6	-	-	-	-
Pac. Hru	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 62	8,10,3,15,18,1,6	-	-	-	-
Pac. Ha	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 62	8,10,3,15,18,1,6	-	-	-	-
Pac. Pe	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 62	8,10,3,15,18,1,6	-	-	-	-
Pac. Fa	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 62	8,10,3,15,18,1,6	-	-	-	-
Pac. Bro	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 62	8,10,3,15,18,1,6	-	-	-	-
Pac. Ji	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 23	2,3,9,10,2,1,6	-	-	-	-
Pac. Kno	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 62	8,10,3,15,18,1,6	-	-	-	-
Pac. Ola	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 62	8,10,3,15,18,1,6	-	-	-	-
	-	-	-	PEV-7	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 23	2,3,9,10,2,1,6
	-	-	-	594	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 68	3,13,1,28,14,9,3
Pac. Plu nested	<i>L. pn. sg. 1</i>	none	8,10,22,30,6,4,3	-	-	-	-
Pac. To nested	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 213	2,19,5,10,18,1,2	-	-	-	-
Pac. Me nested	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1	1,4,3,1,1,1,1	-	-	-	-

## 5.2.2 SBT *Legionella pneumophila* cestovních legionelóz

Environmentální kmeny *L. pneumophila* sg. 1, které byly subtypizovány v rámci epidemiologického šetření cestovních legionelóz tvořily převážnou většinu vzorků. Výjimku tvořila *L. pneumophila* sg. 3 kmene BR-1, u které byl určen ST93 s alelickým profilem 3,10,1,28,14,9,13. Ve spolupráci s laboratoří v Dánsku byla prokázána shoda ST93 s klinickým kmenem (Tabulka č. 20). U jediného klinického kmene Pac. Hro byl určen ST48 s alelickým profilem 5,2,22,27,6,10,12.

Dále bylo analyzováno pět kmenů izolovaných ve třech hotelech v České republice a tři kmeny pocházející ze Španělska. Ve dvou pražských hotelech byl identifikován ST182 a v jednom lázeňském hotelu byl nalezen kmen s alelickým profilem 2,10,3,15,2,1,20, kterému byl přidělen nový ST1090. Ve španělském hotelu, ve kterém byly získány kmeny 68/1 a 68/2 byl identifikován ST23. ST266 byl přítomen ve druhém španělském hotelu. Kmen Seb-27 pochází ze španělské výletní lodi a byl určen ST885. Shoda s klinickým kmenem byla v tomto případě prokázána jinou laboratoří.

**Tabulka č. 20:** Výsledky SBT *L. pneumophila* cestovních legionelóz. Červeně jsou označeny vzorky prokázaných legionelóz ve spolupráci s jinými laboratořemi.

Označení NRL	Klinický kmen identifikace			Označení NRL	Environmentální kmen identifikace		
	sérologie	ST	alelický profil		sérologie	ST	alelický profil
ELDSNet Španělsko		-		68/1	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 23	2,3,9,10,2,1,6
		-		68/2	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 23	2,3,9,10,2,1,6
		-		Hotel 1 Praha	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 182	3,4,1,3,35,9,11
		-		Hotel 3 Praha	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 182	3,4,1,3,35,9,11
		-		Hotel O Praha	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 182	3,4,1,3,35,9,11
		-		FON-13	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1090	2,10,3,15,2,1,20
		-		FON-17	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1090	2,10,3,15,2,1,20
ELSDNet Dánsko		*		BR-1	<i>L. pn. sg. 3</i>	ST 93	3,10,1,28,14,9,13
ELDSNet Španělsko		**		Seb-27	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 885	2,10,9,13,2,10,6
ELDSNet Španělsko		-		Zün	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 266	8,10,3,10,18,1,6
Pac. Hro	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 48	5,2,22,27,6,10,12	-		-	

\*- shoda s klinickým kmenem byla potvrzena spolupracující laboratoří z Dánska

\*\*-shoda s klinickým kmenem byla potvrzena jinou laboratoří



### 5.2.3 SBT *Legionella pneumophila* nozokomiálních legionelóz

Sekvenační subtypizace *L. pneumophila* se uplatnila při šetření čtyř nozokomiálních legionelóz. Ve třech případech (Pac. Vla, Pac. Vr., Pac. Ul) byly sekvenovány klinické i environmentální kmeny a byla prokázána shoda ST (Tabulka č. 21). U Pac Vla a Pac. Ul byla zjištěna shoda kmene *L. pneumophila* sg. 1 ST1. Klinický kmen Pac. Ul byl subtypizován pomocí nested SBT protokolu. Shoda kmenů *L. pneumophila* sg. 6 ST68 byla identifikována u klinického kmene Pac. Vr a environmentálních kmenů 588-1 a 586. *L. pneumophila* sg. 1 ST1 byla také identifikována u klinického vzorku Pac. Mi.

**Tabulka č. 21:** Výsledky SBT *L. pneumophila* nozokomiálních legionelóz. Červeně jsou označeny shodné kmeny *L. pneumophila*.

Označení NRL	Klinický kmen identifikace			Označení NRL	Environmentální kmen identifikace		
	sérologie	ST	alelický profil		sérologie	ST	alelický profil
Pac. Vla	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1	1,4,3,1,1,1,1	HK 4913	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1	1,4,3,1,1,1,1
Pac. Vr	<i>L. pn. sg. 6</i>	ST 68	3,13,1,28,14,9,3	588-1	<i>L. pn. sg. 6</i>	ST 68	3,13,1,28,14,9,3
				586	<i>L. pn. sg. 6</i>	ST 68	3,13,1,28,14,9,3
Pac. Mi	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1	1,4,3,1,1,1,1	-	-	-	-
Pac. Ul NESTED	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1	1,4,3,1,1,1,1	HK 4913	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 1	1,4,3,1,1,1,1

### 5.2.4 SBT *Legionella pneumophila* profesionálních legionelóz

V rámci šetření profesionálních legionelóz byly subtypizovány dva klinické kmeny. V obou případech byla subtypizována *L. pneumophila* sg. 1. U kmene s označením Pac. Ru byl prokázán ST182 a u kmene s označením Pac. Lá byl určen ST62 (Tabulka č. 22). Environmentální kmeny nebyly pro analýzu získány a nebyla prokázána shoda ST.

**Tabulka č. 22:** Výsledky SBT *L. pneumophila* profesionálních legionelóz.

Označení NRL	Klinický kmen identifikace			Označení NRL	Environmentální kmen identifikace		
	sérologie	ST	alelický profil		sérologie	ST	alelický profil
Pac. Ru	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 182	3,4,1,3,35,9,11	šetření v SRN	-	-	-
Pac. Lá	<i>L. pn. sg. 1</i>	ST 62	8,10,3,15,18,1,6		-	-	-

### 5.2.5 SBT *Legionella pneumophila* k hodnocení rizika

Sekvenční subtypizace byla provedena u osmi kmenů *L. pneumophila* sg. 1 (Tabulka č. 23). Dva vzorky (HOK-10, FN B) byly izolovány z oddělení nemocnic, ve kterých jsou léčeni pacienti se zvýšeným rizikem nákazy legionelózou. Vzorek HOK-10 pochází z hematologického oddělení a vzorek FN B pochází z transplantační jednotky kostní dřeně. U obou kmenů byl identifikován sekvenční typ ST1. Dalších šest kmenů bylo sekvenováno v rámci studie hodnocení rizika nákazy legionelózou ve vlacích České republiky. Ve vlacích převažoval ST1 a jen ve dvou případech šlo o ST393.

**Tabulka č. 23:** Výsledky SBT *L. pneumophila* k hodnocení rizika.

Označení NRL	Environnementální kmen-identifikace		
	sérologie	ST	alelický profil
HOK-10	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	ST 1	1,4,3,1,1,1,1
FN B	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	ST 1	1,4,3,1,1,1,1
Pen-4	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	ST 1	1,4,3,1,1,1,1
VKV-17	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	ST 1	1,4,3,1,1,1,1
VKV-10/1	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	ST 1	1,4,3,1,1,1,1
VKV-10/3	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	ST 1	1,4,3,1,1,1,1
VKV-15/2	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	ST 393	3,6,1,25,14,9,7
VKV-6/1 Stu	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	ST 393	3,6,1,25,14,9,7

## 6 DISKUZE

### Sekvenační identifikace *Legionella* sp.

Identifikace druhů legionel sekvenací genu *mip* byla u osmi bakteriálních kmenů ze 43 analyzovaných neúspěšná. Jestliže nedojde k amplifikaci genu *mip* nastává otázka, zda se jedná o *Legionella geestiana*, a nebo jiný bakteriální druh, který byl na základě fenotypových vlastností mylně identifikován jako *Legionella* sp. Možné řešení je identifikace kmene na základě shody v sekvenci genu kódujícího 16S rRNA nebo amplifikovat gen *mip* se standardními primery a primery specifickými pro *L. geestiana*. Druhá možnost se zdá být méně finančně nákladná. V souboru sekvenovaných vzorků byla *L. geestiana* určena pomocí sekvenace úseku 16S rRNA u vzorku VKV 1/2. Vzorek VKV 1/3 nebyl analyzován, ale jelikož pocházel ze stejného vodního zdroje, jde pravděpodobně také o tento druh.

