

HANNA STYPUŁKOWSKA-MISIUREWICZ, BOŻENA KROGULSKA¹⁾, KATARZYNA PANCER, RENATA MATUSZEWSKA¹⁾

LEGIONELLA SP. – LABORATORYJNE ROZPOZNAWANIE ZAKAŻEŃ
U LUDZI I WYKRYWANIE W ŚRODOWISKU WODNYM*

LEGIONELLA SP. – INVESTIGATION OF HUMAN INFECTION AND
DETECTION IN ENVIRONMENTAL WATER

Zakład Bakteriologii, Państwowy Zakład Higieny
00–791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: prof. S. Kałużewski

¹⁾ Zakład Higieny Komunalnej, Państwowy Zakład Higieny
00–791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: dr J. Świątczak

Praca zawiera przegląd metod związanych z problematyką wykrywania i izolacji bakterii z rodzaju Legionella z materiału klinicznego i środowiska wodnego.

WSTĘP

W 1976 roku w czasie obchodów 200-lecia Stanów Zjednoczonych wśród delegatów – członków Legionu Amerykańskiego w Filadelfii wystąpiły nagle zachorowania na ciężkie zapalenie płuc. Zachorowało 221 osób, z których 34 zmarło. Chorobie nadano nazwę choroby legionistów. Tajemniczym czynnikiem etiologicznym zapalenia płuc okazały się Gram-ujemne pałeczki o specjalnych wymaganiach wzrostowych. Utworzono nową jednostkę taksonomiczną rodzinę *Legionellaceae*, rodzaj *Legionella*. Informacji na ich temat stale przybywa: w 1983 roku znano tylko 10 gatunków i 9 grup serologicznych, w 1993 roku ponad 25 gatunków i 48 grup serologicznych, ostatnio wyszczególnia się 41 gatunków i 62 grupy serologiczne. 80–90% zachorowań wywołanych jest przez gatunek *L. pneumophila* (w tym 50–75% przez *L. pneumophila* grupy serologicznej 1, zaś 5–20% zachorowań powodowanych jest przez inne gatunki *Legionella*. Legionelozę występuje w postaci dwóch odmian klinicznych znanych jako: 1. Choroba legionistów (legionelozowe zapalenie płuc). 2. Gorączka Pontiac – grypo-podobne zakażenie o niecharakterystycznym, stosunkowo lekkim przebiegu. Choroba legionistów w przeciwieństwie do gorączki Pontiac przebiega często z wysoką (ponad 40°C) temperaturą ciała i nietypowym zapaleniem płuc. Towarzyszą jej biegunka, zamroczenie i inne objawy neurologiczne oraz objawy uszkodzenia wątroby, bradykar-

* Praca została częściowo wykonana w ramach Strategicznego Programu Rządowego pn: “Bezpieczeństwo i ochrona zdrowia człowieka w środowisku pracy” SPR-1 zadanie nr 04.10.18. Główny Koordynator – Centralny Instytut Ochrony Pracy.

dia itp. Śmiertelność wynosi przeciętnie 10–12%, ale jeśli rozpatrywać tylko ciężkie przypadki zapalenia płuc to wskaźnik ten jest znacznie wyższy (15–20%). Typowe leczenie zapalenia płuc penicylinami jest nie skuteczne ponieważ *L. pneumophila* wytwarza β -laktamazy unieczynnijące te antybiotyki [2, 27, 38, 52, 54, 65, 66]

Pałeczki *Legionella* są to drobnoustroje środowiskowe [11] występujące w naturalnych i sztucznych zbiornikach wodnych oraz w glebie. Wchodzą w skład biofilmów powstających na powierzchniach stykających się z wodą. Przenoszenie pałeczek *Legionella* następuje za pomocą aerozoli wodno-powietrznych tworzących się m.in. w natryskach, nawilżaczach, turbinach dentystycznych, inhalatorach, w przemysłowych wieżach chłodniczych, skraplaczach pary, fontannach, systemach klimatyzacyjnych (chłodzonych wodą), podczas kąpieli w wannach wirowych „jaccuzi” itp. Nie stwierdzono przenoszenia się zakażenia *Legionella* pomiędzy ludźmi. Na zachorowanie najbardziej narażeni są mężczyźni w wieku 50–65 lat, aktywni zawodowo, podróżujący. Czynnikiem ryzyka są: palenie tytoniu, picie alkoholu, zmęczenie podróżą, leczenie immunosupresyjne i cytostaticzne [2, 37, 54, 65, 66].

Zachorowania najczęściej występują sporadycznie, zachorowania zbiorowe obserwowane były wokół zakładów przemysłowych posiadających odprowadzenie aerozoli wodno-powietrznych na zewnątrz oraz w klimatyzowanych budynkach użyteczności publicznej, w bankach, hotelach, na wystawach armatury łazienkowej, a także w szpitalach (zakażenia szpitalne) [37, 68]. Najwięcej zachorowań na legionelozę rozpoznaje się w okresie letnio-jesiennym (czynna klimatyzacja z nawilżaniem).

Szczególnym zagrożeniem jest występowanie zachorowań na chorobę legionistów wśród uczestników organizowanych, grupowych wyjazdów turystycznych do krajów śródziemnomorskich. Szybka i skuteczna rejestracja zachorowań oraz informowanie wszystkich uczestników europejskiej grupy do spraw zakażeń *Legionella* (European Working Group on *Legionella* Infection – EWGLI) pozwala wywrzeć wpływ na właścicieli hoteli, aby poddawali okresowemu oczyszczaniu sieć wodną hotelu oraz badaniom kontrolnym jakość bakteriologiczną wody.

Diagnostyka legionelozy jak również izolacja pałeczek *Legionella* ze środowiska narażają wiele problemów i stanowi przedmiot obrad corocznych spotkań EWGLI. Od 2 lat aktywnie w nich uczestniczy delegacja z Polski (zespół z PZH) [55].

METODY WYKRYWANIA PAŁECZEK *LEGIONELLA* W MATERIALE KLINICZNYM

Poszukiwanie pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym napotyka szereg trudności. *Legionella* są to drobnoustroje o szczególnych wymaganiach odżywczych (L-cysteina, pirofosforan żelaza), długim okresie generacji, a ponadto namnażają się wewnątrz komórek gospodarza – w przypadku człowieka – w makrofagach. Są przez to obecne w próbce w niewielkiej liczbie komórek tworzących kolonie (CFU). Dlatego próbki materiału klinicznego muszą być odpowiednio pobrane, transportowane i przygotowane do badań. Materiał posiany na specjalne podłoża wybiórczo-namnażające należy inkubować przez 5–10 dni.

Dobór materiału do posiewu próbek klinicznych

Popłuczyny oskrzelowe (BAL), aspiraty oskrzelowe, fragmenty tkanki płucnej po biopsji, lub z materiału sekcyjnego są najcenniejszym materiałem do hodowli *Legionel-*

la. Plwociny nie poleca się jako materiału do hodowli bez dodatkowego opracowania. Mimo, że udokumentowano bakteriemie w przebiegu legionelozy, brak jest komercyjnych systemów do hodowli *Legionella* z krwi. Największe prawdopodobieństwo stwierdzenia obecności pałeczek *Legionella* jest podczas badania bioptatów płucnych. Innym ograniczeniem uzyskania hodowli jest możliwość występowania pałeczki *Legionella* w formie żywej, ale niehodowalnej [55, 64, 65].

Transport i przygotowanie materiału klinicznego do posiewu w kierunku pałeczek *Legionella*

Próbki należy pobrać jałowo, a następnie transportować w sterylnych pojemnikach. Można dodać odrobinę destylowanej, jałowej wody (w celu ochrony jej przed wyschnięciem), nie zaleca się stosowania soli fizjologicznej, może ona hamować wzrost *Legionella*. Jeśli czas między pobraniem a posianiem będzie dłuższy niż 30 minut, próbkę należy przechować w lodówce, w przypadku ponad 24 godzin – zamrozić w temperaturze -70°C .

