

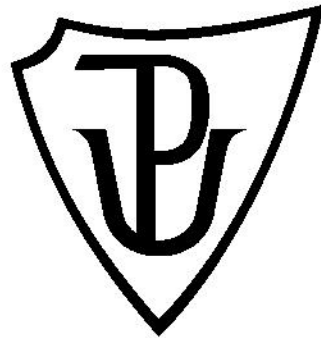
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Petra Škrobalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Zdravotní riziko legionel ve vlacích a jeho hodnocení

Bakalářská práce

Petra Škrobalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: RNDr. Vladimír Drašar

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením RNDr. Vladimíra Drašara z Národní referenční laboratoře pro legionely (NRL legionely) ve Vyškově. Čerpala jsem z uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci 26. 7. 2013

Tato bakalářská práce vznikla za podpory VKV Praha s.r.o. pracoviště Studénka, která nabídla úhradu pro odběry vod a provedení analýz.

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Vladimírovi Drašarovi, vedoucímu NRL legionely, ZÚ Ostrava, za cenné rady, vedení práce, konzultace a poskytnutí pracovních podmínek na pracovišti NRL legionely ve Vyškově.

Souhrn

Bakterie rodu *Legionella* jsou typické vodní mikroorganismy, které se vyskytují v přírodním prostředí. Jak v jezerech a řekách, tak i v půdě. Z těchto rezervoárů se pak dostávají přes úpravný vody do vodovodních systémů budov, průmyslových technologií a různých vodních atrakcí. Touto cestou se mohou legionely dostat i do uzavřených systémů kolejových vozidel, letadel, trajektů, kde mohou představovat určité zdravotní riziko pro cestující veřejnost.

Cílem této práce byla analýza zdravotního rizika legionel ve vlakových soupravách, požadovaná zahraničním odběratelem po českém výrobci hygienických kabin. Byly prověřeny jak vlakové jednotky pro domácí tratě, tak rychlíky jezdící i mimo území ČR.

Bylo odebráno standardním způsobem 18 vzorků z hygienických kabin vagonů včetně napájecí vody v jednotlivých depech. 14 z nich bylo pozitivních na přítomnost legionel. Převládala *L. pneumophila* sg. 1 a sg. 12, *L. anisa*. Sekvenační analýza SBT ukázala, že se v těchto systémech mohou vyskytovat i typy, které jsou pro cestující veřejnost nebezpečné (ST1). Byly nalezeny i dva zcela nové druhy, potvrzené sekvenací genu *mip*.

Na základě těchto zjištění byla navržena nápravná opatření vzhledem ke konstrukci systému zásobování vodou, jejímu ohřevu a možné dezinfekce. Prověřena byla i možnost použití UV lampy na koncovém výtoku.

Takováto studie dosud nebyla v tomto rozsahu v literatuře publikována.

Summary

Bacteria of the genus *Legionella* are typical water microorganisms that commonly occur in wet environments. Both in lakes, rivers and in soil. They can pass through water treatment processes and get thus into potable water systems of buildings, industrial technologies and various water features. This is likely the way how legionella can colonize closed systems of railway carriages, aircrafts and ferries. Their hygiene cabins can represent a health risk to passengers and staff.

Objective of the work was to analyze the risk and prevention of legionella on trains, required by a foreign customer and a Czech manufacturer of the cabins. Both domestic inter city trains and the international ones were included in the study.

18 samples were taken from sinks of the cabins, including feeding water from depositions in a standardised way. 14 of them was positive for the presence of legionella. *L. pneumophila* sg. 1 and 12 prevailed, followed by *L. anisa*. Gene sequencing analysis showed that potentially dangerous SBT can be found there (ST1). Two novel species were also detected in toilet warm water, confirmed by serology and *mip* sequencing.

Remedial measures have been proposed in respect with the design of the water supply system, heating and its chlorine disinfection. The possible use of a UV lamp fitted to a tap was also tested.

Such a complex study has not been published in literature so far.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce.....	9
3	Literární přehled.....	10
3.1	Úvod.....	10
3.2	Taxonomie	10
3.3	Morfologie	11
3.4	Výskyt.....	12
3.5	Patogeneze	13
3.6	Léčba.....	14
3.7	Metody detekce legionel	14
3.7.1	Kultivace.....	14
3.7.2	Přímá imunofluorescence	15
3.7.3	Detekce močového antigenu.....	15
3.7.4	Detekce nukleových kyselin pomocí PCR	16
3.7.5	Sérologie.....	16
3.7.6	Typizace <i>Legionella</i> spp.....	17
4	Úvod do vlastní práce.....	18
5	Legislativa	20
5.1	Základní legislativa železničního provozu	20
5.1.1	Norma UIC 563	20
5.1.2	HIGHT SPEED 2008/232/ES.....	21
5.1.3	LOCPAS 2011/291/ES	21
5.2	Legislativa o vodě.....	24
5.2.1	Směrnice o jakosti vody určené k lidské spotřebě.....	24
5.2.2	Vyhláška o pitné a teplé vodě.....	24
5.3	Legislativa bakterie <i>Legionella</i>	25
6	Sociální zázemí vlakových souprav	27
7	Materiál a metody.....	32
7.1	Příprava kultivačního média	34
7.2	Kultivace.....	34
8	Výsledky.....	38

9	Diskuze.....	42
10	Závěr.....	46
11	Použité zkratky	47
12	Literatura	48
13	Příloha.....	52

1 Úvod

Tato bakalářská práce je zaměřena na zdravotní riziko legionel ve vlacích. Téma bylo vybráno na základě požadavků zahraničního zákazníka, který si vyžádal analýzu rizika legionela u nových vlakových modulů WC, které dodává český výrobce do vlakových souprav. Tato problematika je zatím odbornou veřejností přehlížena. V literatuře chybí relevantní data, chybí i jednotná legislativa jak na národní, tak na evropské úrovni.

Rešeršní část práce je zaměřena na obecnou charakteristiku rodu *Legionella*. Jeho taxonomii, výskyt v prostředí a v umělých systémech vytvořených člověkem, na epidemiologii, klinické aspekty, prevenci a legislativu. Včetně té, která má vztah k prostředkům hromadné dopravy. Zdůrazněny jsou nejen problémy konstrukční, ale i zdravotně rizikové, pokud je lze v některých evropských směrnících najít. Probrány jsou i zkušenosti ze dvou zemí, které se rovněž snaží se s touto problematikou nějak vyrovnat (Itálie, Velká Británie).

Praktická část zahrnuje vlastní experimentální práci. Analýzu zdrojů pitné vody a její odběr v depech a WC modulech u vybraných vlakových souprav různých konstrukcí. Mikrobiologické zpracování vzorků, identifikaci izolátů, jak sérologicky, tak sekvenčními technikami. Včetně vyhodnocení rizika nalezených typů legionel.

Probrány jsou i jednotlivé konstrukční typy WC modulů s návrhem možných úprav, včetně dezinfekce celého systému pro zajištění prevence, který byl i prakticky odzkoušen.

Dosažené výsledky mohou být dobrým vodítkem pro komplexní posouzení zdravotního rizika jak pro zahraničního klienta, tak pro domácího výrobce, který může našich závěrů využít pro praktická vylepšení.

2 Cíle práce

- Vypracování rešerše stávajících znalostí o bakterii *Legionella*
- Hygienické zázemí vlakových souprav
- Laboratorní zpracování vzorků odebrané vody z vlakových souprav
- Analýza rizika kolonizace hygienických buněk legionelami.
- Návrh nápravných technických opatření pro zajištění prevence

3 Literární přehled

3.1 Úvod

Legionářská nemoc se poprvé objevila v roce 1976 v hotelu Belevue ve Philadelphii, PA, během sjezdu Amerických vojenských legionářů. Nakazilo se 221 zúčastněných, zemřelo 34 lidí. Klinicky onemocnění probíhalo jako těžká pneumonie s mimoplicními manifestacemi. Jako zdroj infekce byly nakonec prokázány chladicí věže na střeše hotelu (Fraser a kol., 1977). Původce nákazy byl nejprve prokázán virologickými technikami, později se podařilo sestavit vhodné pevné kultivační médium. Rod *Legionella* byl popsán o tři roky později (1979) a bakterie pojmenována *Legionella pneumophila* na počest onoho sjezdu legionářů. O devět let později, v roce 1985 se objevila první velká epidemie v anglické nemocnici ve Staffordu, kde se potvrdilo 68 případů nákazy a 22 lidí zemřelo (O'Mahony a kol., 1990). Vývojem kultivačních metod byla umožněna detekce dalších druhů legionel, které mohou vyvolávat onemocnění u člověka. Při retrospektivních studiích se ukázalo, že legionely bylo možno nalézt už v zamražených vzorcích uložených v CDC Atlanta v 1943 a v 1947. V roce 1954 byla izolována bakterie (*L.lytica*) z volně žijících améb v půdě v Polsku Drozanskim (Fields a kol., 2002).

3.2 Taxonomie

Doména:	Bacteria
Oddělení:	Proteobacteria
Třída:	Gammaproteobacteria
Řád:	Legionellales
Čeleď:	Legionellaceae
Rod:	<i>Legionella</i>

Od doby rozpoznání legionel byly izolovány různé druhy bakterie z pacientů, které vedly k vytvoření nového bakteriálního rodu *Legionella* patřící do čeledi Legionellaceae. Nejdříve byly *Legionelly* rozděleny do tří samostatně oddělených rodů *Legionella*, *Fluoribacter* a *Tatlockia* na základě nízké DNA hybridizační hodnoty mezi některými druhy rodu *Legionella*. Na základě pozdějších studií analýzy 16S rRNA bylo potvrzeno, že čeleď

Legionellaceae je monofyletická podskupina v rámci oddělení Proteobacteria. Příbuznost mezi druhy rodu *Legionella* je 70%. Fylogeneticky příbuzným je bakteriální patogen *Coxiella burnettii*, která je etiologickým agens horečky Q. Mají podobný intracelulární vývoj a mohou využívat společné geny k infekci hostitele (Fields a kol., 2002).

Počet druhů *Legionella* stále roste. V dnešní době je známo 58 druhů. (tab. 1)

Tab. 1 Přehled druhů legionel - únor 2013

<i>L. adelaidensis</i>	<i>L. londoniensis</i>
<i>L. anisa</i>	<i>L. longbeachae</i>
<i>L. beliardensis</i>	<i>L. lytica</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. maceachernii</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. massiliensis</i>
<i>L. brunensis</i>	<i>L. micdadei</i>
<i>L. busanensis</i>	<i>L. moravica</i>
<i>L. cardiaca</i>	<i>L. nagasakiensis</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. nautarum</i>
<i>L. drancourtii</i>	<i>L. oakridgensis</i>
<i>L. dresdenensis</i>	<i>L. parisiensis</i>
<i>L. drozanskii</i>	<i>L. pneumophila</i>
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. quateirensis</i>
<i>L. erythra</i>	<i>L. quinlivanii</i>
<i>L. fairfieldensis</i>	<i>L. rowbothamii</i>
<i>L. fallonii</i>	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. feeleii</i>	<i>L. sainthelensi</i>
<i>L. geestiana</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. genomospecies</i>	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. germanii</i>	<i>L. spiritensis</i>
<i>L. gratiana</i>	<i>L. steigerwaltii</i>
<i>L. gresilensis</i>	<i>L. taurinensis</i>
<i>L. hackeliae</i>	<i>L. tucsonensis</i>
<i>L. cherii</i>	<i>L. tunisiensis</i>
<i>L. impletisoli</i>	<i>L. steelei</i>
<i>L. israelensis</i>	<i>L. wadsworthii</i>
<i>L. jamestowniensis</i>	<i>L. waltersii</i>
<i>L. jordanis</i>	<i>L. worsleiensis</i>
<i>L. lansingensis</i>	<i>L. yabuuchiae</i>

3.3 Morfologie

Rod *Legionella* jsou tenké pleomorfní, aerobní, gram-negativní bakterie, jejichž rozměry jsou 2 - 20 µm na délku a do šířky dosahují až 0,3 - 0,9 µm. Jedná se o dlouhé vláknité formy, které nesporulují a pohybují se pomocí dvou a více polárních bičíků. V jejich stěnách jsou

obsaženy rozvětvené 2,3 - dihydroxy - mastné kyseliny, které jsou charakteristické pouze u tohoto rodu a u jiných bakterií se nevyskytují. Na vnější membráně se vyskytují důležité antigeny, z nichž některé jsou druhově specifické, a lipopolysacharid, který je hlavním specifickým antigenem pro sérologickou skupinu (Bednář a kol., 1996; Fields a kol., 2002).