Kombinace real-time PCR a sekvenační subtypizace *L. pneumophila* z klinického materiálu umožňuje rychlou identifikaci sekvenačního typu (Mentasti a kol. 2011). Nested SBT protokol byl proveden u čtyř klinických materiálů a umožnil jednu nozokomiální legionelózu potvrdit (Pac. Ul) a jednu vyvrátit (Pac. Plu.).

### Praktické aplikace získaných výsledků

Sekvenační subtypizace *L. pneumophila* umožnila potvrdit tři nozokomiální nákazy a dvě vyvrátit. Dále byly na základě shody sekvenačních typů klinických a environmentálních kmenů prokázány čtyři komunitní legionelózy. Tyto legionelózy byly způsobeny kontaminací vodovodních rozvodů v panelových domech. Panelové domy mají charakteristické společné vlastnosti. Jsou to zejména - centrální výměňková stanice teplé vody bez regulace teploty a dlouhé vodovodní potrubí. Teplota v koncových odběrových místech mnohdy nedosahuje doporučených norem. Při kolonizaci systému legionelami jsou nápravná opatření těžko proveditelná. Zajímavé je zjištění kmenů *L. pneumophila*, které byly kultivovány z vody v bytech na třech různých místech republiky a nebyl u nich určen ST, ale pouze alelický profil. Subtypizace také potvrdila v případě šetření Pac. Šta přítomnost dvou různých subtypů *L. pneumophila* (ST1011-nově přidělen a ST728) v teplé a studené vodě ve stejném bytě. Původcem legionelózy byl ST1011. Tři ze čtyř nakažených pacientů měli onkologické onemocnění. Informovanost těchto lidí o možné nákaze a prevenci před legionelózou při

propouštění z nemocnic by mohla eliminovat tyto případy. Jestliže však dojde ve vodovodním systému ke kolonizaci a pomnožení některým ze silně virulentních kmenů *L. pneumophila* (ST68, ST23) nastává problém, protože nakažení mohou být i zdraví lidé. Pokud není zahájena včasná antibiotická léčba může mít onemocnění fatální následky. Z ozdobné fontány obchodního domu v Plzni byl izolován ST68 v rámci šetření jednoho případu komunitní legionelózy (vzorek 594). Toto zjištění pomohlo provést nápravná opatření a zavedení pravidelných kontrol, jelikož se jedná o virulentní sekvenační typ. Nákaza nebyla prokázána, protože nebyl dostupný klinický kmen ani materiál.

### **Distribuce subtypů *L. pneumophila* v prostředí a klinických izolátech**

Studie zabývající se distribucí sekvenačních typů *L. pneumophila* v Anglii a Německu zjistili různorodé zastoupení ST (Harrison a kol., 2009, Borchardt a kol., 2008). V Anglii byl mezi klinickými kmeny nejvíce zastoupen ST47, ST37 a ST62. *L. pneumophila* sg. 1, mAb Allentown, ST47 je významným původcem infekcí nejen v Anglii, ale také ve Francii a Nizozemí. Mezi environmentálními kmeny byly nejčastěji zastoupeny ST1 a ST79. Časté ST klinických kmenů byly mezi environmentálními kmeny zastoupeny velmi zřídka a naopak. V Anglii nebyl ST62 identifikován v žádném kmeni z prostředí. V Německu byl nejčastějším původcem onemocnění nejrozšířenější ST1 a ST182, který je rozšířen výhradně v Německu. ST47 nebyl identifikován v žádném ze zkoumaných izolátů. Zajímavé bylo zjištění ST182 mezi mými analyzovanými kmeny, které byly izolovány z vodovodních rozvodů dvou pražských hotelů. Tento sekvenační typ byl také původcem profesionální legionelózy instalátéra pracujícího v Německu. V naší studii byl mezi klinickými kmeny nejvíce zastoupen ST62, ST1 a ST23. ST62 byl identifikován pouze v klinických kmenech. Kde je potenciální zdroj tohoto sekvenačního typu, který je z vodovodních sítí izolován velmi zřídka, zůstává otázkou pro mnoho vědců. Možným zdrojem by mohla být vlhká půda. Distribuce vybraných ST v některých státech uvádí (Tabulka č. 24). Červeně jsou označeny sekvenační typy, které byly identifikovány v této diplomové práci.

**Tabulka č. 24:** Distribuce sekvenačních typů ve vybraných státech (www.ewgli.org).

Stát	Sekvenační typ										
	ST1	ST47	ST48	ST62	ST93	ST23	ST37	ST182	ST393	ST656	ST68
Nizozemí	31*/64*	126/2	4/1	48/2	3/1	27/2	13/7	1/0	0/0	0/0	1/0
Velká Británie	43/111	83/3	8/3	27/2	0/2	3/0	46/14	0/0	0/0	0/0	2/11
Francie	139/72	175/0	17/0	59/1	3/2	301/23	6/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Německo	33/57	2/0	0/1	24/2	12/4	9/1	0/0	21/11	0/2	0/0	0/1
Belgie	7/0	1/0	1/0	1/0	0/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Itálie	16/10	1/0	0/0	1/0	0/0	11/6	4/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Česká republika	2/1	0/0	1/0	4/0	1/1	2/0	0/0	0/2	0/2	1/1	1/1
Japonsko	0/11	0/0	0/11	0/0	1/0	4/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/0
Kanada	19/33	1/0	0/0	3/0	0/0	0/0	5/0	0/0	0/0	1/0	6/9

Vysvětlivky: \*/\* - počet klinických izolátů / počet environmentálních izolátů

## Databáze EWGLI

Databáze EWGLI umožňuje nejen identifikaci sekvenačního typu, ale také vybraným osobám po zadání přístupového hesla zjišťovat např. rozšíření jednotlivých ST, zastoupení environmentálních a klinických izolátů daného ST, epidemiologické souvislosti, séroskupinu a monoklonální podskupinu. K 9. 4. 2012 je do databáze vloženo 6086 izolátů *L. pneumophila* s 1198 sekvenačními typy. Zda údaje v databázi vypovídají o skutečném zastoupení jednotlivých ST v daných zemích nelze s jistotou říci. Záleží na individuálním přístupu jednotlivých států, zda do databáze vloží všechny typizované kmeny.

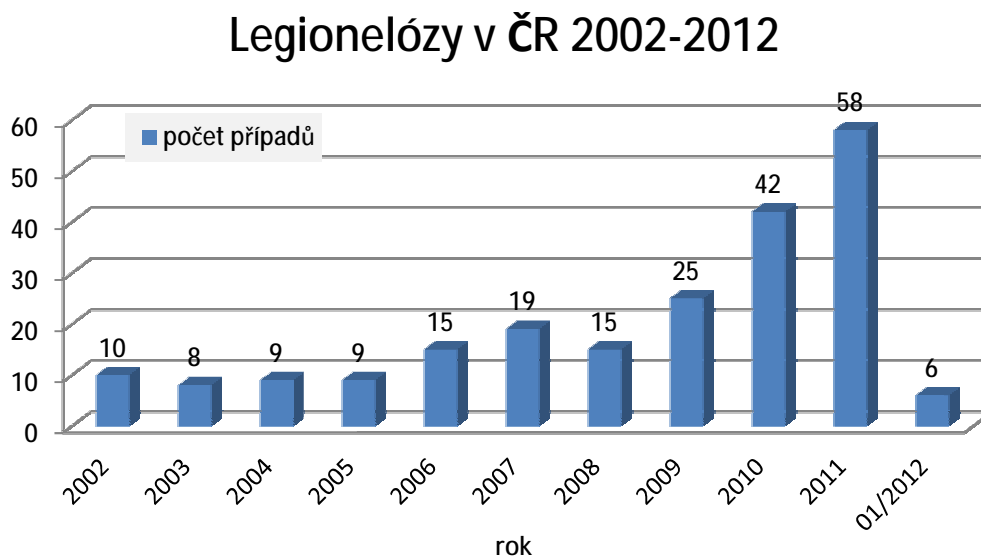
Podílela jsem se na rozšíření databáze subtypizací 19 kmenů *L. pneumophila*, které byly do databáze vloženy. Další kmeny, které byly subtypizovány musí být dále typizovány pomocí monoklonálních protilátek a teprve potom budou vloženy do databáze. Přehled sekvenačních typů izolovaných v České republice uvádí (Příloha č. 5).