W przypadku materiałów „skąpych” w drobnoustroje (BAL itp.) należy próbkę wirować 15 minut przy 1500 x g w zamkniętych próbkach. W przypadku aspiratów płucnych, oskrzelowych, plwociny należy osad zawiesić i rozcieńczyć w stosunku 1:5 w podłożu MHB (*Mueller-Hinton Broth*) w celu rozcieńczenia ewentualnych inhibitorów wzrostu *Legionella* (tylko w próbkach szklanych z korkami szklanymi – ochrona przez aerozolem wodno-powietrznym). Bioptaty, fragmenty tkanek należy rozdrobnić w jałowych warunkach używając skalpela lub jałowego piasku [64].

W celu eliminacji flory towarzyszącej niektórzy autorzy zalecają ogrzewanie próbek w temperaturze 50°C przez 30 minut.

Przed posiewem plwocinę należy potraktować związkiem mukolitycznym np.: preparatem Mistabron (natrium 2-mercaptoaethanosulfonicum).

Hodowla pałeczek *Legionella*

Podłoża

Najczęściej stosuje się podłoże BCYE- α (wg. *Feeley'a*) zawierające ekstrakt drożdżowy, węgiel aktywowany, α -ketoglutarał, L-cysteinę oraz żelazo trójwartościowe (Fe^{3+}), pH podłoża powinno wynosić 6,9 (Tabela I). Na podłożu tym mogą wyrosnąć także inne chorobotwórcze drobnoustroje, w tym: *Francisella tularensis*, *Bordetella pertusis*, *Nocardia asteroides* i in.

Aby zapobiec wzrostowi konkurencyjnych, szybciej rosnących bakterii przy badaniu próbek klinicznych oraz środowiskowych do podłoża hodowlanego dodawane są antybiotyki. Są to najczęściej: polimyksyna (hamująca wzrost pałeczek G(-)), anisomycyna (hamująca wzrost drożdży), cefamandol lub wankomycyna (hamujące wzrost ziarenkowców Gram(+)). Należy pamiętać, że cefamandol hamuje także wzrost pałeczek *Legionella* innych niż *L. pneumophila*, a nie wytwarzających β -laktamaz np.: *L. micdadei*. Najczęściej do podłoża namnażającego BCYE- α dodaje się mieszaninę czynników selektywnych (Tabela I) [64–66].

Tabela I. Podłoża zwykle stosowane do hodowli *Legionella* sp.
Culture media usually used for *Legionella* sp.

Podłoże	Skład	Zastosowanie	Autor
BCYE- α agar	(Buffered charcoal yeast extract) buforowane z wyciągiem drożdżowym, węglem i kwasem α -ketoglutarynowym wzbogacone cysteiną i pirofosforanem żelaza $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$	Standardowe podłoże podstawowe	<i>Pasculle</i> 1980 [44]
BMPA agar	BCYE z cefamandolem, polimiksyną B, anisomycyną	Wybiórcze do posiewu próbek klinicznych	<i>Edelstein</i> 1982 [15]
WY agar	BCYE z glicyną, wankomycyną, polimiksyną B	Wybiórcze do posiewu próbek klinicznych i wody	<i>Wadowsky i Yee</i> 1981 [62]
MWY agar	BCYE z glicyną, wankomycyną, polimiksyną B, anisomycyną, błękitem bromotymolowym oraz purpurą bromokrezolową	Wybiórcze do posiewu próbek wody z systemów chłodniczych	<i>Edelstein</i> 1982 [15]
CCVC agar	BCYE z cefalotyną, kolistyną, wankomycyną i cykloheksamidem	Wybiórcze do posiewu wody ze środowiska	<i>Edelstein</i> 1982 [15]
GVPC agar	BCYE z glicyną, wankomycyną, polimiksyną B, cykloheksamidem	Wybiórcze do posiewu próbek wody i próbek klinicznych	<i>Dennis</i> 1998

Do posiewu krwi stosuje się podłoże dwufazowe, przygotowane we własnym zakresie, gdzie faza stała to agar z węglem aktywowanym, faza płynna podłoża zawiera: ekstrakt drożdżowy, L-cysteinę i sole żelaza.

Warunki hodowli

Optymalne warunki hodowli to: 35–37°C, atmosfera o zwiększonej (2–5%) zawartości CO₂ (wyższa zawartość CO₂ może hamować wzrost *Legionella*), wilgotność powyżej 50%. Inkubacja do 10 dni, wynik dodatni najczęściej można stwierdzić po 5 dniach hodowli. Podejrzane są kolonie wyrastające dopiero po 3 dniach po posiewie.

Czułość i swoistość hodowli

Czułość hodowli: średnio 60%, zakres 30–80% zależy od typu materiału klinicznego: płwocina – 5–70%, aspiraty poprzez tchawicę (TTA), BAL – 30–90%, krew – 10–30%. Swoistość hodowli: 100% [38, 55, 57, 64, 65, 66].

Identyfikacja pałeczek *Legionella*

Wstępna identyfikacja po:

1. Wykonaniu barwienia metodą Grama: w preparacie widoczne cienkie, polimorficzne, nie wytwarzające spor pałeczki Gram-ujemne (uwaga: trudno się zabar-

- wiają, równolegle stosuje się metodę pół-Grama, tj. barwienie bez odbarwiania alkoholem),
2. Stwierdzeniu niezdolności wytwarzania cysteiny (brak wzrostu na podłożu bez cysteiny np.: agar krwawy lub BCYE- α bez cysteiny)
 3. Istnieje możliwość wstępnej identyfikacji *Legionella micdadei* na podłożu BCYE Differential Agar zawierającym barwniki purpurę bromokrezolową i błękit bromotymolowy. Na tym podłożu *L. micdadei* rośnie w postaci niebiesko-szarych lub ciemno niebieskich kolonii (*L. pneumophila* tworzy jasnoniebiesko-zielone kolonie).

Ze względu na bardzo słabą aktywność biochemiczną dalsza identyfikacja pałeczek *Legionella* do gatunku prowadzona jest z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych: (Mab) skierowanych przeciw białku szoku termicznego (Hsp) o masie 58-60 kDa oraz/lub przeciwciał monoklonalnych przeciw białku ekspozowanemu na powierzchni komórki i biorącemu udział w infekcji makrofaga (*Mip*). Przeciwciała monoklonalne do identyfikacji kolonii mogą być stosowane w układzie immunoenzymatycznym (np. ELISA), immunofluorescencji, w immunoblotingu.

Przeciwciała poliklonalne znakowane fluoresceiną nie znalazły zastosowania w identyfikacji *Legionella* -wykazują one szereg reakcji krzyżowych z *Pseudomonas* sp., *Bacteroides fragilis*, *Corynebacterium* sp., *Franciscella tularensis*, *Bordetella* sp. [56, 64].

Inne laboratoryjne metody wykrywania zakażenia *Legionella* (Tabela II)

Metody serologiczne wykrywania legionelozy; stwierdzenie wzrostu miana przeciwciał anty-*Legionella* w surowicy chorego

Stosowane mogą być następujące metody: 1. Test mikroaglutynacji, 2. Test immunofluorescencji pośredniej (IFA), 3. Hemaglutynacja pośrednia, 4. Test ELISA, 5. Western Immunoblotting.

