

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

***LEGIONELLA PNEUMOPHILA* IZPLATĪBA UN  
SEKVENČU TIPU DAUDZVEIDĪBA LATVIJAS  
VIESNĪCU ŪDENSAPGĀDES SISTĒMĀS**

Maģistra darbs

Darba autore: Andžela Staškeviča  
Stud.apl. nr.: as16211

Darba vadītāja: Dr.biol., asoc. prof. Vizma Nikolajeva

Darba konsultante: Mg.biol. Olga Valciņa

RĪGA 2018

# SATURS

Ievads.....	5
1. Literatūras apskats.....	7
1.1. <i>Legionella pneumophila</i> raksturojums.....	7
1.1.1. Bioloģija un taksonomija .....	7
1.1.2. Izplatība vidē un izraisītās slimības .....	8
1.1.3. Epidemioloģija Latvijā un citur Eiropā.....	11
1.1.4. Diagnostika, ierobežošana un kontrole .....	12
1.2. Mikrobioloģiskās identifikācijas un tipēšanas metodes.....	14
1.2.1. Kultivēšanas metodes.....	14
1.2.2. Ģenētiskās metodes.....	16
1.2.3. MALDI-TOF MS metode .....	20
2. Materiāli un metodes.....	22
2.1. Materiāli.....	22
2.1.1. Vielas, reaģenti un barotnes .....	22
2.1.2. Iekārtas .....	23
2.1.3. Laboratorijas palīgmateriāli .....	25
2.1.4. Datorprogrammas un datubāzes.....	26
2.2. Metodes.....	27
2.2.1. Viesnīcu izvēle un ūdens paraugu noņemšana.....	27
2.2.2. <i>Legionella pneumophila</i> izolēšana un serogrupas noteikšana .....	28
2.2.3. DNS ekstrakcija un PCR amplifikācija.....	29
2.2.4. DNS sekvencēšana .....	29
2.2.5. MALDI-TOF MS identifikācija.....	30
2.2.6. Datu apstrāde un analīze .....	30
3. Rezultāti un diskusija .....	32
3.1. <i>Legionella pneumophila</i> izplatība viesnīcu ūdensapgādes sistēmās.....	32
3.2. <i>L. pneumophila</i> sekvenču tipu daudzveidība un izplatība .....	35
3.3. Identificēto <i>L. pneumophila</i> sekvenču tipu filoģenētiskās attiecības .....	39
Secinājumi.....	43
Pateicības.....	44
Literatūras saraksts.....	45
Pielikumi.....	51

## Kopsavilkums

*Legionella pneumophila* ir nosacīti patogēna, dabiskās un mākslīgi radītās saldūdens ūdenskrātuvēs sastopama baktērija, kas spēj izraisīt infekcijas slimību – legionelozi. Lai noskaidrotu *L. pneumophila* izplatību Latvijā, no 40 viesnīcu ūdensapgādes sistēmām noņemti 240 karstā ūdens paraugi un testēti uz *L. pneumophila* klātbūtni. No pētījumā iesaistītajām viesnīcām 25 (65 %) viesnīcās konstatēts vismaz viens *Legionella* pozitīvs paraugs. Maksimālais *L. pneumophila* koloniju veidojošo vienību skaits vienā paraugā bija  $1,1 \times 10^4$  kvv/l. Ar MALDI-TOF MS apstiprināti 99 *L. pneumophila* un 9 *L. rubrilucens* izolāti. Pārstāvētākā no serogrupām bija *L. pneumophila* serogrupa 3 (68 izolāti). Izmantojot SBT metodi iegūti 26 sekvenču tipi, no kuriem četri (ST 2579, ST 2580, ST 2581 un ST 2582) EWGLI datubāzē reģistrēti pirmo reizi. Visvairāk izolātu identificēts ar sekvenču tipa numuru ST 1104 (15 izolāti). Iegūta *minimum-spanning tree* dendrogramma, kurā 26 sekvenču tipi iedalās 4 grupās (A,B,C un D) un 11 atsevišķos “*singletons*” sekvenču tipos. Šis pētījums papildina EWGLI datubāzē iekļauto *L. pneumophila* sekvenču tipu skaitu, palīdz iegūt informāciju par to ģenētisko dažādību Latvijā un pasaulē, kā arī saskatīt *L. pneumophila* radniecību starp atšķirīgajiem sekvenču tipiem.

**Atslēgvārdi:** *Legionella pneumophila*, SBT, viesnīcas, ūdensapgādes sistēmas, MALDI-TOF MS

## Summary

### Prevalence and sequence type diversity of *Legionella pneumophila* in water supply systems of Latvian hotels

*Legionella pneumophila* is a conditionally pathogenic bacteria found in natural and man-made freshwater reservoirs which can cause infectious disease – legionellosis. To find out the prevalence of *L. pneumophila* in Latvia, total of 240 hot water samples from 40 hotel water supply systems were taken. Overall, at least one positive sample of *Legionella* was found in 25 (65 %) of study involved hotels. The maximum number of *L. pneumophila* colony forming units in a sample was  $1.1 \times 10^4$  cfu/l. In total, 99 *L. pneumophila* and 9 *L. rubrilucens* isolates were identified by MALDI-TOF MS. The most frequently *L. pneumophila* serogroup was serogroup 3 (68 isolates). In this study was used SBT method, which all isolates were classified into 26 sequence types, including four new sequence types (ST 2579, ST 2580, ST 2581 and ST 2582) that were submitted in EWGLI database for the first time. A minimum-spanning tree dendrogram was obtained from 26 sequence types containing 4 groups (A, B, C and D) and 11 singleton sequence types. This study complements the EWGLI database with new *L. pneumophila* sequence types, demonstrated genetic diversity not only in Latvia but also in the world, as well as showed relationship between different *L. pneumophila* sequence types.

**Keywords:** *Legionella pneumophila*, SBT, hotels, water supply system, MALDI-TOF MS

## Ievads

*Legionella pneumophila* ir nosacīti patogēna, gramnegatīva, intracelulāra baktērija, kas sastopama dabiskās saldūdens ūdenskrātuvēs (Khodr et al. 2016). Tā var nonākt sadzīves patēriņam lietojamā ūdens aprītē, pie labvēlīgiem augšanas apstākļiem masveidā savairoties un iekļūt ēku ūdensapgādes sistēmās (Zbikowska et al. 2014; Gong et al. 2017). Aspirācijas ceļā, caur elpošanas orgāniem, nonākot cilvēka organismā, *L. pneumophila* spēj izraisīt veselībai bīstamu slimību – legionelozi, ar variablām izpausmes formām, kas sliktākajā gadījumā var novest pat pie letāla iznākuma (Diederer 2008; Phin et al. 2014).

Statistikas dati liecina, ka ar katru gadu paliek arvien vairāk legionelozes saslimšanas gadījumu, kas ir saistīti tieši ar ceļošanu un uzturēšanos viesnīcās, kopumā sastādot aptuveni 20 % no reģistrētajiem saslimšanas gadījumiem (ECDC 2017). Par iemeslu tam varētu būt viesnīcu ēku vecums un izmēri, plašais cauruļvadu tīkls, sezonālais apmeklējums un atšķirīgais ūdens pieprasījums (Borella et al. 2005; Boer et al. 2006).

Iespējams, viens no galvenajiem veidiem, kā samazināt inficēšanos ar *L. pneumophila* un saslimšanas uzliesmojumu skaitu, ir kontrolējot šīs baktērijas izplatību vidē (Sanchez-Buso et al. 2015). Izmantojot uz DNS sekvenci bāzēto tipēšanas metodi jeb SBT, ir iegūstams *L. pneumophila* alēliskais profils un sekvenču tipa numurs, kas nodrošina efektīvu *L. pneumophila* epidemioloģisko tipēšanu, globālās izplatības izmeklēšanu un izsekošanu, kā arī legionelozes uzliesmojumu noskaidrošanu (Kozak-Muiznieks et al. 2014). Šis ir pirmais šāda veida pētījums Latvijas teritorijā, kurā tiek identificēti un subtipēti *L. pneumophila* izolāti no viesnīcu ūdensapgādes sistēmām, ļaujot noskaidrot *L. pneumophila* izplatību un sekvenču tipu daudzveidību.

**Darba mērķis:** Novērtēt *Legionella pneumophila* izplatību un sekvenču tipu daudzveidību Latvijas viesnīcu ūdensapgādes sistēmās.

Izvirzīti sekojoši **darba uzdevumi:**

- 1) Noņemt ūdens paraugus no Latvijas viesnīcu ūdensapgādes sistēmām un veikt testēšanu uz *Legionella pneumophila* klātbūtni.
- 2) Identificēt *Legionella pneumophila*, izmantojot MALDI-TOF MS jeb matricas veicināto lāzera desorbcijas/jonizācijas nolidošanas laika masspektrometrijas metodi.
- 3) Subtipēt *Legionella pneumophila* izolātus, pielietojot SBT jeb uz DNS sekvenci bāzēto tipēšanas metodi.
- 4) Novērtēt iegūtos rezultātus un veikt *Legionella pneumophila* izolātu epidemioloģisko un filoģenētisko analīzi.

Darba eksperimentālā daļa izstrādāta Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā „BIOR” no 2016. gada novembra līdz 2018. gada janvārim. Darbs izstrādāts, turpinot iepriekšējo pētījumu, kas veikts 2016. gadā.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. *Legionella pneumophila* raksturojums

### 1.1.1. Bioloģija un taksonomija

*Legionella pneumophila* ir saldūdens ūdenskrātuvēs sastopama, gramnegatīva, obligāti aeroba, nosacīti patogēna, kustīga baktērija (Khodr et al. 2016; Gong et al. 2017). Tai ir nūjiņveida forma, kuras aptuvenie izmēri ir 0,3 – 0,9 μm diametrā un 2 – 20 μm garumā (Diederer 2008). *L. pneumophila* ir nesporulējoša, ar vienu vai vairākām flagellām, kuru izpaušme ir atkarīga no baktērijas uzturēšanās temperatūras (Hornei et al. 2007).

*L. pneumophila* augšanas un vairošanās ātrums ir atkarīgs no vairākiem ķīmiskiem un fizikāliem faktoriem, kā temperatūra, ūdens pH, izšķīdušo un suspendēto savienojumu koncentrācijas ūdenī, kā arī no bioloģiskiem faktoriem, kā piemēram, *Eubacteria*, *Cyanophyta* vai *Protista* klātbūtnes un to dažādības (Zbikowska et al. 2014). Tā ir samērā rezistenta baktērija, kas spēj uzturēt savu dzīvotspēju sākot no 0°C līdz 60°C temperatūrai, bet aptuveni divu minūšu laikā 58 – 60°C temperatūrā tā aiziet bojā (Hornei et al. 2007; Dilger et al. 2016). *L. pneumophila* optimālā augšanas temperatūra ir 25 – 42°C, jo īpaši stāvošā, ar organiskajām vielām bagātā ūdenī (Diederer 2008). Legionellas ir salīdzinoši prasīgas pēc barības vielām, augšanai nepieciešama sēru saturošā aminoskābe *L*-cisteīns, kā arī dzelzs sāļi (Brenner et al. 2005; Khodr et al. 2016). Optimālais augšanas pH ir 6 – 8, bet ir konstatēta un izolēta no vides avotiem, kuros pH 2,7 līdz 8,3 (Hornei et al. 2007; Subbaram et al. 2017).

*Legionella* ir fakultatīvi intracelulāra baktērija, kas parazitē viensūņos, īpaši amēbās (Zbikowska et al. 2014). Fagocitozes ceļā nonākot šūnā un veidojot vakuolu, tās spēj dzīvot un vairoties gan brīvi dzīvojošo amēbu trofozoīta formā, gan arī, izstumjot specifisko vakuolu, ārpus amēbas organisma (Zbikowska et al. 2014; Mengue et al. 2017). *L. pneumophila* ir viena no tām baktērijām, kas veido biofilmas kā efektīvu aizsardzības mehānismu izdzīvošanai nelabvēlīgos vides apstākļos (Declerck 2010).

*Legionella pneumophila* pieder pie *Gammaproteobacteria* klases, *Legionellales* rindas, *Legionellaceae* dzimtas, kas sastāv no vienas ģints *Legionella* (Brenner et al. 2005). Savukārt, pamatojoties uz DNS/DNS hibridizācijas datiem, *Legionellaceae* dzimta tiek iedalīta trīs ģintīs – *Legionella*, *Fluoribacter* un *Tatlockia* (Garrity et al. 1980 cit. pēc Khodr et al. 2016). *Legionella* ģints sastāv vairāk nekā no 60 sugām, no kurām aptuveni 20 tiek uzskatītas par patogēnām, pārsvarā izolētām no vides avotiem vai inficētiem pacientiem (Ditomasso et al. 2014; Khodr et al. 2016). *Legionella* ģintī esošajās sugās vai pasugās izšķir vairāk nekā 70 atšķirīgas serogrupas, balstoties uz dažādām genotipiskām pazīmēm (Diederer 2008; Gomez-

Valero et al. 2009). Vienas un tās pašas serogrupas celmi var būt ģenētiski atšķirīgi, savukārt dažādu serogrupu celmi var būt ģenētiski cieši saistīti (Brenner et al. 2005). *L. pneumophila* ir suga ar augstu ģenētiskā polimorfisma līmeni, t.i. tām ir liels variāciju skaits DNS molekulā, divas vai vairākas alēles var atrasties vienā lokusā (Aurell et al. 2005; Qin et al. 2013).