## Legionelózy v České republice

V ČR je ročně hlášeno 10 tisíc pneumonií a jen u 50 % z nich je prokázán původce onemocnění. Podlášenost legionelózy má za následek, že je hlášeno v průměru pouze 21 případů za rok (Graf č. 1). V roce 2011 došlo k nárustu počtu případů téměř o polovinu ve srovnání s předchozími roky. Důvodem může být větší informovanost odborníků, ale také povinnost zasílat klinické materiály či kmeny do referenční laboratoře pro legionely. Odhadovaný reálný počet případů v České republice, podle statistických údajů, je při dobře fungující surveillance 200-300 případů za rok. Odběr klinického materiálu ke kultivaci před

zahájením antibiotické léčby a detekce legionel PCR metodou by významně zvýšily počet prokázaných legionelóz. Tato praxe je běžná v Dánsku, které má poloviční počet obyvatel než Česká republika a hlásí šestkrát více případů (data z roku 2009).

**Graf č. 1:** Přehled počtu legionelóz v ČR.



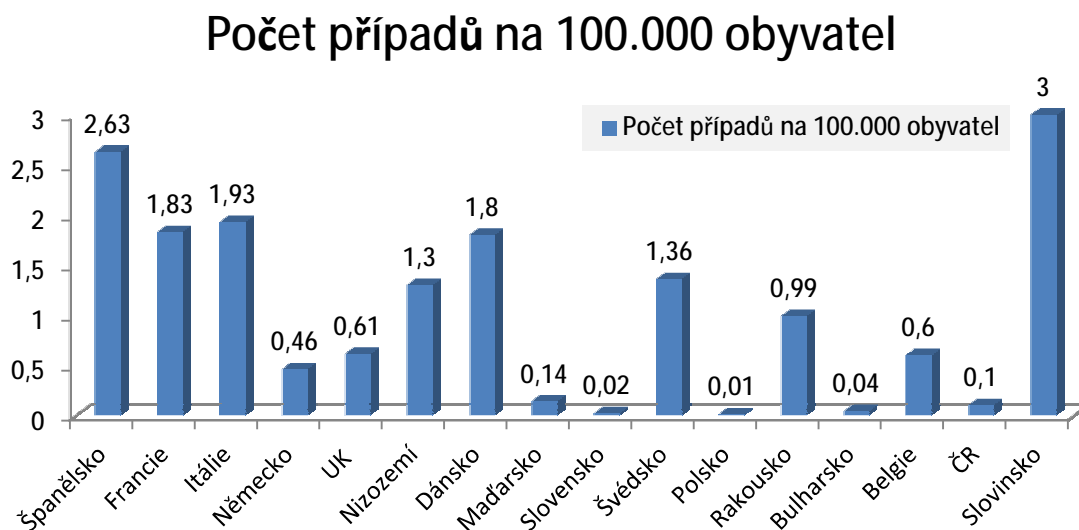
Zdroj: SZÚ infekce v ČR – EPIDAT (<http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>)

## Legionelózy v Evropě

V Evropě je ročně hlášeno 5 – 6 tisíc případů legionelózy. Průměrná četnost výskytu je 1,02 případů na 100 tisíc obyvatel. V České republice je to jen 0,1 případů na 100 tisíc obyvatel (data z roku 2009). Nejvíce případů hlásí Španělsko, Itálie a Francie (Graf č. 1). V těchto státech je také nejvíce případů hromadných výskytů cestovních legionelóz (Ricketts a kol. 2008). Tyto země jsou oblíbenými turistickými destinacemi zejména v letních měsících. Velké hotelové komplexy často nejsou mimo sezónu dostatečně obsazeny, tudíž dochází ke stagnaci vody ve vodovodních systémech. To má za následek pomnožení legionel a zvýšení rizika nákazy hotelových hostů. Pokud hotel kolonizuje virulentní kmen *L. pneumophila* mohou být nakaženi i zcela zdraví turisté. Méně virulentní kmeny způsobují onemocnění u starších a nemocných lidí, kteří mají k onemocnění větší predispozice. Kmeny 68/1 a 68/2, u kterých byl identifikován ST23 byly původcem několika cestovních legionelóz ve Španělsku. V Evropě je ročně hlášeno kolem 800 případů TALD z 35 zemí, které jsou oficiálně zapojeny do ELDSNet. Nejvíce případů hlásí Francie a Anglie. Ve Slovinsku proběhla v roce 2009

epidemie v ubytovně pro zdravotní sestry, proto došlo k nárustu počtu případů a zkreslení údajů.

**Graf č. 2:** Počty případů legionelóz v Evropě za rok 2009.



([http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC\\_DisForm.aspx?ID=767](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DisForm.aspx?ID=767))

## 7 ZÁVĚR

Ve své práci jsem identifikovala druhy legionel pomocí sekvenace genu *mip* u 45 vzorků, které nebylo možné z různých důvodů sérologicky jednoznačně určit. V souboru sekvenovaných vzorků bylo zastoupeno 9 druhů legionel a nejčastějším druhem byla *L. anisa*. Ve dvou případech byla identifikována pro člověka patogenní *L. bozemanii*, jednou z klinického kmene od pacienta s legionelózou a jednou z prostředí. Dalším častým druhem byla nepatogenní *L. quateirensis*, která byla identifikována v 7 vzorcích, z toho třikrát z půdy. Sekvence *mip* čtyř analyzovaných kmenů nebyly přiřazeny k žádnému doposud popsanému druhu a zřejmě jsou to kandidáti na nové druhy legionel.

Sekvenační subtypizace *L. pneumophila* prokázala či vyloučila zdroje nákazy při šetření legionelóz komunitních, nozokomiálních i cestovních. Také se ukázala jako vhodná metoda k posouzení míry rizika nákazy legionelózou. Z celkového počtu 53 analyzovaných vzorků bylo identifikováno 13 sekvenačních typů a 4 alelické profily. Pomocí nested SBT *L. pneumophila* byl určen ST z klinického materiálu ve čtyřech případech a byla prokázána jedna nozokomiální legionelóza. U pacientů převládala *L. pneumophila* sg. 1 ST62, dále pak ST1 a ST23. U legionelóz způsobených ST62 a ST23 nebyl ani v jednom případě nalezen zdroj nákazy. U kmenů izolovaných z prostředí převažoval ST1, který byl původcem tří nozokomiálních nákaz ze čtyř šetřených. *L. pneumophila* sg. 1 ST23 je vysoce virulentním kmenem, který byl původcem několika cestovních legionelóz ve Španělsku. Zajímavý je nález ST182 ve dvou pražských hotelech, protože tento ST byl doposud izolován výhradně v Německu. Z výsledků vlakové studie vyplývá, že vlakové cisterny i vodní zdroje k plnění jsou kolonizovány různými druhy legionel a některé z nich jsou klinicky významné.

Tyto molekulárně biologické přístupy poskytují epidemiologům účinný nástroj pro státní zdravotní dozor a podklad pro návrhy preventivních a nápravných opatření.



## 8 POUŽITÉ ZKRATKY

AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
AP-PCR	polymerázová řetězová reakce s náhodnými primery
BAL	bronchoalveolární laváž
BCYE	kultivační médium pro kultivaci legionel (Buffered Charcoal Yeast Extract)
bp	pár bází (base pair)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotid trifosfáty
CAP	komunitní pneumonie (Community Acquired Pneumonia)
ECDC	Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (European Centre for Disease Prevention and Control)
ELDSNet	European Legionnaires' Disease Surveillance Network
ELISA	enzymatická imunoanalýza (enzyme – linked immunosorbent assay)
EWGLI	Evropská pracovní skupina pro legionelové infekce (European Working Group for Legionella Infection)
IFA	imunofluorescenční analýza (Immuno Fluorescence Assay)
MAbs	monoklonální protilátky (Monoclonal Antibodies)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza
RA	hodnocení rizika (Risk Assessment)
REA	restrikční endonukleázová analýza
RFLP	polymorfismus délky fragmentů štěpených restrikční endonukleázou
SBT	sekvenční subtypizace (Sequence-Based Typing)
ST	sekvenční typ (Sequence Type)
sg.	séroskupina (serogroup)
TALD	cestovní legionelózy (Travel Associated Legionnaires' Disease)
TAS	tracheální aspirát
TBE	Tris-borate EDTA