Metody serologiczne diagnozowania legionelozy wykazują czułość w zakresie 70–80%, która limitowana jest przez: 1. czas niezbędny na rozwinięcie odpowiedzi humoralnej chorego do poziomu wykrywalnego, 2. zdolności pacjenta do odpowiedzi immunologicznej: średnio 20–30% pacjentów nie wytwarza przeciwciał na poziomie wykrywalnym; 25–40% pacjentów wykazywało serokonwersję (4-krotny wzrost miana przeciwciał) po 1 tygodniu od powstania objawów, ale ok. 10% pacjentów wykazuje wzrost miana przeciwciał dopiero po 6–9 tygodniach choroby [55, 64, 65].

Test mikroaglutynacji

Test mikroaglutynacji został opracowany przez *Feeley'a* i współpracowników w 1978 roku. Jest to prosty test mikroaglutynacji wykonywany na płytkach pleksiglasowych. Antygen znakowany safraniną wyklacza się w reakcji z przeciwciałami zawartymi w badanej surowicy. W teście tym nie bada się odpowiedzi pacjenta w poszczególnych klasach przeciwciał. Przygotowanie antygeny możliwe jest z zastosowaniem jednej z dwóch metod:

1. przez ogrzewanie zawiesiny bakterii wyrosłych na podłożach stałych,
2. zabicie formaliną bakterii wyrosłych w woreczku żółtkowym zakażonego jaja.

Tabela II. Potwierdzenie rozpoznania legionelozy przy użyciu metod laboratoryjnych [38]
Laboratory methods use for confirmation the diagnosis of legionellosis

Material	Metoda	Wynik	Interpretacja
BAL, płwocina, biopaty płucne	Hodowla	Dodatni	Potwierdza zakażenie
		Ujemny	Nie wyklucza zakażenia*
	Wykrycie antygenu metodą DFA i/lub wykrycie DNA metodą PCR	Dodatni	Potwierdza zakażenie (a) Przypuszczalne zakażenie (b)
		Ujemny	Nie wyklucza zakażenia*
Mocz	Wykrycie antygenu w moczu: metodą ELISA lub RIA i/lub wykrycie DNA metodą PCR	Dodatni	Potwierdzone rozpoznanie (a, c) Przypuszczalne (b)
		Ujemny	Nie wyklucza zakażenia*
2 próbki surowicy (w odstępie 1–9 tygodni)	Określanie miana przeciwciał metodą IFA lub ELISA lub mikroaglutynacji	Serokonwersja	Potwierdza zakażenie
		Pojedyncze miano powyżej 256	Przypuszczalne zakażenie (brak możliwości oceny czasu zakażenia) (b)
		Poniżej 1:256	Nie wyklucza zakażenia*

a – wg definicji Center for Disease Control USA

b – wg definicji WHO

c – wg definicji Grupy EWGLI i Grupy Badań nad Zapaleniami Płuc

* rozpoznanie negatywne poparte tylko jedną metodą badań może być fałszywie ujemne, negatywny wynik uzyskany dwiema metodami można uznać za prawdziwie ujemny. Zaleca się badanie wszystkich 3 rodzajów materiału klinicznego

Test mikroaglutynacji stosowany jest głównie dla *L. pneumophila* 1. Wynik dodatni w teście mikroaglutynacji uzyskuje się u ponad 95% chorych na chorobę legionistów. Test charakteryzuje się łatwością wykonania oraz przystępną ceną, nie wymaga stosowania specjalnej aparatury. Za dodatnie przyjmuje się zwykle miano powyżej 64 [26, 59, 64].

Odczyn immunofluorescencji pośredniej (IFA)

Test ten został opracowany po epidemii choroby legionistów w 1976 roku przez *McDade* i wsp. [39], stosowany jest m.in. w dwóch wiodących ośrodkach: CDC w Atlancie oraz Central Public Health Laboratory (CPHL) w Wielkiej Brytanii. Obecnie jest dostępny komercyjnie. Umożliwia on badanie odpowiedzi humoralnej chorego w klasach immunoglobulin IgA, IgM i IgG, ale poleca się stosowanie poliwalentnych konjugatów, ze względu na możliwość wytworzenia przeciwciał tylko jednej klasy lub ich kombinacji. Czułość testu została określona na 70–80%, swoistość – 99% dla *L. pneumophila* 1 ponieważ test ten (podobnie jak test mikroaglutynacji) został wystandaryzowany tylko w stosunku do jednego, dominującego w zakażeniach serotypu. Niektóre laboratoria referencyjne (np. w Dreźnie) opracowały system immunofluorescencji pośredniej także dla wybranych innych serotypów *L. pneumophila* i innych gatunków *Legionella*. Stwierdzono krzyżowe reakcje z antygenem *L. pneumophila*

1 w surowicach skierowanych przeciw *P. aeruginosa*, *Campylobacter* sp., *Rickettsia* sp., *Coxiella burnetii*, *Bacteroides* sp., *Haemophilus* sp. oraz *Citrobacter freundii* [55, 64].

Stosowany antygen przygotowany jest z użyciem jednej z ww. metod.

Diagnostyka legionelozy przez poszukiwanie antygenu *Legionella*

Stosowane są następujące metody poszukiwania antygenu *Legionella*: 1. w moczu – ELISA, RIA, 2. w tkankach i wydzielinach dróg oddechowych – immunofluorescencja bezpośrednia (DFA), 3. w wydzielinach dróg oddechowych – test ELISA oparty o poszukiwanie białka szoku termicznego Hsp. Materiał musi być rozbijany ultradźwiękami (w celu uwolnienia białka Hsp), wirowany oraz zawieszany w albuminie bydlęcej.

Wykrywanie antygenu *Legionella* w moczu

W próbce moczu (pobranej do jałowego, szczelnie zamkniętego naczynia) poszukuje się rozpuszczalnego antygenu, którego główny składnik stanowi prawdopodobnie LPS. Jest to antygen ciepło-stały, co oznacza, że przesyłane na duże odległości próbki mogą być zagotowane (5 min.) w celu uniknięcia ewentualnego namnożenia się bakterii towarzyszących. W przypadku wyników wątpliwych polecane jest zagęszczanie moczu przez mikrowirowanie. Dostępne są komercyjne systemy: immunoenzymatyczny ELISA i radioimmunologiczny RIA oraz szybki test immunochromatograficzny [10, 32, 56].

Metoda ta charakteryzuje się: dostępnością materiału, rozpoznaniem we wczesnym etapie choroby, wysoką czułością 75–90% i swoistością 99–100% oraz możliwością uzyskania wyniku dodatniego również gdy występują inne objawy niż zapalenie płuc.

W zależności od producenta testy mogą wykazywać zakażenie tylko *L. pneumophila* 1, lub *L. pneumophila* 1 i *L. pneumophila* 2–14 oraz innych gatunków *Legionella* sp.

Immunofluorescencja bezpośrednia (DFA)

Odczyn ten stosowany jest do poszukiwania tylko *L. pneumophila* głównie w wydzielinach dróg oddechowych, biopatach. Każdy materiał, który jest odpowiedni do posiewu może być również zbadany tym testem. Tkanki można utrzymywać formaliną. Immunofluorescencja bezpośrednia charakteryzuje się czułością w zakresie: 27–70%, wysoką swoistością zależną od typu materiału klinicznego, dodatkowych technik np.: zagęszczania oraz zależy od doświadczenia personelu – istnieje ewentualność otrzymania wyników fałszywie dodatnich związana z zanieczyszczeniem przez *Legionella* płynów użytych do badania. Wynik ujemny może być spowodowany niską czułością testu (ok. 10^4 CFU), stąd taki wynik nie wyklucza zakażenia *Legionella*. Ze względu na dużą liczbę wyników fałszywie dodatnich od 1995 roku uzyskany wynik dodatni nie stanowi podstawy do rozpoznania legionelozy (powinien być potwierdzony inną metodą badania) [55, 64, 65].

