

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Legionella

Martina Váňová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Barbora Voxová

Konzultant: Ing. Pavlína Silvestrová,

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svojí školitelce PharmDr. Barboře Voxové, za odborný dohled, ochotu, cenné rady a vedení při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Pavlíně Silvestrové za pomoc a odborné vedení při experimentální části této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Státnímu zdravotnímu ústavu se sídlem v Ostravě (pracoviště Jihlava) za poskytnutí cenných dat a laboratorních prostor pro moji experimentální práci. V neposlední řadě děkuji i mé rodině a přátelům za podporu.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 22.2.2024

Martina Váňová

Obsah

1. ABSTRAKT	7
2. ABSTRACT	8
3. ÚVOD	9
4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	10
5. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
5.1 Historie	11
5.1.1 Pontiacká horečka	12
5.1.2 Legionářská nemoc	12
5.2 Taxonomie.....	13
5.3 Stavba bakteriální buňky	19
5.3.1 Životní cyklus.....	19
5.3.1.1 Možné děje v hostitelské buňce	19
5.3.1.2 Fáze replikace v hostitelské buňce.....	20
5.4 Laboratorní metody detekce.....	21
5.4.1 Kultivace	21
5.4.1.1 Metoda membránové filtrace	22
5.4.1.2 Metoda přímé inokulace na kultivační půdu	23
5.4.2 Detekce močového antigenu	23
5.4.3 Sérologie.....	24
5.4.4 Nepřímá imunofluorescence.....	25

5.4.5	Detekce nukleových kyselin pomocí PCR.....	25
5.5	Výskyt legionelózy v České republice	26
5.6	Léčba	27
5.7	Patogeneze	27
5.8	Prevence	28
5.9	Eliminace legionel ve vodě	28
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
6.1	Odběr vzorků	30
6.2	Zpracování v laboratoři	31
6.2.1	Přístroje a pomůcky	31
6.2.2	Kultivační média a činidla.....	32
6.2.3	Postup zpracování	33
6.2.3.1	Vzorky s nízkou koncentrací legionel	33
6.2.3.2	Vzorky s vysokou koncentrací legionel	35
6.3	Kultivace	36
6.3.1	Inkubace.....	36
6.4	Vyhodnocení.....	37
6.4.1	Potvrzení kolonií presumptivních bakterií rodu <i>Legionella sp.</i>	38
6.4.2	Sérologická identifikace <i>Legionella pneumophila</i>	38
6.5	Vyjádření výsledků	39
7.	VÝSLEDKY.....	41

7.1	Počty vyšetřovaných pacientů v jednotlivých letech	41
7.2	Počty epidemiologických šetření v letech 2012–2022 podle lokality	43
7.2.1	Podle krajů spadajících pod Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě	43
7.2.2	Podle okresů v Kraji Vysočina.....	46
7.3	Přehled epidemiologických šetření potencionálních zdrojů nákazy na přítomnosti legionely u pacientů pozitivních na legionelózu v letech 2012 až 2022.....	47
7.4	Prokázané druhy legionely z okolí pacientů pozitivních na legionelózu v letech 2012–2022	54
7.4.1	Pozitivní pacienti s prokázaným zdrojem nákazy podle lokality	59
7.4.2	Počty pozitivních vzorků zdroje nákazy s daným druhem legionely.....	61
8.	DISKUSE	64
9.	ZÁVĚR	67
10.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	69
11.	SEZNAM TABULEK	70
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
13.	SEZNAM GRAFŮ.....	72
14.	POUŽITÁ LITERATURA.....	73

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Barbora Voxová

Konzultant: Ing. Pavlína Silvestrová

Název bakalářské práce: *Legionella*

Bakalářská práce se zabývá problematikou bakteriálního rodu *Legionella sp.*, především pak její laboratorní diagnostikou z vody. Cílem této práce je shrnutí dosud známých poznatků o tomto bakteriálním rodě a popis praktikovaných metod v běžné laboratorní praxi. Dále pak statistické vyhodnocení výskytu legionely v Kraji Vysočina, Jihomoravském kraji, Olomouckém kraji, Zlínském kraji a Moravskoslezském kraji v letech 2012 až 2022 na základě dat poskytnutých Státním zdravotním ústavem se sídlem v Ostravě.

Pro kultivaci byly používány specifické půdy, na které se aplikovaly speciální filtry nebo malý objem vody. Kultivace probíhala 7-14 dní. Pro přesnější stanovení příslušného druhu *Legionella sp.* se používaly aglutinační testy.

Bakteriální rod *Legionella* se vyznačuje výskytem v teplovodních potrubích, v místech se stagnací vody, v klimatizacích, především v nemocničních či rekreačních objektech. Kultivace legionely patří k nejnáročnějším. Kolonie mají typický vzhled „broušeného skla“, mají celistvý okraj a bílo-šedou barvu. Zápach narostlých kolonií lze popsat jako nakyslý, zatuchlý.

Z vyhodnocení poskytnutých dat vyplývá, že počet epidemiologických šetření i počet pozitivních pacientů v České republice stoupá. Nejčastěji se jedná o muže starší 55 let, kteří užívají tabákové výrobky.

Klíčová slova: *Legionella sp.*, legionelóza, příznaky, výskyt, experimentální práce, kultivace, aglutinace, vzorky vod, filtrace, epidemiologické šetření

2. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Degree programme: Laboratory diagnostics in healthcare

Author: Martina Váňová

Supervisor: PharmDr. Barbora Voxová

Consultant: Ing. Pavlína Silvestrová

Title of bachelor thesis: *Legionella*

The bachelor's thesis deals with the issue of the bacterial genus *Legionella sp.*, especially its laboratory diagnostics from the water. The purpose of this work is to summarise so far known facts and a description of the methods practiced the standard laboratory practice. Then, a statistical evaluation of the occurrence of legionela in the Vysočina Region, the South Moravian Region, the Olomouc Region, the Zlín Region and the Moravian-Silesian Region from 2012 to 2022 based on information provided by the State Health Institute located in Ostrava.

There we specific mediums used for cultivation, where special filters or a small volume of water were applied. The cultivation was carried out for 7-14 days. The agglutination tests were used for the specific determination of the species.

The bacterial genus *Legionella* is characterized by its occurrence in the hot water pipes, in places with water stagnation, in air conditioners, especially in hospitals or recreational facilities. The cultivation of legionela is one of the most demanding. The colonies have a typical appearance of "ground glass". They have a solid edge and a white-gray color. The smell of the grown colonies can be described as sour, musty.

The evaluation of the provided data shows that the number of epidemiological investigations and the number of positive patients in the Czech Republic is increasing. Most often, these are men over 55 years old who use tobacco products.

Keywords: *Legionella sp.*, legionellosis, symptoms, incidence, experimental work, cultivation, agglutination, water samples, filtration, epidemiological investigation

3. ÚVOD

Jako *Legionella sp.* je označován rod bakteriálních patogenních mikroorganismů z čeledi *Legionellaceae*. Tento rod bakterií může způsobovat tzv. legionářskou nemoc nebo případně mírnější pontiackou horečku. Nejvíce infekčním druhem je *Legionella pneumophila* postihující především dýchací cesty. Nejčastější cestou nákazy je výhradně vdechnutí infikovaného aerosolu do plic. [1]

Voda je nezbytnou součástí našeho života. Používáme ji denně, ať už k osobní hygieně, či jako složku naší potravy. Bez vody by nebyl náš život ale ani život mnoha bakterií, kterým je voda domovem. Mimo jiné k nim patří i právě *Legionella sp.*

Ideálním prostředím pro výskyt legionely je například teplovodní potrubí, klimatizace či boilers. Tyto prostory, myšleno především prostory ve kterých se již *Legionella sp.* v minulosti vyskytovala, je proto nutné pravidelně kontrolovat na přítomnost legionely.

Dalším příkladem, kdy provádíme analýzu vody na přítomnost legionely jsou tzv. epidemiologická šetření, a to v případě, že se vyskytl nový pacient s potvrzeným onemocněním způsobené *Legionella sp.* a není známo místo a způsob jeho nákazy.

4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Práce pojednává o rodu patogenních bakterií *Legionella sp.* V jednotlivých kapitolách jsou zde řešeny otázky historického objevu tohoto kmene, jeho podrobná charakteristika, taxonomie, popis způsobovaného onemocnění, jeho průběh, terapie a dopady na zdraví pacienta. Je zde popisována i bakterie jako taková, její proces rozmnožování, podmínky vhodné pro šíření.

V experimentální části se práce věnuje samotnému laboratornímu stanovení *Legionella sp.* z vodných vzorků. Toto stanovení se využívá při preventivních kontrolách i epidemiologických šetřeních ve Státním zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě (pobočka Jihlava).

Cílem této práce bylo zpracovat soubor aktuálních poznatků o bakteriálním rodu *Legionella sp.* Dále pak zpracovat metodiku stanovení používanou ve Státním zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě dle normy ČSN EN ISO 11731. Závěrem pak zpracovat data o epidemiologických šetřeních z let 2012 až 2022 poskytnutých od Státního zdravotního ústavu a provést jejich statistické vyhodnocení.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Historie

Naprostou první zmínkou o bakteriálním rodu *Legionella sp.* pochází z roku 1957, kdy v Austinu, v Minnesotě propukla první epidemie tzv. pneumonie, později označené jako legionářská nemoc – 1. V období 7. června až 9. srpna 1957 bylo v tamní nemocnici hospitalizováno 87 pacientů s akutním respiračním onemocněním, které ovšem nemělo jasnou příčinu. Téměř většina byla mužů. Většina hospitalizovaných měla kašel, horečku, bolesti hlavy a zápal plic. Pacienti byli ve věku od 14 do 83 let, z nichž asi polovina pacientů byla starší 55 let. Dva pacienti zemřeli. [2]

V roce 1965 byl v St. Elizabeth's Hospital, tedy v tehdejší psychiatrické léčebně, v Washington D.C. objeven po 8 letech další případ nákazy. Stalo se tak v červenci, kdy bylo v nemocnici hospitalizováno asi 6000 pacientů, ze kterých se 81 nakazilo. Respirační onemocnění se u pacientů projevovalo charakteristicky náhlým nástupem vysoké horečky, slabostí, malátností, rentgenově prokázaným zápal plic a neproduktivním kašlem. Cestou nákazy byla pravděpodobně kontaminace půdou obsahující patogen, která se dostala do potrubí s pitnou vodou pro nemocnici při stavebních úpravách potrubí. Stavební úpravy byly prováděny za účelem vytvoření zavlažovacího systému pro trávník. [3]

První zaznamenané případy pontiacké horečky se objevily v roce 1968 v Pontiacu, v Michiganu u lidí, kteří pracovali nebo navštěvovali městské zdravotnické středisko. U těchto lidí nebyly však pozorovány známky pneumonie a průběh onemocnění byl mírnější. Nakazilo se 144 osob. Zdrojem nákazy byla pravděpodobně voda unikající z odpařovacího kondenzačního systému, kterým se voda poté dostala do cirkulujícího vzduchu. Zapnuté klimatizační zařízení způsobovalo opětovný výskyt choroby, ale po jeho vypnutí došlo k eliminaci rizika nákazy. [4], [5]

V létě roku 1976 ve Philadelphii vypukla epidemie smrtelného respiračního onemocnění, která spustila usilovné pátrání po původci onemocnění. Nákaza se podle několika zdrojů šířila vzduchem z hotelové klimatizace. V tamním hotelu tehdy probíhala konference pro asi 4000 legionářů. Onemocněním se nakazilo 221 účastníků, z nichž 34 zemřelo. (pozn. různé zdroje uvádějí různé počty nakažených a zemřelých). Pátrání po původci onemocnění vyústilo v definici nového rodu patogenních bakterií

zvaného *Legionellaceae*. Centrum pro kontrolu chorob (CDC – Centrum for Disease Control) poprvé v roce 1977 použilo termín „legionářská nemoc“. Kvůli nepříliš rychlému určení původce nákazy ze strany CDC panovaly v tomto období i fámy o tom, že se jedná o hoax za účelem donutit lidi, aby se očkovali proti prasečí chřipce. K dalším spekulacím patřily i informace o tom, že se jedná o nevydařený chemický vojenský experiment, či dokonce o podvod. [5], [6], [7]

Jak už bylo popsáno výše, *Legionella sp.* obecně způsobuje onemocnění, které se může prakticky projevit ve dvou formách, a to v lehčí formě jako pontiacká horečka, a nebo v mnohem závažnější formě jako legionářská nemoc. U některých jedinců nemusí propuknout žádné onemocnění a nebo mají jen velmi mírné příznaky.[8]

5.1.1 Pontiacká horečka

Jako pontiackou horečku označujeme onemocnění, které je samo-omezující, krátkodobé a velice se podobá obyčejné chřipce. Průběh nemoci je doprovázený horečkou a předchází mu expozice s *Legionella pneumophila*. Dalšími příznaky může být například celková únava, nevolnost, bolest svalů a kloubů, bolest hlavy, dušnost a kašel. [7], [8]

Vzhledem k tomu, že příznaky pontiacké horečky jsou obdobné jako i u jiných běžných onemocnění, je možné, že mnozí pacienti dosud nevědí, že toto onemocnění prodělali. K přesné diagnóze by musely být provedeny odpovídající testy na přítomnost bakterie, které se pochopitelně běžně neprovádějí u pacientů s příznaky chřipkového onemocnění. [7], [8]

Nakazit se můžeme na mnoha místech jako jsou lázně, nemocnice, hotely, restaurace, klimatizované prostory, budovy jako jsou například chaty či tzv. víkendové objekty, ve kterých není každodenní odběr teplé vody. Teplá voda tak zůstává stát v boilerch a vytváří tak ideální podmínky pro množení bakterií. Infekční bakterie se do organismu dostávají jako součást aerosolu. [7], [8]

5.1.2 Legionářská nemoc

Legionářská nemoc, označovaná také jako legionelóza, je závažné infekční onemocnění postihující respirační trakt. Onemocnění stejně jako pontiackou horečku

způsobuje bakterie *Legionella pneumophila*. Legionelóza ročně v USA postihne až 20000 lidí a pro 5-30 % z nich končí toto onemocnění smrtí. [7], [8]

Legionářská nemoc se obvykle projevuje dušností, zápalom plic, produktivním kašlem, vysokými horečkami, bolestmi těla a hlavy, průjmem, nevolností, zvracením a slabostí. K diagnostice onemocnění se používají speciální laboratorní testy. K léčbě se používají širokospektrá antibiotika jako jsou tetracykliny, makrolidy, azalidy a antibakteriální chinolony, dále pak inhalátory i běžně prodejné léky v závislosti na symptomech a potřebách pacienta. [7], [8]

Legionelóza se šíří pomocí aerosolové vody, která je vdechnuta až do plic. Zdrojem takto kontaminované vody mohou být chladicí věže používané v průmyslových vodních systémech nebo ve velkých klimatizačních systémech, dále pak v horkovodních systémech, odpařovacích chladičích, sprchách, vířivkách, strojích na výrobu ledu a ve zvlhčovačích vzduchu. Tato nákaza se nejčastěji vyskytuje v hotelích, na výletních lodích, v budovách, kde není denní odběr teplé vody, v nemocnicích, a to především v těch, které mají staré či špatně udržované potrubí. [7], [8]

5.2 Taxonomie

První kmeny legionely byly izolovány u morčat v roce 1943. Po několika prvních epidemiích legionářské nemoci, kdy se podařilo objevit, izolovat a pojmenovat první legionelu z klinického materiálu, vznikla ze strany vědců potřeba pojmenovat v roce 1979 bakteriální rod jako *Legionella sp.*, který je jediným rodem později pojmenované čeledi *Legionellaceae*. Původně měla tato čeleď obsahovat rody 3, a to rod: *Legionella*, *Fluoribacter*, *Tatlockia*. [12], [13], [15]

Podobnost DNA mezi jednotlivými bakteriálními druhy je asi 70 %. Doposud známe 66 bakteriálních druhů *Legionella sp.*, z nichž byla nebezpečnost pro člověka prokázána asi u 23. Ze zbylých druhů byla nebezpečnost pro člověka u 21 druhů zcela vyvrácena a u 22 druhů se jí zatím nepodařilo potvrdit ani vyvrátit. [12], [13], [15]