## 9 LITERATURA

- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J., (1996).** Lékařská mikrobiologie: Marvil, s. r. o., Praha.
- Biurrun, A., Caballero, L., Pelaz, C., Leon, E., Gago, A. (1999).** Treatment of a *Legionella pneumophila* colonized water distribution system using copper-silver ionization and continuous chlorination. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20:426-428.
- Benson, R. F., Tang, P. W., Fields, B. S. (2000).** Evaluation of Binax and Biotest Urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 38 (7): 2763-2765.
- Birtles, R. J., Rowbotham, T. J., Raoult, D., Harrison, T. G. (1996).** Phylogenetic diversity of intra-amoeba legionellae as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Mikrobiology* 142: 3525-3530.
- Borchardt, J., Helbig, J. H., Lück P. C. (2008).** Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 29-36.
- Flannery, B., Gelling, L. B., Vugia, D. J., Weintraub, J. M., Salerno, J. J., Conroy, M. J., Stevens, V. A., Rose, Ch. E., Moore, M. R., Fields, B. S., Besser, R. E. (2006).** Reducing *Legionella* colonization of water systems with monochloramine. *Emerg Infect Dis* 12(4): 588-596.
- Carr, R., Warren, R., Towers, L., Bartholomew, A., Duggal, H. V., Rehman, Y., Harrison, T. G., Olowokure, B., (2010).** Investigating a cluster of Legionnaires' cases: Public health implications. *Public Health* 124: 326-331.
- Carol, J., Lee, J., van Wijngaarden, J., Drasar, V., Castellani, M. P. (2006).** Evropské směrnice pro kontrolu a prevenci legionářské nemoci. [[http://www.unichem.cz/download/EU\\_Smernice\\_070123.pdf](http://www.unichem.cz/download/EU_Smernice_070123.pdf)].
- Cazalet, Ch., Rusniok, Ch., Brüggermann, H., Zurane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichot, M., Jarraud, S., Boucheir, Ch., Vandenesch, F., Kunst, F., Etienne, J., Glaser, P., Buchrieser, C., (2004).** Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell function and high genome plasticity. *Nature Genetics* 36: 1165-1173.

- Ciesielki, C. A., Laser, M. J., Wang, W. L. L. (1986).** Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect Immun* 51: 397-404.
- Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J., Jarraud, S. (2004).** Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J Clin Microbiol* 42:458-460.
- Farhat, C., Mentasti, M., Jacobs, E., Fry, N. K., Lück, C. (2011).** The N-acetylneuraminate cytidyltransferase gene *neuA* is heterogenous in *Legionella pneumophila* strains but can be used as a marker for epidemiological typing in the consensus sequence-based typing scheme. *J Clin Microbiol* 49(12): 4052-4058.
- Feddersen, A., Meyer, H. G., Matthes, P., Bhakdi, S., Husmann, M. (2000).** *GyrA* sequence-based typing of *Legionella*. *Med Microbiol Immunol* 189(1): 7-11.
- Fields, B. S., Benson, R. F., Besser, R. E. (2002):** *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15: 506-526.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, S. M., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C., Brachman, P. S. (1977).** Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 297: 1189-1197.
- Fry, N. K., Alexiou-Daniel, S., Bangsberg, J. M., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Forsblom, B., Gaia, V., Helbig, J. H., Lindsay, D., Lück, P. Ch., Plaz, C., Uldum, S. A., Harrison, T. G. (1999).** A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. *Clinical Microbiology and Infection* 5(8): 462-477.
- Fry, N. K., Bangsberg, J. M., Bergmans, A., Bernander, S., Etienne, J., Franzin, L., Gaia, V., Hasenberger, P., Jiménez, B., Jonas, D., Lindsay, D., Metnula, S., Papoutsis, A., Struelens, M., Uldum, S. A., Visca, P., Wannet, W., Harrison, T. G. (2002).** Designation of the European working group for Legionella infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21: 722-728.
- Gaia, V., Fry, N. K., Harrison, T. G. & Peduzzi, R. (2003).** Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J Clin Microbiol* 41, 2932–2939.

- Gaia, V., Fry, N. K., Afshar, B., Luck, P. C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R. & Harrison, T. G. (2005).** Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 43, 2047–2052.
- Gaia, V., Casati, S., Tonolla, M. (2011).** Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 40–44.
- García-Fulgueiras, A., Navarro, C., Fenoll, D., Garcia, J., González-Diego, P., Jiménez-Bunuales, T., Rodriguez, M., Lopez, R., Pacheco, F., Ruiz, J., Segovia, M., Baladrón, B., Pelaz, C. (2003).** Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 9 (8): 915-921.
- Gast, R. J., Moran, D. M., Dennett, M. R., Wurtsbaugh, W. A., Amaral-Zettler, L. A. (2011).** Amoebae and *Legionella pneumophila* in saline environments. *J Water Health* 9(1): 37-52.
- Ginevra, Ch., Lopez, M., Forey, F., Reyrolle, M., Meugnier, H., Vandenesch, F., Etienne, J., Jarraud, S., Molmeret, M. (2009).** Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' Disease. *J Clin Microbiol* 47(4): 981 – 987.
- Greig, J. E., Carnie, J. A., Tallis, G. F., Ryan, N. J., Tan, A. G., Gordon, I., Zwolak, B., Leydon, J. A., Guest, C. S., Hart, W. G. (2004).** An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: Investigation and case-control study. *Medical Journal of Australia* 180(11): 566-572.
- Harrison, T. G., Afshar, B., Doshi, N., Fry, N. K., Lee, J. V. (2009).** Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000–2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:781–791.
- Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Pastorka, M. C., Plaz, C., Lück, P. Ch. (1997).** Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: Possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol* 35: 2841-2845.
- Helbig, J. H., Luck, P. C., Kunz, B., Bubert, A. (2006).** Evaluation of the Duopath Legionella lateral flow assay for identification of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species culture isolates. *Appl Environ Microbiol* 72, 4489–4491.

- Hosein, I. K., Hill, D. W., Tan, T. Y., Butchart, E. G., Wilson, K., Finlay, G. Burge, S., Ribeiro, C. D. (2005).** Point-of-care controls for nosocomial legionellosis combined with chlorine dioxide potable water decontamination: a two-year survey at a Welsh teaching hospital. *Journal of Hospital Infection* 61: 100–106.
- Joly, J. R., McKinney, R. M., Tobin, S. O., Bibb, W. F., Watkins, I. D., Ramsay, D. (1986).** Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 23: 768-771.
- Kaufmann, A. F., McDadem, J. E, Patton, Ch. M., Bennert, J. V., Skaliy, P., Feeley, J. C., Andreson, D. C., Potter, M. E., Newhouse, V. F., Gregg, M. B., Brachman, P. S. (1981).** Pontiac fever: isolation of the etiologic agent *Legionella pneumophila* and demonstrativ of its mode of transmission. *Am J Epidemiol* 114(3): 337-347.
- Ko, K. S., Lee, H. K., Park, M., Lee, K. H., Yun, Y., Yeo-Jun, Woo, S., Miyamoto, H., Kook, Y. (2002).** Application of RNA Polymerase  $\beta$  - subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* 40(7): 2653–2658.
- Kool, J. L., Bergmire-Sweat, D., Hitler, J. C., Brown, E. W., Peabody, D. J., Massi, D. S., Carpenter, J. C., Pruckler, J. M., Benson, R. F., Fields, B. S. (1999).** Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20(12): 798-805.
- Maiwald, M., Helvit, J. H., Lück, P. Ch. (1998).** Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *Journal of Microbiological Methods* 33: 59–79.
- Mentasti, M., Fry, N. K., Afshar, B., Paletou-Foxley, C., Naik, F. C., Harrison, T. G. (2012).** Application of *Legionella pneumophila* – specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological investigation of Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, DOI 10.1007/s10096-011-1535-0.
- Mudroch, D. R. (2003).** Diagnosis of *Legionella* infection. *Medical Mikrobiology* 36: 64-69.
- Murdoch, D. R., Chambers, S. T. 2009.** Atypical pneumonia-time to breathe new life into a useful term? *Lancet Infect Dis* 9:512 - 9.
- Murga, R., Forster, T. S., Brown, E., Pruckler, J. M., Fields, B. S., Donlan, R. M. (2001).** Role of biofilms in the survival of *L. pneumophila* in a model potable-water system. *Mikrobiology* 147: 3121 - 3126.