Badania genetyczne

Określone sekwencje poszukiwane są poprzez sondy genetyczne – wykrywanie 10^4 CFU, swoistość 99,1%, czułość 57%, PCR – system identyfikacji *Legionella* sp., *L. pneumophila*.

Materiałem może być: BAL, tkanka płucna, inne wydzieliny dróg oddechowych, surowica, mocz [7, 25, 30, 41, 47].

Metody genetyczne wykrywania zakażenia *Legionella* jak również identyfikacji wyizolowanych drobnoustrojów stale są doskonalone. Szersze omówienie tych metod będzie przedmiotem innego artykułu.

ROZPOZNAWANIE ZACHOROWAŃ WYWOŁANYCH PRZEZ PAŁECZKI
LEGIONELLA

Rozpoznanie musi być oparte o wyniki badań laboratoryjnych. Definicje tworzone przez poszczególne zespoły badaczy różnią się w zakresie metod uznawanych za potwierdzające rozpoznanie kliniczne. Definicja WHO (1990 r.) przyjmuje za przypadek legionelozy zachorowanie na zapalenie płuc potwierdzone badaniem rentgenologicznym oraz wyhodowaniem *Legionella* sp. lub uzyskaniem 4-krotnego wzrostu miana przeciwciał przeciwko *L. pneumophila* 1. Przypadek legionelozy wg definicji CDC (1990 r.) wymaga oprócz rozpoznania klinicznego (jw.) potwierdzenia laboratoryjnego: dodatniej hodowli lub serokonwersji lub dodatniego wyniku DFA lub obecności antygeny *Legionella* w moczu. Grupa do Badania Zewnątrzszpitalnych Zapaleń Płuc (1995 r.) za legionelozę uznaje przypadek rozpoznany klinicznie potwierdzony hodowłą lub 4-krotnym wzrostem miana przeciwciał lub obecnością antygeny w moczu. W tabeli III zebrano dane dotyczące czułości, swoistości stosowanych metod oraz interpretacji uzyskanych wyników [55].

Tabela III. Czułość i swoistość metod diagnostycznych legionelozy
Sensitivity and specificity of diagnostic methods of legionellosis

Metody	Materiał kliniczny	Czułość	Swoistość	Uwagi	Interpretacja wyniku dodatniego*
Hodowla	plwocina TTA, BAL krew	5–70% 30–90% 10–30%	100% 100% 100%	Wymaga co najmniej 10 dni	„złoty standard” Potwierdzenie rozpoznania
Serologia	surowica	70%	95–99%	Serokonwersja po 1–9 tygodniach, najczęściej stosowana metoda	Potwierdzenie rozpoznania
Test immunofluorescencji bezpośredniej (DFA)	wydzieliny dróg oddechowych	30–80%	> 99%	Szybki (4 godz.), niezbędne doświadczenie, tylko dla <i>L.pneumophila</i>	Przypuszczalne rozpoznanie, wymaga potwierdzenia
Wykrywanie antygeny rozpuszczalnego w moczu	mocz	75–90%	> 99%	Szybki (4 godz.), wczesny etap choroby	Potwierdzenie rozpoznania
PCR	wydzieliny dróg oddechowych, mocz, surowica	(?) większa niż hodowli?	(?)	Szybki (od 5 godz. do 3 dni), konieczność potwierdzania wyników dodatnich	Przypuszczalne rozpoznanie, wymaga potwierdzenia

* wynik ujemny nie wyklucza możliwości infekcji *Legionella*
TTA – transtracheal assay – materiał pobrany z tchawicy
BAL – bronchoalveolar liquid – popłuczyny oskrzelowe pęcherzykowe

Ze względów praktycznych za wynik potwierdzający zakażenie *Legionella* uznaje się miano przeciwciał ≥ 256 w badaniu jednorazowym.

ZAKAŻENIA SZPITALNE PAŁECZKĄ *LEGIONELLA*

Zakażenia szpitalne rozpoznaje się wg zasad podanych w zestawieniu.

Zakażenia w szpitalu:

1. pewne – pobyt 10 pełnych dni przed wystąpieniem zachorowania,
2. prawdopodobne – pobyt do 9 dni przed wystąpieniem objawów, w szpitalu ze szpitalną legionelozą albo jeżeli szczep *Legionella* jest identyczny z izolowanym z systemu wodnego szpitala,
3. możliwe – pobyt w szpitalu do 9 dni przed zachorowaniem, w szpitalu bez legionelozy, bez powiązań mikrobiologicznych między wyizolowanymi z systemu wodnego a wyizolowanymi z materiału klinicznego pałeczkami *Legionella* [27, 41, 52].

METODY IZOLACJI BAKTERII Z RODZAJU *LEGIONELLA* ZE ŚRODOWISKA WODNEGO

Izolacja bakterii z rodzaju *Legionella* ze środowiska wodnego stwarza poważne problemy metodologiczne. Wiąże się one z niewielką koncentracją tych mikroorganizmów w stosunku do mikroflory towarzyszącej, specyficznymi wymaganiami odżywczymi i bardzo powolnym wzrostem na podłożach syntetycznych. Próbkę wody pobrane do badań w kierunku *Legionella*, poddaje się zagęszczaniu oraz obróbce wstępnej w celu częściowej eliminacji mikroflory towarzyszącej.

Zagęszczanie

Zagęszczanie próbek można uzyskać poprzez filtrację membranową, wirowanie lub namnażanie *Legionella* w obecności ameb.

Filtracja membranowa

Najczęściej stosowanymi filtrami w rutynowych badaniach bakteriologicznych wody są filtry membranowe z estrów celulozy o średnicy porów 0,2 μm lub 0,45 μm [24, 40, 42, 50, 51]. W badaniach w kierunku wykrywania bakterii z rodzaju *Legionella* niektórzy autorzy preferują filtry poliwęglanowe o średnicy porów 0,2 μm lub 0,45 μm [24, 40, 42, 50, 51] lub filtry nylonowe [31, 34]. Preferencje te związane są z polecaną metodą uwalniania bakterii z filtra membranowego na drodze sonifikacji lub wytrząsania. Po przesączeniu próbki wody o odpowiedniej objętości filtr membranowy umieszcza się w łaźni ultradźwiękowej, w zamkniętym naczynku zawierającym 5–25 ml wody lub odpowiedniego płynu do rozcieńczeń i poddaje działaniu ultradźwięków przez okres od 2 do 10 minut. Czas działania ultradźwięków zawsze należy dobierać doświadczalnie zależnie od typu urządzenia. Zbyt długi okres oddziaływania powoduje uszkodzenie komórek bakteryjnych, zbyt krótki natomiast nie daje wystarczającego odzysku bakterii z filtrów. Interesujące porównanie stopnia uwalniania *Legionella* z filtrów membranowych z różnego materiału, różnych firm i o różnej średnicy porów zawiera praca *Smitha* i wsp. [51].