3.4 Výskyt

Legionella je všudypřítomná bakterie vyskytující se v přírodních i umělých vodních systémech od jezer, potoků po klimatizační věže, fontány či lázeňské koupele. Byly nalezeny v pramenech, podzemních i mořských vodách, ale také ve vlhké půdě či kompostech. Druh *L. tunisiensis* byla nalezena ve slané vodě (Pagnier a kol., 2012) a druh *L. longbeachae* ve vlhké půdě (Fields a kol., 2002). Jsou to bakterie mající na krátkou dobu toleranci ke kyselému prostředí. Odolají i pH 2. Právě z některých znečištěných podzemních vod půdou, může být bakterie zanesena do nádrží a systémů s vodou, kde má ideální podmínky pro svůj růst (WHO, 2007). V umělých vodních systémech může být například přítomna v klimatizaci, zvlhčovačích vzduchu, odpařovacích chladících věží, sprchách i toaletách, vířivkách či lázních. Podmínky přežití bakterií se velice liší. Bakterie byly nalezeny ve vodách při teplotách od 6 °C po 64 °C. Optimální teplotou pro jejich růst je rozsah mezi 25 - 55 °C. Organismy nejsou schopny se množit při teplotách nižších než 20 °C a nejsou schopny přežít teploty vyšší než 65 °C (Hosein a kol., 2005). Mohou však zůstat v latentní fázi a čekat na příznivější podmínky, aby mohlo dojít opět k jejich rozmnožování (Woods, RSSB, 2012). Bylo také prokázáno, že bakterie *Legionella* se množí ve 14 druzích améb, dvou druhů obrvených protozoí a s jedním druhem řasy se slizovitým obalem (Fields a kol., 2002). Růst legionel v nepřítomnosti prvoků zatím nebyl zatím přesvědčivě dokumentován. Nicméně některé techniky pro studium biofilmů ukazují, že toto množení zřejmě možné je (Rogers a Keevil, 1992). Legionely se stávají nedílnou součástí těchto biofilmů. Zde jsou nutričně soběstačné a podílejí se na vzájemném soužití i s dalšími bakteriálními druhy (pseudomonády, G- nefermentující tyčky, mykobakterie). V tomto prostředí jsou navíc daleko odolnější k dezinfekcím a jiným nepříznivým podmínkám než ve své planktonní fázi. Biofilm se může tvořit na místech všude tam, kde má k tomu optimální podmínky. Vhodné povrchy, materiály, stagnaci vody, dostatek živin. Kontrola biofilmu je klíčovým opatřením pro prevenci legionelóz ve vodních systémech. Je možno mu bránit správnou technickou konstrukcí, omezením přístupu živin nebo desinfekcí oxidačními biocidy (Woods, RSSB, 2012).

3.5 Patogeneze

Legionella je lidský patogen. Inhalace či aspirace kontaminovaných vodních částic vede k vyvolání infekce u člověka. Inhalované částice musí být malé, aby pronikly do nejhlubší části plic - alveol, ale zároveň musí být dostatečně velké, aby obsahovaly aspoň jednu bakteriální buňku. Částice o velikosti 1 - 3 mikronu splňuje kritéria. Takto malé částičky nejsou viditelné pouhým okem, ale mohou poletovat delší dobu ve vzduchu a nemusí být nutně ve vlhkém prostředí (Woods, RSSB, 2012). Bakterie *Legionella* je volně žijící organismus, i když její schopnost se pomnožovat extracelulárně je omezená. Proto infikuje mikroorganismy vyskytující se v biofilmech a množí se uvnitř nich. Buď parazituje, nebo tvoří komenzální vztah s volně žijící amébou. Vrozenou schopností bakterie je replikovat se v různých druzích améb nebo v lidských alveolárních makrofázích. Interakce *L. pneumophila* s eukaryotickou buňkou je klíčem k pochopení schopnosti patogenu způsobit Legionářskou nemoc. Po vstupu do plic jsou bakterie napadeny monocyty a makrofágy v alveolární tkáni. K zabránění vstupu do lyzozomální dráhy slouží systém IV, známý jako Dot/Icm systém. Následně vzniká vakuola obsahující legionelu, která zabrání fúzi lyzozomu s vakuolou a nedochází tak k usmrcení bakteriálních buněk. Spíše naopak, dojde k apoptóze plicních buněk, kdy může dojít k nekróze plicní tkáně a vzniku pneumonie. Usmrcená plicní buňka pak vydává novou replikovanou generaci mikrobů schopných infikovat další buňky. Prozatím nebyl prokázán přenos infekce z člověka na člověka (Zink a kol., 2002; Macela a kol., 2006). Projevy *Legionella* infekce jsou respiračním typem. Jedná se o dva druhy onemocnění, které jsou velice podobné chřipce. První formou je legionářská nemoc, což je vlastně zápal plic (pneumonie) a druhým typem je Pontiacká horečka. Pontiacká horečka, která nese své jméno po městě Pontiac v Michiganu, se vyskytla poprvé v roce 1968. Je to mírnější projev nákazy bakterií *Legionella*. Onemocnění se projevuje jako chřipka. Je provázena horečkou, bolestmi hlavy, nevolností, malátností, ale nejsou zde viditelné příznaky zápalu plic (Glick a kol., 1978). Příznaky většinou odezní během 3 - 6 dní. Není známo, že by rizikové faktory - věk, pohlaví, kouření - mohly nějak ovlivnit infekci (Tossa a kol., 2006). Legionářská nemoc má příznaky zápalu plic virového typu. Liší se závažností onemocnění od mírné nemoci až po možnou hospitalizaci v nemocnici. Příznaky pneumonie jsou suchý dráždivý kašel, bolest na hrudi, spíše lehce zvýšená teplota bolesti hlavy a svalů. U některých pacientů může nastat zmatenost, zvracení a gastrointestinální poruchy. Komplikací nemoci je také selhání orgánů - jater a ledvin. Tento stav se může stát i smrtelným. Většina pacientů rychle reaguje na antimikrobiální léčbu. Rekonvalescence je ale často delší než po obyčejné chřipce, může trvat

až několik týdnů či měsíců. Mezi rizikové faktory patří kouření cigaret, pití alkoholu, imunosuprese (stav snížené imunity) a již probíhající plicní onemocnění. Také platí, že náchylnější k infekci jsou muži (Stout a Yu, 1997; Woods, RBBS 2012).

3.6 Léčba

Účinnou terapií legionářské nemoci je včasné podávání antibiotik. Lékem volby jsou buď antibiotika makrolidové řady nebo chinolony. V praxi se osvědčují clarithromycin nebo azithromycin. Z chinolonů ciprofloxacin nebo levofloxacin (Fields a kol., 2002).

3.7 Metody detekce legionel

V současné době se diagnóza opírá o využití specifických testů, často v jejich kombinaci. Mezi využívané laboratorní metody k detekci legionel se řadí kultivace, detekce močového antigenu, přímá imunofluorescence, detekce nukleových kyselin a detekce specifických protilátek v séru. Výhody a nevýhody metod jsou diskutabilní (Murdoch, 2003). Laboratorně lze vyšetřovat z různých druhů klinického materiálu jako je například sputum, respirační sekret z bronchoalveolární laváže, krve, moči. Kultivace by měla být povinná, pokud došlo k hospitalizaci pacienta s pneumonií nejasné etiologie. Pozitivní kultivace je předpokladem k pozdější možnosti průkazu zdroje nákazy. Některé molekulární techniky jsou používány k určení podtypu kmene *L. pneumophila* v epidemiologických vyšetřeních. *Legionella pneumophila* je geneticky heterogenní, což umožňuje individuální „fingerprint“ každého druhu. Zvýšení dostupnosti a využívání diagnostických testů pomůže lépe charakterizovat epidemiologii legionářské nemoci, včetně jejího výskytu a geografických rozdílů. (Fields a kol., 2002)

3.7.1 Kultivace

Kultivace je považována za základní metodu pro důkaz diagnózy a umožňuje molekulární typizaci. Legionely rostou na půdách s vysokým obsahem aktivního uhlí, které chrání před detoxikací peroxidů v půdě a vznikající oxidací z cysteinu. Nejčastěji se používá agarová půda BCYE, Buffered Charcoal Yeast Extract. Tato půda je složena z kvasničného extraktu, ze zdroje L - cysteinu, aktivního uhlí a pyrofosfátu železitého. Cystein je důležitou aminokyselinou pro možný růst bakterie. Speciální pufr ACES udržuje pH v rozmezí 6,92 - 7,0. Půda může být obohacena ještě antibiotiky (cefamandol, anosimycin, vankomycin), které brání růstu doprovodným mikroorganismům. Na jiných půdách legionely nerostou (Fields a kol., 2002). Kultivované misky se inkubují při teplotě 36 +/-1 °C po dobu 7 dní. První odečet

se dělá po 3 dnech a pak každý další den dochází k posuzování výsledků. Legionely lze izolovat z různých typů vzorků, kdy nejlepší jsou vzorky z dolních cest dýchacích (např. sputum). Byla také úspěšně izolována i z bronchoalveolární laváže, tracheálního aspirátu, pleurální tekutiny, plicní biopsie a krve (Murdoch, 2003). Dle zprávy od Maiwalda a kol.(1998), je sputum méně vhodné než jiné respirační sekrety. Hlavně u pacientů s časnými stádii nemoci, kdy mají málo produktivní kašel. Proto je před kultivací sputa lepší vzorek předupravit zahřáním nebo okyselením.

Kolonie jsou bílošedé, jeví se jako konvexní a kruhové se středem podobajícím se obroušenému sklu. V průměru mají asi 1 mm, ale po několika dnech jsou schopné se rozrůst do větších velikostí. Okraje kolonií často vykazují modrou, zelenou nebo červenou autofluorescenci, díky ní se dají rozpoznat některé druhy rodu *Legionella* (Miskowski, 2007).

3.7.2 Přímá imunofluorescence

Tato metoda přímé imunofluorescence (DFA, Direct Fluorescent Antibody) byla jako první používána k detekci legionel v plicní tkáni a respiračních sekretech. Legionely mohou být detekovány v respiračních sekretech i po několika dnech zahájení antibiotické léčby. Výhoda je, že tato metoda poskytuje výsledek v rámci 2 - 4 hodin. DFA je také využívána k sérologické identifikaci kmenů *Legionella*. Fluorescenčně značené protilátky jsou k dispozici pro *L. pneumophila* a některé další druhy (Fields a kol., 2002). Problémy s citlivostí a specifičností omezily využití DFA v nepřítomnosti dalších prokazatelných testů pro diagnostiku infekce legionelou (Murdoch, 2003).

3.7.3 Detekce močového antigenu

Detekce močového antigenu vede k rychlému zjištění výskytu legionely v moči a může být tak užitečným nástrojem pro časnou diagnózu. Princip metody je založen na využití imunoanalýzy ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). V moči pacientů s legionářskou nemocí se vyskytuje specifický rozpustný antigen, který lze prokázat po 4 dnech od prvních příznaků. Může však v těle pacienta přetrvat i několik týdnů. Doba vyloučení antigenu je individuální. Toto testování dovoluje nasadit rychlou antibiotickou léčbu (Fields a kol., 2002). V dnešní době se vyskytují komerční soupravy pro detekci *L. pneumophila* *sg. 1* antigenu v moči pacientů s příznaky pneumonie. Firma Binax vyvinula imunochromatický test Binax NOW[®] Legionella. Tento test je snadný a může poskytnout výsledek během 15 minut. Pro detekci *L. pneumophila* *sg. 1* má test citlivost v rozmezí 70 -

100 % a specifita se blíží k 100 %. Nevýhodou těchto testů je, že až 40 % případů legionelózy jiného druhu nebo sérotypu zůstává neodhaleno (Murdoch, 2003).