Druhy bakterií nejčastěji stanovujeme pomocí sérologických metod. Používají se antiséra získávána z králíků a v dnešní době jsou již dostupná proti všem druhům a séro skupinám *Legionella sp.* Nejrozšířenějšími druhy jsou *Legionella pneumophila sg 1* a *Legionella pneumophila sg 2-14*. [12], [13], [15]

Doména: *Bacteria*

Oddělení: *Proteobacteria*

Třída: *Gammaproteobacteria*

Řád: *Legionellales*

Čeď: *Legionellaceae*

Rod: *Legionella*

Druh	Místo objevu	Kataláza	Oxidáza	Ureáza	Redukce nitrátu	Hydrolyza hippurátu	β - laktamáza	Autofluores- cence
<i>L. adalaidensis</i>	Austrálie – Adelaide	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. anisa</i>	Severní Amerika – LA	+	+	-	-	-	-	+
<i>L. baliardensis</i>	Francie – Lyon	+	r.	-	-	-	+	-
<i>L. birninghamens is</i>	Severní Amerika – Alabama	+	r.	-	-	-	+	Žluto-zelená
<i>L. bozemanii</i>	Severní amerika	+	+	-	-	-	+	Modro-bílá
<i>L. burnensis</i>	Česká republika – Brno	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. busanensis</i>	Korea – Busan	+	+	-	+	+	+	+
<i>L. cardiaca</i>	Severní Amerika – Chicago	+	*	-	-	+	+	-
<i>L. cherri</i>	Severní Amerika – Minnesota	+	-	-	-	-	+	Modro-bílá

Druh	Místo objevu	Kataláza	Oxidáza	Ureáza	Redukce nitrátu	Hydrolyzáza hippurátu	β- laktamáza	Autofluores- cence
<i>L. cincinnatiensis</i>	Severní Amerika – Cincinnati	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. clemsonensis</i>	Severní Amerika – Ohio	+	-	-	-	-	-	zelená
<i>L. drancourtii</i>	UK – Západní Yorkshire	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. dresdenensis</i>	Německo – Drážďany	+	-	-	-	-	*	Modro-bílá
<i>L. drozanskii</i>	UK	+	-	*	*	*	*	-
<i>L. dumoffii</i>	Severní Amerika – New York	+	-	-	-	-	-	+
<i>L. erythra</i>	Severní Amerika	+	+	-	-	-	+	červená
<i>L. fairfieldensis</i>	Austrálie – Fairfield	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. fallonii</i>	UK	+	+	*	*	*	*	-
<i>L. feeleeii</i>	Severní Amerika	+	-	-	-	-/+	-	-
<i>L. geestiana</i>	UK – Londýn	+	-	-	-	+	-	-
<i>L. gormanii</i>	Severní Amerika – Atlanta	+	-	-	-	-	+	Modro - bílá
<i>L. gratiana</i>	Francie – Savoie	+	-	*	*	*	*	Modro-bílá
<i>L. gresiliensis</i>	Francie – Lyon	+	+	-	-	+	+	-
<i>L. hackeliae</i>	Severní Amerika –	+	-	-	-	-	+	-

Druh	Místo objevu	Kataláza	Oxidáza	Ureáza	Redukce nitrátu	Hydrolyzáza hippurátu	β- laktamáza	Autofluores- cence
	Ann Arbor							
<i>L. impletisoli</i>	Japonsko – Osaka	+	+	-	-	+	*	-
<i>L. indianapolisensis</i>	Severní Amerika – Indianapolis	-	+	*	*	-	+	-
<i>L. israelensis</i>	Israel	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. jamestowniensis</i>	Severní Amerika – Jamestown	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. jordansis</i>	Severní Amerika Bloomington	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. lansingensis</i>	Severní Amerika Lansing	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. londiniensis</i>	Londýn	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. longbeachea</i>	Severní Amerika – Kalifornie	+	+	-	-	-	-/+	-
<i>L. lytica</i>	*	*	-	-	-	*	*	*
<i>L. maceachernii</i>	*	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. massiliensis</i>	Francie – Bouches du Rhone	*	-	*	*	*	-	-
<i>L. micdadei</i>	Severní Amerika – Philadelphia	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. moravica</i>	Česká republika –	+	+	-	-	-	+	-

Druh	Místo objevu	Kataláza	Oxidáza	Ureáza	Redukce nitrátu	Hydrolyzá hippurátu	β - laktamáza	Autofluores- cence
	Jihlava							
<i>L. nagasakiensis</i>	Japonsko	+	*	-	-	-	+	*
<i>L. nautaurum</i>	UK	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. norrlandica</i>	Švédsko – Pitea	*	-	*	*	*	*	-
<i>L. oakridgensis</i>	Severní Amerika – Pennsylvánie	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. parisiensis</i>	Francie – Paříž	+	+	-	-	-	-	+
<i>L. pneumophila</i>	Německo	+	+ +/-	-	-	+	+	-
<i>L. quaeteirensis</i>	Portugalsko – Quarteira	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. quinlivanii</i>	Austrálie – Adelaide	+	-	-	-	-	-	Žluto-zelená
<i>L. rowbothamii</i>	*	+	-	*	*	*	*	Modro-bílá
<i>L. rubrilucens</i>	Severní Amerika – La	+	-	-	-	-	+	+
<i>L. sainthelensi</i>	Severní Amerika - Hora Svaté Heleny	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. santicrucis</i>	Americké Panenské ostrovy	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. saudiensis</i>	Saúdská Arábie – Jeddah	*	*	+	*	-	+	Modrá
<i>L. shakespearei</i>	Stratford nad	+	+	-	-	-	+	-

Druh	Místo objevu	Kataláza	Oxidáza	Ureáza	Redukce nitrátu	Hydrolyzá hippurátu	β- laktamáza	Autofluores- cence
	Avonou							
<i>L. spiritiensis</i>	Severní Amerika – Spirit Lake	+	+	-	-	+	+	-
<i>L. steelei</i>	Severní Amerika – Kalifornie	+	+/-	-	-	-	+	+
<i>L. steigerwaltii</i>	Americké panenské ostrovy	+	-	-	-	-	-	+
<i>L. taurinensis</i>	Itálie – Turín	+	+	-	-	-	-	+
<i>L. thermalis</i>	Japonsko – Tokyo	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. tusconensis</i>	Severní Amerika – Tuscon	+	-	-	-	-	-	+
<i>L. tunisiensis</i>	Afrika – Tunisko	*	*	*	*	*	-	-
<i>L. wadsworthii</i>	Severní Amerika – LA	+	-	-	-	-	+	-
<i>L. waltersii</i>	Austrálie – Adelaide	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. worsleiensis</i>	UK – Worsley	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. yabuuchiae</i>	Japonsko – Osaka	+	+	-	-	+	r.	-

Tabulka 1: Seznam druhů bakteriálního rodu Legionella

<https://legionellacontrol.com/legionella/legionella-species/>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Legionella>

Modře jsou označeny klinicky významní zástupci rodu *Legionella*.

5.3 Stavba bakteriální buňky

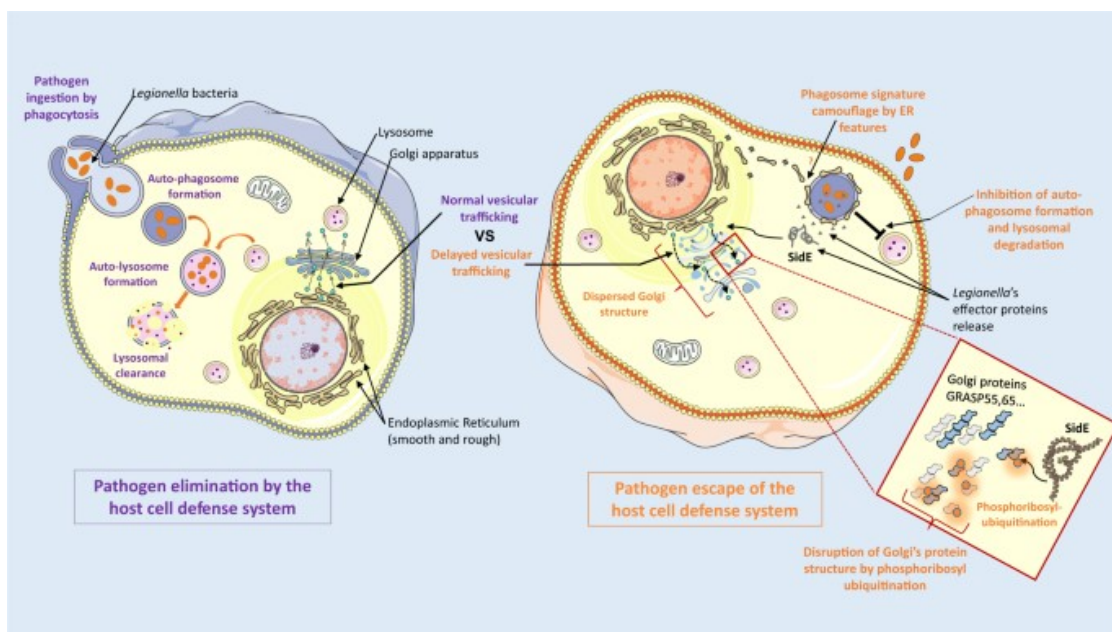
Legionella sp. je nesporeující, aerobní, gram negativní tyčka, která měří asi 2-20 μm . Její samotná buňka je poměrně tenká a pleomorfní. Při její kultivaci na povrchu agaru může mít tvar i dlouhého vlákna. Obal buňky tvoří vnější a vnitřní membrána. Na povrchu se nacházejí fimbrie, ale pohybuje se pomocí jediného, či více bičíku. Jejich dalším specifickým je také to, že jejich bakteriální stěna obsahuje krom jiného i 2,3-dihydroxy mastné kyseliny, což zatím nebylo u žádného jiného bakteriálního druhu prokázáno. [9]

Proteiny vnější membrány tvoří druhově specifické antigeny. Hlavní antigen je tvořen lipopolysacharidy vnější membrány a je specifický pro příslušnou séroskupinu. Díky těmto povrchovým antigenům pak lze bakterie rozdělit pomocí antigenní analýzy, pomocí panelů monoklonálních protilátek na příslušné kmeny. Tyto drobné rozdíly na povrchu bakterie pak mohou napomáhat jako velmi cenné informace pro epidemiologické studie. [9]

5.3.1 Životní cyklus

5.3.1.1 Možné děje v hostitelské buňce

Životní cyklus legionely začíná přichycením a proniknutím do hostitelské buňky. *Legionella sp.* se mimo jiné vyznačuje také tím, že má schopnost se velmi rychle replikovat v lidských buňkách, a to včetně alveolárních makrofágů, i jiných fagocytárních buněk. Během fagocytózy *Legionella sp.* vstupuje do prostorných vakuol makrofágů, kde vytváří tzv. fagozomy. Vzniklé fagozomy jsou pak rychle obaleny prvky endoplazmatického retikula, které mají za úkol maskovat fagozom a chrání ho před lysozomální degradací. Nejnovější studie také ukazují, že *Legionella sp.* využívá tzv. SidE efekторы k podpoře ubikvitinace Golgiho proteinů vázaných na fosforibosyl, což vede k narušení organel a k celkové změně sekreční dráhy hostitele. [10]



Obrázek 1: Hostitelská buňka zlyzuje patogen, patogen se pomnoží v buňce

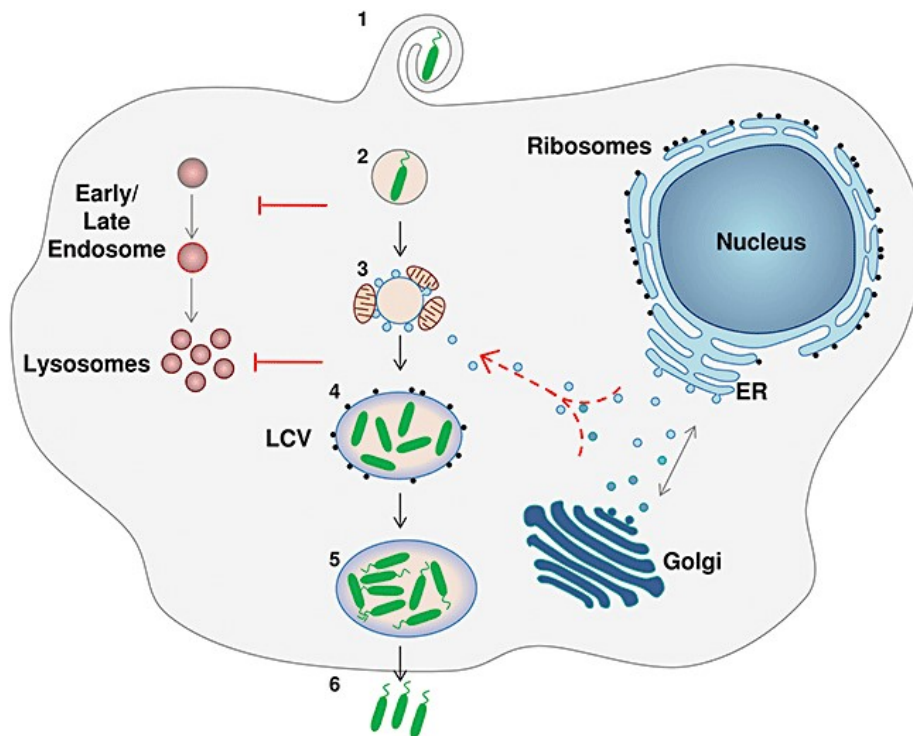
Zdroj: <https://www.nature.com/articles/s41418-021-00860-6>

Na obrázku vlevo je znárodněna druhá možná cesta, a to eliminace patogenu buňkou. Bakterie se zde nacházejí uvnitř fagozomů, které jsou poté zničeny v lysozomech. Naopak na obrázku na pravé straně je znázorněn první popisovaný případ, kdy se fagozom obalil proteiny z endoplazmatického retikula a je tak chráněn proti rozpoznání a následné degradaci v lysozomu. Kromě toho efektorové proteiny *Legionella sp.* SidE unesou ubikvitinový systém hostitelských buněk a katalyzují fosforibosyl-ubikvitinaci (PR-Ub), atypickou post-translační modifikaci proteinů hostitelských buněk, čímž udělují bakteriím přežití uvnitř hostitelských buněk. Mechanicky proteiny SdeA ubikvitinují GRASP55 a GRAPS65, které jsou kritické pro udržení Golgiho struktury, což vyvolává rozptyl organel. To zase způsobuje poruchu sekreční dráhy hostitelské buňky. [10]

5.3.1.2 Fáze replikace v hostitelské buňce

Bakterie rodu *Legionella sp.* se přichytí k povrchu hostitelské buňky, pronikne do ní a usadí se ve vakuole. Vakuola obsahující bakterie se poté vyhýbá spojení s lysozomy a endozomy, aby nedošlo k jejímu absorbování. Vakuola naopak vyhledává mitochondrii, se kterou by mohla interagovat. Po interakci dochází k replikaci a

k přijmutí vezikul z endoplazmatického retikula, přes Golgiho aparát, na stěnu vakuoly. Vakuola se obklopí ribosomy, i nyní dochází k několika replikacím a utvoření bičíku. V poslední fázi životního cyklu legionely unikají bakterie z hostitelské buňky, při její lýze, směrem k sousedním hostitelským buňkám, kde započnou svůj nový infekční cyklus. [11]



Obrázek 2: Intracelulární životní cyklus Legionely

Zdroj: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2009.01351.x>

5.4 Laboratorní metody detekce

Mezi základní laboratorní metody patří kultivace, sérologie a detekce močového antigenu.