- Newton, H. J., Ang, D. K. Y., van Driel, I. R., Hartland, E. L. (2010).** Molecular pathogenesis of infection cause by *Legionella pneumophila*. Clin Mikrobiol Rev Vol 23(2): 274-298.
- O'Mahony, M. C., Stanwell-Smith, R. E., Tillett H. E., Harper, D., Hutchison, J. G. P., Farrell, I. D., Hutchinson, D. N., Lee, J. V., Denis, P. J., Duggal, H. V., Scully, J. A., Denne, C. (1990).** The Stafford outbreak of Legionnaires' disease. Epidemiol Infect 104(3): 361–380.
- Orrison, L. H., Cherry, W. B., Tyndall, R. L., Fliermans, R. L., Gough, S. B., Lambert, M. A., McDougal, L. K., Bibb, W. F., Brenner, D. J. (1983a).** *Legionella oakridgensis*: unusual new isolated from cooling tower water. Appl Environ Microbiol 45: 536-545.
- Orrison, L. H., Bibb, W. F., Cherry, W. B., Thacker, L. (1983b).** Determination of antigenic relationships among Legionellae and non-legionellae by direct fluorescent-antibody and immunodiffusion tests. J Clin Microbiol 17: 332-337.
- Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J. H., Fry, N. K., Lück, P. Ch. (2007).** Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol 45: 1965 - 1968.
- Ratcliff, R. M., Donnellan, S. C., Lanser, J. A., Manning, P. A., Heuzenroeder, M. W. (1997).** Interspecies sequence differences in the Mip protein from the genus *Legionella*: implications for fiction and evolutoinary relatedness. Mol Microbiol 25(6): 1149-1158.
- Ratcliff, R. M., Lanser, J. A., Manning, P. A., Heuzenroeder, M. W. (1998).** Sequence based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. J Clin Microbiol 36: 1560–1567.
- Reyrolle, M., Ratat, C., Leportier, M., Jarraud, S., Freney, J., Etienne, J. (2004).** Rapid identification of *Legionella pneumophila* serogroups by latex agglutination. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23: 864–866.
- Ricketts, K., Joseph, C. A., Yadav, R. (2008).** Travel-associated Legionnaires' disease in Europe in 2008, <http://www.eurosurveillance.org>.
- Rubin, C. J., Thollesson, M., Kirsebom, L. A., Herrmann, B. (2005).** Phylogenetic relationship and species differentiation of 39 *Legionella* species by sequence determinativ of the RNase P RNA gene *rnpB*. Int J Syst Evol Microbiol 55: 2039-2049.
- Rulík, M., Holá, V., Růžička, F., Votava, M. a kolektiv (2011).** Mikrobiální biofirmy. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc

- Scaturro, M., Losardo, M., DePonte, G., Ricci, M. L. (2005).** Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of legionellosis in Rome. *J Clin Microbiol* 43: 5348-5350.
- Stølhaug, A. and Bergh, K. (2006).** Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by *mip* sequencing. *Appl Environ Mikrobiol* 72: 6394-6398.
- Storey, M. V., Ashbolt, J., Stenström, T. A. (2004).** Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila* – a quantitative risk assessment for distributed water. *Water Sci Technol* 50: 77 - 82.
- Stout, J. E. and Yu, V. L. (1997).** Legionellosis. *N Engl J Med* 337: 682-687.
- Stout, J. E., Yu, V. L., Muraca, P., Joly, J., Troup, N., Tompkins, L. S. (1992).** Potable water as a cause of sporadic cases of community-acquired Legionnaires' Disease. *N Engl J Med* 326: 151-155.
- Valsangiacomo, C., Maggi, F., Gaia, V., Balmelli, T. Peduzzi, R., Piffaretti, J. C. (1995).** Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol.* 33: 1716-1719.
- Watkins, I. D., Tobin, J. O., Dennis, P. J., Brown, W., Newnham, R., Kurtz, J. B. (1985).** *Legionella pneumophila* serogroup 1 subgrouping by monoclonal antibodies – an epidemiological tool. *J Hyg Camb* 95: 211-216.
- Wilkinson, H. W., Drasar, V., Thacker, W. L., Benson, R. F., Schindler, J., Potuznikova, B., Mayberry, W. R., Brenner, D. J. (1988).** *Legionella moravica* sp. nov. and *Legionella brunensis* sp. nov. isolated from cooling-tower water. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 139(4): 393-402.
- Yang, G., Benson, R. F., Ratcliff, R. M., Brown, E. W., Steigerwalt, A. G., Thacker, W. L., Daneshvar, M. I., Morey, R. E., Saito, A., Fields, B. S. (2012).** *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water simplex and from a patient with pneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 284-288.
- Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C. M., Paterson, D. L., 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.

# 10 PŘÍLOHY

## **Příloha č. 1:**

**Haluzová, K., Drašar, V., Motlochová, J., Cignová, A. (2011).** Legionelóza - nové možnosti laboratorní diagnostiky a vyhledávání rezervoáru nákazy. In XVII. Kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, Sborník abstrakt. Plzeň 23. 6. - 25. 6. 2011, ISBN 978-80-87118-04-7



# STUDIA PNEUMOLOGICA ET PHTHISEOLOGICA

---

## Supplement

---



# XVII. KONGRES

ČESKÉ A SLOVENSKÉ  
PNEUMOLOGICKÉ A FTIZEOLOGICKÉ  
SPOLEČNOSTI

**23. - 25. 6. 2011**

Plzeň / Česká republika

---



## Legionelóza – nové možnosti laboratorní diagnostiky a vyhledávání rezervoáru nákazy

1 Haluzová Kamila, 2 Drašar Vladimír, 3 Motlochová Jana, 4 Cignová Andrea

1 Oddělení biologických analýz, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Ostrava, Česká republika

2 Národní referenční laboratoř pro legionely, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Vyškov, Česká republika

3 Oddělení imunologie a alergologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Ostrava, Česká republika

4 Oddělení molekulární biologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Ostrava, Česká republika

**Cíle:** Cílem příspěvku je seznámit lékařskou veřejnost s nejnovějšími možnostmi detekce původce legionelózy v klinických vzorcích a poukázat na nové moderní diagnostické přístupy, které jsou již u nás k dispozici. Jedna z nejdůležitějších je metoda sekvenace DNA na průkaz shody kmenů od pacienta a z prostředí, která je akceptovatelná v případě soudních sporů.

**Metody:** Od objevení legionel v r. 1976 bylo popsáno více jak 53 druhů, přičemž minimálně 24 druhů bylo prokázáno jako původce atypických pneumonií. Z dat NRL pro legionely vyplývá, že jen 50% všech legionelóz v ČR bylo v letech 1998-2010 způsobeno nejčastěji citovaným druhem *Legionella pneumophila* sg.1. Druhou polovinu nálezů tvořili *L. pneumophila* sg.3 (17%), sg.6 (13%) a další serologické skupiny. Včetně i dalších druhů jako jsou *L. micdadei*, *L. bozemanii* a *L. maceachernii*. K dispozici jsou nyní 4 standardní metody: průkaz močového antigenu, PCR průkaz DNA legionel ve vybraných vzorcích, kultivace respiračních sekretů a plicní tkáně a průkaz protilátek v krevním séru. Jestliže se podaří vykultivovat kmen *Legionella pneumophila* z klinického materiálu, pak je možnost další detailní typizace kmene metodou sekvenace DNA podle protokolu The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) a subtypizace monoklonálními protilátkami. Tyto výsledky jsou pak přímými podklady pro další epidemiologická šetření. V rámci prezentace chceme také seznámit s výsledky testování nového diagnostického testu Immuvue Legionella Blood Test, který představuje relativně jednoduchý průkaz IgM protilátek proti *Legionella pneumophila* sg. 1 a sg. 3 v krevním séru.

**Výsledky:** Evropským trendem se pro svou snadnost stala diagnostika legionelózy průkazem močového antigenu. Ve zkušených rukách ukáže nejen reakci na *L.p.sg.1*, ale i na řadu dalších serologických skupin. Test je pozitivní už od čtvrtého dne od prvních příznaků. Následuje rychlá PCR, která poskytne první vodítko. Celý proces završí pak kultivace na selektivních půdách. Jelikož protilátky se tvoří poměrně pozdě, tak nemají pro diagnostiku až takový význam. Pokud jsou k dispozici kmene klinické, pak je možné díky sekvenaci přesně vystopovat zdroj nákazy, jak bude ukázáno na vybraných případech.

**Závěr:** Průměrná četnost výskytu legionelózy v Evropě je 1,2 případu na 100 tis. obyvatel (podle dat ECDC za r. 2010), zatímco ČR hlásí průměrně 0,2 případu/100 tis. obyv.. Toto nízké číslo jasně ukazuje, že české hlášené legionelózy představují jen špičku ledovce. Dánsko s polovičním počtem obyvatel hlásí zhruba 10x více nálezů. Odhad našich reálných infekcí je někde mezi 200-300 ročně. Podmínkou pro dosažení tohoto stavu je dobře fungující surveillance, laboratoře ochotné dělat serologii a kultivace a v neposlední řadě osvětlení klinik, kteří potřebné vzorky do těchto laboratoří budou posílat. Pak se budeme moci směle postavit po bok Francie, Anglie, Holandska a dalších, kde surveillance funguje perfektně.