3.7.4 Detekce nukleových kyselin pomocí PCR

PCR (polymerase chain reaction) představuje jeden z mála diagnostických testů pro detekci infekcí způsobených všemi známými druhy legionel. Většina zrychlených testů dokázala identifikovat pouze *L. pneumophila* sg. 1. PCR testy jsou používány k detekci DNA z environmentálních vzorků a také pro analýzu klinických vzorků, zejména z dýchacích cest. U PCR bylo opakovaně prokázáno, že má citlivost na detekci bakterie z dýchacích cest stejnou, ne-li lepší než kultivace (Murdoch, 2003). K detekci *Legionella* spp. jsou využívány geny 5S rRNA, 16S rRNA nebo *mip* (macrophage infectivity potentiator). Gen *mip* byl první molekulární cíl pro PCR detekci *L. pneumophila*. Obsahuje sekvence použitelné pro odlišení druhů legionel mezi sebou. Pro stanovení ostatních druhů legionel je amplifikován gen 16S rRNA. Bakterie není součástí lidské mikroflóry, proto nález legionelové DNA ve vzorku vede k průkazu infekce (Levin, 2009). První komerční test byl určen k detekci legionel z environmentálního zdroje. Byl založen na amplifikaci 5S rRNA a *mip* k detekci legionel. Použitím těchto souprav mohl vést proces k falešně pozitivním výsledkům, včetně kontroly. Během několika posledních let se techniky PCR zlepšily, zvláště pro přímé sledování fragmentů - real-time PCR. Použití real-time PCR urychluje diagnostiku legionely, objasnění role ostatních druhů legionel a zvyšuje přesnost (Fields a kol., 2002).

3.7.5 Sérologie

Sérologie se zabývá průkazem specifických protilátek a antigenů pomocí sérologických metod. Při detekci legionářské nemoci je využíván lidský imunoglobulin IgA, IgG a IgM. Tyto protilátky mohou reagovat s antigenem u *L. pneumophila*. Detekce imunoglobulinu IgM je využívána při infekční sérologii, protože IgM se objeví v průběhu nemoci. Přesto je ale IgM nespolehlivý marker pro měření akutní infekce, protože protilátky IgM mohou přetrvávat delší dobu. Autoři považují tuto hodnotu jako méně spolehlivou (Rojas a kol., 2005). Sérokonverze (zvýšení protilátek) může proto trvat i několik týdnů, což je hlavním omezením sérologických testů. Ve většině případů je zjištěno čtyřnásobné zvýšení protilátek v titru, ale v jiných případech to může trvat i několik měsíců (Murdoch, 2003). Mikroaglutinace, nepřímá imunofluorescence nebo ELISA jsou často využívané metody, které mohou být použity k diagnostice *L. pneumophila* sg. 1. I přes evidentní pomoc mají testy řadu významných omezení, které je potřeba si uvědomit. Příkladem může být výskyt jiného mikroorganismu

způsobující totéž onemocnění. Nevýhodou je také neschopnost přesně detekovat všechny druhy rodu *Legionella* a její séro skupiny. Test mikroaglutinace má výhodu oproti imunofluorescenci, jakou je snadné testování velkého počtu vzorků. Některé ELISA diagnostické soupravy jsou nyní již dostupné i komerčně (Fields a kol., 2002).

3.7.6 Typizace *Legionella* spp.

L. pneumophila sg. 1 lze rozdělit do několika podskupin různými technikami. Sérologická subtypizace využívá polyvalentní a monoklonální protilátky (MAbs). Umožňuje tak testovat velkou sérii vzorků. V roce 1986 byl navržen panel sedmi monoklonálních protilátek. Použitím těchto monoklonálních protilátek bylo určeno 12 podskupin rodu *Legionella* *L. pneumophila* sg. 1 (Helbig a kol., 1997). Tato metoda byla později dále rozpracována.

Kromě této typizace byly úspěšně využity i molekulární techniky, mezi které patří pulzní gelová elektroforéza (PFGE) a arbitrarily primed PCR. Jsou schopny rozlišit subtypy *L. pneumophila* sg. 1 a identifikovat zdroje nemoci způsobené kmeny legionely. Využití analýzy plazmidu k určení podtypu legionely ukázalo, že tato technika má omezené použití. V jednom šetření nedošlo k přenesení klinického kmene do plazmidu a environmentální kmen přenesen byl. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) byl využit k určení typu legionely buď samostatně nebo v kombinaci s rRNA nebo DNA. Postup RFLP byl nadále upraven pro použití PCR amplifikace konkrétního lokusu. Další metody využívané k určení podtypu *L. pneumophila* jsou detekce repetitivních elementů v DNA, polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) a sekvenční subtypizace (SBT). Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů představuje současný postup subtypizace. Má dvě varianty. Jedna používá restrikční enzym a selektivní primer a druhá využívá 2 restrikční enzymy a odpovídající primery. DNA je štěpena restrikčním enzymem (enzymy) a fragmenty jsou ligovány speciálně postavenými adaptéry. Následná PCR se specifickými primery prodlužuje fragmenty DNA. AFLP je metoda rychlá, univerzální a reprodukovatelná a jednodušší než PFGE (Fields a kol, 2002; Gaia a kol, 2003). Jednotlivé kmeny *L. pneumophila* lze typizovat metodou SBT. Jedná se o sekvenci sedmi genů - *flaA*, *mompS* a *proA*, *pilE*, *asd*, *mip* a *neuA*. SBT je založena na PCR amplifikaci a oboustranné sekvenci 7 vybraných genů (Ratzow a kol, 2007).

4 Úvod do vlastní práce

Mezi zdroje s výskytem vyšších koncentrací bakterie *Legionella* patří:

- chladicí věže a odpařovací kondenzátory
- vodní systémy s teplou a studenou vodou
- nemocnice
- hotely, ubytovny
- lázně, koupaliště, termální prameny
- zvlhčovače vzduchu, přístroje pro respiraci
- lodě, trajekty, jachty
- veřejná prostranství
- letadla
- vlaky

O možných rizicích nákazy bakterií je velice málo informací a zároveň příslušná legislativa chybí. Například žádná studie nebyla provedena na monitorování životního prostředí legionely v železničních vozidlech. Otázkou je, zda přítomnost bakterie ve vlacích může způsobit riziko onemocnění cestujícím či personálu. V rámci této otázky proběhlo pár studií. Závěrem bylo, že žádné potenciální ani skutečné riziko pro cestující neexistuje. Tím pádem nehrozí onemocnění a není potřeba navrhopat opatření pro snížení možné nákazy. Jediné údaje o výskytu bakterie *Legionella* ve vlakových nádržích pocházely z Itálie, Velké Británie a České republiky.

Přestože je nedostatek důkazů týkající se rizika a nebezpečí, neznamená to, že se nemůže tento problém stát skutečností. Během let 2011 - 2012 došlo ke zveřejnění několika článků, které se okrajově zmiňovaly o výskytu bakterie ve vlacích a možné nákaze cestujících. K první souvislosti mezi vlaky a bakterií došlo ve Skotsku.

„Přes všechny nesouvislosti mezi bakterií *Legionella* a železničními vozidly, jak uvedl mluvčí HPA, došlo ke zveřejnění, že byla *Legionella* detekována také v železniční soupravě ScotRail ve Skotsku. Během tohoto zveřejnění došlo k úmrtí tří lidí na legionářskou nemoc. Nebylo ale dokázáno, že nemoc byla vyvolána se spojením na vlaky. Jako preventivní opatření provedla společnost ScotRail okamžitou dezinfekci všech nádržích ve všech vlakových jednotkách a nechala provést další preventivní vyšetření na výskyt bakterie nezávislou firmou. Mluvčí

asociace vlakové provozní společnosti se nechal slyšet, že by provozovatelé vlaků v celé Velké Británii měli přijmout vhodná opatření pro řešení tohoto problému.“ (Anonymous, 2011)

Z Velké Británie pochází další článek prokazující výskyt bakterie *Legionella* na palubě vlaku.

„K mimořádným kontrolám několika desítek vlakových souprav bylo testováno na bakterii *Legionella* a také tam byla nalezena. Železniční společnosti v Suussexu - Southern, First Capital Connect a Southeastern - potvrdily, že došlo k testování, ale odmítly zveřejnit výsledky, v kolika toaletních nádržích na vodu se vyskytla bakterie. Stále trvají na tom, že rizika hrozící cestujícím jsou nízká, ale zároveň se snaží najít nápravná opatření. Shelley Atlas, členka skupiny Brighton Line Commuters, řekla, že zpráva o výskytu bakterie je velice znepokojivá pro cestující. Odpovědnost ale nyní leží na železničních společnostech. Jejich úkolem je udělat vše proto, aby nedošlo k ohrožení veřejného zdraví. Proto se dále hledají a přijímají nová opatření k řešení tohoto problému.“ (Gardner, 2012)

V Itálii si stanovili poprvé dohled kontroly životního prostředí na posouzení rizika kontaminace ve vlacích pro ochranu zdraví cestujících. Za vznikem této skupiny stál servis italských železnic a ústav Hygieny na universitě v Římě. Nechali tak vyšetřit klimatizační zařízení a vodu z toalet, které jsou hlavním zdrojem biologických činitelů. Voda na toaletách osobních vlaků, jak pro umyvadlo, tak pro sanitární služby, je dodávána s požadovanými vlastnostmi pro lidskou spotřebu. Vzhledem k systémům, kterými je voda vedena do nádrží, musí být označena jako voda nepitná, protože nedochází k zajištění podmínek pro uchování pitné vody. Osobní vlaky jsou vybaveny nádržemi z pryskyřice nebo oceli, jejichž objem je v rozmezí 200 - 1800 l v závislosti na typu vozu. Jsou umístěny pod střechou vozu, tím pádem voda stéká samospádem do záchodové buňky. Nádrže jsou doplňovány ve stanicích a v depech pomocí tlakových hadic umístěných po boku kolejnic. Plnění probíhá prostřednictvím napojení hadice na napájecí hrdlo pod vozem. Závěrem italské zprávy bylo, že by mělo docházet k monitorování vody na palubě vlaků a provádět rutinní opatření pro prevenci na zabezpečení nezávadnosti vody a zabránit tak možným případům rozšíření legionářské nemoci ve veřejné dopravě (Quaranta a kol., 2012).

5 Legislativa

5.1 Základní legislativa železničního provozu

Základní legislativa pro provoz, stavbu, údržbu, bezpečnost železničního provozu a konstrukce vozidel vychází z norem Mezinárodní železniční unie (UIC, Union International de Chemin de Fer), která byla založena roce 1922 se sídlem ve Francii. Unie koordinuje mezinárodní spolupráce mezi železnicemi, např. i v oblasti vytváření a předkládání specifikací a norem.

5.1.1 Norma UIC 563

Legislativa k provozu sociálních zařízení pro kolejová vozidla je stanovena v platné normě **UIC 563 - Hygienická zařízení a čištění osobních vozů, 8. vydání z 1. 1. 1990**. Norma popisuje požadavky na podmínky provozu sociálního zázemí vagonů a požadavky na vybavení těchto zařízení. Norma se nezabývá požadavky na složení doplňované vody, ale v textu se odvolává ještě na vodu užitkovou, která není již v rámci norem EU o vodě (pitné) definována. Z normy vyplývají tyto hlavní požadavky na vodní hospodářství (VH) pro mytí a splachování WC s ohledem na zásobování vodou:

- plnicí hrdlo chráněno proti znečištění
- zásobník vody (vodojem) přístupný a čistitelný
- povrchy a tvary dílů nejsou náchylné k usazení nečistot
- použití hygienických a chemicky stálých materiálů pro potrubí a rozvody
- u uzavřených systémů VH dimenzovat množství čerstvé vody minimálně na jednodenní provoz
- potrubí a vodojem konstruovat tak, aby mohl být systém bezzbytku vypuštěn a propláchnut

Z hlediska provozu doporučuje norma ohřívání vody na teplotu kolem 30 stupňů a cirkulaci teplé vody mezi ohřívacem a vodojemem.