5.4.1 Kultivace

Legionely ve svém přirozeném prostředí, jako jsou teplovodná potrubí či klimatizace, nejsou vůbec náročné a dokáží se množit i v nepřátelském prostředí fagocytárních buněk. Opak je pravdou při laboratorních kultivacích. Legionely jsou jedny z vůbec nejnáročnějších bakteriálních druhů, co se týče kultivace. Podobně náročné jsou například Francisely. Oba tyto bakteriální rody totiž při své kultivaci

požadují přítomnost L-cysteinu a železa. energii získávají spíše z aminokyselin než ze sacharidů. [9]

Pro kultivaci *Legionella sp.* používáme pufrovaný agar s kvasinkovým extraktem – BCYE (Buffered charcoal yeast extract agar), který je doplněný α -ketoglutarátem s nebo bez antimikrobních látek. Někdy se také používá GVPC půda (Glycin, Vankomicin hydrochlorid, Polymyxin B sulfát, Cykolheximid). Obě půdy se kultivují ve vlhké atmosféře při teplotě kolem 36 °C dnem vzhůru po dobu 7 až 10 dnů (kvůli jejich pomalému růstu), přičemž průběžné odečty se provádí již během 3 a 5 dne kultivace. Konečný odečet se provede na konci kultivace. [14]

Kolonie rodu *Legionella sp.* bývají obvykle bílo-šedé barvy, ale mohou být zbarveny i jinak. Příkladem může být *Legionella erythra* a *Legionella rubrilucens*, které mají červené kolonie, či *Legionella pneumophila*, jejíž kolonie bývají mdle zelené se žlutým nádechem. Kolonie mají charakteristický vzhled tzv. broušeného skla, jsou hladké s celistvým okrajem. V UV záření vykazují některé druhy jako např. *Legionella anisa*, *Legionella cherrii*, *Legionella parisiensis* bílou autofluorescenci. [15]

Kultivace nám umožňuje získat čistou kolonii příslušného bakteriálního druhu, kterou můžeme následně použít k dalším laboratorním vyšetřením.

5.4.1.1 Metoda membránové filtrace

Metoda membránové filtrace se provádí na filtračním zařízení, kdy se do nálevky předkládá 100 ml vzorku vody nebo případně 50 ml, pokud je předpokládán vyšší obsah mikroorganismů (doprovodné mikroflóry). K filtraci se používají nitrocelulóзовé membránové filtry nebo membránové filtry se směsí esterů celulózy. Tzv. kyselé promytí se provádí u vzorů, kde je vyšší obsah doprovodné mikroflóry nebo u vzorků, kde je podezření, že na půdě narostly i jiné bakterie než jen *Legionella sp.* [15]

Kyselé promytí se také provádí během membránové filtrace, kdy se na filtr, přes který byl již filtrován vzorek, nalije 30 ml tzv. promývací kyseliny. Promývací kyselina se nechá působit 5 minut a poté se tak zfiltruje. [15]

Membránové filtry se poté opatrně vyjmou z filtračního zařízení sterilní pinzetou a velmi opatrně se přenesou horní stranou vzhůru na kultivační medium tak, aby filtrační papír k půdě hezky přilnul a nebyly pod ním žádné vzduchové bubliny. Plotny

s filtrem se nechávají stát, aby filtr lépe přilnul k agaru. Pak se plotny otočí dnem vzhůru a inkubují se 7 až 10 dní při 36 ± 2 °C ve vlhké atmosféře (aby nedocházelo k vysychání půdy). [15]

Na konci inkubace se provede konečný odečet. Pokud na filtru poleženém na půdu nic nenarostlo, vzorek je negativní – *Legionella sp.* nebyla přítomna. Pokud narostly kolonie připomínající kolonie legionely, jejich druh se stanoví podle dalších metod, jako je například aglutinace. [15]



Obrázek 3: Filtrační zařízení

Zdroj: autorka práce

5.4.1.2 Metoda přímé inokulace na kultivační půdu

Provádí se inokulací neupraveného, teplem upraveného nebo kyselinou upraveného vzorku na jednu BCYE půdu a na jednu či více selektivních, případně vysoce selektivních půd, jako je například: BCYE+ATB, GVPC, MWY. Objem inokula se pohybuje v rozmezí 0,1 až 0,5 ml a musí být zaznamenán. [15]

Inokulum se roztírá po celé ploše agaru. Plotny se nechávají stát, aby se inokulum mohlo absorbovat do půdy. Pak se plotny otočí dnem vzhůru a inkubují se 7 až 10 dní při 36 ± 2 °C ve vlhké atmosféře (aby nedocházelo k vysychání půdy). [15]

Na konci inkubace se provede konečný odečet. Pokud na půdě nic nenarostlo, vzorek je negativní – *Legionella sp.* nebyla přítomna. Pokud narostly kolonie připomínající kolonie legionely, jejich druh se stanoví podle dalších metod, jako je například aglutinace. [15]

5.4.2 Detekce močového antigenu

Detekce močového antigenu patří společně s kultivací k nejčastějším metodám užívaným k detekci *Legionella sp.* Metoda je určena k velmi rychlému stanovení

diagnózy a využívá imunoanalýzy ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). V moči pacienta v případě, že je skutečně infikován legionelou, se nachází specifický lipopolysacharidový antigen, který lze v moči identifikovat od 3. dne po propuknutí příznaků onemocnění. Tento antigen v těle pacienta může setrvávat i několik týdnů. [16]

Samotné vyšetření trvá asi 15 minut a díky dostupným soupravám je možné jej provést i u lůžka pacienta s podezřením na legionelózu. Jedinou nevýhodou tohoto vyšetření je to, že soupravy umí identifikovat pouze *Legionella pneumophila*, nikoliv však jiné druhy legionel. [16]



Obrázek 4: Test močového antigenu

Zdroj: <https://www.globalpointofcare.abbott/cs/product-details/binaxnow-legionella.html>

5.4.3 Sérologie

Sérologie je metoda založená na průkazu specifických antigenů a protilátek. Při detekci legionářské nemoci se využívá lidských imunoglobulinů IgA, IgM a IgG, které mohou reagovat s antigenem *Legionella pneumophila* za vzniku aglutinace – shluků. V infekční sérologii se využívá především detekce imunoglobulinu IgM, protože se objevuje v počátcích onemocnění. IgM je ovšem poměrně nespolehlivým ukazatelem akutní infekce, protože jeho zvýšená hladina může v těle pacienta přetrvávat i delší dobu. [16]

Metoda je o něco méně spolehlivá než výše zmíněné metody, jelikož může trvat i několik týdnů, než dojde ke zvýšení protilátek neboli sérokonverzi. I přes to je ale součástí běžné laboratorní praxe a slouží k identifikaci hlavních, patogenní druhů

Legionella sp. a jejích sérotypů. Pro sérologii se používají komerční identifikační soupravy, které se musí uchovávat v lednici. [16]

5.4.4 Nepřímá imunofluorescence

Nepřímá imunofluorescenční zkouška se používá k určení druhu *Legionella sp.* Používají se diagnostické sérologické přípravky, u kterých známe jejich specifitu a jejich zdroj. Dále se zde používají monoklonální i polyklonální protilátky, které jsou schopné reagovat se všemi séroskupinami bakterie *Legionella pneumophila*. Existují i specifická antiséra pro jiné druhy a sérotypy, než je *Legionella pneumophila*. Dalším nezbytným činidlem pro tuto metodu je FITC – Fluorescein izothiokyanatan s antikráličím konjugátem. [15]

Na začátku této zkoušky potřebujeme především čisté kolonie legionely z BCYE agaru. Několik těchto kolonií se emulguje do formaldehydového solného roztoku, případně do vody. Vzniklá suspenze se nechá deaktivovat při 60 °C po dobu jedné hodiny. K deaktivované suspenzi se přidá roztok tlumeného fosforečnanu tak, aby vznikl roztok o vhodné optické hustotě. [15]

Poté se na titrační destičky do každé jamičky přidá 5 µl každého antigenu, který se nechá zafixovat nad Bunsenovým kahanem po dobu 10 min. Poté se přidá do jamiček antisérum vytvořené z kolonií *Legionella sp.* Destička se umístí do příslušné nádoby společně s navlhčenou tkaninou (aby nedošlo k vysychání) a nádobka se nechá inkubovat při 36 °C po dobu 30 minut. [15]

Destičky se po inkubaci opláchnou roztokem tlumeného fosforečnanu, do jamiček se přidá FITC a destička se opět nechá inkubovat za stejných podmínek po dobu 30 minut. Po druhé inkubaci se do všech jamiček nakape tzv. glycerolové uzavírací medium. Destičky se vyhodnocují pomocí epifluorescenčního mikroskopu. Ty buňky, které vykazují jasně zelenou fluorescenci, potvrzují daný druh rodu *Legionella sp.* [15]

5.4.5 Detekce nukleových kyselin pomocí PCR

PCR neboli „Polymerase Chain Reaction“ je molekulárně-biologická metoda sloužící k identifikaci bakteriální DNA u pacientů s podezřením na *Legionella sp.* Je to jedna z mála metod, která je schopna odhalit jakýkoliv známý druh legionely, nikoli

pouze *Legionella pneumophila* jako například u metody detekce močového antigenu. Metoda PCR patří k nejcitlivějším a nejpřesnějším metodám a lze ji použít i v reálném čase (real-time PCR). [16]

Tuto metodu je možno aplikovat jak na vzorky vody, tak i na klinické vzorky, jako je například, krev, sputum z dýchacích cest, bronchoalveolární výplach, absces či moč. Tento způsob detekce se pyšní spolehlivostí až 99 % a výsledky jsou již druhý den po odběru vzorku. Při této metodě nezáleží na objemu vzorku, nejsou poskytovány kvantitativní výsledky a nemohou být produkovány kmeny pro epidemiologické studie. Z tohoto vyplývá, že PCR poskytuje pouze kvalitativní výsledky a např. kultivace poskytuje výsledky kvantitativní. Pomocí PCR tedy prokazujeme pouze přítomnost či nepřítomnost daného infekčního agens. Pomocí real-time PCR lze získat i výsledek kvantitativní a lze tedy sledovat průběh onemocnění v čase. [17], [18]

5.5 Výskyt legionelózy v České republice

Nejčastějším druhem *Legionella sp.*, způsobujícím respirační onemocnění, je *Legionella pneumophila*. Nejohroženějšími skupinami jsou děti, osoby s poruchami imunity, kuřáci a starší muži. Navzdory vyspělosti naší země se počty onemocnění způsobené legionelou téměř každoročně navyšují. [19]

Šíření napomohla i epidemie COVID-19, která začala v roce 2019. Během epidemie se v potrubí méně využívaných objektů jako byly např. školy, úřady, restaurace či kulturní zařízení zadržovala voda o ideální teplotě pro množení bakterií. K dalším faktorům pro šíření této bakterie též připívá i zanedbané staré potrubí či špatně zvolná dezinfekce. [20]

Nejčastější výskyt byl meziročně zaznamenán v Praze, dále pak ve Zlíně, Přerově a Liberci. Nejčastějšími místy výskytu jsou pak nemocniční zařízení a hotely. Typicky se tedy jedná o místa napojená na centrální rozvody teplé vody a ventilační zařízení. [19]

2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
25	42	58	56	67	110	120	147	218	213	280	216	239	287	340

Tabulka 2: Počty onemocnění za poslední roky

Zdroj: https://szu.cz/wp-content/uploads/2024/01/Tabulka_leden-prosinec_2023.pdf

5.6 Léčba

Legionářská nebo i pontiacká horečka jsou onemocnění bakteriálního původu, z čehož vyplývá, že jsou léčena pomocí antibiotik. Jak již bylo zmíněno, bakterie legionely atakují makrofágy, tudíž je nutné použít takové antibiotikum, které proniká i do makrofágů. V běžných případech se podává erytromycin a tetracyklin. V těžších případech, např. u hospitalizovaných pacientů se podává levofloaxin a azitromycin (makrolidy). U hospitalizovaných pacientů, se antibiotika obvykle podávají nitrožilně po dobu až 4 týdnů. [22], [23]

Kromě léčby antibiotiky je též velmi podstatné podávání většího množství tekutin a kontrolování správné funkce ledvin a jater. Při zanedbání léčby a ignorování příznaků onemocnění ze strany pacienta může dojít k závažnému zánětu pohrudnice. Mohou vznikat i trvalé následky, které se projevují zapouzdřením zánětlivých míst, kdy je původní měkká tkáň nahrazena vazivem. [22]

5.7 Patogeneze

Touto nákazou jsou obvykle více postihováni muži, a to v poměru 3,3:1. Člověk se legionelou nakazí v momentě, kdy vdechne vodní aerosol obsahující bakterie *Legionella sp.* Poté co se bakterie dostanou do dýchacího traktu, tak adherují na respirační epitel a dostávají se do buněk, kde dochází k jejich množení. Inkubační doba tohoto onemocnění je 2-10 dní. Mohou propuknout dva typy onemocnění, a to lehčí forma tzv. pontiacká horečná, která je podobná chřipce a doprovázena zvýšenou teplotou, únavou, nevolnostmi, bolestí hlavy a svalů. [10], [19], [21]

Naopak při propuknutí druhého, závažnějšího, typu onemocnění jsou příznaky mnohem nepříjemnější. Tzv. legionářská nemoc je kromě příznaků chřipky

doprovázená také zápalom plic. Onemocnění má obvykle delší průběh, a to několik týdnů, až měsíců. U některých pacientů může skončit i smrtí. [21]

5.8 Prevence

K základním preventivním opatřením patří dodržování správné životosprávy, nekouřit a posilovat svoji imunitu. U pacientů, kteří mají obtíže s dýchacím ústrojím, onemocnění plic, jsou po operacích nebo užívají imunosupresivní léky se doporučuje nenavštěvovat místa, kde se vyvíjí pára z horké vody, jako jsou např. sauny, veřejné sprchy, wellness zařízení nebo lázně. Náchylnější jsou též diabetici a pacienti s onemocněním ledvin. Při podezření na nákazu je nezbytné ihned navštívit lékaře. Potvrzení nákazy podléhá hlášení, provádí se tzv. epidemiologické šetření a majitel objektu se zdrojem nákazy je povinný počet eliminovat minimálně pod hladinu KTJ, která je tolerována vyhláškou č. 252/2004 sb. [19], [20], [22]

Základním preventivním opatřením pro vodní potrubí je udržování teploty studené vody pod 20 °C a teploty teplé vody nad 50 °C, aby nedocházelo k vytváření ideálních tepelných podmínek pro množení bakterií. Doporučuje se též používání průtokových ohřívačů vody, aby nedocházelo ke stagnaci a tvorbě biofilmů. Záleží i na materiálu, ze které je potrubí vyrobeno. Jako ideální materiál byla označena měď, méně vhodné jsou pak plasty. [20]

5.9 Eliminace legionel ve vodě

Eliminaci legionel ve vodě můžeme rozdělit na primární a sekundární. Tzv. primární eliminace zahrnuje „znepříjemnění růstu“, které zahrnuje vhodnou stavbu potrubí, vhodný materiál, cirkulaci vody, zabránění vzniku „mrtvých koutů“, kde by mohla voda stagnovat, atd. [19], [20]

Sekundární eliminace se aplikuje na místech, kde množství *Legionella sp.* přesahuje množství tolerované vyhláškou. Sekundární eliminace má dva typy, a to termický a chemický. Termický způsob spočívá v tzv. přehřívání systému, kdy se bakterie ničí pomocí vysoké teploty vody, ve které nemohou přežít. Chemický způsob zahrnuje dezinfekci pomocí ozonu O₃, chloru a nebo chlordioxidu, který se připravuje pomocí generátoru na místě potřeby. [20]

Metoda dezinfekce pomocí chlórdioxidu je v dnešní době nejúčinnějším způsobem v boji proti legionele ve vodním potrubí. Tímto způsobem lze ošetřit vodu užitkovou, teplou průmyslovou i pitnou. [20]

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část práce byla prováděna autorkou práce ve Státním zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, na oddělení biologických analýz, na pracovišti v Jihlavě, pod vedením paní Ing. Pavlíně Silvestrové. V této části se autorka prakticky zaměřila na detekci bakterií rodu *Legionella* ze vzorků vody a ze stěrů. Vzorky byly odebírány na různých místech v kraji Vysočina. Mikrobiologické rozbory byly prováděny dle normy ČSN ISO 11731 Kvalita vod – Stanovení bakterií rodu *Legionella sp.* Tato norma je českou verzí evropské normy EN ISO 11731: 2017 a má stejný status jako oficiální verze.

6.1 Odběr vzorků

Postup odběru vzorků vod vychází z požadavků technických norem pro odběr vzorků a z platné legislativy (ISO 19458). K odběru vzorku slouží tzv. vzorkovnice, určené pro jednotlivá stanovení. Samotná odběrová lahev musí být sterilní a obsahuje thiosíran sodný 20 mg/l. Vzorkovnice je nutno plnit tak, aby v láhvi zůstala vzduchová bublina, která sehraje svoji roli při protřepávání vzorku v laboratoři před samotným vyšetřením. [24]



Obrázek 5: Odběrová lahev

Zdroj: autorka práce

Při odběrech vod pro stanovení legionel je nutné dodržovat současnou českou i evropskou legislativu, aby získané výsledky byly dobře porovnatelné. Součástí vyhlášek jsou totiž i limitní hodnoty pro definované objemy.