*L. pneumophila* suga tiek iedalīta 16 serogrupās, no kurām visbiežāk Leģionāru slimības uzliesmojumus izraisa tieši *L. pneumophila* serogrupa 1 (Lp1) (Khodr et al. 2016). Arī tādas *Legionella* ģints sugas kā *L. longbeachae*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. macaechernii* un *L. sainthelensi* spēj ierosināt dažāda veida saslimšanas, kas biežāk saistāmas ar nozokomiālām infekcijām (Mentasti et al. 2014; ECDC 2016). Kompostos un mitrā, bagātīgā augsnē mītošā *Legionella longbeachae* tiek uzskatīta par vēl vienu Leģionāru slimības ierosinātāju (Amodeo et al. 2010; Graham et al. 2011).

Pēc nukleīnskābju bāzu guanīna-citozīna procentuālā satura DNS molekulā *L. pneumophila* sugā izšķir trīs apakšsugas – *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, *L. pneumophila* subsp. *pascullei* un *L. pneumophila* subsp. *fraseri* (Brenner et al. 2005). Pilna genoma secība ir noteikta *L. pneumophila* celmam Paris ar izmēru 3 503 bp, 3 077 gēni un celmam Lens – 3 345 bp, 2 932 gēni, kuri satur vienu cirkulāru hromosomu (Cazalet et al. 2004).

Salīdzinot ar citām gramnegatīvām baktērijām *L. pneumophila* piemīt specifisks šūnapvalks ar relatīvi plānu peptidoglikāna slāni, bet karstumizturīgiem un izteikti hidrofobiem lipopolisaharīdiem (Hornei et al. 2007; Gomez-Valero et al. 2009). Tiem ir īpatnēja struktūra – garas, sazarotas taukskābju ķēdes, O-specifiska ķēde un paaugstināts O-acetilgrupu un N-acetilgrupu līmenis (Diederer 2008; Shevcuk et al. 2011). Lipopolisaharīdu molekulas satur sugas vai serogrupas atbilstošas struktūras O antigēnu (Gomez-Valero et al. 2009). *L. pneumophila* šūnapvalka sastāvā ir virkne proteīnu ar dažādām virulences funkcijām kā piemēram, adhēziju un nokļūšanu saimniekorganisma šūnās (Brenner et al. 2005; Shevcuk et al. 2011). Šī baktērija spēj veidot ārējās membrānas vezikulas jeb pūslīšus, ko izmanto virulences faktoru transportēšanai ārējā vidē (Shevcuk et al. 2011).

*L. pneumophila* baktērija pirmo reizi konstatēta 1976. gada jūlijā pēc pirmā lielā pneimonijas uzliesmojuma Filadelfijas viesnīcā, kur vienā no dzesēšanas torņiem savairojies liels skaits baktēriju un prasījis aptuveni 30 cilvēku dzīvības (Fraser et al. 1977).

### **1.1.2. Izplatība vidē un izraisītās slimības**

*Legionella* ģints baktērijas ir sastopamas gan dabiskās, gan mākslīgi radītās antropogēnas izcelsmes ūdenskrātuvēs, biofilmās, kā arī zemūdens slānī un dūņās (Zbikowska et al. 2014). *Legionella pneumophila* mēdz būt tādos saldūdens biotopos kā ezeri, strauti, upes, dīķi, rūpnieciskie siltuma avoti, gruntsūdeņi un pazemes ūdeņi (Gaia et al. 2011; Zbikowska et al.

2014; Blanky et al. 2015; Subbaram et al. 2017). Tā var būt sastopama arī mitrā augsnē un dubļos, kas ir netālu no ūdenskrātuvēm, uz tropisko lietusmežu augu un ūdensaugu virsmām, kā arī jūras ūdenī (Surman-Lee et al. 2007; Blanky et al. 2015).

Nelielā koncentrācijā tās no dabiskām ūdenskrātuvēm var nokļūt ūdensapgādes sistēmās, kur pie labvēlīgiem augšanas apstākļiem masveidā savairojas un nonāk dzeramā ūdens aprītē (Borella et al. 2005; Zbikowska et al. 2014). Biežāk tās tiek konstatētas viesnīcu, kā arī slimnīcu un industriālo rūpnīcu dzesēšanas torņos, kas rada ūdens aerosolizāciju (Arslan-Aydogdu, Kimiran 2018). Slimību uzliesmojumi visbiežāk saistīti ar baktēriju savairošanos dušu klausulēs, tualetes ūdenī, gaisa mitrinātājos, dekoratīvajās strūklakās un miglošanas iekārtās, burbuļvannās, kondicionieros, dārza laistīšanas un gaisa attīrīšanas iekārtās, saunās un džakuzi (Bartram et al. 2007; Surman-Lee et al. 2007; Blanky et al. 2015).

Tas, vai baktēriju klātbūtne ūdensapgādes sistēmās izraisīs slimību uzliesmojumus, ir atkarīgs no *L. pneumophila* serogrupu dažādības, savairojušos baktēriju daudzuma, iedzīvotāju imunitātes īpatnībām un baktēriju virulences (Arslan-Aydogdu, Kimiran 2018). Viens no iemesliem, kāpēc saslimšanas biežāk ir saistāmas ar uzturēšanos viesnīcās, ir šo ēku izmēri un vecums, parasti tās ir lielas, bieži vien kultūrvēsturiskas būves ar plašu cauruļvadu tīklu, kurā ir mainīga, nekonzstanta temperatūra, tādējādi pastāv arī lielāks risks biofilmu izveidei (Borella et al. 2005). Viesnīcās mēdz būt sezonāls apmeklējums un atšķirīgs ūdens pieprasījums (Boer et al. 2006). Ilgstoši neapdzīvotu istabiņu krānos un dušu klausulēs notiek ūdens stagnācija, kas labvēlīgi ietekmē legionellu vairošanos (Boer et al. 2006).

Cilvēka organismā *L. pneumophila* nonāk caur elpceļiem, ieelpojot no inficēta vides avota sīkas ūdens vai augsnes daļiņas aerosolu veidā, jo sīkākas šīs aerosolu daļiņas, jo lielāks risks inficēties (Mentasti et al. 2014). Inficēšanās nevar notikt iedzerot kontaminētu ūdeni, un infekcija neizplatās no personas uz personu (Khodr et al. 2016). *L. pneumophila*, nonākot plaušās un savairojoties tajās esošajos makrofāgos, kas tiek uzskatīti par primārajām legionellu mērķšūnām, spēj izraisīt legionelozi ar divām variablām formām (Blanky et al. 2015). Smagākā ir pneimonija, ko dēvē arī par Leģionāru slimību, un vieglākā, ko sauc par Pontiakas drudzi (Diederer 2008).

Pneimonijas jeb plaušu karsoņa inkubācijas periods ir apmēram 2 līdz 10 dienas, tā ir slimība ar strauju sākumu, kuras biežāk konstatētie simptomi ir augsta temperatūra, elpošanas traucējumi un sāpes krūtīs, caureja, nieru un sirdsdarbības traucējumi, mialģija jeb muskuļu sāpes un diareja (Woodhead 2002; Bartram et al. 2007; Cunha 2010). Viens no ilgākajiem reģistrētajiem inkubācijas periodiem ir 19 dienas, bet aptuveni 16 % no saslimšanas gadījumiem tas ilgst 10 dienas (Boer et al. 2006). Simptomu izpausme un to pārklāšanās atkarīga no pacienta imunitātes, vecuma un dzimuma (Bartram et al. 2007). Potenciāli lielāks risks saslimt ar

Leģionāru slimību ir vīriešu dzimuma pārstāvjiem, smēķējošiem, gados vecākiem cilvēkiem vai hronisku plaušu slimību un diabēta pacientiem (Boer et al. 2006; Phin et al. 2014). Ja slimība netiek ārstēta, tā nedēļas laikā strauji progresē un var novest pie letāla iznākuma, ko parasti izraisa elpošanas mazspēja (Diederer 2008). Leģionāru slimību mēdz klasificēt pēc infekcijas rašanās vietas, izšķir tā saucamo sadzīvē iegūto pneimoniju, kad inficēšanās notiek plašā sabiedriskā vietā, hospitalizācijas laikā iegūto pneimoniju un ar ceļošanu saistīto pneimoniju (Beaute et al. 2013). *L. pneumophila* tiek atzīta par vienu no biežākajiem sadzīvē iegūtās pneimonijas (SIP) izraisītājiem, aptuveni 2 – 8 % no SIP gadījumiem sastāda tieši Leģionāru slimība (Bartlett 2008). Eiropā aptuveni 80 % no legionelozes saslimšanas gadījumiem ir sporādiski vai sadzīvē iegūtie (ECDC 2016). Hospitalizācijas laikā iegūto saslimšanas gadījumu iemesls galvenokārt ir kontaminēts ūdens dušās un mākslīgās elpināšanas sistēmās, bet ar ceļošanu saistīto saslimšanas gadījumu iemesls ir kontaminēts ūdens gaisa kondicionēšanas sistēmās un virpuļvannās (Khodr et al. 2016). Leģionāru saslimšanas gadījumi biežāk tiek konstatēti vasarā vai agrā rudenī, kad ir silti un mitri laikapstākļi, lielāks nokrišņu daudzums un augstāks relatīvais mitrums, kas nodrošina *L. pneumophila* sekmīgu izdzīvošanu un vairošanos (Cunha et al. 2010). Lielākā daļa (59 %) no Leģionāru slimības saslimšanas gadījumiem Eiropas Savienības valstīs reģistrēti laika posmā no jūnija līdz oktobrim (ECDC 2017).

Salīdzinoši vieglāka legionelozes forma ir Pontiakas drudzis, kura inkubācijas periods ir apmēram 24 līdz 48 stundas, ar samērā līdzīgiem simptomiem kā gripas saslimšanas gadījumā (Bartram et al. 2007; Khodr et al. 2016). Visbiežāk ir spēcīgas galvassāpes, vārgums, sauss klepus, sāpošs kakls un apgrūtināta elpošana, kas parasti izzūd pēc 2 līdz 5 dienām (Bartram et al. 2007; Diederer 2008). Pontiakas drudzis ir pašierobežojoša infekcija, bez pneimonijas un letalitātes, biežāk izteikta gados jaunākiem cilvēkiem (Phin et al. 2014).

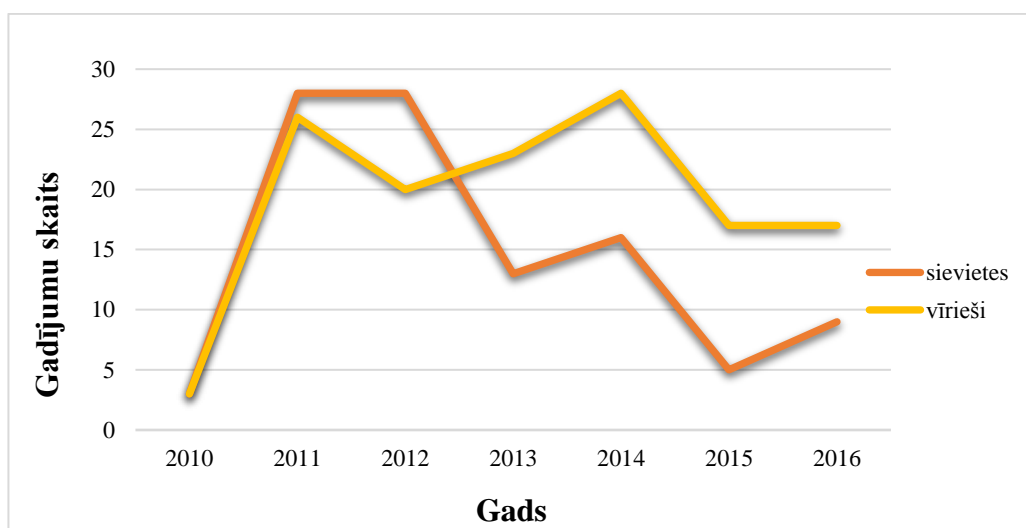
Legioneloze var pāriet dažāda tipa ekstrapulmonālās slimībās, kad *L. pneumophila* no elpošanas sistēmas nokļūst organismā un tiek konstatēta nierēs, miokardā, kaulu smadzenēs, aknās vai gremošanas traktā (Lowry, Tompkins 1993; Bartram et al. 2007). *L. pneumophila* var būt iesaistīta tādu dramatisku slimību ierosināšanā kā sinusīts, pankreatīts, peritonīts, celulīts, smadzeņu abscess, miokardīts, perikardīts un encefalomiēlīts (Bartram et al. 2007).

Legionelozes ārstēšanai nepieciešama atbilstoša diagnostika, savlaicīga un piemērota antibiotiku terapija. *L. pneumophila* ir jutīga pret rifampicīnu un eritromicīnu, bet tos var aizstāt ar spēcīgākām un mazāk toksiskām antibiotikām no makrolīdu grupas, piemēram, azitromicīnu, vai hinolonu grupas – ciprofloksacīnu, levofloksacīnu vai gemifloksacīnu (Bartram et al. 2007; Hornei et al. 2007).

### 1.1.3. Epidemioloģija Latvijā un citur Eiropā

Attīstoties tipēšanas un sekvenčēšanas tehnoloģijām, paveras plašāka iespēja veikt precīzu un ātru epidemioloģisko izmeklēšanu, kas sniedz izpratni par Leģionāru slimības izplatību, vēsturi, uzliesmojumiem, *L. pneumophila* virulenci un galvenajiem infekcijas avotiem (Phin et al. 2014). Lielākie pasaules Leģionāru slimības uzliesmojumi ir bijuši Spānijā Mursijas pilsētā ar 449, Lielbritānijā Barovas pilsētā ar 179 un Kanādā Kvebekas pilsētā ar 182 apstiprinātiem gadījumiem (Bosch et al. 2015). Biežākā Leģionāru slimības ierosinātāja ir *L. pneumophila* serogrupa 1 – pasaulē 84 %, Eiropā 81 % no visiem saslimšanas gadījumiem (ECDC 2016; Khodr et al. 2016).