W większości przypadków odzysk *Legionella* z filtrów był wyższy w procesie sonifikacji niż przy wytrząsaniu. Najwyższy procent odzysku uzyskano przy zastosowaniu filtrów poliwęglanowych o średnicy porów 0,2 μm . Podobne wyniki badań otrzymał *Wolford* i wsp. [67]. *Boulanger* i *Edelstein* [5] w swoich badaniach uzyskali jedynie 13% odzysku bakterii podczas sonifikacji filtrów celulozowych. *Wadowsky* i *Yee* [62] niższy odzysk *Legionella* z filtrów celulozowych tłumaczą tendencją bakterii do adhezji na powierzchni tego materiału. Wyższy odzysk bakterii z filtrów poliwęglanowych wiąże się też z ich strukturą, są one bardziej gładkie, śliskie i cieńsze od filtrów celulozowych, co ułatwia uwalnianie bakterii z ich powierzchni. Wadą filtrów poliwęglanowych jest natomiast tendencja do fałdowania się i marszczenia oraz szybkiego zatykania porów podczas sączenia próbek. Wyniki badań *Smitha* i wsp. [51] opublikowane w 1993 roku nie wpłynęły na kształt normy międzynarodowej ISO 11731 z maja 1998 roku [28], w której przy badaniach wody w kierunku wykrywania *Legionella* zaleca się alternatywnie stosowanie filtrów nylonowych lub poliwęglanowych o średnicy porów 0,2 μm lub 0,45 μm . Wyłączne stosowanie filtrów poliwęglanowych o średnicy porów 0,45 μm w metodzie filtracji i sonifikacji zalecają natomiast wytyczne Niemieckiego Ministerstwa Zdrowia [53]. Obok metody uwalniania bakterii po przesączeniu badanej próbki wody przez sonifikację lub wytrząsanie, niektórzy autorzy polecają przeniesienie filtra bezpośrednio na podłoże hodowlane [22, 36]. Przy czym w tym przypadku stosowane są filtry z estrów celulozy o średnicy porów 0,2 μm lub 0,45 μm [22]. Metoda ta jest też zalecana w obecnie przygotowywanym projekcie drugiej części normy ISO 11731 dotyczącej izolacji *Legionella* z wód uzdatnianych służących do konsumpcji, kąpieli i innych celów użytkowych [29].

Wirowanie

Drugą powszechnie stosowaną metodą zagęszczania próbek wody przeznaczonych do badań w kierunku wykrywania *Legionella* jest wirowanie [5, 15, 28, 42]. Aby zapobiec uwalnianiu się niebezpiecznego aerozolu, wirowanie należy zawsze przeprowadzać w zamkniętych pojemnikach. Norma ISO 11731 [28] zaleca wirowanie próbek przez 10 minut przy 6000 g lub przez 30 minut przy 3000 g. *Boulanger* i *Edelstein* najwyższy odzysk *Legionella* sięgający 52,9% uzyskiwali wirując próbki przez 15 minut przy 8150 g, podczas wirowania przez 30 minut przy 3800 g odzysk wynosił 44,5% [5]. Również *Brindle* i wsp. stwierdzili wyższy odzysk *Legionella* przy stosowaniu wyższych obrotów [6]. Z badań *Boulanger* i *Edelstein* [5] wynika że nie tylko odzysk *Legionella*, ale i precyzja i dokładność metody wirowania w porównaniu z metodą filtracji membranowej jest dużo niższa, szczególnie odnosi się to do próbek wody zawierających niewielkie liczby komórek *Legionella*. Odzysk *Legionella* uzyskany techniką wirowania i filtracji membranowej był porównywalny dopiero przy liczebności *Legionella* przekraczającej 10^3 komórek/ml. O niższej liczbie wykrywanych *Legionella* przy stosowaniu techniki zagęszczania próbek przez wirowanie donoszą też inni autorzy [22, 46, 60, 69]. Ze względu na stosunkowo małą pojemność naczyń wirowniczych, stosowanie tej metody jest ograniczone do próbek o niewielkiej objętości, podczas gdy badania w kierunku wykrywania *Legionella* najczęściej prowadzone są z próbek wody o objętości 1000 ml.

Wzbogacanie próbki przez zastosowanie ameb

Interesującą metodą wykrywania *Legionella* w próbkach wody zawierających bardzo małe, często niewykrywalne opisywanymi powyżej metodami, liczby bakterii zaproponował Rowbotham [48, 49]. Metoda ta polega na wprowadzeniu do badanej próbki ameb, do których wnikają obecne w próbce komórki *Legionella*, namnażają się w wakuolach i po uwolnieniu mogą być bez trudu izolowane metodami konwencjonalnymi. Do tej pory obecność *Legionella* została stwierdzona w 5-ciu rodzajach ameb (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Echinamoeba*) oraz w orzęskach z rodzaju *Tetrahymena*, (*T. pyriformis* i *T. vorax*) [3, 19]. Sanden i wsp. opisali 59 przypadków izolacji *Legionella* z próbek wody zawierających ameby dopiero po ponad 6 tygodniowym okresie przechowywania próbek, podczas gdy badanie tej samej wody bezpośrednio po pobraniu, dawało wyniki negatywne [50]. Frahm i Obst zaobserwowali namnażanie się pojedynczych komórek *Legionella* do wartości 10^3 komórek/ml podczas kilkutygodniowego przechowywania wody w temperaturze 36°C w obecności ameb [22]. Zaobserwowana przez autorów korelacja między próbkami wody zawierającymi ameby i pozytywnymi wynikami wykrywania *Legionella* wynosiła 74%. Fields i wsp. podobny wzrost liczby komórek *Legionella* zanotowali po 7 dniach inkubacji próbek w obecności orzęsków *Tetrahymena pyriformis* [20]. Pomimo, że współzależności pomiędzy bakteriami z rodzaju *Legionella*, a pierwotniakami były tematem licznych prac dokładny mechanizm interakcji nie jest jeszcze do końca poznany [1, 35].

Obróbka wstępna próbek

Niezależnie od stosowanej metody zagęszczania, badanych w kierunku wykrywania *Legionella* próbek wody, przeważnie przed posiewem na odpowiednie podłoże hodowlane konieczne jest przeprowadzenie tzw. obróbki wstępnej próbek mającej na celu ograniczenie wzrostu mikroflory towarzyszącej. O hamowaniu wzrostu *Legionella* przez towarzyszącą mikroflorę heterotroficzną zarówno w środowisku naturalnym jak i na podłożach syntetycznych donoszą liczni autorzy [45]. W badaniach Paszko-Kolva i wsp. [45] bakterie z rodzaju *Legionella* stanowiły jedynie 0,0012% ogólnej liczby bakterii izolowanych z wody, a strefa przejaśnienia na podłożu stałym ze wzrostem zlewnym *Legionella dumoffi* wokół kolonii *Pseudomonas sp.* sięgała 6 mm.

W celu ograniczenia wzrostu mikroflory towarzyszącej próbki poddaje się działaniu kwaśnego buforu (pH 2,2 przez 5–10 minut) lub działaniu podwyższonej temperatury (50°C przez 30 minut). Kwaśnym buforem traktowany jest eluat po sonifikacji filtrów membranowych [28, 31, 60], jak również różnego pochodzenia osady, złoża i muły [28]. W przypadku badań wód uzdatnianych projekt normy ISO 11731 [29] zaleca po przesączeniu próbki wprowadzenie kwaśnego buforu bezpośrednio na umieszczony w aparacie filtracyjnym filtr membranowy, po 5 minutach bufor należy przesączyć, przepłukać filtr i umieścić go na odpowiednim podłożu hodowlanym. Przy stosowaniu tej procedury nie można wykluczyć, że tak drastyczne obniżenie pH spowoduje również zredukowanie liczby komórek *Legionella*. Szewczyk i wsp. [58] donoszą, że redukcja ta może sięgać aż 37%. Również Boulanger i Edelstein [5] po zastosowaniu obróbki wstępnej próbek kwaśnym buforem zaobserwowali redukcję odzysku *Legionella* sięgającą 30%. Badania innych autorów nie potwierdzają tego zjawiska [4, 22, 60, 63]. Bopp i wsp. [4] wykazali, że po 30 i 60 minutach traktowania kwaśnym buforem

zawiesiny $6,3 \times 10^8$ /ml komórek wzorcowego szczepu *Legionella pneumophila* zdolność wzrostu zachowało odpowiednio $6,1 \times 10^8$ i $6,8 \times 10^7$ bakterii/ml. Krótszy okres ekspozycji pozostawał bez wpływu na wzrost *Legionella*. Ci sami autorzy w badaniach wód naturalnych stwierdzili redukcję mikroflory towarzyszącej już po 5 minutach traktowania próbek kwaśnym buforem. Pięciominutowy czas ekspozycji został uznany za optymalny przez większość autorów prowadzących badania wody w kierunku wykrywania *Legionella*.