Pro účely epidemiologického šetření se odběr provede bez jakýchkoliv úprav na výtoku teplé vody – neodstraňují se perlátory a přídavná zařízení, neproplachuje se, neprovádí se dezinfekce. Odebírá se první porce vody z kohoutku nebo sprchy.

Odběry stěrů z vodovodní sítě jsou důležité při průkazu zdroje nákazy v případě onemocnění, kdy vzorek vody, výsledek stěru, může být při standartním odběru negativní. Legionely se vyskytují především v biofilmech. Biocidy dokáží úspěšně eliminovat legionely z vody, ale většinou selhávají při potlačení v biofilmech. Cílem stěrů je doplnit vyšetření vody a prokázat přetrvávající přítomnost legionel ve vybraných lokalitách.

Během transportu vzorků do laboratoře musí být vzorek chlazen. Pro stanovení rodu *Legionella sp.* je transportní teplota mezi 6 °C a 18 °C. Teplá voda a stěry se přepravuje bez chlazení.

6.2 Zpracování v laboratoři

Vzorek je na pracoviště dopraven příslušným pracovníkem, jehož úlohou bylo získat reprezentativní vzorek, dle předepsaných postupů pro správný odběr vzorku. Vzorek prochází přes tzv. příjem vzorků do příslušné laboratoře.

6.2.1 Přístroje a pomůcky

Používá se běžné vybavení mikrobiologické laboratoře: sterilní Petriho misky, termostat vytemperovaný na 36 °C (± 2 °C), přístroj pro membránovou filtraci, membránové filtry, dávkovač filtrů, pH – metr, vodní lázeň a sterilní laboratorní pomůcky (jako jsou pipety, odměrné válce, ohnutá skleněná tyčinka, pinzety atd.). [24]

Mezi speciální pomůcky pro stanovení legionel patří:

Černé membránové filtry – pro přímé položení na kultivační médium po zkoncentrování vzorku. Jsou vyrobeny z nitrocelulózy či ze směsi esterů celulózy. Mají průměr 47-50 mm a průměrnou velikost pórů 0,2 μm nebo 0,45 μm . Černé membránové filtry lépe kontrastují s bílými koloniemi legionel.

Stereoskopický mikroskop – zvětšující nejméně 4krát, se šikmým horním světlem.

6.2.2 Kultivační média a činidla

Pro přípravu kultivačních médií a činidel se používají látky analytické kvality, označované jako p.a., které se vyznačují maximální možnou čistotou. Média pro kultivaci se připravují podle daných pokynů z destilované nebo demineralizované vody, která neobsahuje látky, které by mohly ovlivnit růst mikroorganismů za podmínek zkoušky. Používají se i komerčně dostupná kultivační média a činidla, připravená a užívaná podle pokynů výrobce. [24]

Pro stanovení legionel jsou v běžné laboratorní praxi používána tato kultivační média:

BCYE	Tlumivé kultivační médium s aktivním uhlím a kvasničným extraktem	
BCYE-cys	Tlumivé kultivační médium s aktivním uhlím a kvasničným extraktem bez L-cysteinu	Místo média BCYE-cys se může použít krevní agar, živný agar nebo trypton-sójový agar
BCYE + ATB	Tlumivé kultivační médium s aktivním uhlím, kvasničným extraktem a selektivními suplementy	Antibiotikum – azithromycin, levofloxacin, erytromycin
GVPC	Kultivační médium s glycinem, vankomycinem, polymyxinem B a cykloheximidem	Vysoce selektivní kultivační médium
		<i>Poznámka: Toto médium bylo používáno při experimentální práci</i>
MWY	Modifikované médium Wadowsky Yee	Vysoce selektivní kultivační médium

Tabulka 3: Kultivační média

Zdroj: [24]

Zředovací roztoky používáme v případě, že je nutné ředění, jelikož se předpokládá vysoká koncentrace legionel ve vzorku. Jako ředící médium lze použít: Pageho solný roztok, zředěný Ringerův roztok, solný roztok tlumený fosforečnanem nebo sterilní vodu. [24]

Kyselý tlumivý roztok používáme pro snížení růstu doprovodné mikroflóry, která může ovlivnit výtěžnost cílových legionel. Roztok se připravuje smícháním roztoku kyseliny chlorovodíkové a roztoku chloridu draselného v přesně definovaných poměrech daných normou. [24]

6.2.3 Postup zpracování

Vzhledem ke komplexní povaze různých matic vzorků je nutné nejprve určit vhodnou metodu pro daný typ vzorku. U vzorků vody máme čtyři základní metody zpracování, a to: membránový filtr na plotně, filtrace se smytím, přímé očkování a očkování po zředění. [24]

6.2.3.1 Vzorky s nízkou koncentrací legionel

Nejpoužívanější metodou je metoda membránové filtrace a přímého přenesení membránového filtru na kultivační medium GVPC. Vzorky s nízkou koncentrací legionel a nízkou koncentrací rušivých mikroorganismů se očkují na plotny s BCYE, nebo BCYE + ATB, GVPC nebo MWY médium. [24]

Ve vzorku potenciaálně přítomné legionely se zkoncentrují podtlakovou filtrací přes speciální černý filtr uložený na dně filtrační nálevky. Obvykle je filtrováno 50 ml vzorku. Po každé filtraci daného vzorku je nutné filtrační nálevku opálit plynovou pistolí, aby byla nálevka pro následující vzorek opět sterilní a nedocházelo tak ke kontaminaci.



Obrázek 6: Aparatura pro membránovou filtraci

Zdroj: autorka práce



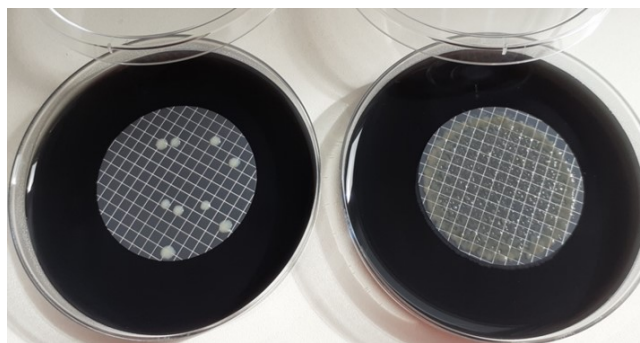
Obrázek 7: Filtrační nálevka s černým filtrem

Zdroj: autorka práce

Je-li nutné snížit růst doprovodné mikroflóry, která může snížit výtěžnost cílových legionel, provádí se úprava určitého objemu vody teplem, kyselinou, nebo kombinací obou úprav. Vzorky s vysokou koncentrací rušivých mikroorganismů se očkují na plotnu GVPC nebo MWY médium. Typickou bakterií, která tzv. přerůstá kolonie legionely, je *Pseudomonas aeruginosa*. [24]

6.2.3.1.1 Úprava vzorku kyselinou

Tzv. kyselé promytí se provádí tak, že je nejprve zfiltrováno 50 ml vzorku a poté se filtr zalije 30 ml kyselého tlumivého roztoku. Ten se na filtru ve filtračním nástavci nechá 5 minut působit. Poté kyselý tlumivý roztok zfiltrujeme a přeneseme na plotnu s GVPC.



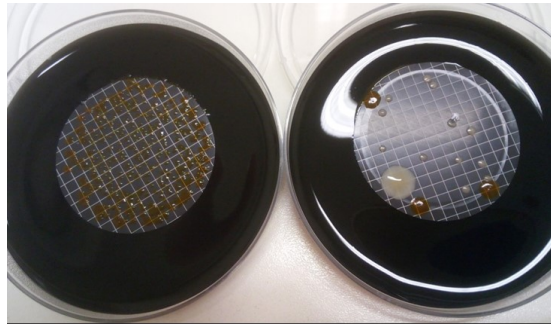
Obrázek 8: Plotna po kultivaci s úpravou a bez úpravy kyselým roztokem

Zdroj: autorka práce

6.2.3.1.2 Úprava vzorku teplem

Do sterilní nádoby se přidá vzorek a vloží se do vodní lázně vytemperované na $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ na dobu (30 ± 2) min. Používají se malé objemy (≤ 5 ml), aby doba do

dosažení požadované teploty byla krátká. Doba úpravy začíná po dosažení požadované teploty. [24]

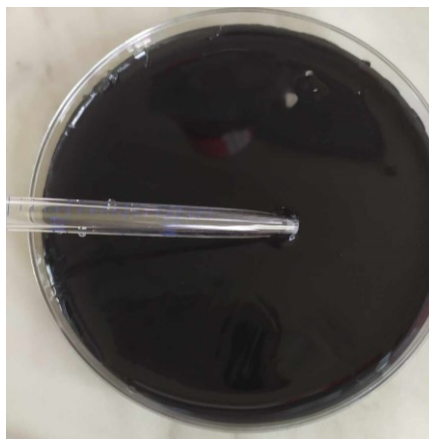


Obrázek 9: Plotna po kultivaci s úpravou a bez úpravy teplem

Zdroj: autorka práce

6.2.3.2 Vzorky s vysokou koncentrací legionel

Ředění je nezbytné, pokud se předpokládá vysoká koncentrace legionel nebo dalších bakterií. Pokud předpokládáme, že koncentrace legionel ve vzorku bude vyšší než 10^4 CFU/l, provádíme obvykle přímé očkování nekonzentrovaného vzorku. Objem vzorku je v rozmezí 0,1 – 0,5 ml a jako kultivační média se používají: jedna plotna BCYE a jedna plotna BCYE+AB. Vzorek na půdu aplikujeme pomocí pipety a pot rozetřeme po celé ploše plotny zahnutou skleněnou tyčinkou. [24]



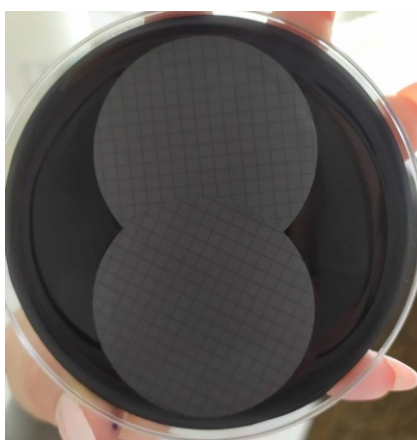
Obrázek 10: Metoda přímého očkování

Zdroj: autorka práce

6.3 Kultivace

Upravené nebo neupravené zkušební podíly vzorku se přenesou na plotny vybraného kultivačního média, selektivního pro organismy rodu *Legionella sp.* a inkubují se.

U filtrů dbáme na to, aby mezi filtrem a kultivačním médiem nevznikaly žádné vzduchové bubliny, protože by mohly omezovat růst bakterií rodu *Legionella sp.* Naopak je u běžné laboratorní praxe možné na jednu plotnu aplikovat i 2 filtry (pokud nebylo provedeno kyselé promytí, či jiná úprava vzorku a jedná se o běžné kontrolní vyšetření). Filtry se pokládají na agar pomocí sterilní pinzety horní stranou vzhůru.



Obrázek 11: Filtry na kultivačním médiu

Zdroj: autorka práce

Plotny, na které byl aplikován určitý objem vzorku, se po rozetření skleněnou tyčinkou nechávají ještě asi 10 minut ležet půdou dolů a až po úplné absorpci vzorku do kultivačního média je možné plotnu otočit dnem vzhůru.

6.3.1 Inkubace

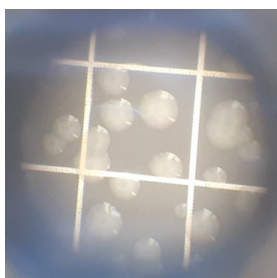
Inkubace probíhá při teplotě 36 °C (± 2 °C) po dobu 7 až 10 dnů. Plotny jsou umístěny v termostatu dnem vzhůru. Aby nedocházelo ke ztrátám vlhkosti, bývají plotny obvykle umístěny v uzavíratelné nádobě případně v igelitovém sáčku. Vlhkost v termostatu lze také podpořit umístěním nádoby s vodou mezi inkubované mističky. Vlhká atmosféra je při inkubaci klíčová. [24]

6.4 Vyhodnocení

Během inkubační doby se provádí tzv. předečítání misek, a to mezi druhým až pátým dnem inkubace. Toto předečítání slouží k identifikaci vzorků s přerostlými koloniemi. Tyto vzorky jsou pak následně znovu zpracovány s použitím úpravy kyselinou či teplem. Lze použít i metodu zředění.

V případě vyšetřování epidemií je vhodné u vzorku s očekávanou vysokou koncentrací rušivých mikroorganismů kontrolovat plotny 2. den, aby se určilo, zda je potřebné vzorek ředit. [24]

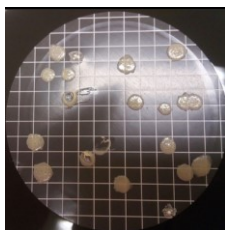
Finální vyhodnocení se provádí na konci inkubační doby, která připadá na 7. až 10. den od začátku inkubace. Protože legionely rostou pomalu a mohou být maskovány růstem jiných mikroorganismů, doporučuje se také používat stereoskopický mikroskop se šikmým horním světlem. [24]



Obrázek 12: Vzhled kolonií pod stereoskopickým mikroskopem

Zdroj: autorka práce

Kolonie bakterií rodu *Legionella sp.* mají obvykle bílo-šedou barvu, ale mohou mít i jiné barvy. Jsou hladké s celistvým okrajem. Charakteristickou vlastností je pro ně „vzhled broušeného skla“. V UV záření kolonie některých druhů vykazují brilantně bílou autofluorescenci. Kolonie *Legionella pneumophila* jsou mdle zelené, často s nádechem do žluta. Je pro ně typický i tzv. kyselý zápach kolonií na plotně. [24]



Obrázek 13: Kolonie rodu *Legionella sp.* po kultivaci

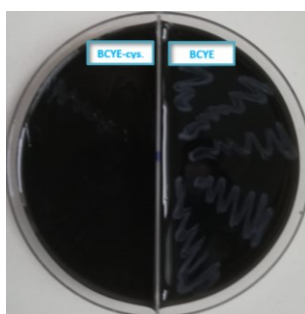
Zdroj: autorka práce

6.4.1 Potvrzení kolonií presumptivních bakterií rodu *Legionella* sp.

Potvrzení se provádí na kultivačních mediích BCYE médium a BCYE-cys. médium. Obě média se obvykle nacházejí na jediné plotně a jsou od sebe oddělena přepážkou.

Z plotny (či ploten) s nejvyšším počtem presumptivních kolonií legionel, na objem vody, se provede subkultivace. Pokud jsou všechny kolonie stejného typu, vyberou se tři presumptivní kolonie. Pokud na plotně roste více morfologicky odlišných typů presumptivních kolonií legionel, vybere se alespoň jedna kolonie každého typu.

Dále se provádí tzv. subkultivace na BCYE médiu a BCYE-cys. médiu. S koloniemi se nesmí přenést kultivační média. Nejdříve očkujeme na BCYE-cys. médium a poté na BCYE médium. Inkubace probíhá při teplotě 36 ± 2 °C po dobu 2 dnů až 5 dnů. Za legionelly se považují ty kolonie, které rostou na plotně BCYE média, ale nerostou na plotně BCYE-cys. média.



Obrázek 14: Potvrzení kolonií rodu *Legionella* na půdě BCYE

Zdroj: autorka práce

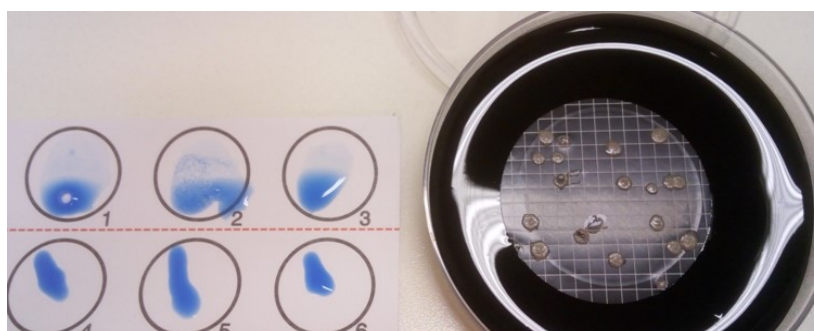
6.4.2 Sérologická identifikace *Legionella pneumophila*

Pro běžnou laboratorní praxi je dostačující používání komerčních identifikačních souprav. Soupravy využívají latexové částice obohacené protilátkami, které aglutinují v přítomnosti specifických antigenů legionel za vzniku viditelných shluků. Testy jsou rychlé, snadné a umožní rychlou identifikaci hlavních patogenních druhů a sérotypů legionel.