Vzhledem ke vzniku a fungování Evropského společenství je i legislativa pro železnici postupně doplňována, aby se zajistila interoperabilita železniční dopravy. Normy, ve kterých se objevují požadavky na systémovou funkčnost sociálního zázemí pro cestující, jsou:

A) **2008/232/ES** (HIGHT SPEED)

B) **2011/291/ES** (LOCPAS)

5.1.2 HIGHT SPEED 2008/232/ES

ROZHODNUTÍ KOMISE ze dne 21. února 2008 o technické specifikaci pro interoperabilitu subsystému „Kolejová vozidla“ transevropského vysokorychlostního železničního systému 2008/232/ES (HIGHT SPEED), *(oznámeno pod číslem K (2006) 648)*

Výňatek z normy týkající se nakládání s vodou:

bod 4.2.2.5 Toalety

Ve vlacích přepravujících cestující musí být nainstalovány uzavřené toalety. Splachování je možné provádět čistou nebo recyklovanou vodou.

Není-li splachovacím prostředkem čistá voda, pak vlastnosti splachovacího prostředku musí být zaneseny do registru kolejových vozidel.

a bod **4.2.9.5 Zařízení pro doplňování vody**

4.2.9.5.1 Obecné

Nová zařízení pro doplňování vody v interoperabilní síti musí být doplňována pitnou vodou v souladu se směrnicí 98/83/ES a způsob jejich provozu musí zajišťovat, aby jakost vody v krajním místě pevné části těchto zařízení splňovala požadavky na jakost vody určené k lidské spotřebě stanovené v uvedené směrnici.

4.3.5.4 Toalety

Bod 4.2.2.5 této TSI specifikuje požadavky na splachovací systém toalet. V TSI subsystému „Provoz“ z roku 2006 není uvedena žádná specifikace týkající se pravidel pro vypracování plánu oběhu a servisu toalet.

5.1.3 LOCPAS 2011/291/ES

ROZHODNUTÍ KOMISE ze dne 26. dubna 2011 o technické specifikaci pro interoperabilitu subsystému kolejová vozidla – lokomotivy a kolejová vozidla pro přepravu osob transevropského konvenčního železničního systému **2011/291/EU** (LOCPAS), *(oznámeno pod číslem K (2011) 2737).*

Výňatek z normy:

bod 4.2.5.1 Sociální zařízení

Pokud je ve vozidlové jednotce k dispozici vodovodní kohoutek a pokud není voda z kohoutku zajišťovaná v souladu se směrnicí o pitné vodě (směrnice Rady 98/83/ES (1), musí být nápisem viditelně označeno, že voda z kohoutku *není pitná*.

Sociální zařízení (toalety, umývárny, bar/restaurační zařízení), pokud je jím vozidlová jednotka vybavena, nesmí umožňovat vypouštění žádných látek, které škodí zdraví lidí nebo poškozují životní prostředí.

Vypouštěné látky (upravená voda) musí splňovat platné evropské předpisy podle rámcové směrnice o vodě:

- Bakteriální obsah vody vypouštěné ze sociálních zařízení nesmí v žádném případě překročit hodnotu bakteriálního obsahu střevních enterokoků a střevních bacilů *Escherichia coli* specifikovanou jako „dobrou“ pro vnitrozemské vody ve směrnici Evropského parlamentu a Rady 2006/7/ES týkající se řízení kvality vody pro koupání.
- Při procesu úpravy vody nesmí být používány látky, které jsou uvedeny v příloze I směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/11/ES o znečištění způsobeném určitými nebezpečnými látkami vypouštěnými do vodního prostředí Společenství.

Aby byl omezen rozptyl vypouštěné tekutiny podél trati, musí k nekontrolovanému vypouštění z jakéhokoli zdroje docházet pouze směrem dolů, pod rámem skříně vozidla ve vzdálenosti do 0,7 metru od podélné osy vozidla.

V části normy "**Údržba**" pro doplňování vody:

bod 4.2.11.4 Zařízení pro doplňování vody

Platí pro všechny vozidlové jednotky vybavené vodovodními kohoutky.

Voda dodávaná do vlaku až do plnicího rozhraní s kolejovým vozidlem v interoperabilním systému je považována za pitnou ve smyslu směrnice 98/83/ES, podle specifikace uvedené v bodě 4.2.13.4 TSI Infrastruktura transevropského konvenčního železničního systému (2011/275/EU), kde je uvedeno:

4.2.13.4 Doplnování vody

Všechny TSI kategorie tratí

- 1) Pevná zařízení pro doplňování vody musí být kompatibilní s vlastnostmi vodovodního systému stanovenými v TSI HS a CR kolejová vozidla.
- 2) Pevná zařízení pro doplňování vody v interoperabilní síti se doplňují pitnou vodou vyhovující požadavkům směrnice Komise 98/83/ES
- 3) Způsob jejich provozu musí zajišťovat, aby jakost vody dodávané do kolejového vozidla splňovala požadavky na jakost vody stanovené ve směrnici 98/83/ES.

Vlakové zařízení (*vodní hospodářství vozidla*) na skladování vody nesmí představovat žádná dodatečná rizika pro lidi kromě rizik spojených se skladováním vody doplňované v souladu s výše uvedenými ustanoveními.

Tento požadavek se považuje za splněný na základě posouzení materiálu a kvality potrubí a těsnění. Materiál musí být vhodný k přepravě a skladování vody vhodné k lidské spotřebě.

Směrnice EU **2011/291/EU** (LOCPAS) bodem 4.2.5.1 se tak zřejmě dostává do rozporu s požadavky směrnice Komise 98/83/ES o jakosti vody určené k lidské spotřebě, kde se definuje v článku 1 a hlavně v článku 2 voda určená k lidské spotřebě (voda pro veřejnost) jako voda pitná, pro vaření apod. Proto i k vodě používané v dopravním prostředku se musí přistupovat jako k vodě pitné a zajistit nezávadnost vody tak, aby nebyla snížena hygiena a bezpečnost spotřebitele a nebyla ohroženo zdraví cestujícího. Toto by se mělo promítnout i do ochrany vody před legionelami, protože systém zásobování vody ve vozidle je svým řešením (teplotní poměry ve vozidle) ideální pro kolonizaci těchto bakterií ve vodě. Z norem dále vyplývá, že voda na rozhraní mezi stacionárním plněním a vozidlem, musí splňovat směrnici 98/83/ES, tedy, že voda do vozidla je doplňována jako pitná.

Vedle mezinárodních a evropských norem si jednotlivé železnice zemí vytváří své směrnice pro provoz a údržbu vozidel. V rámci údržby vody České dráhy vydaly **Směrnici ředitele O12 č. 4/2012: Čištění a dezinfekce nádrží na pitnou vodu v jídelních a lůžkových vozech**. Pro provoz osobních vozů v současnosti v této oblasti nejsou stanoveny žádné směrnice ani nařízení.

5.2 Legislativa o vodě

Pitná voda je definována zákonem jako voda, která je zdravotně nezávadná a ani při trvalém požívání nezpůsobí onemocnění či jiné poruchy zdraví kvůli přítomnosti mikroorganismů nebo látek způsobující akutní, chronické či pozdní působení na zdraví člověka a jeho potomstvo. Musí to být taková voda, jejíž smyslově postižitelné vlastnosti a kvalita nezakazuje jejímu požívání a užívání pro hygienické potřeby fyzických osob. Nezávadnost vody se stanovuje hygienickými limity biologických, fyzikálních, chemických a mikrobiologických ukazatelů. Tato definice pitné vody je uložena v zákoně 258/2000Sb a vyhlášce 252/2004Sb., které se jí bezprostředně týkají.

5.2.1 Směrnice o jakosti vody určené k lidské spotřebě

Požadavky na vodu, která je používána v dopravních prostředcích jsou stanoveny základní směrnicí 98/83/ES a směrnice Evropské unie. Základní směrnice 98/83/ES definuje vodu určenou k lidské spotřebě jako veškerou vodu, jak v původním, tak v upraveném stavu (určenou k pití, vaření, přípravě potravin, ze zásobníků cisteren, v lahvích nebo kontejnerech). Výjimky tvoří přírodní minerální vody a léčivé vody. Musí být přijata opatření k zajištění zdravotně nezávadné a čisté vodě určené k lidské spotřebě. Voda nesmí obsahovat mikroorganismy, parazity a ani látky, které by mohly ohrozit zdraví člověka a splňovat normy jakosti povoleného množství výskytu bakterií. Pravidelně musí docházet ke kontrole jakosti vody určené k lidské spotřebě, zda nedošlo k překročení limitů výskytu bakterií a nebezpečných látek. Pokud by došlo k objevení nějakého mikroorganismu nebo látky, pro které není stanoven limit, musejí být dodatečně monitorováni a musí dojít k zjištění, že se nejedná o možné ohrožení lidského zdraví. Dojde-li k překročení stanovených hodnot, musí se přikročit k jejich nápravě tak, že dojde k obnovení jakosti vody pro lidské použití. Také musí dojít k takovému zajištění, aby při instalaci nových úpraven a rozvodů vody byly materiály a používané látky bezpečné pro lidskou spotřebu a nepřesahovaly tak nezbytně vyšší koncentrace než je nutné (směrnice 98/83/ES).

5.2.2 Vyhláška o pitné a teplé vodě

Existuje také vyhláška 252/2004, která stanovuje hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Tato vyhláška poukazuje na hygienické limity biologických, fyzikálních, chemických a mikrobiologických ukazatelů jakosti pitné vody, včetně pitné vody balené a teplé vody dodávané potrubím nebo vodovodem, teplé vody

vyráběné z individuálního zdroje pro účely osobní hygieny. Jak voda pitná, tak ani voda teplá nesmí obsahovat parazity, mikroorganismy a látky jakéhokoliv druhu, které by měly větší koncentraci a mohly tak ohrozit veřejné zdraví. Jak tato vyhláška ukazuje v případě biologických a mikrobiologických ukazatelů teplé vody i vody vyráběné z individuálního zdroje pro účely osobní hygieny, nesmí dojít k překročení limitu 100 KTJ/ 100 ml u bakterií rodu *Legionella*. Odběr vzorků pro stanovení ukazatele teplé vody se provede po minutovém odpuštění vody. Teplota vody po odtečení by neměla získat nižší teplotu než 50 °C, kvůli minimalizaci rozvoje legionel z rozvodu vody. Za vyhovující výsledky se stále považují hodnoty bez abnormálních změn. Jako mezní hodnota je stanovena pro nemocnice a jiná zdravotnická a ubytovací zařízení. Pro oddělení s hospitalizovanými pacienty se sníženou imunitou se vyžaduje limitní hodnota 0 KTJ/ 50 ml. Dojde-li k překročení mezních hodnot ukazatelů, musí se nutně opakovat odběr vzorků a pro ověření potvrdit nedodržení hygienických limitů. Popřípadě musí dojít ke kontrole po nápravných opatřeních (vyhláška 252/2004 Sb.).