Ograniczenie wzrostu mikroflory towarzyszącej metodą podwyższania temperatury badanych próbek do 50°C przez 30 minut stosowane jest stosunkowo rzadko, chociaż metoda ta alternatywnie do metody zakwaszania zalecana jest przez normę ISO 11731 [29]. Z doświadczeń Dennis i wsp. wynika, że redukcja liczby bakterii z rodzaju *Legionella* w temperaturze 50°C następuje dopiero po 240 minutach działania [9]. Po 30 minutach inkubacji próbek wody w tej temperaturze można się natomiast spodziewać całkowitej redukcji liczby komórek *Pseudomonas* sp., bakterie grupy coli ginęły po 150 minutach a *Micrococcus* sp. po 90 minutach.

Większość autorów w swoich publikacjach podkreśla, że nie ma jednej uniwersalnej metody, którą jako najlepszą można by było polecić do izolowania bakterii z rodzaju *Legionella* ze środowiska wodnego. Skuteczność zastosowanej metody zależy między innymi od pochodzenia próbki wody (wody naturalne – powierzchniowe, gruntowe; wody użytkowe) od jej składu chemicznego i temperatury oraz stopnia zanieczyszczenia, w tym od ilości i składu jakościowego mikroflory towarzyszącej [22, 33, 60]. Tiefenbrunner i wsp. [60] najlepsze wyniki izolacji *Legionella* z instalacji wody zimnej uzyskali metodą sączenia próbek przez filtry poliwęglanowe, sonifikacji i obróbki eluatu kwaśnym buforem. Autorzy ci wykazali, że przy zastosowaniu tej metody następuje prawie całkowita eliminacja pałeczek Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (w tym *Pseudomonas*) oraz drożdży. Metoda ta nie wpływa natomiast na liczbę Gram-dodatnich i Gram-ujemnych ziarniaków oraz bakterii tworzących spory. Do izolacji *Legionella* z instalacji wody gorącej i mieszanej autorzy ci polecają koncentrację próbek przez wirowanie, sonifikację osadu i zakwaszenie. Frahm i Obst najwyższy procent izolacji *Legionella* z próbek uzyskali stosując, w badaniach wody pochodzącej z instalacji domowych, metodę filtracji membranowej, zakwaszania i bezpośredniej hodowli mikroorganizmów na filtrze przeniesionym na odpowiednie podłoże [22]. Autorzy ci proponują pominięcie etapu sonifikacji opierając się na badaniach Smith i wsp., z których wynikało, że podczas sonifikacji tylko 22 do 66% bakterii przechodzi do eluatu [51]. Wobec dużej rozbieżności wyników badań uzyskiwanych przez różnych autorów, różnymi metodami, norma ISO 11731 [28] zaleca zagęszczone lub nie zagęszczone próbki wody, mułów lub osadów badane w kierunku wykrywania *Legionella*, podzielić na trzy części, z których jedną zaleca stosować bez obróbki wstępnej, jedną poddać działaniu podwyższonej temperatury i jedną kwaśnego buforu. Postępowanie takie znacznie zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia *Legionella* szczególnie w próbach o bliżej nie znanym stopniu zanieczyszczenia, które badane są po raz pierwszy.

Hodowla

Niezależnie od zastosowanej metody koncentracji i obróbki wstępnej badanych próbek wody następnym etapem badań jest zazwyczaj hodowla poszukiwanych mikroorganizmów.

Jedną z pierwszych metod namnażania *Legionella*, stosowaną również przy badaniu wody, było wprowadzenie próbki materiału do krwi 4–6 tygodniowych świnek morskich. [4, 8, 12, 21, 39, 42, 43, 61]. W przypadku obecności w badanej próbce pałeczek *Legionella* po dwóch dniach od zaszczepienia obserwowano rozwijający się proces chorobowy kończący się przeważnie po 6 dniach śmiercią. Wyciągi z wątroby i śledziony martwych zwierząt zawierające namnożone komórki *Legionella* wprowadzano następnie do woreczków żółtkowych embrionów kurzych, po 4–5 dniach homogenat rozprowadzano na podłożach syntetycznych. Feeley i wsp. [16] spośród 17 różnych podłoży bakteriologicznych, na które posiewali zakażoną zawiesinę kurzych woreczków żółtkowych, wzrost pałeczek *Legionella* uzyskali jedynie na podłożu Mueller-Hintona z dodatkiem 1% hemoglobiny i 1% roztworu określanego jako Iso Vitale X. Dalsze prace tych autorów doprowadziły do zastąpienia wymienionych czynników chlorowodorkiem L-cysteiny i roztworem pirofosforanu żelaza (F-H agar), równocześnie autorzy zaobserwowali, że najkorzystniejsze warunki wzrostu dla pałeczek *Legionella* występują przy obniżonym stężeniu tlenu i podniesionym do 2,5% stężeniu CO₂. Kolejną modyfikacją podłoża do hodowli *Legionella* było zastąpienie kwaśnego hydrolizatu kazeiny i skrobi, wyciągiem drożdżowym i węglem drzewnym (charcoal – yeast extract CYE – agar) [17]. Posiewy standaryzowanej zawiesiny zakażonych jaj kurzych na porównywane podłoża wykazały na agarze F-H obecność 4,35 x 10⁶ komórek *Legionella* w przeliczeniu na 1ml inokulum po 4 dniach inkubacji i 4,85 x 10⁸ komórek w 1 ml na agarze CYE po 3 dniach inkubacji. Równocześnie autorzy sugerują, że inkubację na podłożu CYE można prowadzić w warunkach tlenowych bez konieczności podwyższania stężenia CO₂ do 2,5%. Edelstein [13] najkorzystniejsze warunki izolacji pałeczek *Legionella* zarówno z materiału klinicznego jak i z próbek wody uzyskał po uzupełnieniu podłoża CYE w ACES bufor (kwas N-2-acetamido-2-amino etanosulfonowy) i α-ketoglutaran (podłoże BCYE-α). Na podłożu tym *Legionella* rośnie w postaci lekko wypukłych kolonii barwy kremowo-białej lub szarej z wyraźnie opalizującym środkiem. Kolonie można zaobserwować pod mikroskopem po 24 godz. inkubacji, między 3 a 5 dniem są już widoczne gołym okiem, po 5–7 dniach osiągają średnicę 3–4 mm [44]. Posiane płytki należy inkubować w temperaturze 36 ± 1°C, przy wilgotności > 50% do 10 dni. Podłoże BCYE-α jest najczęściej stosowanym podłożem podstawowym do hodowli pałeczek *Legionella* ze środowiska naturalnego jak i z materiału klinicznego.