Legionella Latex Test využívá modré latexové částice obohacené protilátkami, které aglutinují v přítomnosti specifických buněčných antigenů legionel a vytváří viditelné shluky.

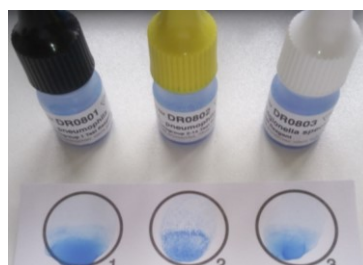
Pomocí identifikační soupravy lze rozlišit sérotyp:

- *Legionella pneumophila* sg. 1 (černý uzávěr činidla)
- *Legionella pneumophilla* sg. 2-14 1 (žlutý uzávěr činidla)
- *Legionella* spp. (bílý uzávěr činidla)



Obrázek 15: Identifikace séro skupiny *Legionella pneumophilla* sg. 2-14

Zdroj: autorka práce



Obrázek 16: Testovací činidla

Zdroj: autorka práce

6.5 Vyjádření výsledků

Při vyjadřování výsledků musíme vždy brát v úvahu ředění vzorku. Pro vyhodnocení vzorku se vždy vybírá plotna nebo plotny s nejvyšším počtem potvrzených kolonií na objem vzorku. Výsledky udáváme v jednotce CFU/l, neboli počet kolonií tvořících jednotku rodu *Legionella* na daný objem vzorku.

Výsledky u vzorku stěrů se mohou vyjadřovat jako počet legionel na 100 cm². Pokud byl stěr proveden na místě, kde nelze jednoznačně stanovit velikost setřené plochy, například v případě nepravidelných povrchů, zaznamená se přítomnost/nepřítomnost legionel na stěr.

7. VÝSLEDKY

Tato část bakalářské práce porovnává data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, o šetření bakterií rodu *Legionella* v letech 2012–2022. Jelikož pod Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě spadá pouze polovina České republiky, nebylo možné zpracovat informace celorepublikově. Jsou zde tedy zpracovány informace o výskytu legionely v Jihomoravském kraji, Zlínském kraji, Olomouckém kraji, Moravskoslezském kraji a podrobně, podle okresů, v Kraji Vysočina. Ostatní kraje spadají pod Státní zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem.



Obrázek 17: Pracoviště Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě

Zdroj: <https://www.firmy.cz/detail/363188-zdravotni-ustav-se-sidlem-v-ostrave-ostrava-moravska-ostrava.html>

7.1 Počty vyšetřovaných pacientů v jednotlivých letech

V letech 2012 až 2022 bylo na přítomnost bakterií rodu *Legionella*, ve Státním zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, vyšetřováno celkem 153 pacientů. Celkově se dá říci, že počet vyšetření během let spíše stoupal. Nejvyšší počet vyšetření byl proveden v roce 2017. [27]

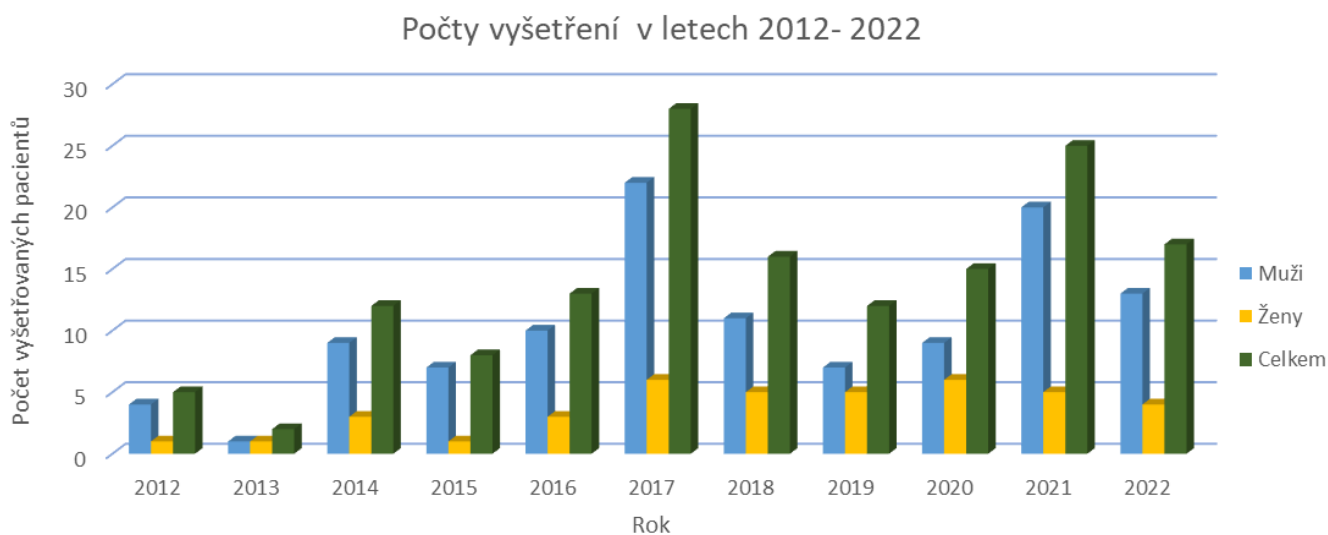
Zvýšený počet epidemiologických šetření a vyšetření je způsobem vývojem medicíny i mikrobiologie. Během minulých let se tento bakteriální rod dostal více do podvědomí obyvatelstva, odborní pracovníci o něm získali více informací a tudíž vzrostl i počet vyšetření, a to jak preventivních, tak i epidemiologických. Dříve byla onemocnění způsobována bakteriálním rodem *Legionella* často zaměňována za chřipku či zápal plic, k čemuž částečně dochází i v dnešní době.

Epidemiologická šetření se provádějí u pacientů, u kterých byla z klinického materiálu potvrzena legionelóza, ale hledá se jejich potencionální zdroj nákazy. Potvrzení legionelózy totiž podléhá hlášení na Krajskou hygienickou stanici, která si poté vyžádá epidemiologické šetření od Státního zdravotního ústavu. Cílem je najít zdroj nákazy. Z potencionálních zdrojů nákazy se odebírá několik vzorků vody a několik stěrů.

Rok	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Muži	4	1	9	7	10	22	11	7	9	20	13
Ženy	1	1	3	1	3	6	5	5	6	5	4
Celkem	5	2	12	8	13	28	16	12	15	25	17

Tabulka 4: Počty vyšetření v letech 2012 – 2022

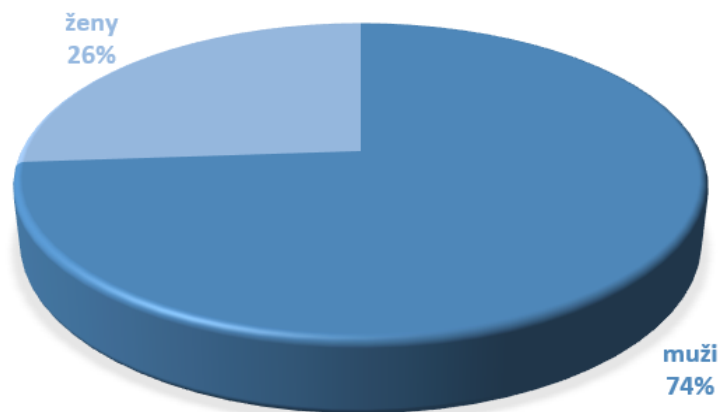
Zdroj: data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě



Graf 1: Počty vyšetření v letech 2012–2022

Zdroj: data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, autorka práce

PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ VYŠETŘOVANÝCH MUŽŮ A ŽEN



Graf 2: Procentuální zastoupení vyšetřovaných mužů a žen

Zdroj: data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, autorka práce

Tento graf jasně poukazuje na to, že *Legionella sp.* napadá mnohem častěji muže než ženy, a to v poměru 3:1. Z poskytnutých dat také vyplývá, že se nejčastěji jedná o muže ve věku 55+, kteří jsou silnými kuřáky. I u žen bývá věk spíše vyšší a obvykle jsou tyto ženy závislé na tabákových výrobcích.

7.2 Počty epidemiologických šetření v letech 2012–2022 podle lokality

Počty epidemiologických šetření jsou v různých krajích naší republiky odlišné. Jsou ovlivněny např.: počtem obyvatel, počtem odebíraných vzorků, velikostí kraje, počtem nemocnic, lázní, hotelů a jiných veřejných prostor, kde se vyskytují vodní zařízení.

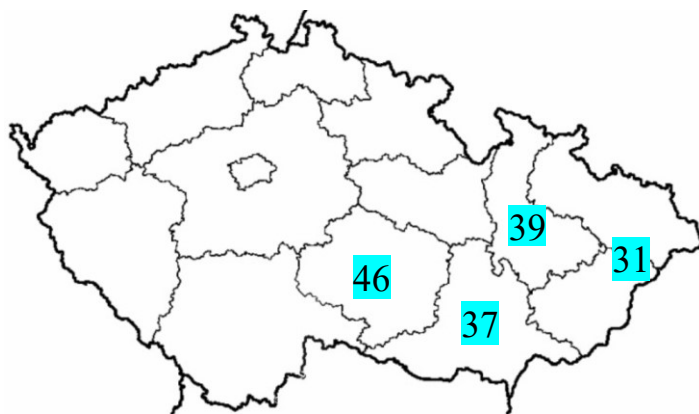
7.2.1 Podle krajů spadajících pod Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Jak již bylo zmíněno výše, pod Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě spadají kraje: Jihomoravský, Olomoucký, Zlínský, Moravskoslezský a Kraj Vysočina. Pracoviště pro vyšetření bakteriálního rodu *Legionella* se ale nacházejí pouze ve čtyřech krajských městech, a to v Jihlavě, Brně, Olomouci a Ostravě. Na Ostravské pracoviště proto přichází vzorky jak z Moravskoslezského kraje tak i z kraje Zlínského.

Rok	Kraj Vysočina (pracoviště Jihlava)	Jihomoravský kraj (pracoviště Brno)	Olomoucký kraj (pracoviště Olomouc)	Moravskoslezský a Zlínský kraj (pracoviště Ostrava)
2012	2	0	2	1
2013	1	1	0	0
2014	2	2	6	2
2015	1	3	1	3
2016	1	1	7	4
2017	6	12	1	9
2018	6	4	5	1
2019	6	0	5	1
2020	8	1	3	3
2021	9	8	5	3
2022	4	5	4	4
Celkem	46	37	39	31

Tabulka 5: Počty epidemiologických šetření v letech 2012–2022 podle lokality

Zdroj: data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě



Obrázek 18: Mapa počtu epidemiologických šetření v jednotlivých krajích v letech 2012–2022

Zdroj: <http://www.mapaceskerekrepubliky.cz/img/slepa-mapa-kraju-cr.jpg>, autorka práce

Z výše uvedené tabulky a mapy vyplývá, že v letech 2012 až 2022 bylo nejvíce epidemiologických šetření provedeno právě v Kraji Vysočina na pobočce v Jihlavě. Bylo zde provedeno 46 šetření, přičemž nejvíce jich bylo provedeno v roce 2021, a to 9 šetření. [27]

Druhý nejvyšší počet šetření byl vykonán v Olomouckém kraji, na pobočce v Olomouci, a to 39 šetření. Následuje kraj Jihomoravský, kde na Brněnské pobočce provedli 37 šetření. Paradoxně nejnižší počet šetření bylo provedeno na Ostravské pobočce, kde bylo provedeno 31 šetření ze Zlínského a Moravskoslezského kraje. [27]

Fakt, že byl nejvyšší počet šetření proveden právě na Vysočině je pravděpodobně ovlivněn tím, že se zde ve vodovodní síti z tepláren vyskytuje teplá voda o celkově nižší teplotě než například v Moravskoslezském a Zlínském kraji. Zde je navzdory nejvyššímu počtu obyvatel, ze zmiňovaných částí České republiky, počet šetření nejnižší.

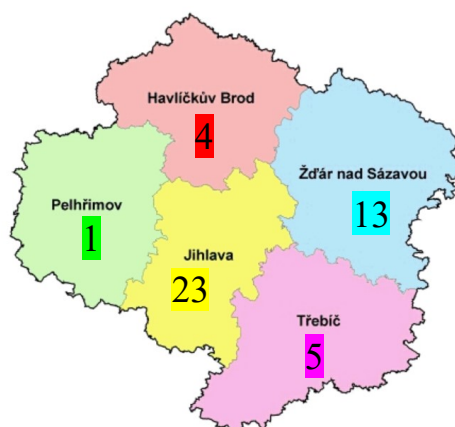
V Kraji Vysočina se nachází pouze tři teplárny, a to v Třebíči, Žďáru nad Sázavou a Novém Městě na Moravě. V Moravskoslezském a Zlínském kraji se nachází tepláren podstatně více. V Kraji Vysočina je tak výrazně méně rodin zásobováno teplou vodou z tepláren. Tyto rodiny pak pro výrobu teplé vody využívají vlastní kotle na ohřev vody, kde často z ekonomických důvodů udržují nižší teplotu teplé vody, než by měla optimální teplota být. Vytváří se tak ideální prostředí pro pomnožení legionely i jiných bakterií.

7.2.2 Podle okresů v Kraji Vysočina

Rok	Okres Jihlava	Okres Havlíčkův Brod	Okres Pelhřimov	Okres Žďár nad Sázavou	Okres Třebíč
2012	0	1	0	1	0
2013	0	0	0	1	0
2014	0	0	0	2	0
2015	1	0	0	0	0
2016	0	0	0	0	1
2017	2	0	0	3	1
2018	5	1	0	0	0
2019	2	0	0	1	3
2020	6	0	0	2	0
2021	5	2	0	2	0
2022	2	0	1	1	0
Celkem	23	4	1	13	5

Tabulka 6: Počty epidemiologických šetření v jednotlivých okresech Kraje Vysočina v letech 2012–2022

Zdroj: data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě



Obrázek 19: Počty epidemiologických šetření v jednotlivých okresech Kraje Vysočina v letech 2012–2022

Zdroj: <https://www.czso.cz/csu/xj/okresy>, autorka práce

Ze získaných dat vyplývá, že v letech 2012 až 2022 bylo nejvíce epidemiologických šetření na legionelózu u pacientů z okresu Jihlava. Bylo zde vyšetřováno 23 pacientů. [27]

Okres s druhým nejvyšším počtem šetřených pacientů je okres Žďár nad Sázavou se 13 pacienty podezřelými na legionelózu. Zbývající tři okresy mají výrazně nižší počty prováděných epidemiologických šetření, a to: okres Třebíč – 5, okres Havlíčkův Brod – 4, okres Pelhřimov – 1. [27]

Nejvyšší počet epidemiologických šetření v Kraji Vysočina byl proveden v okrese Jihlava patrně z těchto důvodů: nenachází se tu žádná teplárna, nachází se zde krajské město, krajská nemocnice, aqua park, je zde téměř nejvyšší počet obyvatel a mnoho lidí sem za prací dojíždí. [27]

7.3 Přehled epidemiologických šetření potenciálních zdrojů nákazy na přítomnosti legionely u pacientů pozitivních na legionelózu v letech 2012 až 2022

Rok	Číslo pacienta	Pohlaví	Typ vzorku	Výsledek
2012	1.	Muž	4x voda, 1x stěr	Negativní
	2.	Muž	1x voda, 5x stěr	Negativní
	3.	Muž	4x voda, 2x stěr	Pozitivní
	4.	Žena	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	5.	Muž	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
2013	1.	Žena	3x voda, 0x stěr	Negativní
	2.	Muž	4x voda, 3x stěr	Pozitivní
2014	1.	Muž	5x voda, 3x stěr	Pozitivní
	2.	Muž	3x voda, 3x stěr	Negativní
	3.	Muž	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	4.	Žena	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	5.	Žena	4x voda, 2x stěr	Negativní