Pēc Latvijas slimību profilakses un kontroles centra (SPKC) apkopotajiem datiem Latvijā no 2010. līdz 2016. gadam reģistrēti 236 Leģionāru slimības gadījumi, no kuriem 16 ir bijuši letāli. 1. attēlā redzams kopējais Leģionāru slimības gadījumu skaits vīriešiem un sievietēm laika periodā no 2010. gada līdz 2016. gadam.



1. attēls. Reģistrētie Leģionāru slimības gadījumi Latvijā laika posmā no 2010. gada līdz 2016. gadam (dati iegūti no SPKC pārskatiem par atsevišķām infekcijas un parazitārajām slimībām).

Figure 1. Registered cases of Legionnaires disease in Latvia in the period from 2010 to 2016 (data from SPKC reports of infectious and parasitic diseases).

Latvijas slimību profilakses un kontroles centra 2016. gada statistikas pārskatā par atsevišķām infekcijas un parazitārajām slimībām reģistrēti 26 Leģionāru slimības saslimšanas gadījumi – 17 vīrieši, no kuriem divi letāli iznākumi, un 9 sievietes. Slimību profilakses un kontroles centra epidemioloģijas biļetens Nr.40(1537) norāda, ka vidējais legionelozes gadījumu skaits Latvijā no 2012. līdz 2016. gadam ir 25 gadījumi. Lietuvā no 2011. gada līdz 2015. gadam reģistrēti 27 saslimšanas gadījumi, Igaunijā – 34 gadījumi (ECDC 2017).

Letālo gadījumu skaits Eiropā 2014. gadā sastādīja aptuveni 10 %, bet ASV – 8 % no visiem reģistrētajiem legionelozes saslimšanas gadījumiem, visaugstākais rādītājs (34 % no letālajiem gadījumiem) bija nozokomiāli iegūtajām infekcijām (ECDC 2016). Visvairāk 2015. gadā apstiprināto saslimšanas gadījumu reģistrēts Itālijā, Francijā, Spānijā un Vācijā, bet vismazāk – Bulgārijā, Polijā, Rumānijā un Slovēnijā (ECDC 2017). Kopējie statistikas dati par 2015. gadu veido sadalījumu, kurā 69 % no reģistrētajiem saslimšanas gadījumiem ir sadzīvē iegūtie, 21 % – ar ceļošanu saistītie, 8 % – hospitalizācijas laikā iegūtie un 2 % citi gadījumi (ECDC 2017). Eiropas Savienībā 2016. gadā ziņoti 7069 saslimšanas gadījumi (ECDC 2017).

Pēc Eiropas Slimību profilakses un kontroles centra (ECDC<sup>1</sup>) apkopotajiem datiem 2015. gadā reģistrēti 1414 ar ceļošanu un uzturēšanos viesnīcās saistīti (TALD<sup>2</sup>) leģionāru slimības gadījumi, kas ir aptuveni par 20 % vairāk nekā 2014. gadā. Lielbritānijā 2017. gada oktobrī reģistrēti 14 TALD gadījumi, Francijā – divi, Čehijā un Dānijā – viens (ECDC 2017). Itālijā jau 2002. gadā 20 % no saslimšanas gadījumiem sastādīja TALD gadījumi (Borella et al. 2005).

EWGLI<sup>3</sup> datubāzē 2016. gada martā reģistrēti 2156 dažādi *L. pneumophila* sekvenču tipi no 60 valstīm, kopumā sastādot 10792 ierakstus, bet 2018. gada aprīlī tie bija jau 12389 ieraksti, no kuriem 60 Latvijas valsts izolāti. Divi no šiem ierakstiem reģistrēti kā klīniskie, ar ceļošanu saistītie gadījumi, pārējie 58 ir ZI “BIOR” reģistrēti vides izolāti.

#### 1.1.4. Diagnostika, ierobežošana un kontrole

Pirmā metode, kas tika izmantota, lai noteiktu *Legionella* antigēnu klīniskajos paraugos, bija tiešā imūnfluorescence, izmantojot poliklonālos antiserumus, bet komerciāli pieejamā monoklonālā antivielā, vērsta pret specifisko *L. pneumophila* antigēnu, nodrošināja skaidrāku krāsojumu un mazāk krustenisko reakciju, tādēļ tās izmantošana ir efektīvāka (Brenner et al. 2005).

Visbiežāk izmantotās metodes *L. pneumophila* noteikšanai ir fluorescējošās metodes, urīna antigēna tests, kā arī asiņu testēšana (Bartram et al. 2007). Tiek izmantoti arī seroloģiskie testi, bet tie var būt nespecifiski un vairumā gadījumu nav ieteicami (Murdoch 2003). Diagnostikai tiek izmantota arī parastā kultivēšanas metode, kas tiek uzskatīta par mazāk uzticamu, izmantojot no pacienta plaušu audiem, plaušu noskalojumiem, pleiras šķidrums, bronhu alveolārā lavāžas šķidrums vai krēpām pagatavotu suspensiju un uzsējot to uz atbilstošas barotnes (Murdoch 2003; Brenner et al. 2005). Efektīvākais diagnostikas veids

<sup>1</sup> European Centre for Disease Prevention and Control

<sup>2</sup> Travel-associated Legionnaires disease

<sup>3</sup> European Working Group for Legionella Infections

iekļauj vienlaikus vismaz divu metožu analīžu rezultātus, piemēram, gan krēpu kultivēšanu, gan urīna antigēna testu (Murdoch 2003).

Legionellu ierobežošanas un kontroles pasākumu pamatā ir novērst baktēriju iekļūšanu un savairošanas ūdensapgādes sistēmā, kā arī identificēt un likvidēt izplatības riska avotu (Bartram et al. 2007; Messonnier, Breysse 2017). Svarīgi ir nodrošināt regulāru monitoringu, kas iekļauj ne tikai *L. pneumophila*, bet arī citu baktēriju, viensūņu, organisko barības vielu un temperatūras kontroli ūdensapgādes sistēmā (Bartram et al. 2007). Ūdens temperatūras fluktuācija, ūdens spiediena izmaiņas, ūdens stagnācija, nogulšņu izveide, kā arī biofilmas ir galvenie faktori, kas veicina legionellu vairošanos (Messonnier, Breysse 2017).

Pasaules Veselības organizācija, kā arī Eiropas Slimību profilakses un kontroles centrs ir izveidojis ūdens apsaimniekošanas programmu, ūdens drošības un riska pārvaldības plānu legionellu samazināšanai. Tas ietver sevī kontroles pasākumu kopumu, sākot ar ūdensapgādes sistēmas detalizētu analīzi, shēmas izpēti un apsekošanu, kā arī apdraudējumu novērtēšanu un monitoringu (Messonnier, Breysse 2017). Šī kontroles plāna izstrādes un īstenošanas pamatā ir speciālistu komandas izveide, iekļaujot ēkas īpašnieku un apsaimniekotāju, ūdens apstrādes speciālistus, rūpnieciskos higiēnistus, mikrobiologus un valsts vides speciālistus (Bartram et al. 2007; Messonnier, Breysse 2017).

Eiropas leģionāru slimības uzraudzības tīklā (ELDSNet<sup>4</sup>) izstrādāts un ievietots 14 punktu plāns viesnīcu īpašniekiem, lai mazinātu *Legionella* izraisīto saslimšanu risku. Vieni no svarīgākajiem šī plāna punktiem ir nodrošināt visos numuriņos ūdens notecināšanu no dušu klausulēm un krāniem vismaz reizi nedēļā, neskatoties uz numuriņu izmantošanas biežumu, kā arī izveidot regulāras tīrīšanas un dezinfekcijas grafikus dzesēšanas torņiem un saistītajām ūdens caurulēm, karstā ūdens tvertnēm, ūdens filtriem, gaisa kondicionēšanas sistēmām un ūdens sildītājiem, kalorifieriem (ELDSNet 2017).

Ūdens sistēmas dezinfekcijai cīņā pret *L. pneumophila* tiek izmantots nātrijs hipohlorīds, monohloramīns, hlora dioksīds, ūdeņraža peroksīds, vara un sudraba jonizācija, ultravioletais starojums, kā arī termālā dezinfekcija, kurā vismaz stundu ūdensapgādes sistēmā tiek nodrošināta aptuveni 55 – 60°C temperatūras uzturēšana (Bartram et al. 2007).

Būtiski profilakses pasākumi ir ūdens cauruļu kontrole, temperatūras monitorings, ūdens apstrāde, tīrīšana un dezinfekcija, kas samazina mikroorganismu savairošanās risku un nostiprināšanās iespēju, tādējādi novēršot arī biofilmu uzkrāšanos ūdens sadales tīklos (Bartram et al. 2007). Svarīgs *L. pneumophila* ierobežošanas pasākums ir noteikt biofilmu izveides iemeslu, likvidēt un novērst to izveidi. Viens no faktoriem, kas var ietekmēt biofilmu

---

<sup>4</sup> European Legionnaires' Disease Surveillance Network

veidošanos, ir ūdensapgādes sistēmas santehnikas un būvniecības materiāli iekšējā ūdensvada ierīkošanai (Lediņš 2007). Būtiska nozīme ir arī iekšējā ūdensvada tīkla veidam, posmu garumiem, savienojuma vietu un pievades, izvades vietu materiāliem, kas var veicināt mikroorganismu kolonizāciju un biofilmu veidošanos (Lediņš 2007). Patogēno baktēriju iekļūšanu ūdensapgādes sistēmā samazina ūdens apstrāde, pirms tas tiek padots tīklā patērētāju vajadzībām, kā piemēram, dezinfekcija, nostādināšana, filtrēšana un dzidrināšana (Lediņš 2007). Efektīvs veids, kā mikroorganismiem samazināt uzturēšanās un augšanas iespēju ūdens sistēmas caurulēs, ir regulāra ūdens notecināšana (Bartram et al. 2007).

Viens no galvenajiem vides faktoriem, kas veicina legionellu savairošanos, ir temperatūra, tādēļ ūdensapgādes sistēmā tai jābūt diapazonā, kas nav labvēlīgs šīs baktērijas dzīvotspējai. Saskaņā ar Ministru kabineta noteikumiem Latvijas Republikā ūdensapgādes sistēmā aukstā ūdens temperatūrai sadales tīklos jābūt zemākai par 20°C un karstā ūdens temperatūrai ne zemākai par 55°C (MK noteikumi Nr.332, 2015).

*L. pneumophila* ierobežošanai un savairošanās iespējas novēršanai svarīgi ir noteikt arī tās virulenci un patogenitāti, kas nodrošina labāku izpratni par baktērijas izdzīvošanu dabā, fagolizosomu veidošanās mehānismiem un iekļūšanu saimniekorganismā (Arslan-Aydogdu, Kimiran 2018).

## **1.2. Mikrobioloģiskās identifikācijas un tipēšanas metodes**

Mikrobioloģijā sistemātika un taksonomija balstās uz mikroorganismu raksturošanu, klasificēšanu un nomenklatūru, turklāt sistemātika ir pamata bāze identifikācijai, kas ir noteikšana līdz ģintij vai sugai, balstoties uz kopīgām īpašībām (Welker, Moore 2011). Mikroorganismu identificēšanai tiek izmantotas mikrobioloģiskās, imunoloģiskās vai ģenētiskās (molekulārās bioloģijas) analīzes.

Tipēšanas metodes nodrošina vienas mikroorganisma sugas dažādu izolātu raksturošanu, balstoties uz to atšķirīgām morfoloģiskām un ģenētiskām īpašībām, ķīmisko vielu un/vai metabolisma galaproduktu producēšanu (Welker, Moore 2011; Khodr et al. 2016). Tipēšanas būtiskākā priekšrocība ir datu iegūšana, ko izmanto globālu epidemioloģisku pētījumu veikšanā (Sabat et al. 2013; Khodr et al. 2016).

### **1.2.1. Kultivēšanas metodes**

Mikroorganismu kultivēšanai un noteikšanai līdz sugai tiek izmantotas piecas pamatnostādnes – inokulēšana, inkubēšana, izolēšana, kontrole un identifikācija (Madigan, Martinko 2006). Lai kultivētu mikroorganismus, tie jāizolē no dabiskās vides un jāiegūst

atsevišķas sugas tīrkultūra, kas prasa zināšanas par katrai baktērijai nepieciešamajām barības vielām, labvēlīgiem augšanas apstākļiem, inkubācijas temperatūru, skābekļa vai CO<sub>2</sub> nepieciešamību (Madigan, Martinko 2006). Klīniskajā mikrobioloģijā biežāk pielietotās kultivēšanas metodes ir apliešanas metode, smērēšanas metode, perpendikulāro svītru metode un membrānu filtrēšanas metode (Koster et al. 2003; Sanders 2012). Katrai kultivēšanas metodei ir savs noteikšanas diapazons atkarībā no parauga tilpuma, kur zemākā noteikšanas robeža ir atkarīga no maksimālā parauga tilpuma, bet augstāko noteikšanas robežu var izvēlēties atkarībā no analizējamā parauga atšķaidījuma koncentrācijas (Koster et al. 2003).

Identificējot mikroorganismus ar klasiskām metodēm, svarīga nozīme ir barotņu sagatavošanai un piemeklēšanai, to sastāva, funkcionālā tipa un pielietojuma mērķa, kā arī inkubācijas apstākļu noteikšanai (Koster et al. 2003; Gaia et al. 2011). Mikroorganismu kultivēšanā tiek izmantotas šķidrās, pusšķidrās un cietās agarizētās barotnes ar specifiskiem augšanas faktoriem to sastāvā, kas veicina mikroorganismu metabolismu un koloniju sekmīgu attīstību (Madigan, Martinko 2006).