5.3 Legislativa bakterie *Legionella*

Pro určení bakterie *Legionella* existuje mezinárodní norma ISO 11731, „Jakost vod - Stanovení bakterií rodu *Legionella*“. Podstatou normy je popis kultivačních metod pro izolaci organismů rodu *Legionella* a jejich stanovení. A také je použitelná pro identifikaci bakterie ze všech vodních prostředí včetně pitných, průmyslových a přírodních spolu s dalšími materiály, kterými jsou kaly, náplavy a sedimenty. Při práci s bakteriemi je potřeba dodržovat stanovená pravidla, aby nedošlo k možnému šíření. Vyskytnou-li se jakékoliv pochybnosti o možnosti inhalace aerosolu, je lepší pracovat v bezpečném očkovacím boxu. Podstatou zkoušky výskytu bakterie rodu *Legionella* ve vzorku je nutné zkoncentrování metodou membránových filtrů nebo odstředování. Aby nedocházelo k růstu další mikroflóry, je potřeba upravit část vzorku kyselinou a druhou teplem. Poté dojde k naočkování vzorků na povrch selektivního kultivačního média pro rod *Legionella* a nechá se inkubovat. Veškeré používané chemikálie pro výrobu médií a činidel musejí mít zaručenou analytickou jakost. Mohou se také používat komerčně dostupná činidla, dehydratované média a sérologické přípravky. Výsledky se stanovují počtem kolonie tvořící jednotky (KTJ) rodu *Legionella* vybráním tří kultivačních misek s největším počtem potvrzených kolonií. Počet KTJ rodu *Legionella* se stanoví vynásobením čísla koncentračním faktorem.

Hlavním důvodem tohoto předpisu je dokázat přítomnost nebo absenci bakterie *Legionella* ve vzorku. Udává se přítomnost/ absence *Legionella pneumophila* a předpokládaný výskyt/ nepřítomnost jiných druhů rodu *Legionella*. Nepřítomnost bakterie ve vzorku se uvádí jako „nedetekované“. V ideálním případě se určují séroskupiny všech izolátů *L. pneumophila* (ČSN ISO 11731).

6 Sociální zázemí vlakových souprav

Sociální zázemí a vodní hospodářství železničních vagonů prodělalo během trvání železnice mnoho technických změn a za dobu vývoje se změnila i legislativa provozování umýváren a toalet. V současné době je vývoj takový, že toalety nových nebo rekonstruovaných vozů jsou projektovány jako tzv. uzavřený systém vodního hospodářství, což znamená, že voda tekoucí ze zásobníku vody (vodojemu) je využita pro splachování toalety a poté je jímaná do odpadní nádrže. Jímky soupravy jsou potom obvykle centrálně vyčerpány na určeném stanovišti. U vysokorychlostních vozů nad cestovní rychlost 200 km/h je i odpadní voda z umyvadla svedena do odpadní nádrže. Jinak se voda z umyvadel stále vypouští pod vůz na trať.

Toalety s vodním hospodářstvím se v současnosti navrhují a dodávají jako kompaktní moduly (obr. 1), které se zabudují do vozidla jako stavebnicový celek.



Obr. 1 Modul WC (foto: VKV Praha)

K hlavním částem modulu WC vagonu patří:

- vlastní modul WC se zařizovacími předměty (např. zásobník na ručníky, na toaletní papír, madla, dávkovač mýdla, zrcadlo atd.)
- vodojem o objemech 200-400 litrů
- plnicí a přepadové potrubí vodojemu
- ohřívač vody
- vnitřní rozvody vody se systémem automatického vyprázdnění vodního hospodářství při možnosti zámrazu systému v zimním období
- mísa WC s podtlakovým systémem vyprázdnění
- odpadní nádrž o objemu 250-500 litrů
- elektronické řízení vodního hospodářství - jednoúčelový počítač s vlastním softwarem

Schéma vodního hospodářství je v příloze č. 1, kde v legendě jsou popsány jednotlivé prvky vodního hospodářství vozu.

Nádrž vodojemu (obr. 2) je vyrobena z nerezavějící oceli nebo z plastu a je izolována. Uvnitř nádrže jsou tzv. „vlnolami“ pro stabilitu vodojemu při jízdě vozidla. Nejčastěji bývá umístěna nad stropem toalety, tedy pod střešou, kde je v letních měsících vystavena tepelnému záření a může být ohřívána až nad teplotu 50 stupňů.



Obr. 2 Vodojem (foto: VKV Praha)

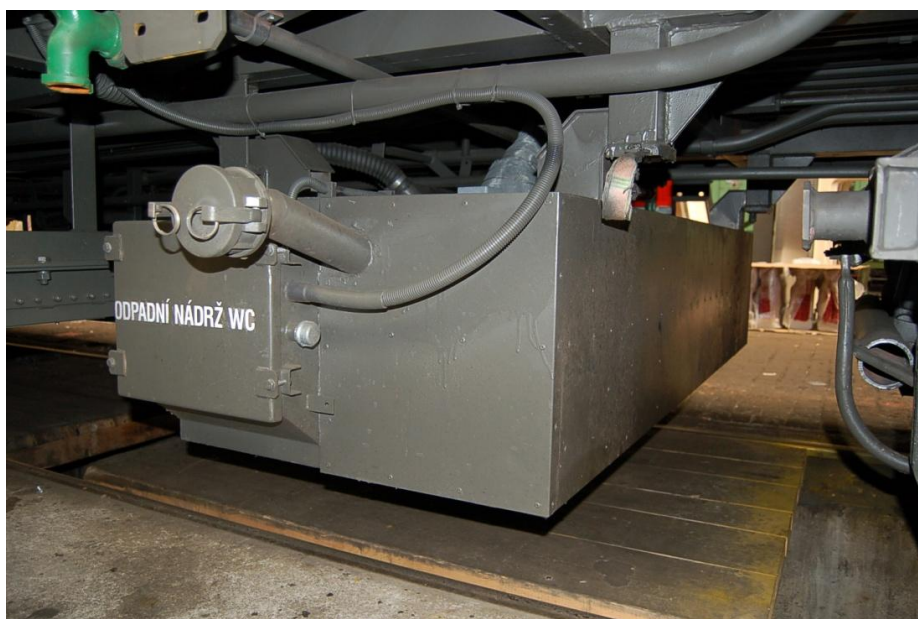
Plnicí a přeřadové potrubí slouží k naplnění vodojemu. Plnicí místa jsou po obou stranách vozu. Hrdlo bývá převážně nechráněno, může tak nastat jeho kontaminace. Vozidla jsou plněna z externího zdroje hadicemi v depech, který je napojen na veřejný vodovodní řád.

Vnitřní rozvody jsou vyrobeny z klasického vodoinstalačního materiálu schváleného pro vodovodní rozvody, které jsou převážně z mědi, mosazi, nerezů, popřípadě polypropylenu. Potrubí jsou osazeny regulačními a ovládacími prvky, např. ručními ventily, elektromagnetickými ventily, snímači teploty apod. Součástí vnitřních rozvodů je ohřívač vody, který ohřívá vodu na 35 stupňů a odtud je voda dávkována výtakovým raménkem (obr. 3) do umyvadla.



Obr. 3 Výtokové raménko (foto: D. Škrobal)

Odpadní nádrž může být interní nebo externí (umístěna pod vozem, obr. 4). Nádrž je vybavena temperací proti zamrznutí bioodpadu, snímači hladiny, odsávacím a odpadním potrubím.



Obr. 4 Odpadní nádrž pod vozem (foto: VKV Praha)

Na závěr může být konstatováno, že tvarová konstrukce nádrží, potrubí, fitinků, ovládacích prvků napomáhá významně adhezenci a kolonizaci bakterií a prohřívání vody v letních měsících podporuje tvorbu biofilmu a množení mikrobů.

7 Materiál a metody

Experimentální část byla provedena se vzorky vody, které byly získány z vlakových souprav na různých nádražích po České republice a z plnicích venkovních hadic nacházejících se venku nebo uvnitř dep. K odebrání vzorku bylo potřeba nejprve vodu odpustit (došlo k dvojitému odpuštění vody při automatickém nastavení) a změřit její teplotu. (obr. 5) Odebráno bylo přibližně 200 ml vody do sterilních skleněných lahví.(obr. 6) Po odebrání vody z vlakových souprav byla odpuštěna voda také z plnicích hadic. Některé z těchto hadic jsou stále venku a nejsou chráněny žádnou krytkou. (obr. 7) Vzorky byly odvezeny do Národní referenční laboratoře pro legionely ve Vyškově.



Obr. 5 Měření teploty vody na toaletě ve vlaku (foto: A. Škrobalová)



Obr. 6 Odběr vody do láhve (foto: A: Škrobalová)



Obr. 7 Plnicí hadice (foto: A. Škrobalová)

7.1 Příprava kultivačního média

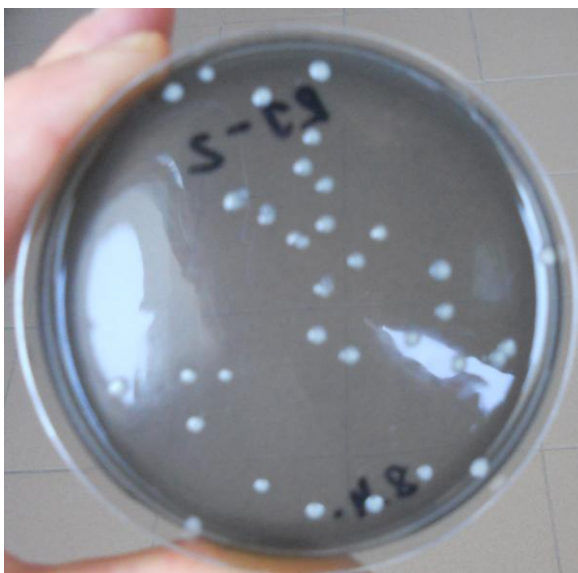
Nejprve bylo rozpuštěno 0,15 g pyrofosfát železitý a 0,25 g L-cystein ve sterilních Erlenmeyerových baňkách o objemu 50-100 ml v 10 ml demineralizované vody. Totéž bylo provedeno s cykloheximidem, který byl uložen do termostatu při 50 °C na dobu, dokud nedošlo k jeho rozpuštění. Do Erlenmeyerovy baňky o objemu 2000 ml bylo odměřeno 500 ml demineralizované vody. Do baňky bylo přidáno 5 g ACES pufr a ten byl zamíchán krouživými pohyby. Ze zásobního roztoku 1 N KOH bylo přidáno 18,5 ml, který nesmí být starší než jeden měsíc. Po rozpuštění byly přidány další složky kultivačního média, kterými bylo 1,5 g glycinu, 0,5 g α -ketoglutarátu draselného, 5 g kvasniční extraktu a 0,9 g aktivního uhlí. Během přidávání jednotlivých složek bylo doplňováno zbývající množství vody (430 - 443 ml). Poslední přidanou složkou bylo 5 g agaru Oxoid. Následně se směs nechala 15 minut odstát. Půda byla autoklávována při 121 °C \pm 1 °C po dobu 20 minut. Po ukončení cyklu byla půda ochlazena na 50 °C za stálého míchání. Do připraveného média bylo přidáno 10 ml cysteinu sterilizovaného membránovou filtrací. 10 ml bylo nasáto do stříkačky a protlačeno přes filtrační nástavec o porezitě 0,22 μ m. Stejný postup byl proveden u pyrofosfátu. Po každém přidavku byl objem půdy promíchán krouživým pohybem. Do připraveného média byly dále přidány antibiotické suplementy. Do lahvičky s polymyxinem B sulfátem bylo přidáno 10 ml demineralizované vody a byla protřepána. Vznikl tak zásobní roztok. Do lahvičky s vancocinem 500 mg bylo přidáno 10 ml demineralizované vody a protřepáno tak, aby došlo k rozpuštění antibiotika. Tak vznikl další zásobní roztok. Oba se jsou uchovávány v mrazničce při teplotě - 20 °C \pm 3 °C. Jsou rozmrazeny vždy jen před vlastní přípravou. Pro přípravu GVPC média byl nejprve přidán pollymyxin, po zamíchání vancocin a na konec cykloheximid. Následně byla půda rozlita do Petriho misek o průměru 60 a 90 mm. Misky se uchovávají při 4 - 8 °C v ledničce uzavřené v plastických sáčcích po dobu jednoho měsíce.