Rok	Číslo pacienta	Pohlaví	Typ vzorku	Výsledek
	6.	Muž	4x voda, 4x stěr	Negativní
	7.	Muž	4x voda, 2x stěr	Negativní
	8.	Muž	14x voda, 10x stěr	Negativní
	9.	Žena	4x voda, 2x stěr	Negativní
	10.	Muž	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	11.	Muž	3x voda, 2x stěr	Negativní
	12.	Muž	3x voda, 1x stěr	Negativní
2015	1.	Muž	3x voda, 4x stěr	Pozitivní
	2.	Muž	4x voda, 4x stěr	Negativní
	3.	Muž	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	4.	Žena	3x voda, 4x stěr	Negativní
	5.	Muž	5x voda, 1x stěr	Pozitivní
	6.	Muž	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	7.	Muž	3x voda, 2x stěr	Negativní
	8.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
2016	1.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
	2.	Muž	1x voda, 2x stěr	Pozitivní
	3.	Muž	3x voda, 3x stěr	Negativní
	4.	Muž	4x voda, 1x stěr	Negativní
	5.	Žena	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
	6.	Muž	4x voda, 2x stěr	Pozitivní
	7.	Muž	3x voda	Pozitivní
	8.	Žena	4x voda, 2x stěr	Negativní
	9.	Muž	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
	10.	Žena	3x voda, 2x stěr	Negativní

Rok	Číslo pacienta	Pohlaví	Typ vzorku	Výsledek
	11.	Muž	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	12.	Muž	4x voda, 4x stěr	Negativní
	13.	Muž	4x voda, 4x stěr	Pozitivní
2017	1.	Muž	5x voda, 3x stěr	Negativní
	2.	Žena	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	3.	Muž	1x voda, 2x stěr	Pozitivní
	4.	Muž	9x voda, 3x stěr	Pozitivní
	5.	Muž	3x voda, 2x stěr	Pozitivní
	6.	Žena	3x voda, 2x stěr	Negativní
	7.	Muž	2x voda, 2x stěr	Negativní
	8.	Muž	4x voda, 2x stěr	Pozitivní
	9.	Muž	2x voda, 1x stěr	Negativní
	10.	Žena	5x voda, 3x stěr	Pozitivní
	11.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
	12.	Muž	4x voda, 4x stěr	Pozitivní
	13.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
	14.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
	15.	Muž	6x voda, 5x stěr	Pozitivní
	16.	Žena	3x voda, 1x stěr	Negativní
	17.	Žena	4x voda, 2x stěr	Negativní
	18.	Muž	3x voda, 2x stěr	Negativní
	19.	Muž	3x voda, 3x stěr	Negativní
	20.	Muž	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
	21.	Muž	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
	22.	Muž	5x voda, 4x stěr	Pozitivní

Rok	Číslo pacienta	Pohlaví	Typ vzorku	Výsledek
	23.	Muž	4x voda, 4x stěr	Negativní
	24.	Muž	2x voda, 3x stěr	Negativní
	25.	Žena	2x voda, 3x stěr	Negativní
	26.	Muž	2x voda, 2x stěr	Negativní
	27.	Muž	2x voda, 2x stěr	Negativní
	28.	Muž	4x voda, 2x stěr	Negativní
2018	1.	Muž	11x voda, 1x stěr	Pozitivní
	2.	Muž	4x voda, 1x stěr	Negativní
	3.	Muž	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
	4.	Žena	3x voda, 2x stěr	Negativní
	5.	Muž	3x voda, 2x stěr	Negativní
	6.	Muž	6x voda, 3x stěr	Negativní
	7.	Muž	4x voda, 4x stěr	Pozitivní
	8.	Muž	5x voda, 4x stěr	Negativní
	9.	Muž	5x voda, 3x stěr	Negativní
	10.	Muž	3x voda, 4x stěr	Pozitivní
	11.	Muž	2x voda, 3x stěr	Negativní
	12.	Žena	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
	13.	Muž	2x voda, 3x stěr	Negativní
	14.	Žena	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
	15.	Žena	2x voda, 3x stěr	Negativní
	16.	Žena	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
2019	1.	Žena	5x voda, 3x stěr	Pozitivní
	2.	Muž	5x voda, 3x stěr	Negativní
	3.	Muž	3x voda, 2x stěr	Pozitivní

Rok	Číslo pacienta	Pohlaví	Typ vzorku	Výsledek	
	4.	Muž	7x voda, 4x stěr	Negativní	
	5.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní	
	6.	Žena	6x voda, 4x stěr	Negativní	
	7.	Žena	3x voda, 2x stěr	Negativní	
	8.	Žena	4x voda, 1x stěr	Pozitivní	
	9.	Muž	5x voda, 5x stěr	Negativní	
	10.	Žena	3x voda, 3x stěr	Negativní	
	11.	Muž	5x voda, 3x stěr	Negativní	
	12.	Muž	2x voda, 6x stěr	Pozitivní	
	2020	1.	Žena	5x voda, 3x stěr	Pozitivní
		2.	Muž	3x voda, 0x stěr	Pozitivní
		3.	Žena	4x voda, 3x stěr	Negativní
4.		Žena	3x voda, 3x stěr	Pozitivní	
5.		Žena	4x voda, 4x stěr	Negativní	
6.		Žena	3x voda, 3x stěr	Pozitivní	
7.		Muž	3x voda, 3x stěr	Pozitivní	
8.		Muž	5x voda, 6x stěr	Pozitivní	
9.		Muž	4x voda, 6x stěr	Negativní	
10.		Žena	4x voda, 5x stěr	Negativní	
11.		Muž	2x voda, 2x stěr	Pozitivní	
12.		Muž	3x voda, 3x stěr	Negativní	
13.		Muž	4x voda, 4x stěr	Negativní	
14.		Muž	2x voda, 2x stěr	Negativní	
15.		Muž	6x voda, 6x stěr	Negativní	
2021	1.	Muž	5x voda, 4x stěr	Negativní	

Rok	Číslo pacienta	Pohlaví	Typ vzorku	Výsledek
	2.	Žena	4x voda, 3x stěr	Negativní
	3.	Muž	4x voda, 2x stěr	Pozitivní
	4.	Muž	5x voda, 4x stěr	Pozitivní
	5.	Muž	4x voda, 4x stěr	Negativní
	6.	Muž	4x voda, 3x stěr	Pozitivní
	7.	Žena	3x voda, 3x stěr	Pozitivní
	8.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
	9.	Žena	5x voda, 3x stěr	Negativní
	10.	Muž	3x voda, 3x stěr	Negativní
	11.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
	12.	Žena	3x voda, 2x stěr	Negativní
	13.	Muž	4x voda, 4x stěr	Negativní
	14.	Žena	4x voda, 2x stěr	Negativní
	15.	Muž	4x voda, 3x stěr	Pozitivní
	16.	Muž	4x voda, 2x stěr	Pozitivní
	17.	Muž	3x voda, 5x stěr	Negativní
	18.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
	19.	Muž	5x voda, 4x stěr	Negativní
	20.	Muž	14x voda, 6x stěr	Negativní
	21.	Muž	6x voda, 4x stěr	Negativní
	22.	Muž	4x voda, 3x stěr	Negativní
	23.	Muž	5x voda, 2x stěr	Negativní
	24.	Muž	16x voda, 14x stěr	Negativní
	25.	Muž	4x voda, 3x stěr	Pozitivní
	2022	1.	Muž	4x voda, 4x stěr

Rok	Číslo pacienta	Pohlaví	Typ vzorku	Výsledek
	2.	Muž	3x voda, 2x stěr	Negativní
	3.	Žena	5x voda, 4x stěr	Negativní
	4.	Muž	4x voda, 2x stěr	Pozitivní
	5.	Muž	7x voda, 4x stěr	Pozitivní
	6.	Muž	5x voda, 4x stěr	Pozitivní
	7.	Muž	5x voda, 2x stěr	Negativní
	8.	Žena	5x voda, 3x stěr	Pozitivní
	9.	Muž	2x voda, 3x stěr	Negativní
	10.	Muž	4x voda, 2x stěr	Negativní
	11.	Muž	3x voda, 3x stěr	Negativní
	12.	Žena	4x voda, 1x stěr	Pozitivní
	13.	Muž	3x voda, 2x stěr	Negativní
	14.	Žena	4x voda, 3x stěr	Negativní
	15.	Muž	4x voda, 6x stěr	Negativní
	16.	Muž	5x voda, 5x stěr	Pozitivní
	17.	Muž	3x voda, 3x stěr	Negativní

Tabulka 7: Přehled epidemiologických šetření potencionálních zdrojů nákazy na přítomnosti legionely u pacientů pozitivních na legionelózu v letech 2012 až 2022

Zdroj: data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě

Z předchozí tabulky je patrné, že ne u každého pacienta pozitivního na legionelózu, který byl podroben epidemiologickému šetření, musí být nalezen zdroj nákazy. Stává se, že vzorky odebrané z potencionálních zdrojů nákazy pacienta jsou všechny negativní a pacient má přesto legionelózu. Vyšetření se provádí z několika vzorků vody a z několika stěrů. Někdy se zdroj nákazy neprokáže.

Vzorky vody se odebírají například u vstupu studené vody do objektu, výstupu teplé vody do systému, na koncových bodech stoupaček, z výtoku trysek, v rozích bazénů 15 cm pod hladinou. Dle platné legislativy můžeme zdroje vody, pro šetření na bakteriální rod *Legionella*, rozdělit na dva druhy: Teplá voda př. 2, kdy se jedná o pitnou vodu a Teplá voda př. 3, kdy se jedná o individuální zdroj vody, kterým může být např. vlastní studna. [25]

Tzv. stěrovkami se rotačním pohybem stírají vnitřní stěny vodovodních baterií, ústí připojené hadice k baterii, stěny bazénů, přepadové kanálky bazénů, odtokové kanálky, vnitřky trysek. Každá stěrovka by měla obsahovat 0,5 – 1 ml původní vody. [26]

Počet vzorků závisí na ploše či objemu objektů, ze kterých jsou vzorky odebírány. V některých případech se stává, že výsledek vzorků vody a stěrů je odlišný. Pokud je bakteriální rod *Legionella* potvrzen alespoň u jednoho vzorku, je pacient považován za pozitivního na prokázaný druh legionely.

7.4 Prokázané druhy legionely z okolí pacientů pozitivních na legionelózu v letech 2012–2022

Rok	Pohlaví	Kraj	Legionella
2012	Muž	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Žena	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
2013	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
2014	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Žena	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
2015	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Moravskoslezský a	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14

Rok	Pohlaví	Kraj	Legionella
		Zlínský kraj	
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
2016	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella anisa</i> , <i>Legionella taurinensis</i>
	Žena	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 6 + <i>Legionella spiritensis</i>
	Muž	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Kraj Vysočina – Třebíč	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1 a 2-14
2017	Žena	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 6
	Žena	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 3
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 8
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
2018	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1

Rok	Pohlaví	Kraj	Legionella
	Muž	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> spp
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> spp
	Žena	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Žena	Kraj Vysočina – Jihlava	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Žena	Kraj Vysočina – Jihlava	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
2019	Žena	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Žena	Kraj Vysočina – Třebíč	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Kraj Vysočina – Jihlava	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
2020	Žena	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Žena	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Žena	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Kraj Vysočina – Jihlava	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Kraj Vysočina – Žďár nad Sázavou	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
2021	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Žena	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> spp.
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14

Rok	Pohlaví	Kraj	Legionella
	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Kraj Vysočina – Jihlava	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1
2022	Muž	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Jihomoravský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Žena	Moravskoslezský a Zlínský kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Žena	Olomoucký kraj	<i>Legionella pneumophila</i> sg 2-14
	Muž	Kraj Vysočina – Jihlava	<i>Legionella pneumophila</i> sg 1

Tabulka 8: Prokázané druhy legionely z okolí pacientů pozitivních na legionelózu v letech 2012–2022

Zdroj: data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě



Graf 3: Počty pacientů s prokázaným výskytem legionely ve vzorcích z okolního prostředí v letech 2012–2022

Zdroj: autorka práce

Výše uvedený graf téměř kopíruje graf č. 1 o počtu epidemiologických šetření v letech 2012 až 2022, ovšem ve zlomkovém množství skutečně prokázaného výskytu legionely v prostředí pacienta. Počet pozitivních vzorků na legionelu, z celkového počtu vzorků podrobovaných epidemiologickému šetření, se meziročně pohybuje mezi 30 až 70 %. [27]

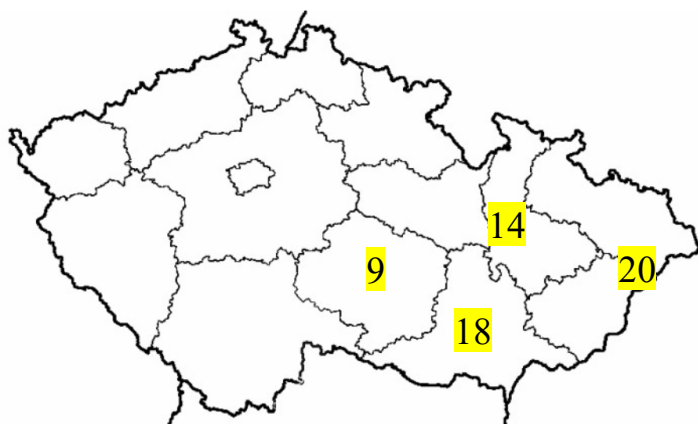


Graf 4: Poměr pozitivních mužů a žen s prokázaným zdrojem nákazy

Zdroj: autorka práce

Tento graf zobrazuje pro legionelu typický vzorec poměru infikovaných mužů a žen, a to v poměru 3:1.

7.4.1 Pozitivní pacienti s prokázaným zdrojem nákazy podle lokality



Obrázek 20: Mapa počtu pozitivních pacientů s prokázaným zdrojem nákazy v letech

2012–2022

Zdroj: <http://www.mapaceskerekpubliky.cz/slepa-mapa-cr>, autorka práce

Mapa počtu pozitivních pacientů s prokázaným zdrojem nákazy v letech 2012 až 2022 ukazuje, že nejvyšší počet pozitivních vzorků byl v Moravskoslezském a Zlínském kraji, i když zde byl počet šetření nejnižší. Je zde tedy nejvyšší procento pozitivních vyšetřovaných vzorků z okolního prostředí pacienta.

Může to být dáno tím, že v Moravskoslezském kraji se nachází mnoho měst, žije tu mnoho lidí zanechávajících uhlíkovou stopu a je zde velmi rozšířený průmysl, především hutnický. Je tady tudíž velmi znečištěné ovzduší, které poškozuje zdraví pacientů, a to především plíce, které pak mohou být náchylnější k nákaze stejně tak, jako plíce kuřáka.

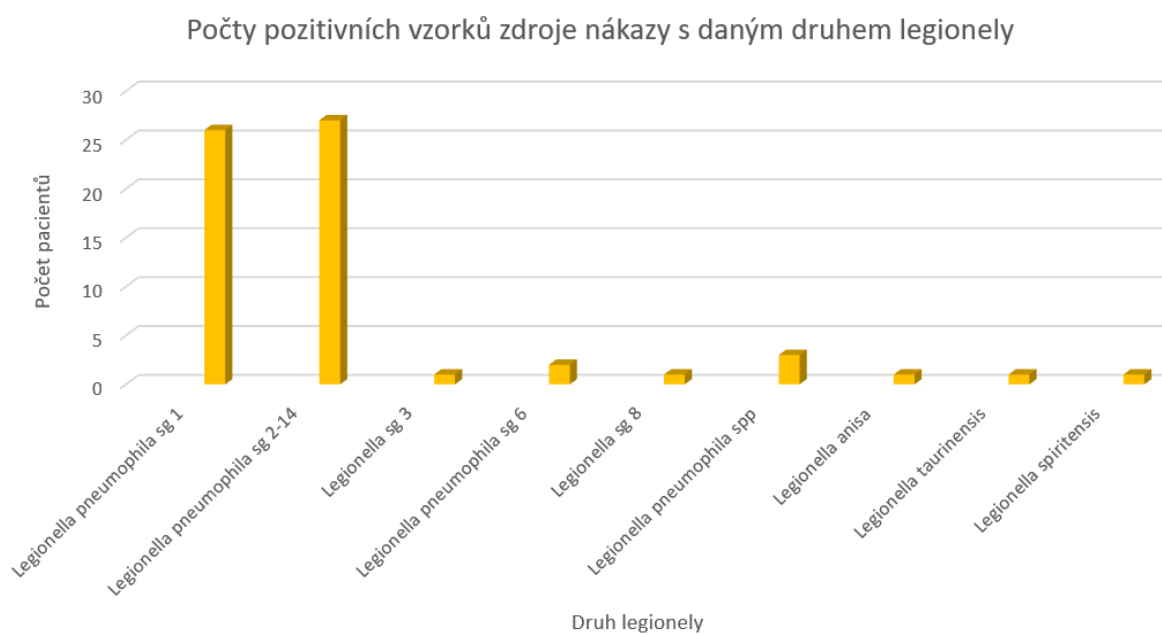


Obrázek 21: Pozitivní pacienti s prokázaným zdrojem nákazy podle okresů Kraje Vysočina v letech 2012–2022

Zdroj: <https://www.cuscz.cz/kontakty/uzemni-pracoviste/kraj-vysocina.html>, autorka práce

Nejvíce pozitivních pacientů s prokázaným zdrojem nákazy bylo v letech 2012 až 2022 v Kraji Vysočina, v okrese Jihlava. To může být ovlivněno tím, že v tomto okrese žije téměř nejvíce obyvatel, je zde nejvíce odebíraných vzorků a mnoho dalších lidí sem dojíždí do krajského města za prací či za lékařskou péčí. Nachází se tu také krajská nemocnice a aqua park.