**Příloha č. 2:**

**Drašar, V., Haluzová, K., Cignová, A., Polcar, R. (2011).** Czech trains as ideal settings for legionella colonization: a risk assesment study. 26th Meeting of the European Working Group for Legionella Infection (EWGLI), Vienna – Austria. 25. - 27. 5. 2011.



**26<sup>th</sup> Meeting of the European Working Group  
for Legionella Infections (EWGLI)**

**25<sup>th</sup> - 27<sup>th</sup> May 2011**

**Vienna - Austria**



**PROGRAMME AND ABSTRACT BOOK**

## SESSION 6

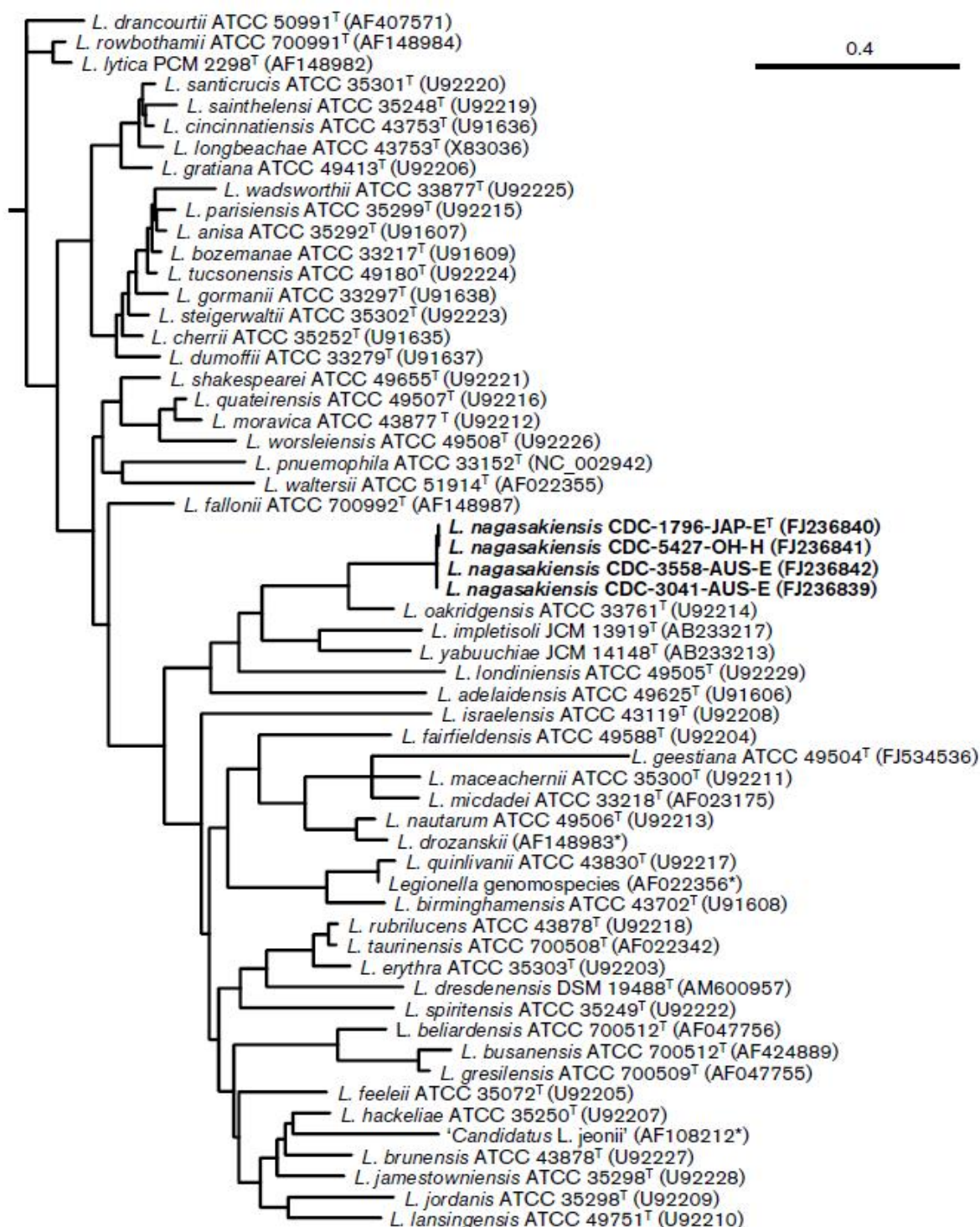
### O 32 - Czech trains as ideal settings for *legionella* colonization: a risk assessment study.

Vladimir Drasar, Kamila Haluzova, Andrea Cignova  
Public Health Institute Ostrava,  
Radomir Polcar, FACTOR.E Brno, Czech Republic

A *legionella* risk assessment study was conducted on three types of trains where water is heated onboard. Suburban, local fast and InterCity trains were investigated, including domestic depots where trains are serviced and filled with drinking water. IUC Code 563 (1990) recommends heating water in toilets to 30C, but does not mention any preventive measures regarding microbial colonization. All 11 suburban trains tested contained a large spectrum of *Legionella* species in concentrations ranging from 6-24 000 cfu/100ml *L.pneumophila* sg.1, Sequence Type 1 (ST1) and ST393, sg.3, sg.12 and five other species including two novel ones. Water temperature moved from 19-29C. Two local fast trains were colonized by *L.brunensis* and *L.anisa*. Four InterCity trains were positive for *L.pneumophila* sg.1 ST1 and sg.5. Total heterotrophic counts at 36C ranged from 6-560cfu/ml (median130). Investigation of particular depots implicated the water filling as possible sources of *legionella*, but did not explain the diversity of species found. The most likely explanation was that some trains were filled from other "natural" (i.e.untreated) sources.

Technical inspection revealed uncleanable under roof water tanks, the water heating and no disinfection as the main critical points. Two remedial measures were proposed. A simple disinfection of filling water and steaming of the system. Drinking water is not required onboard except in the galleys. Passengers should be protected by written warnings and pictograms. Train and depot staff should use personal protection because some of the *legionella* isolated are of clinical significance.

**Příloha č. 3:** Fylogenetický strom 54 druhů legionel založený na podobnosti sekvence genu *mip*. Čára vpravo představuje 0,4 % divergence (Yang a kol., 2012).



## Příloha č. 4: Příklad výsledku identifikace druhů legionel pomocí databáze EWGLI.

Your sequence is extracted from a text format. There is no associated quality information. We suggest you check that the quality of your source sequence is good for at least the first 300 bases in order to have confidence in the result.

Sequence length: 574

### Species Percent id

L.brunensis_KV-11	100.00
L.brunensis_IMVS-594	97.52
L.brunensis	96.81
L.hackeliae_sg1	86.37
L.jamestowniensis_IMVS-707	84.60
L.jamestowniensis	83.72
L.lansingensis	82.48
L.feeleii_sg1	81.24

We suggest that to have confidence in the identification the top 'hit' should match with at least 95% identity and the second closest species match should match a value of at least 2% less than the top 'hit'.

Click on a species name in the table above or in the alignment, to reveal further details