Baktēriju noteikšanai un identificēšanai tiek pielietoti dažādi bioķīmisko procesu testi, kā piemēram, katalāze, koagulāze, indol-tests, oksidāze, β-galaktozidāze, ureāze, citrāta utilizācija, cietes hidrolīze un oksidācijas-fermentācijas (O/F) tests (Madigan, Martinko 2006). Koliformu un *E.coli* noteikšanai ūdenī plaši tiek pielietoti dažādi ātrie *Colilert* testi, kas ir noteikta substrāta metode jeb enzīmu bāzes metode (Koster et al. 2003). Ātra, precīza un ērta metode gan raugu, gan grampozitīvo un gramnegatīvo baktēriju identifikācijai ir *API* jeb analītiskā profila indeksa tests (ražotājs BioMérieux). Tā darbības pamatā ir specializētu strēmeļu komplekts ar vairāk nekā 20 bioķīmiskiem testiem, kuros tiek noteikta enzīmātiskā aktivitāte, parasti saistīta ar mikroorganisma ogļhidrātu fermentāciju vai olbaltumvielu un aminoskābju katabolismu (Setiani et al. 2015). Identifikācija līdz sugai notiek izmantojot rezultātā iegūto profila numuru un *API* tīmekļa plašo datubāzi (Setiani et al. 2015).

Arī *L. pneumophila* kontrolei tiek izmantotas parastās kultivēšanas metodes, izolējot to gan no klīniskiem, gan vides avotiem. Identificēt un analizēt *Legionella* ģints sugas, izmantojot klasiskās mikrobioloģiskās metodes, kā piemēram, Grama krāsošanas metodi, ir gandrīz neiespējami un sarežģīti, jo tās slikti iekrāsojas un ir grūti nosakāmas (Hornei et al. 2007; Gaia et al. 2011). Precīzai *L. pneumophila* identifikācijai tiek izmantotas poliklonālās vai monoklonālās antivielas (LVS ISO 11731:1998). Salīdzinoši ātrai *Legionella* serogrupas noteikšanai un apstiprināšanai tiek izmantoti klasiskās mikrobioloģijas lateksa aglutinācijas testi, kas sastāv no neitrāla sintētiskā materiāla – lateksa daļiņām, pārklātām ar attīrītām antivielām vērstām pret konkrētās serogrupas *L. pneumophila* virsmas O antigēniem (Hornei et al. 2007). Notiekot lateksa daļiņu aglutinācijai jeb reakcijai starp antivielām un piesaistītajiem

antigēniem, parādās ar neapbruņotu aci redzamu strukturālu daļiņu izveide un salipšana (Madigan, Martinko 2006). Sākotnēji *L. pneumophila* identifikācijai pārsvarā tika izmantotas fenotipiskās metodes, ar kuru palīdzību tika identificētas tikai 9 serogrupas (Helbig et al. 2002). Šobrīd *L. pneumophila* sugai izšķir 16 serogrupas (Khodr et al. 2016).

*L. pneumophila* noteikšana ūdenī un uzskaitē tiek veikta saskaņā ar Starptautiskās Standartizācijas organizācijas ISO standartu LVS ISO 11731:1998, kopš 2017. gada spēkā stājies atjaunots ISO standarts LVS EN ISO 11731:2017. Tas paredz veikt ūdens paraugu mikrobioloģisko testēšanu, izmantojot membrānu filtrēšanas metodi. Saskaņā ar standartu tiek veikta koncentrēta parauga sagatavošana, termiskā un skābes apstrāde, kā arī uzsēšana uz selektīvas agara barotnes. Kultivēšanai tiek izmantota specializēta BCYE jeb bufera-ogles-rauga-ekstrakta agara barotne ar cisteīnu un bez cisteīna, kā arī selektīva *Legionella* GVPC barotne, kas ir papildināta ar antibiotikām – vankomicīnu, polimiksīnu un cikloheksimīdu (LVS ISO 11731:1998). *L. pneumophila* ir salīdzinoši prasīga pēc barības vielām, tādēļ sekmīgai tās augšanai ir nepieciešams *L*-cisteīns un dzelzs sāļi, kas ir iekļauti BCYE barotnes sastāvā (Khodr et al. 2016). Inkubēšana notiek  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  temperatūrā līdz pat 14 dienām (LVS ISO 11731:1998). Tipiskām *L. pneumophila* kolonijām ir izteikti apaļa forma, pelēkbalta krāsa ar purpurkrāsas vai rozā krāsas matētu mirdzumu (LVS ISO 11731:1998).

Tipiskā identifikācija klīniskajā mikrobioloģijā, izmantojot klasiskās, uz fenotipiskām pazīmēm balstītās metodes, ir laikietilpīgs, ne vienmēr precīzs, samērā dārgs un sarežģīts process (Murdoch 2003; Gaia et al. 2011). Turklāt tās ir efektīvas salīdzinoši nelielai daļai dzīvotspējīgo baktēriju (Koster et al. 2003). Kultivēšanas metodes lielākoties balstītas uz koloniju fenotipisko īpašību raksturošanu, nenovērtējot mikroorganismus genoma līmenī (Madigan, Martinko 2006). Epidemioloģiskās analīzes veikšanai nepietiek tikai ar mikroorganismu identificēšanu līdz ģintij vai sugai, tādēļ nepieciešama to tipēšana un raksturošana ģenētiskā līmenī, izmantojot sarežģītas molekulārās bioloģijas metodes (Khodr et al. 2016).

### 1.2.2. Ģenētiskās metodes

Strauju attīstību molekulārās identifikācijas metodēm ir veicinājusi polimerāzes ķēdes reakcija (PCR), kur galvenais uzdevums ir pavairot interesējošo DNS, iegūstot vairākas kopijas sarežģīta un gara procesa rezultātā, polimerāzes, praimeru un katalizatoru klātbūtnē (Sibley et al. 2012; Ditommaso et al. 2014). Atšķirībā no klasisko metožu fenotipiskās raksturošanas, kas var būt mājīga un nestabila, molekulārajai amplifikācijai ir priekšrocības, jo tiek izmantotas stabilas īpašības ģenētiskā līmenī (Sibley et al. 2012).

*L. pneumophila* tipēšanai plaši tiek pielietotas uz PCR balstītas tehnikas, piemēram, amplificēto fragmentu garuma polimorfisms (AFLP<sup>5</sup>), kas ir viena no standartizētajām metodēm Eiropas Klīniskās mikrobioloģijas un infekcijas slimību biedrības (ESCMID<sup>6</sup>) *Legionella* izraisīto infekciju izpētes grupā (Sabat et al. 2013; Mentasti et al. 2014; Khodr et al. 2016). AFLP priekšrocība ir reproducējamība un automatizācija, bet kā trūkums ir tas, ka metode ir salīdzinoši darbietilpīga un dārga (Sabat et al. 2013). Viena no pirmajām *L. pneumophila* tipēšanas un ģenētiskās identitātes pierādīšanas metodēm bija restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma tehnika (RFLP<sup>7</sup>), kuras pamatā ir DNS šķelšana ar restriktāzēm (Harrison et al. 2007). Par molekulāro tipēšanas metožu "zelta standartu" tiek uzskatīta pulsējošā lauka gēla elektroforēze (PFGE<sup>8</sup>), ar kuras palīdzību iespējams identificēt arī *L. pneumophila* klonus (Aurell et al. 2005). Tā ir salīdzinoši lēta un viegli atkārtojama dažādu klīniski nozīmīgu baktēriju tipēšanas metode ar augstu diskriminējošo līmeni jeb uzticības pakāpi, kā arī epidemioloģisko atbilstību (Aurell et al. 2005; Sabat et al. 2013).

Tieši molekulārā bioloģija ir nodrošinājusi iespēju paātrināt slimību diagnozes uzstādīšanu, kas ļauj pieņemt būtiskus lēmumus medicīnā un cilvēka ārstēšanas procesos (Welker, Moore 2011). Leģionāru slimības molekulārā epidemioloģija, diagnostika, uzraudzība un novēršana pēdējo gadu laikā īpaši aktuāla kļuvusi Eiropas Savienības valstīs un tādās attīstītās valstīs kā ASV, Kanāda, Jaunzēlande, Austrālija un Singapūra (Phin et al. 2014). Citās pasaules valstīs informācijas trūkuma un nepietiekamības dēļ šī slimība netiek pilnībā atzīta, tās ierobežošanai, kontrolei, kā arī epidemioloģiskajai situācijai netiek pievērsta nozīme (Phin et al. 2014).

Lai veiktu globālus epidemioloģiskus pētījumus, efektīva metode ir multilokusu sekvenču tipēšana (MLST<sup>9</sup>), kas nosaka ģenētisko saistību starp izolātiem, izmantojot DNS sekvencēšanu vairāku gēnu raksturošanai (Sabat et al. 2013). Baktēriju izolātu ģenētisko atšķirību noteikšanai tiek pielietota arī viena lokusa sekvenču tipēšana (SLST<sup>10</sup>), kurā tiek salīdzinātas sekvenču variācijas vienā mērķa gēnā (Sabat et al. 2013). Mērķa lokuss tiek identificēts, izmantojot genoma ieguves pieeju, atsaucoties uz sugas populācijas ģenētisko struktūru (Scholz et al. 2014).

Jauna un perspektīva *L. pneumophila* tipēšanas metode ir pilna genoma sekvencēšana (WGS<sup>11</sup>), ar kuras palīdzību ir iespējams noteikt izolātu molekulāro dažādību, kā arī diferencēt

---

<sup>5</sup> Amplified fragment length polymorphism

<sup>6</sup> European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

<sup>7</sup> Restriction fragment length polymorphism

<sup>8</sup> Pulsed-field gel electrophoresis

<sup>9</sup> Multilocus sequence typing

<sup>10</sup> Single Locus Sequence Typing

<sup>11</sup> Whole genome sequencing

epidemioloģiski saistītus un nesaistītus izolātus (Bosch et al. 2015). Pētījumi liecina, ka pilna genoma sekvencēšana ir reproducējama metode, ar kuras palīdzību ir apstiprināti divi nozīmīgi legionelozes uzliesmojumi Nīderlandē (Bosch et al. 2015). Metode ar augstu diskriminējošo līmeni *L. pneumophila* tipēšanai ir arī nākamās paaudzes sekvencēšana (NGS<sup>12</sup>), tomēr tā ir dārga un laikietilpīga, lai to izmantotu rutīnas testēšanā (Bosch et al. 2015). Pateicoties NGS augstajai precizitātei un izšķirtspējas potenciālam, šī metode var tikt izmantota slimību uzliesmojumu izmeklēšanā, kā arī vienas sugas izolātu ģenētisko saistību noteikšanā un analizēšanā (Sabat et al. 2013).

Kopš 2007. gada par visefektīvāko un plašāk izmantoto metodi *L. pneumophila* molekulārajai subtipēšanai un epidemioloģiskās analīzes veikšanai tiek uzskatīta uz DNS sekvenci bāzētā tipēšana jeb SBT<sup>13</sup> metode, kura kļuvusi par "zelta standartu" starp tipēšanas metodēm (Bosch et al. 2015; Sanchez-Buso et al. 2015). SBT ir apstiprināta internacionāla molekulārās bioloģijas metode, attīstīta Eiropas Klīniskās mikrobioloģijas un infekcijas slimību biedrības *Legionella* izraisīto infekciju izpētes grupā (Mentasti et al. 2014). *L. pneumophila* subtipēšana tiek izmantota epidemioloģiski saistītu slimības gadījumu identificēšanai un infekcijas avota noteikšanai, sekmējot preventīvu kontroles un ierobežošanas pasākumu īstenošanu (Khodr et al. 2016).

SBT ļauj veikt epidemioloģisko tipēšanu klīniskajiem un vides *L. pneumophila* izolātiem, izmeklēt un izsekot konkrēta izolāta globālo izplatīšanos un noskaidrot legionelozes uzliesmojumus dažādās pasaules valstīs, īpaši ar ceļošanu saistītos gadījumus (Gaia et al. 2005; Ditommaso et al. 2014; Mentasti et al. 2014). Tā ir salīdzinoši ātra un reproducējama septiņu gēnu molekulārā tipēšanas metode ar augstu diskriminējošo pakāpi (Bosch et al. 2015). Uz DNS sekvenci bāzētā tipēšana nodrošina nukleotīdu sekvenču iegūšanu, kuras iespējams izmantot ģenētiskās daudzveidības un populācijas struktūras analīzei (Sanchez-Buso et al. 2015).

Metodes sākotnējais posms ir DNS ekstrakcija no svaigas, tīras *L. pneumophila* kultūras kolonijām. SBT pamatā ir polimerāzes ķēdes reakcija, nukleīnskābju amplifikācija ar atkārtotiem DNS sintēzes cikliem, sekvencēšanas reakcija un sekvenču analīze (Sibley et al. 2012). Eiropas leģionāru slimības uzraudzības tīklā ir izveidots SBT protokols *L. pneumophila* epidemioloģiskajai tipēšanai, kurā definēts, ka DNS secības noteikšana notiek balstoties uz priekšu ejošiem (*forward*) un atpakaļgaitā ejošiem (*reverse*) praimeriem, marķējamiem ar septiņiem specifiskiem gēnu lokusiem (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* un *neuA*) (Ditommaso et al. 2014).