7.4.2 Počty pozitivních vzorků zdroje nákazy s daným druhem legionely

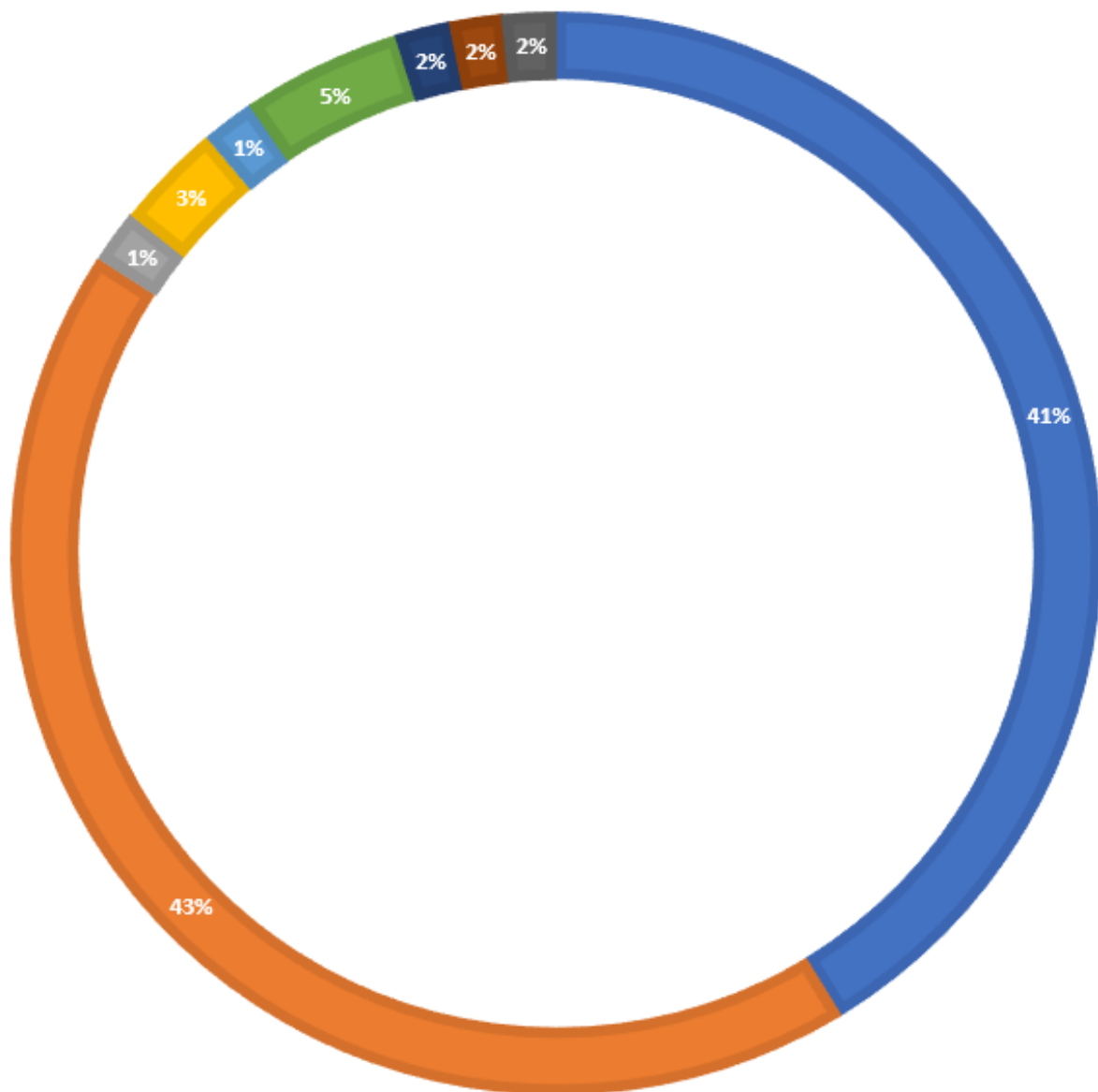


Graf 5: Počty pozitivních vzorků zdroje nákazy s daným druhem legionely

Zdroj: autorka práce

POČTY POZITIVNÍCH VZORKŮ ZE ZDROJE NÁKAZY S DANÝM DRUHEM LEGIONELY

- Legionella pneumophila sg 1
- Legionella pneumophila sg 2-14
- Legionella sg 3
- Legionella pneumophila sg 6
- Legionella sg 8
- Legionella pneumophila spp
- Legionella anisa
- Legionella taurinensis
- Legionella spiritensis



Graf 6: Poměr výskytu daných druhů legionely

Zdroj: autorka práce

V případě nálezu serologické skupiny 1 jsou vzorky na žádost Krajské hygienické stanice odeslány do Národní referenční laboratoře pro legionely Vyškov k další podrobné identifikaci. V Národní referenční laboratoři také probíhá porovnání s kmenem získaným z klinického materiálu příslušného pacienta.

Předchozí grafy ukazují poměr výskytu jednotlivých druhů bakteriálního rodu *Legionella* v letech 2012 až 2022. Z grafů je patrné, že nejrozšířenějšími druhy jsou *Legionella pneumophila* sg 1 a *Legionella pneumophila* sg 2-14.

U 43 % pozitivních vzorků nákazy byla v tomto období prokázána *Legionella pneumophila* sg 2-14 a u 41 % pozitivních vzorků nákazy byla prokázána *Legionella pneumophila* sg 1. [27]

Ostatní prokázané druhy jako jsou: *Legionella pneumophila* spp, *Legionella anisa*, *Legionella taurinensis* a *Legionella spiritensis* byly prokázány pouze v řádu několika málo jednotek. [27]

8. DISKUSE

Zpracování výsledků ukázalo, že počty šetřených mužů a žen, i počty pozitivních mužů a žen na bakteriální rod *Legionella sp.*, jsou v poměru 3:1. Jako typický obraz pacienta se zde jeví: muž starší 55 let, který je silným kuřákem. U žen bývá obraz podobný, ale pacientek je podstatně méně. Tento výsledek podílu pozitivních mužů a žen se shoduje s teoretickou částí této práce. [27]

Nejvyšší počet šetření byl v letech 2012 až 2022 proveden v Kraji Vysočina, na pobočce v Jihlavě. V tomto období zde bylo provedeno 46 epidemiologických šetření, z čehož polovina pacientů pocházela z okresu Jihlava. Naopak nejméně šetření bylo vykonáno na pracovišti v Ostravě, pod které spadají kraje Zlínský a Moravskoslezský. Celkově nejvyšší počet šetření byl proveden v roce 2017. Celkový počet epidemiologických šetření provedených Státním zdravotním ústavem se sídlem v Ostravě v letech 2012 až 2022 je 153. [27]

Paradoxně nejvíce pozitivních pacientů na bakteriální rod *Legionella sp.* bylo v období let 2012 až 2022 odhaleno na pobočce v Ostravě, kde bylo provedeno nejméně epidemiologických šetření a která přijímá vzorky ze dvou krajů. Pozitivní výsledek byl u 20 pacientů napříč oběma kraji. Naopak nejméně pozitivních pacientů bylo v Kraji Vysočina i navzdory tomu, že zde bylo provedeno nejvíce epidemiologických šetření. Celkový počet pozitivních pacientů v Kraji Vysočina byl 9, přičemž z toho 6 pacientů pocházelo z okresu Jihlava. [27]

V teoretické části bylo uvedeno, že počet pozitivních pacientů stoupá, což se při vyhodnocování poskytnutých informací potvrdilo. Z dat vyplývá, že počty epidemiologických šetření meziročně stoupají. Úměrně k vzestupu počtu šetření stoupají i počty pozitivních pacientů. Počty šetření a počty pozitivních pacientů jsou ovlivněny např.: počtem vzorků, výskytem tepláren v dané oblasti, teplotou vody v potrubí pro teplou vodu, výskytem nemocnic a zařízeních s klimatizací, bazény, vířivkami, budovami se zastaralým potrubím a slepými rameny potrubí.

Při vyhodnocování byl předpoklad nejvyššího výskytu druhů *Legionella pneumophila sg 1* a *Legionella pneumophila sg 2-14*, což se zpracováním dat potvrdilo. Tyto druhy byly prokázány u 84 % pozitivních pacientů. U zbývajících pozitivních pacientů byly prokázány druhy jako jsou: *Legionella pneumophila spp*, *Legionella*

anisa, Legionella taurinensis a Legionella spiritensis. Ty byly prokázány pouze v řádu několika málo jednotek. [27]

V porovnání s druhou částí České republiky, kam spadají kraje: Jihočeský, Plzeňský, Karlovarský, Středočeský, Ústecký, Pardubický, Královehradecký a Liberecký kraj, má autorkou práce řešená část republiky podstatně vyšší záchyt legionely. Tyto kraje, které nebyly doposud v práci řešeny, spadají pod Státní zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem. Státní zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem provádí podstatně méně šetření, laboratoře se zde nezaměřují primárně na problematiku legionely a také se zde nenachází žádná referenční laboratoř. Například Karlovarský kraj má téměř každý rok nulový záchyt legionely. To je vzhledem k četnosti lázeňských zařízení poměrně zvláštní. Nelze to tedy vysvětlit jinak než, že se zde odběry vzorků a následná šetření téměř neprovádějí. (RNDr. Drašar – ústní sdělení)

V porovnání se sousedními zeměmi, má Česká republika roční záchyt oproti Slovenské republice třikrát vyšší. Polská republika, která má téměř 40 milionů obyvatel, tudíž přibližně čtyřikrát více obyvatel než Česká republika, má meziroční záchyt pětkrát nižší. Z toho vyplývá, že se Česká republika, jako celek, problematikou legionelózy zabývá podstatně více než například Polsko. (RNDr. Drašar – ústní sdělení)

V roce 2023 byla v Polsku dokonce epidemiologie legionelózy. Několik lidí, především seniorů, zemřelo. Nemoc se začala šířit v srpnu na jihovýchodě země. Podrobnější informace o průběhu epidemiologie bohužel nejsou stále známy. (RNDr. Drašar – ústní sdělení)

Z evropských zemí je největší výskyt Legionářské nemoci, vzhledem k počtu obyvatel, ve Slovinsku a v Lotyšsku. Dále pak ve Španělsku, Portugalsku, Itálii, Francii, Dánsku a Nizozemsku. Naopak nejlepší výsledky, tudíž nejnižší výskyt hlásí země: Česká republika, Slovensko, Irsko, Řecko, Bulharsko a Rumunsko. K zemím, které se touto problematikou příliš nezabývají, a nemají tudíž výsledky, které by byly porovnatelné, patří Německo, Rakousko, Švýcarsko, Maďarsko, Litva, Švédsko, Finsko, Belgie, Chorvatsko, Černá Hora, Bosna a Hercegovina, Kosovo, Severní Makedonie, Albánie a Srbsko. [28]

Ze statistik, zveřejněných společností Centers for Disease Control and Prevention, z let 2000 až 2017 o výskytu legionelózy ve Spojených státech amerických vyplývá, že výskyt tohoto onemocnění každým rokem stoupá. Od roku 2000 do roku 2017 vzrostl

počet pacientů na pětinašobek. Nejvíce pacientů zde legionelózou onemocní obvykle během letních měsíců. Zhruba polovina pacientů spadá do věkové skupiny 40 až 60 let. Legionelóza zde naopak nejméně postihuje děti do 10 let. 60 % pacientů jsou muži. Bylo také potvrzeno, že legionelóza postihuje nejvíce bělošskou populaci, která tvoří téměř 65 % nemocných. Jako dobrý statistický výsledek můžeme považovat informaci, že 75 % obyvatel USA, kteří onemocněli touto nemocí, nepotřebovali hospitalizaci. Značná část pacientů se nakazila během cestování. Nejvíce nemocných bylo v letech 2016 a 2017 ve státech: New York, Pennsylvania, Ohio, Indiana, Michigan, Illinois, Maryland, Delaware a RI. Naopak nejnižší výskyt byl zaznamenán ve státech: Washington, Oregon, Idaho, North Dakota, Nevada, Utah, Arizona, New Mexico a Louisiana. [29]

Mnoho zemí se dnes v diagnostice spoléhá především na močový antigen. Tento test je ovšem schopen spolehlivě diagnostikovat pouze druh *Legionella pneumophila*. V některých zemích, jako například v Austrálii a na Novém Zélandu, kde byla etiologie komunitní pneumonie systematicky studována, se onemocnění *Legionella longbeachae* objevilo jako hlavní příčina legionelózy. Tento druh je dnes velmi rozšířen například i v Kanadě, USA, Jihoafrické republice, Japonsku a Číně. Minimálně jeden případ byl potvrzen i v zemích jako jsou: Anglie, Španělsko, Francie, Německo, Norsko, Švédsko a Finsko. Problémem dnešní doby je, že mnoho zemí není schopno legionelózu správně identifikovat a tudíž mnoho případů nebylo vůbec potvrzeno. [30]

Je politováníhodné, že nebylo možné získat reprezentativní informace o výskytu legionelózy ve všech krajích České republiky, ale pouze v krajích spadající pod Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě. I tak, se ale můžeme pochlubit tím, že u nás v České republice dbáme na prevenci, správnou diagnostiku i výzkum tohoto bakteriálního rodu. Česká republika, jako celek, je ve světovém žebříčku na předních místech, z hlediska řešení problematiky výskytu legionely. Zbývá jen doufat, že v průběhu let se i ostatní státy více zaměří na řešení problematiky týkající se výskytu legionelózy.

9. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je věnována problematice bakteriálního rodu *Legionella sp.* Je zaměřena na analýzu z vody a ze stěrů. Data a laboratorní prostory pro práci byly poskytnuty Státním zdravotním ústavem se sídlem v Ostravě pod odborným dohledem konzultantky práce, paní Ing Pavlína Silvestrové. Celá práce byla vedena vedoucí práce, paní PharmDr. Barborou Voxovou.

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat soubor o aktuálních poznatcích o bakteriálním rodu *Legionella sp.* a zpracovat metodiku stanovení dle normy ČSN EN ISO 11731. Závěrem pak statisticky zpracovat data o epidemiologických šetřeních poskytnutých od Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Data jsou z let 2012 až 2022 a poskytují informace o šetřeních v krajích: Vysočina, Jihomoravském, Olomouckém, Zlínském a Moravskoslezském.

Zkoumaný bakteriální rod se vyskytuje nejčastěji ve vodním prostředí nacházejícím se např.: ve starém teplovodním potrubí, slepých ramenech potrubí, v místech se stagnací vody, v klimatizacích, vířivkách, bazénech, nemocničních a hotelových zařízeních. Nejohroženějšími skupinami jsou děti, osoby s poruchami imunity, kuřáci a starší muži. Rod způsobuje pontiackou horečku a legionářskou nemoc, které jsou často zaměňovány za obyčejnou chřipku či zápal plic.

Při potvrzení výskytu legionelly na daném místě, následují nápravná opatření. Patří mezi ně zamezení stagnace vody v rozvodech i jejich dílčích částech, dále vyhýbání se použití nevhodných materiálů, např. těsnění z přírodní gumy, barvy a tmely. Pokud již k výskytu bakterií *Legionella* dojde, je doporučeno použít dezinfekční opatření, mezi něž patří krátkodobé přechlorování nebo proplachy vodou zahřátou na vyšší teplotu, či instalace ionizátorů, ze kterých se uvolňují ionty stříbra a mědi.