	0	10	20	30	40	50
L.feeleii_sg1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L.lansingensis	CAGCTACAACATCATTAAATAGTGACATGGATAAAGTTGTCTTTATAGCATTGGCGCTGATT					
L.jamestowniensis	CATCTGCTACATCATTAAATAGCGACACGGATAAAGCTGTCTTATAGTATCGGTGCTGACT					
L.jamestowniensis_IMVS-70	CACCTGCAACATCATTAAATAGCGACATGGATAAACTGTCTTACAGTATTGGTGTCTGATT					
L.hackeliae_sg1	CACCTGCAACATCATTAAATAGCGACATGGATAAACTGTCTTATAGTATTGGTGTCTGATT					
L.brunensis	CACCTACAACATCATTAAATAGTGACATGGATAAAGCTGTCTTACAGTATTGGCGCTGATT					
L.brunensis_IMVS-594	CACCTACAACATCATTAAATAGTGACATGGATAAAGCTGTCTTACAGTATTGGCGCTGATT					
L.brunensis_KV-11	CACCTACAACATCATTAAATAGTGACATGGATAAAGCTGTCTTACAGTATTGGCGCTGATT					
Consensus	CACCTACAACATCATTAAATAGTGACATGGATAAAGCTGTCTTACAGTATTGGCGCTGATT					
	60	70	80	90	100	110
L.feeleii_sg1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L.lansingensis	TAGGTAAGAATTTTAAAAAGCAAGGCATCGAAATCAGTCCGGCTGCTATGGCTAAGGGAT					
L.jamestowniensis	TGGGTAAAAATTTTAAAAAGCAAGGGATTGATATTAATCCTTCAGCAATGGCTAAGGGCT					
L.jamestowniensis_IMVS-70	TAGGTAAAAATTTTAAAAACAGGGTATTGATATTAATCCAGCAGCGATGGCTAAGGGTT					
L.hackeliae_sg1	TAGGTAAGAATTTTAAAAAGCAAGGTATTGATATTAATCCAGCAGCAATGGCCAAAGGTT					
L.brunensis	TAGGTAAAAACTTTTAAAAAGCAAGGTATTGATATCAATCCTTCAGCAATGGCCAAAGGTT					
L.brunensis_IMVS-594	TAGGTAAAAACTTTTAAAAAGCAAGGTATTGATATCAATCCTTCAGCAATGGCCAAAGGTT					
L.brunensis_KV-11	TAGGTAAAAACTTTTAAAAAGCAAGGTATTGATATCAATCCTTCAGCAATGGCCAAAGGTT					
Consensus	TAGGTAAAAACTTTTAAAAAGCAAGGTATTGATATCAATCCTTCAGCAATGGCCAAAGGTT					
	120	130	140	150	160	170
L.feeleii_sg1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L.lansingensis	TACAAGACGGCATGAGTGGTCAACTGTTGCTGACTGAACAACAAATGAAAGACGTTT					
L.jamestowniensis	TACAAGATGGTATGAGCGGTGGTCACTGTTGTTACTCACAGAGCAGCAATGAAAGAGTGTAT					
L.jamestowniensis_IMVS-70	TGCAAGATGGCATGACTGGTGGTCAATTACTGTTGACTGAACAGCAGATGAAAGATGTTT					
L.hackeliae_sg1	TGCAAGATGGCATGAGTGGCGGTCAATTGCTGTTAACTGAACAGCAAAATGAAAGATGTAT					
L.brunensis	TGCAAGATGGTATGAGCGGTGGGCCAATTGTTATTGACAGAACAGCAAAATGAAAGATGTAT					
L.brunensis_IMVS-594	TGCAAGATGGTATGAGCGGTGGGCCAATTGTTATTGACAGAACAGCAAAATGAAAGATGTAT					
L.brunensis_KV-11	TGCAAGATGGTATGAGCGGTAGTCAATTGTTATTGACAGAACAGCAAAATGAAAGATGTTT					
Consensus	TGCAAGATGGTATGAGCGGTAGTCAATTGTTATTGACAGAACAGCAAAATGAAAGATGTTT					
	180	190	200	210	220	230
L.feeleii_sg1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L.lansingensis	TAAATAAATTTCAAAAAGACTTAATGGCAAAAACGAAATGCGGAATTCACATAAAAAGCTG					
L.jamestowniensis	TGAATAAATTTCAAAAAGATCTAATGGCAAAAACGTAATGCTGAGTTCACTAAAAAGGCTG					
L.jamestowniensis_IMVS-70	TGAATAAATTTCAAAAAGACTTAATGGCTAAAACGCAATGCCGAATTCATAAAAAGCTG					
L.hackeliae_sg1	TGAATAAATTTCAAAAAGATTTAATGGCTAAGCGTAATGCAGATTTCAATAAAAAGCTG					
L.brunensis	TGAATAAATTTCAAAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAGCAAGAAAGCTG					
L.brunensis_IMVS-594	TGAATAAATTTCAAAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAATTCAGCAAGAAAGCTG					
L.brunensis_KV-11	TGAATAAATTTCAAAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAGTTCAGCAAGAAAGCTG					
Consensus	TGAATAAATTTCAAAAAGATTTGATGGCAAAGCGTACTGCTGAGTTCAGCAAGAAAGCTG					
	240	250	260	270	280	290
	-----	-----	-----	-----	-----	-----

L.feeleii\_sgl  
L.lansingensis  
L.jamestowniensis  
L.jamestowniensis\_IMVS-70  
L.hackeliae\_sgl  
L.brunensis  
L.brunensis\_IMVS-594  
L.brunensis\_KV-11  
**Consensus**

AAGAAAATAAAGCGAAAGGTGAAGCGTTTCATGAGCCAGAATAAGGCCAAAGAAGGCCTAG  
AAGAAAACAAGATTAAGGGCGAAGCCTTTTAACTGCAAAATAAAAACAAAGATGGTGTTA  
AAGAAAATAAAGCAAAGGGCGAAGCCTTTTAAATCAAATAAAGCAAAGATGGCGTAG  
ATGAAAATAAAGCAAAGGGGGAAGCTTTTAAATCAAATAAAGCAAAGACGGCGTAG  
AAGAAAACAAGCTAAGGGGCGATGCCTTTTAAATCAAATAAAGCTAAAGATGGCGTAG  
ACGAAAATAAAGCTAAAGGTGAAGCCTTTTAAATCAGAATAAAGCAAAGAAGGTGTTG  
ACGAAAATAAAGCTAAAGGTGAAGCCTTTTAAATCAGAATAAAGCAAAGAAGGTGTTG  
ACGAGAATAAAGCTAAAGGTGAAGCCTTTTAAATCAGAATAAAGCAAAGAAGGTGTTG  
ACGAGAATAAAGCTAAAGGTGAAGCCTTTTAAATCAGAATAAAGCAAAGAAGGTGTTG

300 310 320 330 340 350  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----  
L.feeleii\_sgl  
L.lansingensis  
L.jamestowniensis  
L.jamestowniensis\_IMVS-70  
L.hackeliae\_sgl  
L.brunensis  
L.brunensis\_IMVS-594  
L.brunensis\_KV-11  
**Consensus**

TTAGTTTGCCAAAGCGGGTTACAATATAAAATAATCCAGGCTGGTACTGGTGCAAACCAG  
TTAGTCTGCCAAGTGGTTTGCAATATAAAGTCTTGAAAAAGGAAATGGCGCTAAACCTA  
TTACATTGCCCAAGTGGTTTACAGTACAAGGTTCTCCAAAAGGGTGTATGGTGCTAAACCTG  
TTACATTGCCCAAGTGGTTTACAGTACAAGGTTCTCCAAAAGGGTGTATGGTGCTAAACCTG  
TGAGTTTACCAAGTGGTTTGCAATATAAAATAATTTCAAAGGGTGTATGGTGCTAAACCTT  
TTAGTTTACCAAGTGGTTTGCAATATAAAATAATTTCAAAGGGTGTATGGTGCTAAACCTT  
TTAGTTTACCAAGTGGTTTGCAATATAAAATAATTTCAAAGGGTGTATGGTGCTAAACCTT  
TTAGCTTACCAAGTGGTTTGCAATATAAAATAATTTCAAAGGGTGTATGGTGCTAAACCTT  
TTAGCTTACCAAGTGGTTTGCAATATAAAATAATTTCAAAGGGTGTATGGTGCTAAACCTT

360 370 380 390 400 410  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----  
L.feeleii\_sgl  
L.lansingensis  
L.jamestowniensis  
L.jamestowniensis\_IMVS-70  
L.hackeliae\_sgl  
L.brunensis  
L.brunensis\_IMVS-594  
L.brunensis\_KV-11  
**Consensus**

CAAAAGATGACACTGTCACTGTTGAATACACTGGCAAAGTTAATTGATGGCCAGGTTTTTG  
CAAAAATGATACTGTGACTGTTGAATATACGGGCAAATTAATTGACGGCCAAAGTTTTTG  
CCAAAGGATACCGTTACTGTTGAATACACTGGGTAAGTTAGTTGATGGTCAAGTTTTTG  
CCAAAGGATACCGTTACTGTTGAATATACACTGGCAAAGTTAATTGATGGTCAAGTTTTTG  
CTAAAGATGATACTGTTACCGTTGAATACACTGGTACATTAATTGATGGTCAAGTTTTTG  
CTAAAGAGGACTGTTACCGTTGAATACACTGGTACACTGATTGATGGCCAAAGTTTTTG  
CTAAAGAGGACTGTTACCGTTGAATACACTGGTACACTGATTGATGGCCAAAGTTTTTG  
CTAAAGAGGACTGTTACTGTTGAATACACTGGTACACTGATTGATGGCCAAAGTTTTTG  
CTAAAGAGGACTGTTACTGTTGAATACACTGGTACACTGATTGATGGCCAAAGTTTTTG

420 430 440 450 460 470  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----  
L.feeleii\_sgl  
L.lansingensis  
L.jamestowniensis  
L.jamestowniensis\_IMVS-70  
L.hackeliae\_sgl  
L.brunensis  
L.brunensis\_IMVS-594  
L.brunensis\_KV-11  
**Consensus**