Poza obróbką wstępną próbek, która nie prowadzi do całkowitej eliminacji mikroflory towarzyszącej konieczne jest uzupełnienie podłoża o czynniki zwiększające jego selektywność. Gorman i wsp. [23] proponują dodanie cefalotyny i cykloheksamidu (CCVC-BCYE agar) na podłożu tym nie będą jednak rosły gatunki *Legionella* nie wytwarzające cefalosporynazy np. *L. micdadei* i *L. feeleii*. Wadowski i Yee [62] w celu zahamowania wzrostu pałeczek Gram-ujemnych zaproponowali oprócz antybiotyków wankomycyny i polimyksyny dodanie do podłoża wolnej od jonów amonowych glicyny (podłoże WY). Edelstein [15] zmodyfikował to podłoże uzupełniając je w anisomycynę – antybiotyk hamujący rozwój drożdży, oraz barwniki błękit bromotymolowy i purpurę bromokrezolową (podłoże MWY). Przeprowadzone przez tego autora badania porównawcze izolacji *Legionella* z 24 próbek wody wykazały 92% próbek dodatnich przy zastosowaniu podłoża MWY, wobec 79% na podłożu z dodatkiem cefamandolu, polimyksyny B i anizomycyny (podłoże BMPA-α) i 71% na podłożu podstawowym

BCYE- α bez dodatku czynników hamujących. Również *Kusnetsov* i wsp. [34] najwyższy procent próbek pozytywnych w stosunku do *Legionella* (76,%) uzyskali stosując metodę posiewu zagęszczonych i zakwaszonych próbek wody na podłoże MWY, równolegle na podłożu BCYE- α uzyskali 70,5% próbek dodatnich spośród 95 badanych. Autorzy ci szczególnie polecają podłoże MWY do badania próbek wody pochodzących z systemów chłodniczych. Niemieckie Ministerstwo Zdrowia zaleca podłoże MWY do wykrywania obecności *Legionella* w wodach ciepłych instalacji domowych natomiast BCYE- α do hodowli czystych szczepów w badaniach potwierdzających [53].

PODSUMOWANIE

Laboratoryjna diagnostyka zachorowań wywołanych bakteriami z rodzaju *Legionella* oraz metody wykrywania i izolacji tych drobnoustrojów ze środowiska wodnego są przedmiotem stałego zainteresowania mikrobiologów. Poszukiwanie pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym czy w wodzie napotyka szereg trudności. Pałeczki *Legionella* są wewnątrzkomórkowymi patogenami o szczególnych wymaganiach odżywczych, długim okresie generacji, występują w niewielkiej koncentracji w stosunku do mikroflory towarzyszącej. Zatem wybór metody zależy od: typu materiału klinicznego, pochodzenia próbki wody, spodziewanej koncentracji *Legionella*, stopnia zanieczyszczenia badanej próbki (skład i ilość flory towarzyszącej). W świetle przedstawionych prac można stwierdzić, że dotychczas nie opracowano uniwersalnej metody, którą jako najlepszą można by polecić do izolowania i wykrywania *Legionella* z materiału klinicznego czy środowiska wodnego.

H. Stypułkowska-Misiurewicz, B. Krogulska, K. Pancer, R. Matuszewska

LEGIONELLA SP. – INVESTIGATION OF HUMAN INFECTION AND DETECTION IN ENVIRONMENTAL WATER

Summary

Legionella sp. is the etiological agent of Legionnaires Disease and the Pontiac Fever, one of the new emerging diseases. *Legionella* are common in natural environment but in low number of bacteria cells, especially in comparison to other bacterial flora. Because of special nutritious requirement and long time of *Legionella* generation, the isolation of bacteria and the diagnosis of legionellosis cause many problems. In this publication some methods for detection of *Legionella* sp. in environmental water and clinical samples are presented and evaluated.

PIŚMIENNICTWO

1. Anand C., Skinner C., Malic A., Kurtz J.: Interaction of *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba palenstinensis*). J. Hyg. (Cambridge) 1983, 91, 167.
2. Bannister B.A., Begg W.T., Gillespie S.H.: Choroba legionistów i legionelloza (legionellosis). W: Choroby zakaźne, Wyd. Med. Urban i Partner, Wrocław 1998, 151.
3. Barbaree J., Fields B., Feeley J., Gorman G., Martin W.: Isolation of protozoa from water associated with a Legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 1986, 51, 422.
4. Bopp C., Sumner J., Morris G., Wells J.: Isolation of *Legionella* sp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J. Clin. Microbiol. 1981, 13, 714.

5. Boulanger C., Edelstein P.: Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 16, 1805.
6. Brindle R., Stannett P., Cunliffe R.: *Legionella pneumophila*: comparison of isolation from water specimens by centrifugation and filtration. *Epidemiol. Infect.* 1987, 99, 241.
7. Catalan V., Garcia F., Moreno C. et al.: Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater by nested polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 1997, 148, 71.
8. Dennis P., Fitzgeorge R., Taylor J., Bartlett C., Barrow G.: Public Health. *Legionella pneumophila* in water plumbing systems. *Lancet* 1982, 949.
9. Dennis P., Green D., Jones B.: A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *J. Appl. Bacteriol.* 1984, 56, 349.
10. Dominguez J., Gali N., Matas L. et al.: Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Assay for the Detection of *Legionella* Antigen in Urine Samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, 18, 896.
11. Dożański W.J.: *Sarcobium lyticum*: life in an Extreme Environment. *Bull. Pol. Acad. Sci., Biological Sci.* 1996, 44, 165.
12. Dufour A., Jakubowski W.: Drinking water and Legionnaires disease. *JAWWA* 1982, 74, 631.
13. Edelstein P.: Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1981, 14, 298.
14. Edelstein P., Snitzer J., Finrgold S.: Isolation of *Legionella pneumophila* from hospital potable water specimens: comparison of direct plating with guinea pig inoculation. *J. Clin. Microbiol.* 1982, 15, 1097.
15. Edelstein P.: Comparative study of selective media for isolations of *Legionella pneumophila* from potable water. *J. Clin. Microbiol.* 1982, 16, 697.
16. Feeley J., Gorman G., Weaver R., Mackel D., Smith H.: Primary isolation media for the Legionnaires disease bacterium. *J. Clin. Microbiol.* 1977, 8, 320.
17. Feeley J., Gibson R., Gorman G., Langford N., Rasheed J., Mackel C., Baine W.: Charcoal – yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 1979, 10, 437.
18. Fields B.: The molecular ecology of *Legionellae*. *Trends in Microbiology* 1996, 4, 286.
19. Fields B.: *Legionella* and protozoa: interaction of pathogen and its natural host. W: *Legionella* current status and emerging perspectives, J. Barbarree, R. Breiman, A. Dufour (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993, 129.
20. Fields B., Shotts E., Feeley J., Gorman G., Martin W.: Proliferation of *Legionella pneumophila* as intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrachymena pyriformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1970, 47, 476.
21. Fliermans C., Cherry W., Orrison L., Smith S., Tison D., Pope D.: Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41, 9.
22. Frahm E., Obst U.: Erfahrungen mit optimierten Methoden zum Nachweis von *Legionellen* im Trinkwasser. *Zbl. Hyg.* 1994, 196, 170.
23. Gorman G., Barbaree J., Feeley G.: Procedures for the recovery of *Legionella* from water. *Developmental Manual*, Centers for Disease Control, Atlanta 1983.
24. Gorman G., Barbaree J., Feeley J.: Procedures for the recovery of *Legionella* from the water. *Developmental Manual*. Centers for Disease Control, Atlanta 1993
25. Grimm D., Merkert H., Ludwig H. et al.: Specific detection of *Legionella pneumophila*: Construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 2686.
26. Harrison T.G., Dournon E., Taylor A.G.: Evaluation of sensitivity of two serological tests for diagnosing pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J. Clin. Pathol.* 1987, 40, 77.