Výsledky ukázaly, že počty mužů a žen, ať už podrobovaných epidemiologickému šetření či pozitivních na bakteriální rod *Legionella sp.*, jsou v poměru 3:1. Typický obrazem pacienta je: muž starší 55 let, který je silným kuřákem. U žen bývá obraz podobný, ale pacientek je podstatně méně.

Nejvyšší počet epidemiologických šetření byl v období let 2012 až 2022 proveden v roce 2017. Celkový počet epidemiologických šetření, vykonaných Státním zdravotním ústavem se sídlem v Ostravě, v letech 2012 až 2022 byl 153. Meziročně byl nejvyšší

počet šetření proveden v Kraji Vysočina, ale paradoxně zde bylo nejméně skutečně pozitivních pacientů. Naopak nejméně šetření, ale paradoxně nejvíce pozitivních pacientů, odhalilo pracoviště v Ostravě, a to ve Zlínském a Moravskoslezském kraji. Tyto výsledky jsou ovlivněny např.: počtem vzorků, výskytem tepláren v dané oblasti, teplotou vody v potrubí pro teplou vodu, výskytem nemocnic a zařízeních s klimatizací, bazény, vířivkami, budovami se zastaralým potrubím a slepými rameny potrubí.

Nejčastěji byla u pacientů prokázána *Legionella pneumophila* sg 1 (41 %) a *Legionella pneumophila* sg 2-14 (43 %). U zbývajících pozitivních pacientů byly prokázány druhy jako jsou: *Legionella pneumophila* spp, *Legionella anisa*, *Legionella taurinensis* a *Legionella spiritensis*. Ty byly prokázány pouze v řádu několika málo jednotek. [27]

Česká republika je v porovnání s ostatními zeměmi na velmi dobré úrovni laboratorní diagnostiky legionely. Na poměrně vysoký počet šetření a odebraných vzorků zde, vzhledem k počtu obyvatel, nemáme příliš mnoho pozitivních pacientů. Používáme různé laboratorní postupy a věnujeme se i prevenci. Pochopitelně stejně jako i v jiných zemích nejsou zdaleka všechny případy legionelózy odhaleny, především pokud se jedná o lehčí formu v podobě pontiacké horečky, ale i přesto se u nás touto problematikou, na rozdíl od jiných zemí, velmi zabýváme. V České republice byly dokonce objeveny i nové druhy legionely, jako například *Legionella burnensis* a *Legionella moravika*.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
ATB	<i>Antibiotic</i>	Antibiotikum
BCYE	<i>Buffered charcoal yeast extract agar</i>	Pufrovaný agar kvasnicový extrakt
BCYE-cys	<i>Buffered charcoal yeast extract agar – cystein</i>	Pufrovaný agar kvasnicový extrakt s L-cystein
BCYE-AB	<i>Buffered charcoal yeast extract agar – antibiotic</i>	Pufrovaný agar kvasnicový extrakt s antibiotiky
č.	<i>číslo</i>	Číslo
CFU	<i>Colony forming units</i>	Kolonie tvořící jednotku
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	metoda sloužící k detekci a stanovení koncentrace antigenů nebo protilátek
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>	Fluorescein izothiokyanatan s antikráličím konjugátem
GVPC	<i>Glycin, Vankomicin hydrochlorid, Polymyxin B sulfát, Cykolheximid</i>	Půda obsahující Glycin, Vankomycin hydrochlorid, Polymyxin B sulfát, Cykloheximid
KTJ	<i>Kolonie tvořící jednotku</i>	Kolonie tvořící jednotku
MWY	<i>Modified wadowsky yee</i>	Vysoce selektivní agar, selektivní médium, které je alternativou k GVPC agaru
např.	<i>například</i>	Například
p.a.	<i>per analysis</i>	Látky analytické kvality
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Polymerázová řetězová reakce
sb.	<i>sbírky</i>	Sbírky
sg	<i>serogroup</i>	Séroskopina
sp.	<i>species</i>	Druh
tzv.	<i>takzvaný</i>	Takzvaný
UK	<i>United Kingdom</i>	Spojené Království (Británie)

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam druhů bakteriálního rodu Legionella	18
Tabulka 2: Počty onemocnění za poslední roky.....	27
Tabulka 3: Kultivační média.....	32
Tabulka 4: Počty vyšetření v letech 2012 – 2022	42
Tabulka 5: Počty epidemiologických šetření v letech 2012–2022 podle lokality.....	44
Tabulka 6: Počty epidemiologických šetření v jednotlivých okresech Kraje Vysočina v letech 2012–2022.....	46
Tabulka 7: Přehled epidemiologických šetření potencionálních zdrojů nákazy na přítomnosti legionely u pacientů pozitivních na legionelózu v letech 2012 až 2022	53
Tabulka 8: Prokázané druhy legionely z okolí pacientů pozitivních na legionelózu v letech 2012–2022.....	57

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Hostitelská buňka zlyžuje patogen, patogen se pomnoží v buňce.....	20
Obrázek 2: Intracelulární životní cyklus Legionely	21
Obrázek 3: Filtrační zařízení.....	23
Obrázek 4: Test močového antigenu.....	24
Obrázek 5: Odběrová lahev.....	30
Obrázek 6: Aparatura pro membránovou filtraci	33
Obrázek 7: Filtrační nálevka s černým filtrem.....	34
Obrázek 8: Plotna po kultivaci s úpravou a bez úpravy kyselým roztokem	34
Obrázek 9: Plotna po kultivaci s úpravou a bez úpravy teplem	35
Obrázek 10: Metoda přímého očkování	35
Obrázek 11: Filtry na kultivačním médiu	36
Obrázek 12: Vzhled kolonií pod stereoskopickým mikroskopem	37
Obrázek 13: Kolonie rodu Legionella sp. po kultivaci	37
Obrázek 14: Potvrzení kolonií rodu Legionella na půdě BCYE	38
Obrázek 15: Identifikace séro skupiny Legionella pneumophilla sg. 2-14.....	39
Obrázek 16: Testovací činidla.....	39
Obrázek 17: Pracoviště Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě	41
Obrázek 18: Mapa počtu epidemiologických šetření v jednotlivých krajích v letech 2012–2022	45
Obrázek 19: Počty epidemiologických šetření v jednotlivých okresech Kraje Vysočina v letech 2012–2022.....	46
Obrázek 20: Mapa počtu pozitivních pacientů s prokázaným zdrojem nákazy v letech.....	59
Obrázek 21: Pozitivní pacienti s prokázaným zdrojem nákazy podle okresů Kraje Vysočina v letech 2012–2022	60

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Počty vyšetření v letech 2012–2022	42
Graf 2: Procentuální zastoupení vyšetřovaných mužů a žen.....	43
Graf 3: Počty pacientů s prokázaným výskytem legionely ve vzorcích z okolního prostředí v letech 2012–2022	58
Graf 4: Poměr pozitivních mužů a žen s prokázaným zdrojem nákazy	59
Graf 5: Počty pozitivních vzorků zdroje nákazy s daným druhem legionely	61
Graf 6: Poměr výskytu daných druhů legionely.....	62

14. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) *Legionella: Vše o Legionelle na jednom místě* [online]. CZ/SK/PL: Legionella, 2023 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://legionella.cz/>
- 2) T. OSTERHOLM, MICHAEL, TOM D. Y. CHIN, DONALD O. OSBORNE, H. BRUCE DULL, ANDREW G. DEAN, DAVID W. FRASER, PEGGY S. HAYES a WILLIAM N. HALL. A 1957 OUTBREAK OF LEGIONNAIRES' DISEASE ASSOCIATED WITH A MEAT PACKING PLANT. *OXFORD AKADEMIC: American Journal of EPIDEMIOLOGY* [online]. OXFORD AKADEMIC, 1983, 1983, 1983(-), 1 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1476-6256. Dostupné z: <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/117/1/60/87832?login=false>
- 3) THACKER, S.B., J. V. BENNETT, D. W., et al. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium: Abstract. *PubMed: National Library of Medicine* [online]. USA: OXFORD AKADEMIC, -, 1978 Oct, 1978(-), 1 [cit. 2023-03-18]. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/138.4.512
- 4) H. GLICK, THOMAS H., MICHAEL B. GREGG, BERNARD BERMAN, GEORGE MALLISON, WALLACE W. RHODES, JR. a IRA KASSANOFF. PONTIAC FEVER: AN EPIDEMIC OF UNKNOWN ETIOLOGY IN A HEALTH DEPARTMENT: I. CLINICAL AND EPIDEMIOLOGIC ASPECTS: -. *OXFORD AKADEMIC: American Journal of EPIDEMIOLOGY* [online]. USA: OXFORD AKADEMIC, 1978, 01 February 1978, 1978(-), 149-160 [cit. 2023-03-18]. Dostupné z: doi:-
- 5) Legionella (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever): History, Burden, and Trends. *Center for Disease Control and Prevention: -* [online]. USA: Center for Disease Control and Prevention, 2021, 2021, 2021(-), - [cit. 2023-03-18]. ISSN 800-232-4636. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/legionella/about/history.html>
- 6) DEPARTMENT OF PATHOLOGY, UNIVERSITY OF VERMONT, COLLEGE OF MEDICINE a BURLINGTON 05405. Legionnaires disease: historical perspective.: Abstract. *PubMed Central: National Library of Medicine* [online]. USA: National Library of Medicine, 1988, January 1988, 1988(-), 60-81 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: doi:10.1128/cmr.1.1.60
- 7) *Legionnaires' Disease Lawyer: Legionnaires disease, History* [online]. Philadelphia: Jules Zacher P.C. 2021, 2021 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://www.legionnairelawyer.com/>
- 8) HEUNER, Klaus a Michele SWANSON. *Legionella: Molecular Microbiology* [online]. March 2008. University of Würzburg, Germany and University of Michigan, USA: Caister Academic Press, 2008 [cit. 2023-03-20]. ISBN 978-1-913652-23-4. Dostupné z: <https://www.caister.com/leg>
- 9) S., Baron, ed. Legionella. In: *Medical Microbiology. 4th edition.: Legionella* [online]. 4th. The University of Texas Medical Branch at Galveston: Copyright ©, 1996, Chapter 40 [cit. 2023-03-25]. ISBN -. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7619/>

- 10) AHMED, Oumaima, Louis MASCLEF a El Bachir AFFAR. Surviving the host–pathogen interaction: Legionella uses its SidE arsenal to mediate phosphoribosyl-linked ubiquitination of Golgi proteins inducing organelle fragmentation: -. *Cell Death & Differentiation*: - [online]. -: Springer Nature Limited, 2021, 30. August 2021, -(375), 1 [cit. 2023-03-25]. ISSN 1476-5403. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41418-021-00860-6>
- 11) S. FRANCO, Irina, Howard A. SHUMAN a Xavier CHARPENTIER. The perplexing functions and surprising origins of Legionella pneumophila type IV secretion effectors. *Wiley Online Library* [online]. -: Copyright © 1999-2023 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved, 2009, 1. September 2009 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2009.01351.x>
- 12) Garrity GM, Brown A, Vickers ARM. (1980). Tatlockia and Fluoribacter: Two New Genera of Organisms Resembling Legionella pneumophila. *Int J Syst Bacteriol* 30:609–614.
- 13) Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation: DIAGNOSIS Taxonomy. *American Society for Microbiology* [online]. Copyright © 2023 American Society for Microbiology, 2002, 1. July 2002, 2002(-), - [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002](https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002)
- 14) RELLER, L. Barth, Melvin P. WEINSTEIN a David R. MURDOCH. Diagnosis of Legionella Infection. *OXFORD AKADEMIC* [online]. OXFORD AKADEMIC, 2003, 1 January 2003, 2003(-), Pages 64–69 [cit. 2023-04-01]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/36/1/64/283769>
- 15) *Kvalita vod - Stanovení bakterií rodu Legionella*. Leden 2018. Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě: Úřad pro technickou normalizaci, meteorologii a státní zkušebnictví, 2018.
- 16) Využívané laboratorní metody k detekci Legionell. *Legionella: vše o Legionelle na jednom místě* [online]. Legionella.cz: © Legionella CZ|SK|PL, 2016, 30. června 2016 [cit. 2023-04-02]. Dostupné z: <https://legionella.cz/clanky/vyuzivane-laboratorni-metody-k-detekci-legionell/>
- 17) HEALTH, J Water, Katherine E FISHER, Leah P WICKENBERG, Lesley F LEONIDAS, Anna A RANZ, Michelle A HABIB, Rafael M BUFORD a William F MCCOY. Next Day Legionella PCR: a highly reliable negative screen for Legionella in the built environment: Abstract. *PubMed: National Library of Medicine* [online]. NLM NIH HHS USA.gov: National Library of Medicine, 2020, Jun 2020, 2020(-), 345-357 [cit. 2023-04-02]. Dostupné z: [doi:10.2166/wh.2020.004](https://doi.org/10.2166/wh.2020.004)
- 18) [Epidemiology and laboratory diagnostics of legionellae]. *PubMed* [online]. USA: National Library of Medicine, 2001, May 2001, 2001(-) [cit. 2023-04-02]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11407064/>
- 19) Výskyt legionelózy v ČR. Ohrožení jsou jedinci se sníženou imunitou, zejména kuřáci. *Legionella: vše o Legionelle na jednom místě* [online]. CZ|SK|PL: © Legionella, 2019, 16. října 2019 [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://legionella.cz/clanky/vyskyt-legionelozy-v-cr/>
- 20) Proč vzrůstají počty nakažených legionelózou. *Průmyslová ekologie. cz* [online]. -: Průmyslová ekologie ©, 2021, 12.4.2021 [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://www.prumyslovaekologie.cz/info/proc-vzrustaji-pocty-nakazenych-legionellozou>

- 21) -Legionella-Bakterie pod drobnohledem: Rozhovor. *Teplo pro Prahu* [online]. Praha, 2016, -(), 6-7 [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://www.ptas.cz/data/folders/Legionella-f110.pdf>
- 22) Legionářská nemoc – nákaza, průběh a léčba onemocnění. *Legionella: vše o Legionelle na jednom místě* [online]. CZ|SK|PL: © Legionella, 2019, 13. května 2019 [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://legionella.cz/clanky/legionarska-nemoc-nakaza-prubeh-a-lecba-onemocneni/>
- 23) Legionella a zdraví. *Legionella: vše o Legionelle na jednom místě* [online]. CZ|SK|PL: © Legionella, - [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://legionella.cz/legionella-a-zdravi/>
- 24) ZDRAVOTNÍ ÚSTAV SE SÍDLEM V OSTRAVĚ - JAN HOFMAN. *ČESKÁ TECHNICKÁ NORMA - Kvalita vod - Stanovení bakterií rodu Legionella* [online]. Leden 2018. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2018 [cit. 2023-09-08].
- 25) ZDRAVOTNÍ ÚSTAV SE SÍDLEM V OSTRAVĚ - JAN HOFMAN. *Odběr vzorků vod na legionelly*. 2. vydání. Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum hygienických laboratoří.
- 26) ZDRAVOTNÍ ÚSTAV SE SÍDLEM V OSTRAVĚ - JAN HOFMAN. *Odběr stěrů na legionelly*. 3. vydání. Státní zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Centrum hygienických laboratoří, 2005.
- 27) ING. SILVESTROVÁ, Pavlína. *Data Státního zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě* [pdf]. Jan Hofman. 2023.
- 28) Seznam výskytů Legionářské nemoci ve světě - Legionella.cz. In: *Legionella* [online]. 2018 [cit. 2023-11-06]. Dostupné z: https://legionella.cz/wp-content/uploads/2018/10/legionella_svet-min.jpg
- 29) Legionella (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever). Online. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2020, roč. -, č. -, article -, s. -. Licence: Centers for Disease Control and Prevention. Dostupné z: Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/legionella/health-depts/surv-reporting/2016-17-report-tables/index.html>. [cit. 2023-11-18].
- 30) Legionellosis Caused by Non-Legionella pneumophila Species, with a Focus on Legionella longbeachae. Online. *MDPI*. 2021, roč. -, č. -, s. -. Dostupné z: MDPI, <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/291>. [cit. 2023-11-18].