7.2 Kultivace

Vzorky byly očkovány přímo na povrch kultivačního média nebo filtrovány, kdy filtr byl přenes na povrch půdy v Petriho misce. Pro přímou inokulaci byly misky předsušeny v termostatu při 48 °C \pm 2 °C po dobu 20 \pm 5 minut v závislosti na stáří misky. Byly připraveny dvě Petriho misky s GVPC médiem pro každý vzorek. Každá miska byla naočkována 0,5 ml vzorku. Tekuté inokulum bylo rozetřeno stejnosměrně po povrchu plotny sterilní hokejkou. Po absorbování inokula do média byly misky obráceny dnem vzhůru,

zabaleny do plastických sáčků a inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 7 dní. Dále bylo vždy 50 ml vzorku zfiltrováno přes membránový filtr. Filtr byl přenesen do předem připravené misky s GVPC agarem a ty byly inkubovány stejně.

Misky byly inkubovány v plastických sáčcích po dobu 10 dní. Třetí den inkubace byly misky poprvé prohlíženy. První odečet byl proveden po 4 dnech. Tentýž den byly udělány první izolace z jednotlivých zástupců morfologických skupin legionel. Z každého monotypu byly izolovány alespoň tři kolonie. Následující dny byly misky kontrolovány a dodatečný růst kolonií byl zaznamenán a konečné počty kolonií byly upraveny. Konečné odečety byly uzavřeny 10. den. Poté byly misky zlikvidovány. Membránové filtry byly kontrolovány 5. den a odečteny po 7 dnech. Kolonie na nich rostou pomaleji. Celkové počty byly překontrolovány po 10 dnech (obr. 8).

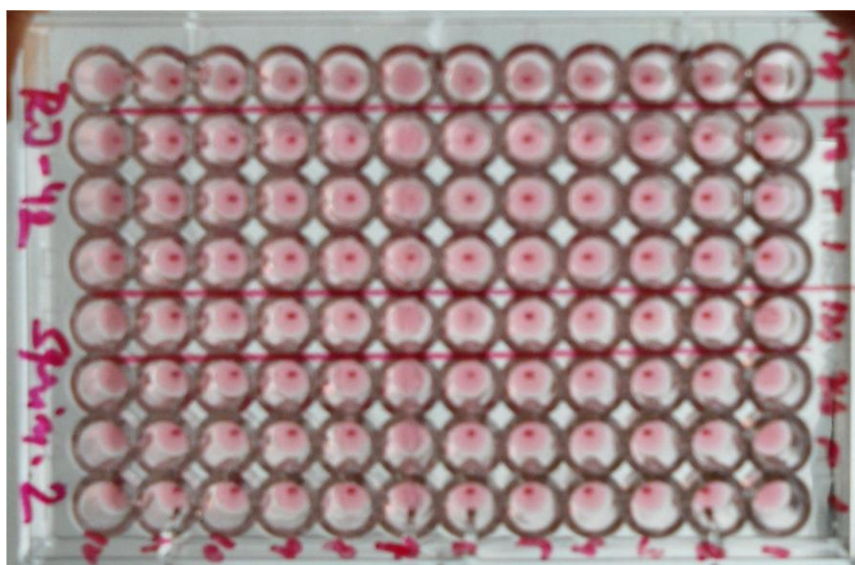


Obr. 8 Kolonie bakterie legionela na Petriho misce (Foto: P. Škrobalová)

Potvrzení a identifikace izolátů je možná pouze sérologicky. Využívají se k tomu monoklonální, polyklonální nebo vysycená králičí séra. Nejprve byla připravena zásobní kultura pro identifikaci. Širokou kličkou byla naočkována izolovaná a vyčištěná kultura na povrch BCYE agaru. Po inkubaci misky při 48 hodinách při 36 °C ±1°C byly na povrch napipetovány 3 ml pufru PBS 7,2. Skleněnou hokejkou byl nárůst emulgován, stáhnut ve skloněné poloze misky k jejímu okraji a nepipetován v objemu 1 ml do centrifugační zkumavky o objemu 10 ml. Zkumavka byla vložena do vodní lázně teperované na 70 °C ± 5 °C na dobu 15 minut. Následovala centrifugace po dobu 30 minut při 3000ot./min.

Supernatant byl slit a sediment ve zkumavce znovu nasuspendován ve 3 ml pufru PBS 7,2 a na Vortexu protřepán. Znovu následovala centrifugace při stejných parametrech. Supernatant byl slit a sediment byl převrstven 2 ml pufru PBS 6,4. Dále byl připraven pracovní roztok. 0,1 ml zásobní kultury bylo napipetováno do skleněné zkumavky, která lze použít do nástavce SPEKOL 10 ER1. Souběžně byl napipetován 0,1 ml do druhé zkumavky, která sloužila jako pracovní roztok. Do první zkumavky byly přidány 3 ml pufru PBS 6,4 a promíchán na Vortexu. Bylo měřeno na SPEKOLu při 530 nm. Pufir PBS 6,4 byl přidáván tak dlouho, dokud extinkce nedosáhla hodnoty $0,210 \pm 20$. Hodnota byla vyznačena na zkumavku se zásobní kulturou. Do druhé zkumavky bylo přidáno tolik pufru PBS 6,4 se safraninem a želatinou, kolik bylo uvedeno na zásobní kultuře. Toto byla pracovní kultura pro vlastní mikroaglutinační test. Mikroaglutinační test byl proveden v mikrotitrační destičce typu U s polyklonálními králičími séry vlastní výroby. Schéma postupu bylo následující. Každý kmen byl nejprve testován v sestavě sér *L. pneumophila* sg. 1 - 15. Při negativní reakci s druhem *L. pneumophila* byl použit panel se séry *L. species* 1 - 48 zahrnující všechny známé druhy legionel.

Do první jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μ l séra ředěného ve zkumavce 1 : 128 v pufru PBS 6,4 s želatinou. Do všech zbylých jamek bylo napipetováno 25 μ l pufru PBS se želatinou. Pomocí ředícího hřebenu Rotatiter fy DYNEX byla séra naředěna geometrickou řadou od první do poslední jamky. V takto připravené mikrotitrační destičce byly všechny jamky zakápnuty 25 μ l pracovního roztoku zkoumaného kmene. Inkubace proběhla při laboratorní teplotě v plastickém sáčku přes noc. Na druhý den byla destička vložena na dvě hodiny do ledničky pro zvýraznění vlastní reakce. Poté došlo k odečtu. Pozitivní reakce se jevila jako aglutinace na dně jamky. Při negativní reakci se na dně jamky objevil bodový knoflík, který v šikmé poloze stékal (označováno jako tekoucí slza), (obr. 9).



Obr. 9 Mikrotitrační destička (Foto: V. Drašar)

8 Výsledky

Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách č. 2 - 4. Výsledky byly rozděleny do jednotlivých tabulek podle druhu vlaku. Analýza výskytu *Legionella* byla provedena u 18 vzorků (tab. 2 - 4). Z toho 11 vzorků bylo odebráno z vlakových souprav patřících pod správu Českých drah, 4 vzorků ze souprav RegioJetu a 3 vzorků od dopravce Leo Express. Vzorky byly odebírány z výtokových ramének na toaletách po odpuštění vody cca 20 sekund. Přitom byla měřena teplota vody. Naplněný vzorek byl popsán číslem vlakové soupravy, teplotou vody a datem. Následně byl vzorek do druhého dne převezen do laboratoře ke kultivaci. Vzorky byly naneseny na médium v Petriho misce a inkubovány v termostatu při konstantní teplotě. U 14 vzorků byl nález pozitivní. U zbylých 10 vzorků nebyla nalezena žádná bakterie *Legionella*.

V tab. 2 jsou znázorněny vzorky, které byly odebrány v příměstských vlakových soupravách (ČD). Teplota vody se pohybovala v rozmezí od 19 - 29 °C. Přítomnost bakterie *Legionella* byla prokázána v rozmezí 6 KTJ /100 ml - 24 000 KTJ /100 ml. Odběr vzorků probíhal jeden den při cestě ve vlakových soupravách. Nejčastěji nacházejícím se druhem byla *L. pneumophila* sg. 1 (5 vzorků). Druhým nejvíce zastoupeným druhem byla *L. anisa* a *L. pneumophila* sg. 12 (3 vzorky). Zastoupení ostatních druhů bylo *L. pneumophila* sg. 2 (2 vzorky), *L. pneumophila* sg. 3 (2 vzorky), po jednom vzorku *L. worsleiensis*, *L. rubrilucens*, *L. erythra*. Byly nalezeny také dva kmeny, které se ukázaly být novými druhy na základě sekvenace genu *mip*. V tab. 2 jsou také zaznamenána depa, ve kterých dochází k plnění vody do zásobních tanků.

Tab. 2 Nálezy ve vodním systému vagonu odebrané z výtokových ramének na toaletách

Vlak č.	Depo	Tepl. °C	CPM při 36 °C	Legionella KTJ /100 ml	Identifikace	ST
914 118	Valašské Meziříčí	27	> 10 ³	4 900	<i>L. pneum.sg. 3</i> <i>L. erythra</i>	
914 091		28	160	1 200	<i>L. anisa</i>	
914 021	Suchdol nad Odrou	29	560	1 800	<i>L. pneum.sg. 1, Pont.</i>	393
914 003	Otrokovice	26	0	24 000	<i>L. pneum.sg. 1 Pont.</i> <i>L. pneum.sg. 1 OLDA</i> <i>L. rubrilucens</i>	1
914 052		19	8	600	<i>L. worsleiensis</i>	
914 029		26	28	4 000	<i>L. pneum.sg. 12</i> <i>L. spec.nov</i>	
914 013	Veselí	21	5	6	<i>L. pneum.sg. 1</i> <i>L. anisa</i>	393
954 218	Olomouc	28	38	400	<i>L. pneum. sg. 3</i>	
460 007	Bohumín	19	15	200	<i>L. pneum.sg. 1</i> <i>L. anisa</i> <i>L. „spec.novs“</i>	1
471 057		24	480	12 000	<i>L. pneumophila sg. 12</i> <i>L. brunensis sg. 2</i>	
471 057		21	120	500	<i>L. pneumophila sg. 12</i> <i>L. brunensis sg. 2</i>	

Vagon č. - identifikační číslo vlaku

Tepl. °C - měřená teplota odebrané vody vzorku

KTJ / 100 ml - počet kolonií bakterie vyskytující se na 100 ml vody

ST - subtypizace

V tab. 3 jsou zaznamenány vzorky, které byly odebrány z RegioJetu směr Havířov - Praha. Teplota vody byla v rozmezí 26 - 34 °C. Přítomnost bakterie *Legionella* byla prokázána v rozmezí 0 KTJ /100 ml - 5 400 KTJ /100 ml. Odběr proběhl během jednoho dne. Nejčastějším druhem byla *L. pneumophila* sg. 1 (2 vzorky) a dalším zástupcem v jednom vzorku *L. pneumophila* sg. 5. Na jedné toaletě nebyl nalezen žádný druh bakterie *Legionella*, kdy důvodem může být čerstvě doplněná voda.

Tab. 3 Nálezy ve vodním systému vagonů odebrané z výtokových ramének na toaletách

Vlak	Vagon č.	Tepl. °C	Legionely KTJ/100 ml	Identifikace
Regio Jet IC1012	61 81 91 000-8	29	2000	<i>L. pneum sg. 1</i>
	61 81 30 90 012-8	34	5400	<i>L. pneum. sg. 5</i>
Regio Jet IC1007	61 81 30 90 021-9	26	0	
	61 81 18 91 020-6	28	140	<i>L. pneum. sg. 1</i>

Tepl. °C - měřená teplota odebrané vody vzorku

KTJ / 100 ml - počet kolonií bakterie vyskytující se na 100 ml vody

V tab. 4 jsou zaznamenány vzorky, které byly odebrány z Leo Expressu směr Praha - Bohumín. Teplota vody byla v rozmezí 15 - 16 °C. Přítomnost bakterie *Legionella* nebyla prokázána. Odběr vody proběhl v jednom dni. U dopravní společnosti Leo Express nebyla v jejich vlakových soupravách nalezena žádná bakterie rodu *Legionella*. Důvody mohou být hned dva. Vlakové soupravy jsou nové a teprve nedávno se začaly používat v železniční dopravě. Dalším důvodem je velice nízká teplota vody, která znemožňuje rozmnožování bakterie.