---

<sup>12</sup> Next generation sequencing

<sup>13</sup> Sequence-Based Typing

Visi šie gēni tiek ekspresēti *L. pneumophila* baktērijā, tie nepieciešami dzīvības uzturēšanai un ir iesaistīti dažādu funkciju veikšanā (Aurell et al. 2005; Gaia et al. 2005). Atšķirībā no MLST metodes, kurā izmantotie gēni ir “housekeeping” jeb neselektīvie gēni, SBT metodē pielietotās mērķa sekvenču ir daļa no daudzveidīgiem gēniem (Gaia et al. 2005). *FlaA* gēns iesaistīts flagelīna ekspresijā, *pilE* kodē IV tipa pilīnu, *asd* ir “housekeeping” gēns, kurš kodē *L. pneumophila* aspartāta β-semialdehīddehidrogenāzi, *proA* kodē cinka atkarīgo metaloproteināzi A (Aurell et al. 2005; Gaia et al. 2005). Divi ir virulences faktoru gēni – virsmas proteīnu gēns *mip*, kurš ir makrofāgu infekciozitātes potenciators, un *mompS*, kurš ir galvenais ārējās membrānas proteīna gēns (Aurell et al. 2005; Gaia et al. 2005). Dažiem izolātiem N-acilneiramināta citidiltransferāzes (viens no lipopolisaharīdu biosintēzē iesaistītiem enzīmiem) kodējošais *neuA* gēns neamplificējas, tādēļ tas tiek aizstāts ar 68 % homologu variantu *neuAh*, kurš sastopams salīdzinoši reti, tikai dažos *L. pneumophila* celmos, dažādās serogrupās, izņemot serogrupu 1 (Mentasti et al. 2014). Sākotnējie pētījumi, kuros tiek kombinēti tikai trīs no iepriekšminētajiem gēniem – *flaA*, *proA* un *mompS*, *L. pneumophila* serogrupas 1 tipēšana notiek salīdzinoši neefektīvi, taču, papildinot gēnu kombināciju ar *asd*, *pilE* un *mip*, epidemioloģiskās tipēšanas shēma uzlabojusies (Gaia et al. 2005). Par to pārliecinoties, oficiāli tika aprakstīta uz DNS sekvenču bāzētās tipēšanas metode un izveidota datubāze, kas ļauj efektīvi veikt epidemioloģisko tipēšanu gan klīniskajiem, gan vides *L. pneumophila* izolātiem (Gaia et al. 2005).

DNS secības noteikšana notiek ģenētiskajā analizatorā jeb sekvenatorā. Tajā iegūtās sekvenču tiek apgrieztas un salīdzinātas ar katram gēnam SBT-EWGLI tiešsaistes datubāzē pieejamo referenču sekvenču. Ievietojot datubāzē iegūtās sekvenču, iespējams iegūt alēlisko profilu, kurš sastāv no septiņiem alēļu numuriem (Gaia et al. 2005). Alēlisko profilu izmanto sekvenču tipa (ST) noteikšanai, kas ir vispārpieņemts *L. pneumophila* klīniskā vai vides izolāta numurs (Mentasti et al. 2014). Darbojoties ar datubāzē pieejamo informāciju, analizējot sekvenču tipu daudzveidību un sadalījumu, iespējams efektīvi un ātri izprast vidē sastopamās patogēnās *L. pneumophila* baktērijas izplatību, kā arī slimību uzliesmojumu gadījumus un infekcijas rašanās cēloni (Sanchez-Buso et al. 2015).

Pirmo molekulāro metožu pamatā mikroorganismu tipēšanai izmantoja izdalītās DNS attīrītus fragmentus, kas laika gaitā un tehnoloģiju attīstības rezultātā noveda pie sarežģītu sekvenču metožu izstrādes un izmantošanas (Helbig et al. 2002; Gaia et al. 2011). Tradicionālās tipēšanas metodes balstās uz fenotipa raksturošanu, iekļaujot serotipus, biotipus vai fāga tipus, savukārt jaunākās metodes, iejaucoties molekulārā līmenī, spēj atrast atšķirības ne tikai starp tipiem, bet arī apakštipiem, kā arī pārbaudīt celmu ģenētisko saistību (Sabat et al. 2013).

### 1.2.3. MALDI-TOF MS metode

Rutīnas darbā mikroorganismu identifikācijai tiek pielietota MALDI-TOF MS metode jeb matricas veicinātā lāzera desorbcijas/jonizācijas nolidošanas laika masspektrometrija, kas salīdzinot ar sekvencēšanas metodēm, uz PCR balstītām tehnoloģijām un citām molekulārām metodēm ir daudz ātrāka un lētāka (Moliner et al. 2010).

MALDI-TOF MS ir metode, kuru apvienojot ar programmēšanu un datu analīzi, ātri un ērti ir iespējams identificēt dažādus mikroorganismus (Dilger et al. 2016). MALDI-TOF MS pamatā ir masspektrometrija, kas ir efektīva metode, lai atklātu un identificētu proteīnus pēc to svāra un lādiņa, tāpēc tā balstās uz masas – lādiņa proporciju ( $m/z$ ) (Gaia et al. 2011). Šī metode precīzi nosaka molekulāro masu peptīdiem un maziem proteīniem masas spektrā no 2000 līdz 20 000 daltoniem (Santos et al. 2015). Ar MALDI-TOF MS ir iespējams identificēt daudzu baktēriju, raugu un pelējumsēņu sugas, izmantojot iegūtos masas spektra pīķus, kuros novēro proteīnu spektrālo profilu (Moliner et al. 2010). Iegūtais spektrs spēj noteikt iespējamo baktēriju pēc rezultātiem, ko uzrāda pirolīzes produkti no fosfolipīdiem un hinoniem (Nomura 2015). Rezultāts tiek uzskatīts par korektu un pieņemamu varbūtību sugas līmenī, ja logaritmiskā vērtība  $\log(score)$  ir  $> 2.000$ , bet, ja  $< 2.000$ , tad ticamības koeficients samazinās un analīzi būtu vēlams veikt atkārtoti (Bruker 2014; Moliner et al. 2010).

Pīķu esamība vai neesamība konkrētajā masas spektrā, kā arī viena masas spektra atšķirības variē atkarībā no sugas vai ģints specifikas (Santos et al. 2015). MALDI-TOF MS ir uzticama metode *L. pneumophila* identifikācijai līdz sugai un pasugai, bet serogrupas ar to nav nosakāmas (Moliner et al. 2010).

Identifikācijas sākotnējais posms ir baktēriju kultūras nelielas šūnu daļas, apmēram  $10^4$  līdz  $10^5$  kolonijas veidojošo vienību, uztriepšana uz mērķa plates, uzreiz pārklājot to ar matriksa šķīdumu un atstājot istabas temperatūrā uz laiku, kamēr uztriepe izžūst un matrikss kristalizējas (Rodriguez-Sanchez et al. 2014). Matriksa šķīdums ietver sevī šķīdinātājus – ūdeni, etanolu, metanolu, acetonitrilu un trifluoretiķskābi, kā arī pulverveida matriksu, kurš tajos tiek izšķīdināts (Welker, Moore 2011). Izklūstot cauri mikroorganisma šūnas sienai, šķīdinātāji padara iekšējās proteīnus pieejamus analīzes veikšanai (Welker, Moore 2011). Matrikss tiek uzskatīts kā aģents, jonizējot proteīnus un pārveidojot tos vienkāršās molekulās ar augstu elektrisko lādiņu (Bruker 2014). Identifikācijas process sākas, ievietojot sagatavoto mērķa plati masspektrometrā, kā rezultātā parādās pīķi, attēlojot noteiktas molekulārās masas (Bruker 2014). Virs mērķa plates novietotais elektrods veido elektrisko lauku un proteīni caur to virzās uz masas noteicēju, kur tiek izmantoti UV lāzeri, fokusējoties uz atbilstošiem joniem (Bruker 2014). Tā kā proteīniem un peptīdiem ir atšķirīgas masas, tad joni nokļūst līdz noteicējam jeb

detektoram dažādos laikos, tāpēc šī masspektrometrijas metode ir nolidošanas laikā – „*time of flight*”.

Datu interpretācijai nepieciešama iegūto rezultātu salīdzināšana ar datubāzēm. Galvenās pieejamās datubāzes mikroorganismu identificēšanai ir MALDI Biotyper-*Bruker Daltonics* un *AnagnosTec* SARAMIS (Gaia et al. 2011; Santos et al. 2013). Datubāzes nodrošina identificētās sugas spektru, iespējams, arī tādu sugu spektru, kuras pašlaik nav pietiekami pārstāvētas (Gaia et al. 2011). Tomēr ir tādas sugas, kuru profili *Bruker Daltonics* datubāzē nav pieejami. Iespēja, ka no vides iegūtais izolāts pārstāvēs jaunu sugu, ir augsta, bet iespēja, ka tas būs identificējams un iekļauts kādā no masas spektru datubāzēm, salīdzinoši zema (Welker, Moore 2011). *Legionella* masspektrometrijas profilu ir salīdzinoši nedaudz, ar tikai vienu vai dažiem spektriem sugas vai pasugas līmenī (Moliner et al. 2010). *Bruker* datubāzē pieejami tādu sugu spektrālie profili kā *L. anisa*, *L. rubrilucens*, *L. parisiensis*, *L. brunensis*, *L. jordanis*, *L. longbeachae*, kā arī visu trīs *L. pneumophila* pasugu profili (Moliner et al. 2010).

Pētījumi liecina, ka MALDI-TOF MS identificēšanas rezultāti sakrīt ar kultivēšanas metožu un bioķīmisko testu rezultātiem, turklāt iegūstama arī vērtīga papildus informācija par dažādām baktēriju sugām. Relatīvā frakcija, identificējot *Legionella* spp. ar MALDI, ir tikai par 0,6 % zemāka nekā izmantojot bioķīmiskos testus (Dilger et al. 2018). Šobrīd MALDI-TOF MS ir ieviesta metode rutīnas darbā diagnostikas laboratorijās un atzīta kā vienkārša, ekonomiska un ātra identifikācijas metode ar augstu uzticamības pakāpi (Dilger et al. 2018).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Vielas, reaģenti un barotnes

Darbā izmantotās vielas, reaģenti un barotnes apkopotas 1. tabulā.

1. tabula

Darbā izmantotās vielas, reaģenti un barotnes.

Table 1

In study used solutions, reagents and agar media.

Nr.	Vielā	Nosaukums	Sērijas nr., tūpums/ daudzums	Derīguma termiņš	Ražotājvalsts, firma
1.	Fizioloģiskais šķīdums	Saline tablets	100 gab.	10.2019	Anglija, <i>Oxoid</i>
2.	BCYE barotne	<i>Legionella</i> BCYE Agar	10051 20 pl.	3 mēn.	Itālija, <i>Liofilchem</i>
3.	BCYE barotne bez cisteīna	<i>Legionella</i> BCYE Agar w/o cysteine	10412 20 pl.	3 mēn.	Itālija, <i>Liofilchem</i>
4.	GVPC barotne	<i>Legionella</i> Agar (GVPC)	10128 20 pl.	3 mēn.	Itālija, <i>Liofilchem</i>
5.	Lateksa aglutinācijas serumi 2, 3, 6, 9 serogrupai	<i>Legionella</i> Agglutination Latex reagents	PL215 2,7 ml	11.2019	Kanāda, <i>Pro-Lab Diagnostics</i>
6.	Lateksa aglutinācijas serums 1 serogrupai	<i>Legionella</i> Agglutination Latex reagents SG1	M271050 2,5 ml	10.2019	Itālija, <i>Biolife</i>
7.	Lateksa aglutinācijas serums 2 – 15 serogrupai	<i>Legionella</i> Agglutination Latex reaģents SG2-15	M271050 2,5 ml	10.2019	Itālija, <i>Biolife</i>
8.	Destilēts ūdens	Water, LC-MS CHROMASOLV	39253 500 ml	02.2018	Šveice, <i>Sigma-Aldrich</i>
9.	Acetonitrils	Acetonitrile	34967 250 ml	09.2019	Vācija, <i>Sigma-Aldrich</i>
10.	Skudrskābe	Formic acid	33015 500 ml	09.2019	Vācija, <i>Sigma-Aldrich</i>
11.	Liofilizēts matrikss	Matrix HCCA	8255344 2,5 mg	04.2019	Vācija, <i>Bruker</i>
12.	No nukleāzes brīvais ūdens	Nuclease-free water	E476 100 ml	11.2019	ASV, <i>Amresco</i>
13.	Etanols	Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	500 ml	-	Vācija, <i>VitLab</i>
14.	Formamīds	Hi-Di Formamide	4311320 25 ml	09.2019	ASV, <i>Applied Biosystems</i>
15.	BigDye 3.1 krāsviela	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	1706404 100 reakc.	01.2019	ASV, <i>Applied Biosystems</i>

1. tabulas turpinājums

Nr.	Vielā	Nosaukums	Sērijas nr., tilpums/ daudzums	Derīguma termiņš	Ražotājvalsts, firma
16.	Sekvencēšanas buferšķīdums	BigDye Terminator 5x Sequencing buffer	4305603 1 ml	11.2018	ASV, <i>Applied Biosystems</i>
17.	PCR HotStar Master Mix šķīdums	HotStarTaq Master Mix Kit	203446 25 µl	06.2018	Vācija, <i>Qiagen</i>
18.	25 mM MgCl <sub>2</sub>	Magnesium chloride	203443 9 µl	06.2018	Vācija, <i>Qiagen</i>
19.	F praimeris	Forward primers	K-7400 3 µl	09.2019	Koreja, <i>Bioneer</i>
20.	R praimeris	Reverse primers	K-7400 3 µl	09.2019	Koreja, <i>Bioneer</i>
21.	Molekulārais secības marķieris	OX Aligment marker	929524 1,5 ml	06.2019	Vācija, <i>Qiagen</i>
22.	Molekulārais izmēra/griešanas marķieris	OX Size marker	929561 50 µl	10.2019	Vācija, <i>Qiagen</i>
23.	Eksonukleāze	Exonuclease I	EN0581 1000 reakc.	03.2021	ASV, <i>Thermo Scientific</i>
24.	Sārmainā fosfatāze	Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkline Phosphatase	EF0651 1000 reakc.	03.2020	ASV, <i>Thermo Scientific</i>
25.	Nātrija acetāts	Sodium acetate	N202003 100 ml	01.2019	Zviedrija, <i>Sigma-Aldrich</i>

2.1.2. Iekārtas

Darbā izmantotās iekārtas apkopotas 2. tabulā.