27. Hryniewicz W.: Bakterie atypowe a zakażenia układu oddechowego. Medycyna Po Dyplomie, wyd. specjalne, sierpień 1999, 1.
28. ISO 11731: 1998. Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*.
29. ISO CD 11731 – 2 (1998). Detection and enumeration of *Legionella* – Part 2: Detection in drinking water and treated bathing waters by a membrane filtration method.
30. Jaulhac B., Reyrolle M., Sodahlon Y.K. et al.: Comparison of sample preparation methods for detection of *Legionella pneumophila* in culture-positive bronchoalveolar lavage fluids by PCR. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 2120.
31. Jousimies-Somer H., Waarala, S., Väisänen M.: Recovery of *Legionella* sp. from water samples by four different methods. W: *Legionella* current status and emerging perspectives, J. Barbarree, R. Breiman, A. Dufour (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993, 40.
32. Kazandjian D., Chie R., Gilbert G.L.: Rapid diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection with the Binax Enzyme Immunoassay Urinary Antigen Test. J. Clin. Microbiol. 1997, 35, 954.
33. Kusnetsov J., Martikainen P., Jousimies-Somer H., Väisänen M., Tulkki A., Ahonen H., Nevalainen A.: Physical, chemical and microbiological water characteristics associated with the occurrence of *Legionella* in cooling tower systems. Wat. Res. 1993, 27, 85.
34. Kusnetsov J., Jousimies-Somer H., Nevalainen A., Martikainen P.: Isolation of *Legionella* from water samples using various culture methods. J. Appl. Bacteriol. 1994, 76, 155.
35. Lee J., West A.: Survival and growth of *Legionella* species in the environment. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement. 1991, 70, 121S.
36. Linde H., Hengerer A., Voggesberger E., Hecht J., Ehret W., Wolf H.: Sanierung von Warmwassersystemen mit Legionellenbefall – Dokumentation eigener Erfahrungen mit thermischer Desinfektion. Zbl. Hyg. 1995, 197, 441.
37. Lutichau H.R., Vinther C., Uldum S.A. et al.: An Outbreak of Pontiac Fever Among Children Following Use of a Whirlpool. Clin. Infect. Dis. 1998, 26, 1374.
38. Maiwald M., Helbig J.H., Luck P.C.: Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. J. Microbiol. Methods. 1998, 33, 59.
39. McDade J., Shepard C., Fraser D., Tsai T., Redus M., Dowdle W.: Legionnaires, disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N. Engl. J. Med. 1977, 297, 1197.
40. Miller R., Kenepf K.: Risk assessments for legionnaires disease based on routine surveillance of cooling towers for *Legionellae*. W: *Legionella* current status and emerging perspectives, J. Barbarree, R. Breiman, A. Dufour (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993, 40.
41. Miyamoto H., Yamamoto H., Arima K. et al.: Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63, 2489.
42. Negrón-Alvira A., Perez-Suarez I., Hazen T.: *Legionella* sp. in Puerto Rico cooling towers. Appl. Environ. Microbiol. 1988, 54, 2331.
43. Orrison L., Cherry W., Milan D.: Isolation of *Legionella pneumophila* from cooling tower water by filtration. Appl. Environ. Microbiol. 1981, 41, 1202.
44. Pasculle A.: *Legionella*. In: Clinical and Pathogenic Microbiology, second edition. Chief Editor: B.J. Howard, Washington, D.C. 1984
45. Paszko-Kolva C., Hacker P., Steward M., Wolfe R.: Inhibitory effect of heterotrophic bacteria on the cultivation of *Legionella dumoffi*. W: *Legionella* current status and emerging perspectives, J. Barbarree, R. Breiman, A. Dufour, Eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993, 40.
46. Payment P., Berube A., Perreault D., Armon R., Trudel M.: Concentration of *Gardia lamblia* cysts, *Legionella pneumophila*, *Clostridium perfringens*, human enteric viruses, and coliphages

- from large volumes of drinking water, using a single filtration. *Can. J. Microbiol.* 1989, 35, 932.
47. Riffard S., Presti F.L., Vandenesch F. et al.: Comparative Analysis of Infrequent-Restriction-Site PCR and Pulsed Field Gel Electrophoresis for Epidemiological Typing of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strains. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 161.
 48. Rowbotham T.: Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 1980, 33, 1179.
 49. Rowbotham T.: Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J. Clin. Pathol.* 1983, 36, 978.
 50. Sanden G., Morrill W., Fields B., Breiman R., Barbaree J.: Incubation of water samples containing amoebae improves detection of *Legionellae* by the culture method. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58, 2001.
 51. Smith L., Carroll K., Mottice S.: Comparison of membrane filters for recovery of *Legionellae* from water samples. 1993, 59, 344.
 52. Sopena N., Sabria M., Pedro-Botet M.L. et al.: Prospective Study of Community-Acquired Pneumonia of Bacterial Etiology in Adults. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, 18, 852.
 53. Standardarbeitenweigungen QS – Dok. Teil B17 Methoden-Nr. 168. Qualitätssicherungs – Handbuch – Mikrobiologie – Nachweis von Legionellen in Wasser aller Art. Bundesgesundhbl. 1993, 36, 162.
 54. Stypulkowska-Misiurewicz H.: Legioneloza. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Zapobieganie i zwalczanie. (red. W. Magdzik). Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne, Vesalius, Kraków 1993, 197.
 55. Stypulkowska-Misiurewicz H., Krogulska B., Pancer K., Matuszewska R.: Some problems in laboratory diagnosis of *Legionella* infections in Poland, EWGLI, 1999 abstract 41.
 56. Stypulkowska-Misiurewicz H., Pancer K., Krogulska B., Matuszewska R.: Ocena testu do wykrywania antygenów *Legionella* w moczu. XV Międzynarodowa Konf. Diagnostyka Mikrobiologiczna, Puławy 1999, 59.
 57. Stypulkowska-Misiurewicz H., Stochmal I.: Metodyka hodowli *Legionella pneumophila* w warunkach krajowych. Referaty XXII Zjazdu Pol. Tow. Ftyzjo-pneumonologicznego, Lublin, 1986, 1055.
 58. Szewczyk R., Allestam G., Stenström T.-A.: Improved recovery of *Legionella* from water samples by use of black membrane filters. *Zbl. Hyg.* 1991, 192, 258.
 59. Tateda K., Murakami H., Ishii Y. et al.: Evaluation of clinical usefulness of the microplate agglutination test for serological diagnosis of *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.* 1998, 47, 325.
 60. Tiefenbrunner F., Arnold A., Taranboi E., Cerneck U., Emde K.: Comparison of different detection methods for isolation of *Legionella pneumophila* from waters supplies of alpine hotel resorts. W: *Legionella* current status and emerging perspectives, J. Barbarree, R. Breiman, A. Dufour, Eds., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993, 40.
 61. Tobin J., Swann R., Bartlett C.: Isolation of *Legionella pneumophila* from water systems: methods and preliminary results. *Brit. Med. J.* 1981, 282, 515.
 62. Wadowsky R., Yee R.: A glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 42, 768.
 63. Wang W., Blaser M., Cravens J., Johnson M.: Growth, survival, and resistance of the Legionnaires disease bacterium. *Ann. Intern. Med.* 1979, 90, 614.
 64. Ward K.W.: Processing and Interpretation of Specimens for *Legionella* sp. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (red. H.D. Isenberg), ASM, Washington, 1994, 1.
 65. Winn W.C. Jr.: *Legionella*. In: *Manual of Clinical Microbiology* (red. P.R. Murray) ASM, Washington D.C. 1995
 66. Winn W, Jr.: Legionnaires disease: hospital perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 1988, 1, 60.

67. *Wolford R., Kuchta J., Wadowsky R., Yee R.*: Isolation of *Legionella pneumophila* by membrane filtration, Q-25. Program Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1998, 287.
68. *Visca P., Goldoni P., Luck P.C. et al.*: Multiple Types of *Legionella pneumophila* Serogroup 6 in a Hospital Heated-Water System Associated with Sporadic Infections. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 2189.
69. *Voss L., Button K., Rheins M., Tuovinen O.*: Sampling methodology for enumeration of *Legionella* sp. In: water distribution systems. *Thonsbery C., Balows A., Feeley J., Jakubowski W.*, Eds., *Legionella*-proceedings of the 2nd International Symposium. Society for Microbiology, Washington, D.C. 2921.

Otrzymano: 2000.05.11