Tab. 6 Nálezy ve vodním systému vagonů odebrané z výtokových ramének na toaletách

Vlak	Vagon č.	Tepl. °C	Legonely KTJ /100 ml
Leo Express L1356	94-54-1-480-002-5 B	15	0
	94-54-1-480-002-5 C	15	0
Leo Express L1353	94-54-1-480-002-5 D	16	0

Vagon č. - identifikační číslo vlaku

Tepl. °C - měřená teplota odebrané vody vzorku

9 Diskuze

Experiment byl zaměřen na sledování četnosti výskytu bakterie *Legionella* ve vodních systémech vlakových souprav. Podle mezinárodní normy UIC 563 existují legislativní požadavky pro železnice. Jedním z bodů normy je ohřívání užitkové vody využívající se ve vlacích. Je doporučováno vodu před použitím ohřívat na teplotu 30 °C. V ČR zatím nejsou hygienické požadavky legislativně stanoveny. Pitná voda není vyžadována s výjimkou restauračních vozů. Nedochozí tak k žádným kontrolám a čištění vodního systému vlaků, který zásobuje vodou veškeré toalety ve vagonech.

Výzkum ve Velké Británii vyžadoval zjistit, jak velké riziko by mohla mít přítomnost bakterie *Legionella* ve vlaku s nepitnou vodou. Reakcí na tento požadavek bylo velké úsilí zjistit, jestli existuje možná spojitost a nebezpečí mezi bakterií a vlakem. Riziko, které bakterie představuje, se stalo bodem výzkumu. Účelem bylo poskytnout základní identifikaci a přiměřené opatření ke zmírnění rizika. Následoval přehled studií, kdy závěrem bylo, že údaje potřebné pro podporu daného rizika neexistují. Kromě údajů o výskytu bakterie ve vlakových nádržích v Itálii, Velké Británii a České republice se zdá, že další informace o výskytu potenciálního či skutečného rizika pro cestující v železničních kolejových vozidlech neexistují. Jednoduše řečeno, nebyly vydány žádné studie, které by potvrdily vztah mezi výskytem nákazy nemoci bakterií a železnicí. Nesmí se ale zapomínat, že nedostatek důkazů týkající se nebezpečí a rizika nemohou vést k vyvolání nemoci. Absence dat neznamená opomínat možný předpoklad rizika, které představuje bakterie *Legionella* v nepitných systémech. (Woods, RBSS, 2012)

Stejně jako morální povinnost zaměstnavatelů chránit zaměstnance a členy veřejnosti, všeobecné zdravotní legislativy vyžadují, aby pracovníci a veřejnost byla chráněna před možnými riziky. Nařízení Control of Substances Hazardous to Health (COSHH) se vztahuje na mikroorganismy, jako jsou legionely. Některé základní principy správné pracovní hygieny jsou dány COSHH a musí se dodržovat:

- prevence
- regulační opatření (technické kontroly, jako jsou izolace nebo odvětrávání)
- osobní ochranné prostředky

V souvislosti s prevencí u legionely znamená vyhnout se vypouštění kontaminované vody a omezit rozsah tvorby aerosolu.

Současné kontroly výskytu bakterie v oboru železniční dopravy nejsou známé. Neexistuje žádná kontrolní skupina. Záleží na každé stanici a vozovně, jakým způsobem napájí vodu do tanků a za jakých podmínek skladuje vodu pro další použití. Není známo žádné nařízení u nás, které by stanovovalo, že voda doplňovaná pro používání veřejností ve vlacích, by musela být pitná. Proto jsou také všechny toalety vybaveny piktogramy - Voda není pitná.

Možným řešením na snížení výskytu bakterie legionela ve vodních systémech vlaku je jejich eliminace a návrhy na její odstranění. Odstranění legionel z jakýkoliv vodních systémů je obtížné. Možné postupy pro eliminaci jsou dobře funkční v laboratorních podmínkách, ale v praxi jsou náročnější. Většinou dochází ke snížení počtu bakterií, ale tento jev je přechodný. Po určitém čase dojde k opětovnému nárůstu bakterií v systémech. Nejvíce používané metody na odstranění legionely ze systému se využívají dezinfekce oxidačními prostředky a tepelné metody. Používají se také další metody, jako jsou fyzikální nebo chemické, ale jen ve specifických případech. Využívanými metodami v železniční dopravě je dezinfekce UV zářením a pomocí přípravků na bázi chlóru. Další metody jsou případné návrhy, které by se daly využít pro snížení možného rizika výskytu bakterie legionela ve vodních systémech vlaků.

Dezinfekce UV zářením

Vodní systémy vozů mohou být vybaveny UV lampou, kdy UV záření inaktivuje DNA bakterií. Maximální účinek má při vlnové délce 254 nm. (Muraca, 1987; Kim a kol., 2002) UV záření působí pouze v místě přístroje, kde byl nainstalován. Má účinek jen na ozařované místo nikoli na potrubní systém. Tato metoda se používá jako doplňková při hyperchloraci nebo při tepelném předehřátí (Franzin a kol., 2002).

Dezinfekce chemickými prostředky

Přípravky na bázi chlóru

Chemická dezinfekce vodního systému se provádí u všech vozů. Před odjezdem vozu do depa kolejových vozidel (DKV) a začátkem dezinfekce je potřeba zcela vyprázdnit vodní systém vozu. Pro dezinfekci nádrží se používá přípravek na bázi chlóru (např. chlornany vápníku a

sodíku, chlórdioxid nebo chloraminy). Ve světě doporučovaným a účinným na dezinfekci vody je chlórdioxid. Působí nejen na legionely, ale také na vytvořené biofilmy a redukuje jejich počet. Po dezinfekci se nejdříve 30 minut po provozním naplnění odebere vzorek vody. Provede se rozbor. V případě, že rozbor vody nebude odpovídat limitům stanovených pro kvalitu pitné vody, bude dezinfekce provedena znovu (směrnice ČD, 2012).

Dezinfekce se dělá 1x za 3 měsíce u všech vozů, které nejsou vybaveny UV lampou. U vozů s nainstalovanou UV lampou se dezinfekce provádí 1x za 12 měsíců (směrnice ČD, 2012).

Ionty mědi a stříbra

Používáním iontů stříbra a mědi by v systému mohlo zabránit pomnožení legionel na delší dobu (Miuenzner a kol., 1997). Účinek metody je založen na elektrolytickém uvolňování stříbra a mědi. Ionty jsou pro volně žijící legionely i legionely žijící v biofilmech toxické. Tato metoda by se dala využívat jako doplňková metoda k účinné chloraci. Řádný dezinfekční efekt by byl dosažen za současného používání dezinfekce chlórem. (Kool, 2002) Nevýhodou této metody je ekonomická náročnost a stálá kontrola koncentrace iontů, protože vlastnosti vody ovlivňují působení iontů stříbra (Špaleková M., 2003).

Využití membránových filtrů

Membránový filtr na konci vodovodního kohoutku by poskytoval trvalou ochranu. Nástavec s filtrem by se nasadil na kohoutek a chránil by tak uživatele před mikroorganismy z vody a před aerosolem. Studie provedená autory Vonbergem a kol. (2008) v nemocnicích prokázala, že filtr s póry 0,2 µm snížila výskyt a počet kolonií legionel ve vodě. Problémem této metody je krátká životnost filtrů, častá výměna a finanční náročnost. Stejně jako UV technologie platí, že voda za filtračním nástavcem není již hygienicky chráněna.

Další potencionální opatření ke snížení rizika

Aby došlo ke snížení znečištění, mělo by docházet:

- k pravidelnému čištění hadic a připojovacích závitů
- k ošetřování vody teplotou nad 60 °C
- ke krytování plnicích míst na vozidle
- k pravidelnému plnění a vypouštění nádrží na vozidle a zásobních nádrží v depech.

Další možností jak snížit růst kontaminace na vozidle je:

- kompletní vypouštění nádrží a pravidelné plnění nádrží na vozidle
- hloubkové čištění a dezinfekce nádrže vlaku
- dosáhnout automatického odpouštění v závislosti na čase/teplotě
- zavést antibakteriální gely na ruce a tím zrušit vodu v umyvadlech
- izolovat sběrné nádrže či lakovat střechy stříbrem

Řešením by také mohlo být snížení vzniku aerosolu. Pomocí:

- odstranění trysek z kohoutů
- vakuové splachovací záchody
- odstranění vysoušeče rukou
- automatické zavírání víka toalety před spláchnutím

10 Závěr

Ve své práci jsem se zabývala výskytem bakterie *Legionella* ve vodních systémech vlakových souprav. V souboru kultivovaných vzorků bylo zastoupeno 9 druhů, z toho dva druhy byly neznámé. Nejčastější výskyt druhu byla *L. pneumophila* sg. 1, jejíž sekvenční typ ST 1 je universálním patogenem napříč Evropou. Mezi nalezenými druhy byly také bakterie, které jsou spojovány s onemocněním člověka. Příkladem může být *L. anisa* nebo *L. erythra*. Všechny druhy této bakterie se vyskytovaly ve veřejně dostupných železničních prostředcích, kde by mohly způsobit riziko nakažení jedinců, kteří využívali vlakovou toaletní jednotku.

Prozatím nebyla prokázána žádná souvislost nakažení mezi člověkem a legionelou pocházející z vody v železničním vozidle. To ovšem neznamená, že bychom měli opomenout možné riziko, které by mohlo vzniknout. I pokud by bylo onemocnění diagnostikováno, ani lékař, ani epidemiolog se na cestování vlakem vyptávat asi nebudou. Dodnes totiž neexistuje žádná legislativa, která by udávala, jak zacházet s vodou v nádržích vlaků a jak je správně čistit, aby v ní nedocházelo k rozmnožování mikrobů. Prozatímním řešením je uvést do chodu alespoň pár návrhů na eliminaci bakterie a opatření, která by vedla ke snížení rizika.

Podle mého názoru nedojde k žádným opatřením do doby, dokud se z potenciálního rizika nakažení nestane skutečné a nedojde k ohrožení lidských životů.

11 Použité zkratky

ACES	N-2-acetamido-2-aminoethansulfonová kyselina
AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
BCYE	kultivační médium pro kultivaci legionel (Buffered Charcoal Yeast Extrakt)
CDC	centra pro kontrolu nemocí a prevence (Centers for Diseases Control and Prevention)
CFU	kolonie tvořící jednotky (Colony-forming units)
ČD	České dráhy a. s.
GVPC	kultivační médium
DFA	přímá imunofluorescence (Direct Fluorescent Antibody)
DKV	depo kolejových vozidel
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzymatická imunoanalýza (Enzyme - linked immunosorbent assai)
MAbs	monoklonální protilátky
NRL	národní referenční laboratoř
PA	Pensylvánie
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	pulzní gelová elektroforéza
RFLP	polymorfismus délky fragmentů štěpených restriční endonukleázou
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RSSB	Rail Safety and Standards Board
SBT	sekvenční subtypizace (Sequence - Based Type)
sg.	séroskupina (Serogroup)

12 Literatura

Anonymous (2011): Legionella bacteria detected in train toilet systems. Dostupné online z: <http://www.bbc.co.uk/news/uk-scotland-13593399>, navštíveno naposledy: 1. 7. 2013

Bartram J., Chartier Y., Lee J., Bond K., Surman-Lee S. (2007). Legionella and the Prevention of Legionellosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization Press, ISBN 9241562978.

Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. (1996). Lékařská mikrobiologie: Marvil, s.r.o. Praha.

ČSN ISO 11731 (2002). Jakost vody - Stanovení bakterií rodu *Legionella*. Praha: Český normalizační institut.