2. tabula  
Darbā izmantotās iekārtas.  
Table 2  
In study used equipment.

Nr.	Iekārta	Modelis	Ražotājvalsts, firma	Nosakāmo parametru diapazons, precizitāte
1.	Lāzera termometrs	ET05 Digital Pocket	ASV, <i>Klein Tool</i>	- 40 līdz 250° C
2.	Vakuuma filtrēšanas sistēma	MilliporeSigma WP6122050	ASV, <i>Capitol Scientific</i>	230 V; 50 Hz; 1,7 A
3.	Termostats	BD240 04-71835	ASV, <i>Binder</i>	100°C; 200-230 V; 50/60 Hz; 3A; 0,68 kW
4.	MALDI-TOF masspektrometrs	Autoflex Speed LIN, S.Nr. 8264120.00575	Vācija, <i>Bruker</i>	96 paraugi

## 2. tabulas turpinājums

Nr.	Iekārta	Modelis	Ražotājvalsts, firma	Nosakāmo parametru diapazons, precizitāte
5.	Bioloģiskais drošības skapis	BH-EN 2003-S, Nr. 261	Itālija, <i>Faster</i>	220-230V; 50/60 Hz; 21260 RPM; 300 W
6.	Automātiskā 1-kanāla pipete	Single-channel Pipet ratiopetta	Vācija, <i>Ratiolab</i>	20-200 µl 100-1000 µl
7.	Automātiskā 1-kanāla pipete	Transferpette S	Vācija, <i>Brand</i>	0,1-2,5 µl
8.	Krafitājs	Vortex-Genie 2, 3010084	ASV, <i>Scientific Industries</i>	230 V; 45 W; 50 Hz; 1 A
9.	Centrifūga	Micro 22R, Nr. 0005281-07-00	Vācija, <i>Hettich</i>	24 lielās iedobes, 13000 rpm
10.	Termobloks – krafitājs	TS-100, Sēr. Nr. 430811004/08 0042	Latvija, <i>Biosan</i>	+25 līdz +100°C
11.	Minicentrifūga	Combi-Spin FVL-2400N	Latvija, <i>Biosan</i>	230 V; 50 Hz; 30 W; 250 mA; 6000 rpm
12.	Spektrofotometrs	NanoDrop, Sēr. Nr. C219	ASV, <i>NanoDrop Technologies</i>	220-750 nm ± 2% par. tilpums 1 µl
13.	Saldētava	Dr.Dairei, Nr. 1223002618	Japāna, <i>Dairei Co</i>	0°C līdz – 20°C
14.	Kapilārās elektroforēzes iekārta	QIAXcel Advaced, Sēr.Nr. 14016	Vācija, <i>Qiagen</i>	96 paraugi
15.	Laminārais skapis	HS-12, Nr. 400225767	Vācija, <i>Heraeus</i>	20 V; 50 Hz; 3,0 A; 0,75 kW
16.	Automātiskā 1-kanāla pipete	Eppendorf, Nr. 189841	Vācija, <i>Eppendorf</i>	2-20 µl
17.	Automātiskā 1-kanāla pipete	Biohit, Nr. 1462390	Vācija, <i>Sartorius</i>	0,5-10 µl
18.	Automātiskā 1-kanāla pipete	Finnpipette, Nr. EJ03593/4510	ASV, <i>Thermo Scientific</i>	100-1000 µl
19.	Amplifikators	ProFlex PCR System, Nr. 297802725	ASV, <i>Applied Biosystems</i>	+ 4 līdz + 99°C ± 1°C
20.	Amplifikators	PeQLab, GmbH	Vācija, <i>Peqlab</i>	+ 4 līdz + 99°C ± 1°C
21.	Automātiskā 8-kanālu pipete	Boeco, Nr. 9908100	Vācija, <i>Boeco</i>	5-100 µl
22.	Lielā centrifūga	5810 R	Vācija, <i>Eppendorf</i>	4x100 ml, 14 000 rpm, 230 V/ 50-60 Hz
23.	Ģenētiskais analizators	Genetic Analyzer 3500, Nr. 26118-060	ASV, <i>Applied Biosystems</i>	8 kapilāri

### 2.1.3. Laboratorijas palīgmateriāli

Darbā izmantotie laboratorijas palīgmateriāli apkopoti 3. tabulā.

3. tabula  
Darbā izmantotie laboratorijas palīgmateriāli.  
Table 3  
In study used laboratory consumables.

Nr.	Nosaukums	Ražotājs, firma	Tilpums/daudzums iepakojumā	Derīguma termiņš
1.	Ependorfa mēģenes	Vācija, <i>Sarstedt</i>	1,5 ml	10.2018
2.	Mikrobioloģiskās cilpiņas	Vācija, <i>Sarstedt</i>	1 µl; 10 µl	03.2019
3.	Transferpipete	Vācija, <i>Sarstedt</i>	5 ml	02.2018
4.	Vienreizlietojamie pipešu uzgaļi	Vācija, <i>Sarstedt</i>	2 – 200 µl; 100 – 200 µl; 10 µl	09.2020
5.	Aglutinācijas testu vienreizlietojamais papīrs	Kanāda, <i>Pro-Lab Diagnostics</i>	10 gab.	12.2020
6.	8 stripu PCR mēģenes	ASV, <i>Applied Biosystems</i>	8 mēģenes; 0,2 ml	08.2018
7.	Optiskā 96-iedobju plate	ASV, <i>Applied Biosystems</i>	20 gab.	05.2018
8.	Mini – 20°C dzesētājs	Vācija, <i>Eppendorf</i>	12 iedobes	-
9.	96 iedobju dzesēšanas plate	Vācija, <i>Eppendorf</i>	96 iedobes	-
10.	96 iedobju septa	ASV, <i>Applied Biosystems</i>	20 gab.	05.2018
11.	Optiskā līmplēve	ASV, <i>Applied Biosystems</i>	100 gab.	05.2018
12.	Plastmasas pudeles	Vācija, <i>Sarstedt</i>	1 L	-
13.	Polikarbonāta filtri	Francija, <i>Prat-Dumas</i>	100 gab.	02.2019
14.	Petri plates	Vācija, <i>Sarstedt</i>	20 gab.	09.2020
15.	Piltuves	Vācija, <i>Sarstedt</i>	20 gab.	-

#### 2.1.4. Datorprogrammas un datubāzes

Darbā izmantotās datorprogrammas un datubāzes apkopotas 4. tabulā.

4. tabula  
Darbā izmantotās datorprogrammas un datubāzes.  
Table 4  
In study used software and database.

<b>Nr.</b>	<b>Programmas nosaukums</b>	<b>Versija</b>	<b>Uzstādīšanas datums</b>
1.	Sequencing Analysis Software	Version 6	22.01.2015
2.	QIAxcel ScreenGel Software	1.4	19.10.2015
3.	NanoDrop ND-1000 Software	V.3.5.1	10.09.2007
4.	Molecular Evolutionary Genetics Analysis – MEGA	V.5.2	29.05.2013
5.	Bruker Daltonics MALDI Biotyper	3.0	27.05.2015
6.	Online eBurst Software	V.3	-
7.	Online PHYLOViZ Software	Web version	-
8.	BioNumerics Software	7.0	-
9.	EWGLI Sequence-Based Typing (SBT) Database	3.0	-

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. Viesnīcu izvēle un ūdens paraugu noņemšana

Pētījumam nejausi izlasē iekļautas tika 70 Latvijas viesnīcas (25 Rīgā un 45 ārpus Rīgas) tā, lai tās atrastos izkliedēti (gan Latvijas teritorijā, gan atsevišķi Rīgas pilsētas teritorijā) un pēc iespējas lielākā attālumā viena no otras. Viesnīcas ārpus Rīgas izvēlētas katra Latvijas novada lielākajās pilsētās. Katrai viesnīcai no ZI “BIOR” tika nosūtīta oficiāla vēstule ar aicinājumu piedalīties pētījumā, norādot, ka iegūtie dati tiks izmantoti tikai apkopotā veidā un glabāti konfidenciāli. Piedalīties piekrita 40 no 70 viesnīcām (5. tabula).

5. tabula  
Pētījumā iesaistīto viesnīcu skaits.  
Table 5  
Number of hotels involved in study.

Novads	Viesnīcu skaits				
	Izvēlētas	Piekrita	Nepiekrita		
			Bijis monitorings	Neinteresē	Nav atbildes
Latgale	12	7	-	2	3
Vidzeme	11	5	1	1	4
Zemgale	11	4	-	2	5
Kurzeme	11	6	3	1	1
Rīga	25	18	2	1	4
<b>Kopā</b>	<b>70</b>	<b>40</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>17</b>

Kopumā tika noņemti 240 karstā ūdens paraugi (1 parauga tilpums 1 L) laika periodā no 2016. gada novembra līdz 2017. gada maijam 15 dažādās Latvijas pilsētās (2. attēls).



2. attēls. Ūdens paraugu noņemšanas punkti.  
Figure 2. Water sampling points.

Katrā viesnīcā tika noņemti seši ūdens paraugi (ar izņēmuma gadījumu), 170 no krāna un 70 no dušas klausules (6. tabula). Katrā viesnīcā ūdens paraugi tika noņemti trīs istabiņās, no katras divi – viens pirms ūdens notecināšanas, otrs pēc trīs minūšu notecināšanas. Divās viesnīcās pēc apsaimniekotāja lūguma noņemts papildus paraugs, kopumā sastādot septiņus paraugus no vienas viesnīcas, bet vienā viesnīcā (viesu namā) noņemti četri ūdens paraugi, jo tajā bija pieejamas tikai divas istabiņas (6.tabula). Uzreiz pēc iepildīšanas pudelē visiem ūdens paraugiem nomērīta ūdens temperatūra un fiksēta protokolā.

6. tabula  
Noņemto ūdens paraugu skaits.

Table 6  
Number of taken water samples.

	Viesnīcu skaits	Paraugu skaits				No vienas viesnīcas
		Krāns		Dušas klausule		
		Pirms	Pēc	Pirms	Pēc	
	15	3	3	0	0	6
	15	2	2	1	1	6
	5	1	1	2	2	6
	2	2	3	1	1	7
	2	0	0	3	3	6
	1	0	0	2	2	4
<b>Kopā</b>	<b>40</b>	<b>170</b>		<b>70</b>		

### 2.2.2. *Legionella pneumophila* izolēšana un serogrupas noteikšana

*Legionella pneumophila* izolēšana tika veikta saskaņā ar standartu LVS ISO 11731:1998. Visi ūdens paraugi ar spiediena palīdzību tika filtrēti, izmantojot vakuuma membrānfiltru metodi. Veikta filtru noskalošana koncentrātu ieguvei, to termiskā apstrāde un apstrāde ar skābi. Apstrādātie paraugi uzsēti uz selektīvās GVPC agara barotnes un ievietoti termostatā  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  uz 10 dienām. Raksturīgās *Legionella* kolonijas tika pārsētas uz BCYE un BCYE bez cisteīna barotnes un ievietotas termostatā  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  uz 2 dienām. Koloniju apstiprināšana veikta ar MALDI-TOF masas spektrometru (2.2.5 apakšnodaļa). Apstiprinātajiem *L. pneumophila* izolātiem ar lateksa aglutinācijas metodi tika veikta serogrupas noteikšana. Izmantoti divi lateksa aglutinācijas serumi – *Legionella pneumophila* TEST L1 un *Legionella pneumophila* TEST L2–15. Konkrētas serogrupas noteikšanai tika izmantoti papildus *L. pneumophila* serogrupas 1, 2, 3, 6 un 9 lateksa aglutinācijas serumi.

### 2.2.3. DNS ekstrakcija un PCR amplifikācija

DNS ekstrakcija veikta pēc 48 h *L. pneumophila* inkubācijas termostatā  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Pilna 1  $\mu\text{l}$  izmēra mikrobioloģiskā cilpiņa ar *L. pneumophila* kultūras kolonijām suspendēta 500  $\mu\text{l}$  no nukleāzes brīvā ūdens un ar kratītāja palīdzību iegūta viendabīga suspensija. Ependorfa mēģenes ar baktēriju suspensiju ievietotas termoblokā  $100^{\circ}\text{C}$  temperatūrā lizēšanai uz 8 minūtēm, atdzesētas un ievietotas centrifūgā (3 min x 13 000 rpm) supernatanta iegūšanai. Aptuveni 400  $\mu\text{l}$  supernatanta tika pārnestas jaunās mēģenēs tūlītējai izmantošanai vai saldēšanai  $-18^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Ar *NanoDrop* spektrofotometru noteikta katra *Legionella pneumophila* celma izdalītās DNS koncentrācija (izmantotā koncentrācija  $\sim 20$  ng/ $\mu\text{l}$ ), nepieciešamības gadījumā veikta atšķaidīšana.