ATAGCACTGAAAAACGGGTAAGCCTGCTACGTTCAAAGTATCACAGGTTATCCCTGGCT  
ACAGTACCGAAAGAACCGGTAACCCAGCAACGTTCAAAGTATCTCAAGTAATACCAAGGCT  
ACAGCACTGAAAGAACCGGCAAACTGCTACTTTCAAAGTGTCTCAAGTTATTCCTGGGT  
ACAGCACTGAAAGAACCGGCAAACTGCTACTTTCAAAGTATCTCAAGTTATTCCTGGAT  
ATAGTACTGACCGAACCTGGCAAGCCAGCTACGTTCAAAGTATCACAGGTTATCCCTGGCT  
ACAGTACCGATAAAGCTGGTAAACCCAGCCACTTTCAAAGTATCACAGGTTATTCCTGGGT  
ACAGTACCGATAAAGCTGGTAAACCCAGCCACTTTCAAAGTATCACAGGTTATTCCTGGAT  
ATAGTACCGATAAAGCAGGTAACCCAGCCACTTTCAAAGTATCACAGGTTATTCCTGGAT  
ATAGTACCGATAAAGCAGGTAACCCAGCCACTTTCAAAGTATCACAGGTTATTCCTGGAT

480 490 500 510 520 530  
|-----|-----|-----|-----|-----|-----  
L.feeleii\_sgl  
L.lansingensis  
L.jamestowniensis  
L.jamestowniensis\_IMVS-70  
L.hackeliae\_sgl  
L.brunensis  
L.brunensis\_IMVS-594  
L.brunensis\_KV-11  
**Consensus**

GGACTGAAGCATTACAATTAATGCTGCGGTTCTACTGGGAAGTCTATGTTCTGCGCG  
GGACTGAGGCTCTGCAATTAATGCTGCTGGTTCAACTTGGGAAGTATATGTTCTGCGCG  
GGACTGAAGCATTACAATTAATGCTGCTGGCTCAACTTGGGAAGTATATGTTCTGCGCG  
GGACTGAAGCATTACAATTAATGCTGCTGGCTCAACTTGGGAAGTATATGTTCTGCGCG  
GGACTGAAGCATTACAATTAATGCTGCTGGCTCAACTTGGGAAGTATATGTTCTGCGCG  
GGACTGAAGCATTACAATTAATGCTGCTGGCTCAACTTGGGAAGTATATGTTCTGCGCG  
GGACTGAAGCATTACAATTAATGCTGCTGGCTCAACTTGGGAAGTATATGTTCTGCGCG  
GGACTGAAGCATTACAATTAATGCTGCTGGCTCAACTTGGGAAGTATATGTTCTGCGCG  
GGACTGAAGCATTACAATTAATGCTGCTGGCTCAACTTGGGAAGTATATGTTCTGCGCG

540 550 560  
|-----|-----|-----  
L.feeleii\_sgl  
L.lansingensis  
L.jamestowniensis  
L.jamestowniensis\_IMVS-70  
L.hackeliae\_sgl  
L.brunensis  
L.brunensis\_IMVS-594  
L.brunensis\_KV-11  
**Consensus**

GTCTTGCCCTATGGTCCACGCAGTGT  
ATTTAGCTTATGGTCCCTCGAAGCGT  
ATTTGGCTTATGGTCCCTCGTAGTGT  
ATTTGGCTTATGGTCCCTCGTAGTGT  
ATTTAGCCTATGGTCCCTCGCAGTGT  
ATTTAGCTTATGGTCCCTCGCAGTGT  
ATTTAGCTTATGGTCCCTCGCAGTGT  
ATTTAGCTTATGGTCCCTCGCAGTGT  
ATTTAGCTTATGGTCCCTCGCAGTGT  
ATTTAGCTTATGGTCCCTCGCAGTGT



**Příloha č. 5:** Environmentální a klinické kmeny vložené do EWGLI databáze *L. pneumophila* izolované v ČR k 9. 4. 2012. Celkem 37 izolátů z 6086 v databázi. Červeně jsou označeny kmeny prezentované v této diplomové práci.

Identifikační číslo	Označení	Alelický profil	ST	sg.	mAb	Zdroj	Město	Souvislost
EULV0992	Fr	6,10,19,28,19,4,9	328	3	NA	Environmental	Hradec Kralove	Unknown
EULV0101	UI	6,6,17,8,13,11,3	339	5	NA	Clinical	Hradec Kralove	Unknown
EULV1012	Ku	3,6,1,7,14,9,11	340	2	NA	Clinical	Pisek	Community-acquired
EULV1116	W03-101	2,6,17,14,12,8,8	413	1	France	Environmental	Unknown	Routine
EULV2710	Bur	4,7,11,3,11,12,9	42	1	Benidorm	Clinical	Karlovy Vary	Travel-associated
EULV2711	TOS-1	4,7,11,3,11,12,9	42	1	Benidorm	Environmental	Karlovy Vary	Travel-associated
EULV2712	ZL-6	6,10,15,24,9,14,16	592	1	Benidorm	Environmental	Karlovy Vary	Routine
EULV2713	KV-1	6,10,15,24,9,14,16	592	1	Benidorm	Environmental	Karlovy Vary	Travel-associated
EULV2930	Pav-1	17,10,3,28,9,4,11	640	1	Oxford/OLDA	Clinical	Frydek Mistek	Nosocomial
EULV2931	Stu-1	7,10,17,3,17,11,11	641	1	Knoxville	Clinical	Praha	Community-acquired
EULV2942	PI 15-3	2,10,3,15,9,4,3	648	6	NA	Environmental	Unknown	Routine
EULV3133	BLA	3,10,1,28,14,9,13	93	3	NA	Clinical	Unknown	Nosocomial
EULV4088	KV-14	2,10,1,3,9,4,3	787	6	NA	Environmental	Karlovy Vary	Routine
EULV4089	KV-7	2,6,17,14,12,8,11	788	1	Allentown/France	Environmental	Karlovy Vary	Routine
EULV4092	Bar	2,10,1,28,9,4,13	789	3	NA	Clinical	Plzen	Community-acquired
EULV4093	Fa	2,10,3,28,9,4,3	728	3	NA	Clinical	Praha	Community-acquired
EULV4094	FD-3(1)	2,10,3,28,9,4,3	728	3	NA	Environmental	Praha	Community-acquired
EULV4095	FD-3(2)	2,10,3,28,9,4,3	728	3	NA	Environmental	Praha	Community-acquired
EULV5091	BR 2010	3,10,1,28,14,9,13	93	3	NA	Environmental	Praha	Travel-associated
EULV5128	Sta 2011	1,4,3,1,1,4,6	1011	1	NT	Clinical	Jicin	Community-acquired
EULV5129	JC1/1 2011	1,4,3,1,1,4,6	1011	1	NT	Environmental	Jicin	Community-acquired

Identifikační číslo	Označení	Alelický profil	ST	sg.	mAb	Zdroj	Město	Souvislost
EULV5592	F13 2011	2,10,3,15,2,1,20	1090	1	NT	Environmental	Luhacovice	Travel-associated
EULV5593	F13 2011	2,10,3,15,2,1,20	1090	1	NT	Environmental	Luhacovice	Travel-associated
EULV5594	F17 2011	2,10,3,15,2,1,20	1090	1	NT	Environmental	Luhacovice	Travel-associated
EULV6042	Ho 2007	2,3,9,10,2,1,6	23	1	NT	Clinical	Plzen	Community-acquired
EULV6043	Di 2010	2,3,9,10,2,1,6	23	1	Allentown /France	Clinical	Praha	Community-acquired
EULV6044	Hru 2007	8,10,3,15,18,1,6	62	1	NT	Clinical	Plzen	Community-acquired
EULV6045	HotL1	3,4,1,3,35,9,11	182	1	NT	Environmental	Praha	Routine
EULV6056	HotO	3,4,1,3,35,9,11	182	1	NT	Environmental	Praha	Routine
EULV6057	Bro 2010	8,10,3,15,18,1,6	62	1	NT	Clinical	Plzen	Community-acquired
EULV6058	Vr 2011	3,13,1,28,14,9,3	68	6	NA	Clinical	Plzen	Nosocomial
EULV6059	OC D 2011 -594	3,13,1,28,14,9,3	68	6	NA	Environmental	Rokycany	Routine
EULV6060	Fa 2010	8,10,3,15,18,1,6	62	1	NT	Clinical	Ceske Budejovice	Unknown
EULV6061	FN B 2008	1,4,3,1,1,1,1	1	1	NT	Environmental	Brno	Routine
EULV6062	Kno 2010	8,10,3,15,18,1,6	62	1	NT	Environmental	Kostelec na Hane	Routine
EULV6063	Mi 2010	1,4,3,1,1,1,1	1	1	NT	Clinical	Vrchlabi	Nosocomial
EULV6064	Pa 2012	1,4,3,1,1,1,1	1	1	Oxford	Clinical	Havirov	Nosocomial

NA = Not Applicable; NT = Not Tested; NK = Not Known