Fields, B. S., Benson, R. F., Besser, R. E. (2002): *Legionella* and Legionnaires' disease: 25years of investigation. Clin Microbiol Rev 15: 506-526.

Franzin L., Cabodi D., Fantino C. (2002). Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by *Legionella*. J Hosp Infect; 269-274.

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.

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.

Gardner B. (2012). Dostupné z: http://www.theargus.co.uk/news/10067438.Legionnaires_bug_lurking_in_a_third_of_train_loos/, navštíveno naposledy: 1. 7. 2013

Glick T. H., Gregg M. B., Berman B., Mallison G., Rhodes JR. W. W., Kassanoff I. (1978). Pontiac Fever - An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiological aspects. Am. J. Epidemiol., 149-160.

- 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.
- 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*, 100–106.
- Kim B. R., Anderson J. E., Mueller S. A., Gaines W. A. (2002).** Literature review-efficacy of variol disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res*, 4433-4444.
- Kool J. L. (2002).** Control of *Legionella* in Drinking Water Systems: Impact of Monochloramine. *Legionella*. ASM Press, Washington DC, 411-418.
- Levin A.S. (2009).** Nosocomial legionellosis: preventiv and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 7, 57-68.
- Macela A., Stulík J., Trebichavský I., Kroča M., Janovská S. (2006).** Infekční choroby a intracelulární parazitizmus bakterií. Praha: Grada, ISBN: 8024706644.
- Maiwald, M., Helbig J. H., P. Luck C.. (1998).** Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *J. Microbiol. Methods* 33:59–79.
- Ministerstvo zdravotnictví:** Vyhláška 252/2004 Sb. v platném znění vyhlášky 293/2006 Sb. Hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
- Miskowski D. (2007).** An overview of *Legionella* Analyses. Dostupné z: www.legionellatesting.com/legionella-article.html, navštíveno naposledy 1. 7. 2013
- Miuenzner S., Schwille R. C., Fairley A., Wald E.R. , Ge J. H., States S. J., Libert T., Wadowsky R. M. (1997):** Efficaty of Thermal Treatment and Copper - Silver Ionization for Controlling *Legionella Pneumophila* in High - Volume Hot Water Plumbing Systems in Hospitals. *Am. J. Infect. Control*, 452-457.
- Mudroch, D. R. (2003).** Diagnosis of *Legionella* infection. *Medical Mikrobiology* 36: 64-69.

Muraca P, Stout JE, Yu VL (1987). Comparative Assessment of Chlorine, Heat, Ozone and UV light for Killing *Legionella Pneumophila* within a Model Plumbing Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 447-453.

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., Dennis P. J., Duggal H. V., Scully J. A., Denne C. (1990). The Stafford outbreak of Legionnaires` disease. *Epidemiol Infect.* 104: 361–380.

Pagnier I., Boughalmi M., Croce O., Robert C., Raoult D., La Scola B. (2012). Genome Sequence of *Legionella tunisiensis* Strain LegM^T, a New *Legionella* Species Isolated from Hypersaline Lake Water. *J. Bacteriol.* vol. 194 no. 21 5978.

Quaranta G., Vincenti S., Ferriero A. M., Boninti F., Turnaturi C., Gliubizzi M. D., Munafó E., Ceccarelli G., Causarano C., Accorsi M., Del Nord P., Ricciardi W., Laurenti P. (2012). *Legionella* on board trans: effectiveness of environmental surveillance and decontamination. *BMC Public Health*, 12:618. doi: 10.1186/1471-2458-12-618.

Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J. H., Fry, N. K., Lück, P. Ch. (2007). Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 45: 1965 - 1968.

Rojas A., Navarro M. D., Fornés F. E., Serra E., Simarro E., Rojas J., Ruiz J. (2005). Value of serological testing for diagnosis of Legionellosis in outbreak patients. *J Clin Microbiol.* vol. 43(8): 4022-4025.

Rogers J., and Keevil C. W. (1992). Immunogold and fluorescein immunolabeling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2326–2330.

Směrnice ředitele O12, České dráhy, a.s., Generální ředitelství, Odbor kolejových vozidel (2012). Čištění a dezinfekce nádrží na pitnou vodu v jídelních a lůžkových vozech, účinnost od 1. 9. 2012, stran 8

Stout, J. E. and Yu, V. L. (1997). Legionellosis. *N Engl J Med* 337: 682-687.

Špaleková M (2003). Príspevok k problematike nozokomiálnych legionelových infekcií. Nozokomiálne nákazy, 2, stran 10

Tossa P., Deloge-Abarkan M., Zmirou-Navier D., Hartemann P., Mathieu L. (2006). Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. BMC Public Health, 6: 112., 10.1186/1471-2458-6-112

Union International de Chemin de Fer UIC 563 (1990): Hygienická zařízení a čištění osobních vozů, 8. vydání

Úřední věstník Evropské unie (2008): ROZHODNUTÍ KOMISE o technické specifikaci pro interoperabilitu subsystému „Kolejová vozidla“ transevropského vysokorychlostního železničního systému, 2008/232/ES, dostupné online z: <http://www.mdcz.cz/NR/rdonlyres/AE4D6A83-FD0B-403A-9EE8-5EBB6DDB123/0/32008D0232TSIVRTKolvoz.pdf>, navštíveno naposledy: 1. 7. 2013

Úřední věstník Evropské unie (2011): ROZHODNUTÍ KOMISE o technické specifikaci pro interoperabilitu subsystému kolejová vozidla – lokomotivy a kolejová vozidla pro přepravu osob transevropského konvenčního železničního systému, 2011/291/EU, dostupné online z: <http://www.mdcz.cz/NR/rdonlyres/2BD9CF7F-2D34-42D8-A204-488D6FD70283/0/32011D0291TSIlokosvozy.pdf>, navštíveno naposledy: 1. 7. 2013

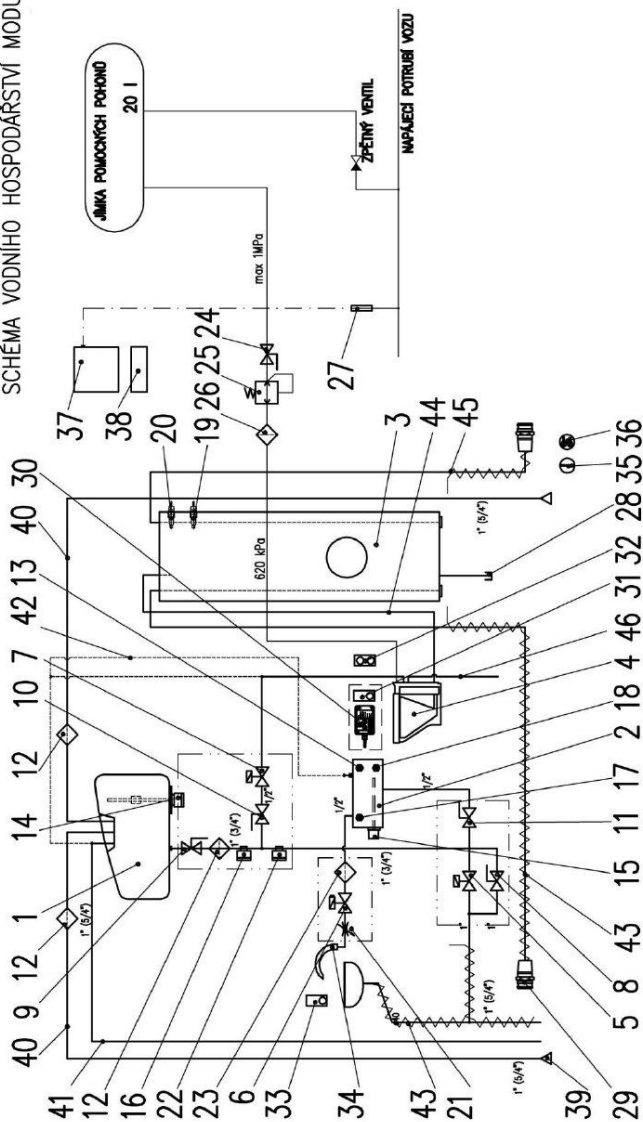
Vonberg RP, Sohr D, Bruderek J, Gastmeier P. (2008). Impact of a silver layer on the membrane of tap water filters on the microbiological quality of filtered water. BMC Infect Dis; 8: 133

Zink S. D., Pedersen L., Cianciotto N. P., Kwaik Y. A. (2002). The Dot/Icm type IV secretion of Legionella pneumophila is Essential for the induction of apoptosis in human macrophages. Infect. Immun. vol. 70, 1657-1663

13 Příloha

Příloha č. 1 Schéma vodního hospodářství železničního vozidla

SCHÉMA VODNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ MODULU WC



LEGENDA:

- | | | | | | |
|----|---|----|--------------------------------|----|------------------------------------|
| 1 | VODOJEM | 13 | HLADINOVÝ SNÍMAČ OHŘÍVAČE VODY | 25 | REGULÁTOR TLAKU 3/8" |
| 2 | OHŘÍVAČ VODY | 14 | HLADINOVÝ SNÍMAČ VODOJEMU | 26 | FILTR 3/8" |
| 3 | OPROVNĚNÍ NÁDRŽ | 15 | TOPNICE OHŘÍVAČE | 27 | TLAKOVÝ SPÍNAČ |
| 4 | STOLAN WC S ŘÍDÍCÍ JEDNOTKOU | 16 | TERMOSTAT 5°C VODOJEMU | 28 | ZÁTKA G2 - NOLIZOVÉ VYPLOUŠTENÍ |
| 5 | ELMAGNET. VENTIL 1" - ODTAVENÍ VH | 17 | TERMOSTAT PRŮTOČNĚ 50°C | 29 | KAMÍK S VĚM |
| 6 | ELMAGNET. VENTIL WC 1/2" | 18 | OCHRANNÝ TERMOSTAT 80% | 30 | JEDNOTKA SERVISNÍHO SPŘACHOVÁNÍ |
| 7 | ELMAGNET. VENTIL 1" - ODTAVENÍ VH | 19 | HLADINOVÝ SNÍMAČ NÁDRŽE 100% | 31 | TLAČÍTKO SPŘACHOVÁNÍ WC |
| 8 | ELMAGNET. VENTIL 1" - ODTAVENÍ VH | 20 | HLADINOVÝ SNÍMAČ NÁDRŽE 100% | 32 | TLAČÍTKO RESET A KVIJACE |
| 9 | UZAVÍRACÍ VENTIL 1/2" - ODTAVENÍ VODOJEMU | 21 | REGULAČNÍ ŠROUBENÍ PRÁME 1/2" | 33 | TLAČÍTKO DĚKOVÁNÍ VODY DO UMÝVADLA |
| 10 | UZAVÍRACÍ VENTIL WC - 1/2" | 22 | SNÍMAČ PŘÍTOMNOSTI VODY | 34 | VÝTOKOVÁ HUBICE |
| 11 | UZAVÍRACÍ VENTIL 1/2" - OOST. OHŘÍV. VODY | 23 | STROJÝ FILTR V ŠROUBENÍ | 35 | UKAZATEL HLADINY VODOJEMU |
| 12 | FILTR 1" | 24 | RUČNÍ VENTIL 3/8" | 36 | UKAZATEL HLADINY PLOUSTI NÁDRŽE |
| 37 | ŘÍDÍCÍ JEDNOTKA VH | | | | |
| 38 | SVORKOVNICE | | | | |
| 39 | PLNÍCÍ HRDLO | | | | |
| 40 | PLNÍCÍ POTRUBÍ VODOJEMU | | | | |
| 41 | PŘEPADOVÉ POTRUBÍ VODOJEMU | | | | |
| 42 | OVÝZUSŇOVACÍ POTRUBÍ | | | | |
| 43 | TOPNÝ KABEL POTRUBÍ | | | | |
| 44 | OPROVNĚNÍ POTRUBÍ | | | | |
| 45 | ODSÁVACÍ POTRUBÍ | | | | |
| 46 | HADICE ODFUKU | | | | |