Izmantojot *QIAGEN Sample and Assay Technologies Quick-Start* protokolu, tika aprēķināts nepieciešamais reaģentu, praimeru daudzums un koncentrācija katra parauga amplifikācijai. Astoņās ependorfa mēģenēs pagatavots amplifikācijas reakcijas maisījums, sastāvošs no nukleāzes brīvā ūdens, *PCR HotStar Master Mix* šķīduma,  $\text{MgCl}_2$ , praimera F un praimera R atbilstošajiem gēniem (noteiktā secībā – *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA* vai *neuAh*). Sterilās 8 stripu PCR mēģenēs iepilināti 18  $\mu\text{l}$  pagatavotā maisījuma katram gēnam un klāt pievienoti 2  $\mu\text{l}$  iepriekš izdalītās DNS. Stripu PCR mēģenes nocentrifugētas (10 s x 3000 rpm) un ievietotas PCR amplifikatorā, uzstādot termālā cikla parametrus saskaņā ar *Quick-Start* protokolu.

Iegūtie PCR amplifikācijas produkti ievietoti kapilārās elektroforēzes iekārtā koncentrācijas noteikšanai. Ar *QIAXcel ScreenGel Software* datorprogrammu iegūta elektroforēzes aina un noteikta katra gēna produkta koncentrācija. Veikta PCR produktu atšķaidīšana līdz koncentrācijai 1,5 ng/ $\mu\text{l}$  ar kopējo tilpumu 5  $\mu\text{l}$  katram gēnam.

### 2.2.4. DNS sekvencēšana

Pirms sekvencēšanas tika veikta PCR produktu attīrīšana pievienojot 0,5  $\mu\text{l}$  eksonukleāzes I un 1  $\mu\text{l}$  sārmainās fosfatāzes (kopējais beigu tilpums katrā mēģenē 6,5  $\mu\text{l}$ ). Stripu PCR mēģenes nocentrifugētas (10 s x 3000 rpm) un ievietotas uz attīrīšanu PCR amplifikatorā, uzstādot parametrus 15 minūšu inkubācijai  $37^{\circ}\text{C}$  temperatūrā un 15 minūšu beigu reakcijai  $85^{\circ}\text{C}$  temperatūrā.

Izmantojot *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* protokolu, tika aprēķināts nepieciešamais reaģentu, praimeru daudzums un koncentrācija sekvencēšanas reakcijai. Sešpadsmit ependorfa mēģenēs pagatavots sekvencēšanas reakcijas maisījums, sastāvošs no nukleāzes brīvā ūdens, sekvencēšanas buferšķīduma un *BigDye* krāsvielas. Astoņās no tām

iepilināti *Forward* praimeru atbilstošajā secībā no *flaA* līdz *neuAh*, atlikušajās astoņās *Reverse* praimeru. Sterilās stripu mēģenēs, ievērojot secību, iepilināti 18 µl pagatavotā maisījuma katram gēnam un klāt pievienoti 2 µl attīrīta PCR produkta (kopējais tilpums 20 µl). Stripu mēģenes nocentrifugētas (10 s x 3000 rpm) un ievietotas amplifikatorā sekvencēšanas reakcijai, uzstādot termālā cikla parametrus saskaņā ar *Applied Biosystems BigDye Terminator* protokolu.

Izmantojot etanola/nātrija acetāta precipitācijas metodi (saskaņā ar *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* protokolu), tika pagatavots etanola, nātrija acetāta un destilēta ūdens maisījums PCR produktu precipitācijai. Stripu mēģenēs visiem gēniem pievienoti 80 µl pagatavotā vielu maisījuma (kopējais tilpums 100 µl) un to saturs pārnesta uz optisko 96-iedobju plati, sekojot līdzīgi gēnu secībai. Plate ievietota centrifūgā (30 min x 3000 rcf) supernatanta atdalīšanai. Ar centrifūgas palīdzību (15 s x 1500 rcf) atdalīti supernatanta atlikumi un katrā no iedobēm pie precipitāta pievienoti 150 µl 70 % etanola, nukleotīdu atmazgāšanai. Plate atkārtoti ievietota centrifūgā (10 min x 3000 rcf) un, atbrīvojoties no supernatanta, katrā iedobē pievienoti 20 µl formamīda. Uzstādot nepieciešamos parametrus, plate tika ievietota ģenētiskajā analizatorā sekvenču iegūšanai.

### 2.2.5. MALDI-TOF MS identifikācija

Visi pētījumā iegūtie *Legionella* izolāti tika apstiprināti izmantojot *Bruker MALDI Biotyper* tiešās identifikācijas metodi. Plānā kārtā uz MALDI-TOF masspektrometra mērķa plates ailēm tika veikta atsevišķu koloniju uztriepe. Uz bioloģiskā materiāla katrā aizpildītajā ailē uzpilināts 1 µl HCCA matricas, atstāts nožūšanai istabas temperatūrā un ievietots masspektrometrā izolātu identifikācijai.

### 2.2.6. Datu apstrāde un analīze

Ar *Sequencing Analysis Software* datorprogrammu iegūtas katra parauga septiņu gēnu sekvences. Izmantojot *MEGA 5.2.2* datorprogrammas parametru *Align by ClustalW*, sekvences tika nolīdzinātas un apgrieztas atbilstoši EWGLI datubāzes<sup>14</sup> references sekvencēm. Iegūtās sekvences ievietotas datubāzē alēliskā profila un sekvenču tipa numura noteikšanai. Klīnisko gadījumu skaita noteikšanai izmantoti EWGLI epidemioloģiskie dati.

Pirms jauniegūto sekvenču tipu piešķiršanas veikta sekvenču kvalitātes pārbaude, izmantojot datubāzes *Sequence Quality Tool* sistēmu. Izolāti ar atšķirīgajiem sekvenču tipa numuriem reģistrēti EWGLI datubāzē kā Latvijas valsts vides izolāti. Izmantojot *PHYLOViZ* datorprogrammu izveidota *minimum-spanning tree* dendrogramma, ar *eBurst Online* veikta

---

<sup>14</sup> [http://www.hpabioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpabioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)

filoģenētiskā analīze. Izmantojot *BioNumerics* datorprogrammu (MALDI-TOF MS masas spektrus) un *MEGA 5.2.2* datorprogrammu (*asd* gēna sekvences) izveidotas UPGMA<sup>15</sup> dendrogrammas.

P vērtība aprēķināta ar Vilkoksona testu (ticamības intervāls 95 %).

---

<sup>15</sup> *Unweighted pair group method with arithmetic mean*

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. *Legionella pneumophila* izplatība viesnīcu ūdensapgādes sistēmās

Pētījumā tiek pierādīts, ka *Legionella* ir plaši sastopama baktērija Latvijas viesnīcu ūdensapgādes sistēmās, jo no 40 viesnīcām 26 (65 %) tika identificēts vismaz viens *Legionella* pozitīvs paraugs. Viesnīcu saraksts un iegūtie rezultāti apkopoti 1. pielikumā. Kopumā no 240 paraugiem 108 (45 %) bija *Legionella* pozitīvi, no kuriem 99 (41 %) *L. pneumophila* un 9 (4 %) *L. rubrilucens* izolāti (7. tabula). No 170 krāna noņemtajiem paraugiem 73 (43 %) paraugos tika konstatēta *L. pneumophila*, bet no 70 dušas klausules noņemtajiem paraugiem 26 (37 %) paraugos tika konstatēta *L. pneumophila*.

7. tabula  
*Legionella* izplatība viesnīcu ūdensapgādes sistēmās.

Table 7  
Distribution of *Legionella* in hotel water supply system.

	Pozitīvie paraugi			Negatīvie paraugi		
	Krāns N (poz.) %	Dušas klausule N (poz.) %	Kopā N (poz.) %	Krāns N (neg.) %	Dušas klausule N (neg.) %	Kopā N (neg.) %
<i>L. pneumophila</i>	170 (73) 43	70 (26) 37	240 (99) 41	170 (97) 57	70 (44) 63	240 (141) 59
<i>L. rubrilucens</i>	170 (9) 5	70 (0) 0	240 (9) 4	170 (161) 95	70 (70) 100	240 (231) 96

\*N – kopējais noņemto paraugu skaits

Līdzīgs pētījums veikts Itālijā, kurā 75 % no iesaistītajam viesnīcām konstatēta *Legionella* spp. un 60,5 % no noņemtajiem ūdens paraugiem *Legionella* pozitīvi (Borella et al. 2005). Tieši viesnīcu ūdensapgādes sistēmas ir viens no galvenajiem *Legionella pneumophila* rezervuāriem, kas varētu būt saistīts ar ēkas plašo cauruļvadu tīklu un mainīgo temperatūru tajā (Borella et al. 2005).

*L. pneumophila* ir pārstāvētākā *Legionella* suga, kas identificēta šajā pētījumā, sastādot 92 % no 108 *Legionella* pozitīvajiem paraugiem. Šis rādītājs ir daudz lielāks nekā līdzīgā iepriekš veiktā pētījumā Ķīnā, kurā *L. pneumophila* konstatēta 51,9 % un Japānā 87,1 % no identificētajām *Legionella* sugām (Qin et al. 2013; Kanatani et al. 2017). Otra *Legionella* suga, kas identificēta šajā pētījumā, ir *L. rubrilucens*, sastādot 8 % no 108 *Legionella* pozitīvajiem paraugiem. Kanatani (2017) pētījumā *L. rubrilucens* identificēta 16,1 % no *Legionella* pozitīvajiem paraugiem. To, ka paraugos konstatēta *L. rubrilucens* nevis *L. pneumophila*, nevajadzētu uzskatīt par mazsvarīgu, jo pētījumi liecina, ka ne tikai *L. pneumophila*, bet arī citas sugas spēj ierosināt dažāda veida saslimšanas, kas galvenokārt saistītas ar nozokomiālām infekcijām (Qin et al. 2013; Mentasti et al. 2014).

*L. rubrilucens* konstatēta tikai no krāna ņemtajos paraugos, savukārt Kanatani (2017) pētījumā tikai no dušas klausulēm ņemtajos paraugos. 7. tabulā redzams, ka *L. pneumophila* konstatēta 43 % no krāna un 37 % no dušas klausules ņemtajos paraugos. Tieši dušas klausules palielina risku inficēties ar *Legionella*, jo tajās tiek izveidoti smalki, aerosolizēti ūdens pilieni, kas spēj nonākt cilvēka respiratorajā sistēmā (Kanatani et al. 2017).

Ūdens temperatūra ir viens no galvenajiem fizikālajiem parametriem, kas ietekmē *Legionella* dzīvošanu un vairošanos (Dilger et al. 2016). *L. pneumophila* spēj uzturēt savu dzīvotspēju temperatūrā no 0°C līdz 60°C (Hornei et al. 2007; Dilger et al. 2016). Maksimālā ūdens temperatūra no krāna ņemtiem paraugiem, kurā identificēta *L. pneumophila*, ir 63±1°C, bet minimālā 16±1°C, savukārt no dušas klausules ņemtiem paraugiem maksimālā 57±1°C, bet minimālā 21±1°C (8. tabula). Ūdens temperatūras atšķirība *Legionella* pozitīvajiem un *Legionella* negatīvajiem paraugiem nav statistiski būtiska (P = 0.185978, CI = 95 %).

8. tabula

Pozitīvo un negatīvo *L. pneumophila* paraugu raksturlielumi pirms un pēc ūdens notecināšanas.

Table 8

Characteristics of positive and negative *L. pneumophila* samples before and after water pouring.

Notecināšana	Temperatūra° C								Kolonizācija, kvv/l	
	Krāns				Dušas klausule					
	Pozitīvi paraugi		Negatīvi paraugi		Pozitīvi paraugi		Negatīvi Paraugi		vid.	min-max
	vid.	min-max	vid.	min-max	vid.	min-max	vid.	min-max		
Pirms	34,7	16-61	34,2	27-48	33,7	21-45	36,0	23-55	1,8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>1</sup> - 1,1 x 10 <sup>4</sup>
Pēc	47,9	20-63	50,1	37-58	47,4	40-57	51,3	38-63	1,0 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>1</sup> - 8,5 x 10 <sup>3</sup>

Visvairāk pozitīvo *L. pneumophila* paraugu identificēts ūdens temperatūrā 34 – 40°C, kas atbilst optimālajam (25 – 42°C) *L. pneumophila* augšanas temperatūras diapazonam (Diederer 2008). Pētījumi liecina, ka ūdens temperatūrā virs 60°C *L. pneumophila* aiziet bojā aptuveni divu līdz trīs minūšu laikā, bet šādas temperatūras uzturēšanai viesnīcām nākas saskarties ar problēmām, kas saistītas ar palielinātām apkures izmaksām, kā arī speciālu ūdens maisītāju ieviešanu applaucēšanās riska mazināšanai (Borella et al. 2005; Dilger et al. 2018).

Pētījumā maksimālais *L. pneumophila* koloniju veidojošo vienību skaits bija 1,1 x 10<sup>4</sup> kvv/l (8. tabula). Vidējais koloniju veidojošo vienību skaits pirms ūdens notecināšanas bija 1,8 x 10<sup>3</sup> kvv/l, bet pēc ūdens notecināšanas 1,0 x 10<sup>3</sup> kvv/l. Zināms, ka *L. pneumophila* augšanai labvēlīgi apstākļi ir stāvošs, ar organiskajām vielām bagāts ūdens, kas veidojas ilglaicīgi neizmantotos krānos vai dušu klausulēs (Diederer 2008; Kanatani et al. 2017). Pētījumā tas

apstiprinās, jo gan no krāna, gan dušu klausulēm noņemtajos paraugos koloniju veidojošo vienību skaits pirms ūdens notecināšanas ir statistiski būtiski lielāks nekā pēc ūdens notecināšanas ( $P = 0,000014$ ;  $CI = 95 \%$ ). Šī pētījuma mazākais konstatētais koloniju veidojošo vienību skaits bija  $50 \text{ kvv/l}$ . Lai gan  $54,5 \%$  no paraugiem koloniju veidojošo vienību skaits bija  $<10^3 \text{ kvv/l}$  (šie rezultāti netiek attēloti), tomēr to nedrīkstētu atstāt nevērības cienīgu, jo labvēlīgu apstākļu klātbūtnē *L. pneumophila* ātri spēj savairoties.

Trīs no pētījumā iesaistītajām viesnīcām izrādīja iniciatīvu noņemt ūdens paraugus no siltummezgla (šie rezultāti netiek attēloti). Rezultātā no divu viesnīcu siltummezgla izolēta *L. pneumophila* ( $1,5 \times 10^2 \text{ kvv/l}$  un  $7,5 \times 10^3 \text{ kvv/l}$ ). Vienas viesnīcas siltummezglā *L. pneumophila* klātbūtne netika konstatēta, savukārt šīs pašas viesnīcas divu istabiņu noņemtie ūdens paraugi bija *L. pneumophila* pozitīvi. Izriet secinājums, ka sākotnējais *L. pneumophila* avots var būt gan jau pirmatnējais ūdens pievads ēkai, gan arī konkrēts ēkas ūdensapgādes sistēmas posms, kurā baktērijas nokļuvušas un masveidā savairojušās. Vienā istabiņā noņemtais paraugs pirms notecināšanas var būt *Legionella* negatīvs, bet pēc notecināšanas – pozitīvs. Tas liek secināt, ka baktērijas ir savairojušās nevis krāna vai dušas klausules galvā, bet kādā no ūdensapgādes sistēmas posmiem līdz nonākšanai konkrētajā istabiņā.

Citi parametri, izņemot temperatūru, kā piemēram, ūdens pH, cauruļu izgatavošanas materiāls, hlora vai citu dezinfekcijas līdzekļu klātbūtne šajā pētījumā netika aplūkoti. Pētījumi, kuros tas tiek noteikts, liecina, ka, piemēram, ūdens paraugos ar aktīvā, atlikušā hlora saturu  $>0,1 \text{ mg/l}$  *Legionella* dzīvotspēja samazinās (Kanatani et al. 2017). Borella (2005) pētījumā tiek aplūkota *Legionella* klātbūtne viesnīcu ūdensapgādes sistēmā saistībā ar cauruļu materiālu, ēkas vecumu, ūdens izcelsmi, sildītāju veidu, ēkas stāvu un istabiņu skaitu. Vienīgais faktors, kas pozitīvi korelē ar *L. pneumophila* klātbūtni, ir ēkas vecums (Borella et al. 2005). Šajā pētījumā *L. pneumophila* klātbūtne nav atkarīga no ēkas uzbūvēšanas gada (1. pielikums). Jaunākā viesnīca, kurā konstatēta *L. pneumophila* klātbūtne, ir uzbūvēta 2011. gadā, bet vecākā 1886. gadā. 1. pielikumā redzams, ka *L. pneumophila* ir konstatēta gan 2008. gada, gan 2010. gada, gan 2011. gada būvētās ēkās, savukārt nav konstatēta 1873. gada un 1820. gada būvētās ēkās. Tomēr jāatzīmē, ka no 14 viesnīcām, kurās netika konstatēta *L. pneumophila*, 12 ir ēkas, kuras jaunākas par 2007. gadu.

Ar lateksa aglutinācijas metodi tika noteiktas piecas *L. pneumophila* serogrupas – SG 1; SG 2; SG 3; SG 6 un SG 9 (1. pielikums). *L. pneumophila* SG 1 identificēti 13 izolāti, SG 2 – 10 izolāti, SG 3 – 68 izolāti, SG 6 – 4 izolāti un SG 9 – 4 izolāti (9. tabula). Visbiežāk sastopamā serogrupa ir *L. pneumophila* serogrupa 3 (68 izolāti, 68,7 %), kas arī Qin (2013) pētījumā ir pārstāvētākā (67 izolāti, 25,3 %). Savukārt Kanatani (2017) pētījumā tikai 2 izolāti no 31 identificēti kā *L. pneumophila* serogrupa 3. Otra pārstāvētākā serogrupa ir *L. pneumophila*

serogrupa 1 (13 izolāti, 13,1 %) (9. tabula). Pasaulē ar Leģionāru slimības uzliesmojumiem visbiežāk saistīta tieši *L. pneumophila* serogrupa 1, kas Eiropā sastāda aptuveni 85 % no ziņotajiem gadījumiem un 70 % no tiem ir ar ceļošanu saistītie jeb TALD gadījumi (Aurell et al. 2005; Khodr et al. 2016).

Šajā un līdzīgos pētījumos apstiprinās, ka vienas ēkas ūdensapgādes sistēmā var būt ne tikai dažādas *Legionella* sugas, bet arī atšķirīgas *L. pneumophila* serogrupas (Qin et al. 2013; Kanatani et al. 2017). No 26 *L. pneumophila* pozitīvajām viesnīcām 7 viesnīcās tika konstatētas divas atšķirīgas serogrupas kopā – SG 3 un SG 6, SG 2 un SG 3, SG 2 un SG 1, SG 3 un SG 1 (1. pielikums). Divās viesnīcās konstatēta tikai *L. rubrilucens*, bet divās *L. pneumophila* kopā ar *L. rubrilucens*. Trijās viesnīcās no vienas istabiņas identificētas divas atšķirīgas serogrupas (šie rezultāti netiek attēloti), pirms ūdens notecināšanas *L. pneumophila* serogrupa 2, bet pēc notecināšanas – serogrupa 3. Tas varētu būt izskaidrojams ar kļūdainu serogrupas noteikšanu, jo, izmantojot lateksa aglutinācijas testu, no BCYE barotnes tika ņemtas tikai divas tipiskās *L. pneumophila* kolonijas. Iespējams, analizējot vismaz piecas kolonijas, vienā paraugā varētu identificēt vairākas serogrupas.

### **3.2. *L. pneumophila* sekvenču tipu daudzveidība un izplatība**

Izmantojot uz DNS sekvenci bāzēto tipēšanas (SBT) metodi, visiem 99 *L. pneumophila* izolātiem tika iegūts alēliskais profils un sekvenču tipa numurs (9. tabula). SBT ir "zelta standarts" starp *L. pneumophila* tipēšanas metodēm, kas ļauj veikt *L. pneumophila* epidemioloģisko tipēšanu, izmeklēt un izsekot globālo izplatīšanos, kā arī noskaidrot legionelozes uzliesmojumus pasaulē (Sanchez-Buso et al. 2015). Pētījumā iegūti 26 sekvenču tipa numuri, no kuriem četri iepriekš nav bijuši reģistrēti EWGLI datubāzē. Diviem izolātiem piešķirts jauns sekvenču tipa numurs ST 2582, sešiem – ST 2581, trijiem – ST 2579 un trijiem – ST 2580.

Visi izolāti ar atšķirīgajiem sekvenču tipa numuriem reģistrēti EWGLI datubāzē kā vides izolāti no Latvijas. No EWGLI datubāzes (01/2018) iegūts un 9. tabulā apkopots arī katra sekvenču tipa izraisīto klīnisko gadījumu skaits. Visvairāk reģistrēto klīnisko gadījumu skaits ir ST 1, ST 62 un ST 9, visi *L. pneumophila* serogrupas 1 izolāti. Arī klīniska gadījuma izolāti ir bijuši vides izolāti, pirms tie reģistrēti kā infekciju izraisoši (Sanchez-Buso et al. 2015). ST 1 no 876 klīniskajiem gadījumiem 48 (5,5 %) reizes reģistrēts kā TALD jeb ar ceļošanu saistīts sekvenču tips, ST 62 – 29 (7,4 %) reizes un ST 9 – 20 (13,9 %) reizes (arī TALD gadījumu skaits iegūts EWGLI datubāzē). Tikai septiņiem sekvenču tipiem, no kuriem četri jauniegūtie, nav bijis reģistrēts neviens klīniskais gadījums.

Ar SBT metodi iegūtie *L. pneumophila* izolātu alēliskie profili un sekvenču tipa numuri.

Table 9

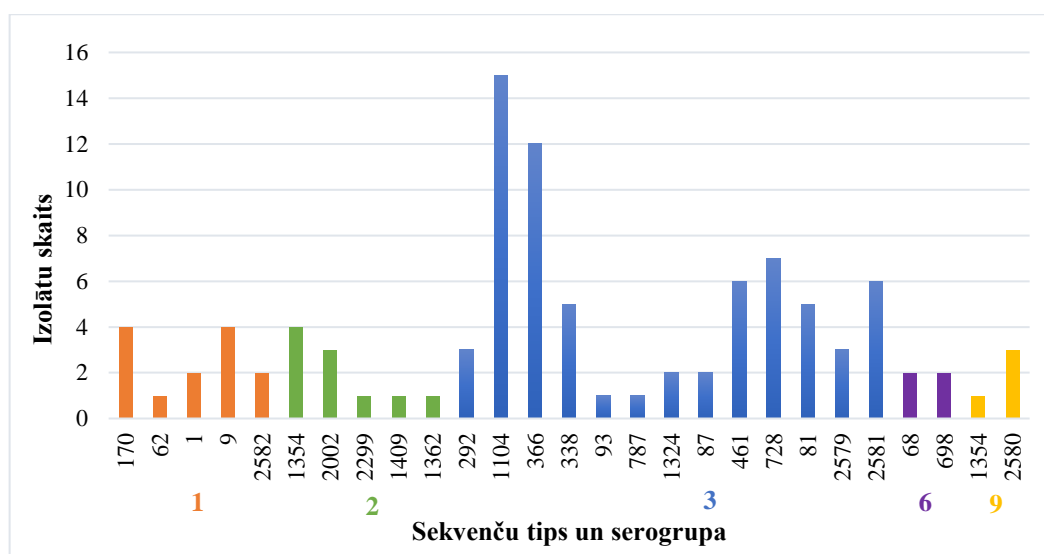
Allele profiles and sequence type of *L. pneumophila* isolates obtained by the SBT method.

Serogrupa	Alēliskais profils	Sekvenču tipa numurs	Izolātu skaits	Klīnisko gadījumu skaits (EWGLI) (uz 01.2018)	
<b>1</b>	2,10,3,10,9,4,11	ST 170	4	6	
	3,10,1,3,14,9,11	ST 9	4	144	
	2,10,15,10,9,4,11	<b>ST 2582</b>	2	0	
	1,4,3,1,1,1,1	ST 1	2	876	
	8,10,3,15,18,1,6	ST 62	1	389	
Izolāti (%)			13 (13,1 %)		
<b>2</b>	2,10,24,28,4,4,207	ST 1354	4	2	
	10,22,7,28,16,18,8	ST 2002	3	0	
	1,10,3,5,1,1,213	ST 2299	1	1	
	6,10,19,28,19,4,207	ST 1409	1	3	
	2,10,3,28,9,4,207	ST 1362	1	3	
Izolāti (%)			10 (10,1 %)		
<b>3</b>	3,13,1,28,14,9,13	ST 1104	15	2	
	2,10,3,3,9,4,6	ST 366	12	3	
	2,10,3,28,9,4,3	ST 728	7	4	
	2,32,20,38,34,35,219	<b>ST 2581</b>	6	0	
	6,10,14,28,21,14,9	ST 461	6	3	
	2,10,15,28,9,4,13	ST 338	5	3	
	2,10,3,28,9,4,9	ST 81	5	8	
	2,5,3,28,9,4,6	<b>ST 2579</b>	3	0	
	6,10,19,28,19,4,3	ST 292	3	4	
	5,1,22,30,6,10,203	ST 1324	2	15	
	2,10,3,28,9,4,13	ST 87	2	18	
	2,10,1,3,9,4,3	ST 787	1	0	
	3,10,1,28,14,9,13	ST 93	1	66	
	Izolāti (%)			68 (68,7 %)	
	<b>6</b>	7,10,17,3,17,11,9	ST 698	2	0
3,13,1,28,14,9,3		ST 68	2	28	
Izolāti (%)			4 (4,0 %)		
<b>9</b>	6,10,19,28,19,14,3	<b>ST 2580</b>	3	0	
	2,10,24,28,4,4,207	ST 1354	1	2	
Izolāti (%)			4 (4,0 %)		
<b>Kopā</b>			<b>99</b>		

\*ST treknrakstā – jauniegūtie, pirmo reizi EWGLI datubāzē reģistrētie sekvenču tipi.

Pasaulē visbiežāk sastopamais ir ST 1 sekvenču tips, kurš pārsvarā identificēts vides izolātiem (Kozak-Muiznieks et al. 2014; Sanchez-Buso et al. 2015). Iespējams, celmi ar sekvenču tipu ST 1, koeksistējot ar citiem virulentiem celmiem, horizontālās gēnu pārneses rezultātā ir ieguvuši papildus virulences pazīmes (Kozak-Muiznieks et al. 2014). Virulentajiem celmiem mainās arī šūnas sienas fizikālās īpašības, tādējādi uzlabojas noturība un rezistence (Kozak-Muiznieks et al. 2014). Celmi ar atšķirīgiem sekvenču tipiem var veidoties saskaroties ar izmaiņām gēnu līmenī, mutāciju vai rekombināciju procesā (Chasqueira et al. 2014).

Visvairāk izolātu identificēts ar sekvenču tipa numuru ST 1104 – 15 izolāti, ST 366 – 12 izolāti un ST 728 – 7 izolāti (3. attēls). ST 1104 EWGLI datubāzē reģistrēts 9 reizes, no kurām divas kā klīniska gadījuma izolāts un vienu reizi ar nozokomiālu infekciju saistīts izolāts.



3. attēls. Izolātu skaits attiecīgajam sekvenču tipam un serogrupai.

Figure 3. Number of isolates for appropriate sequence type and serogroup.

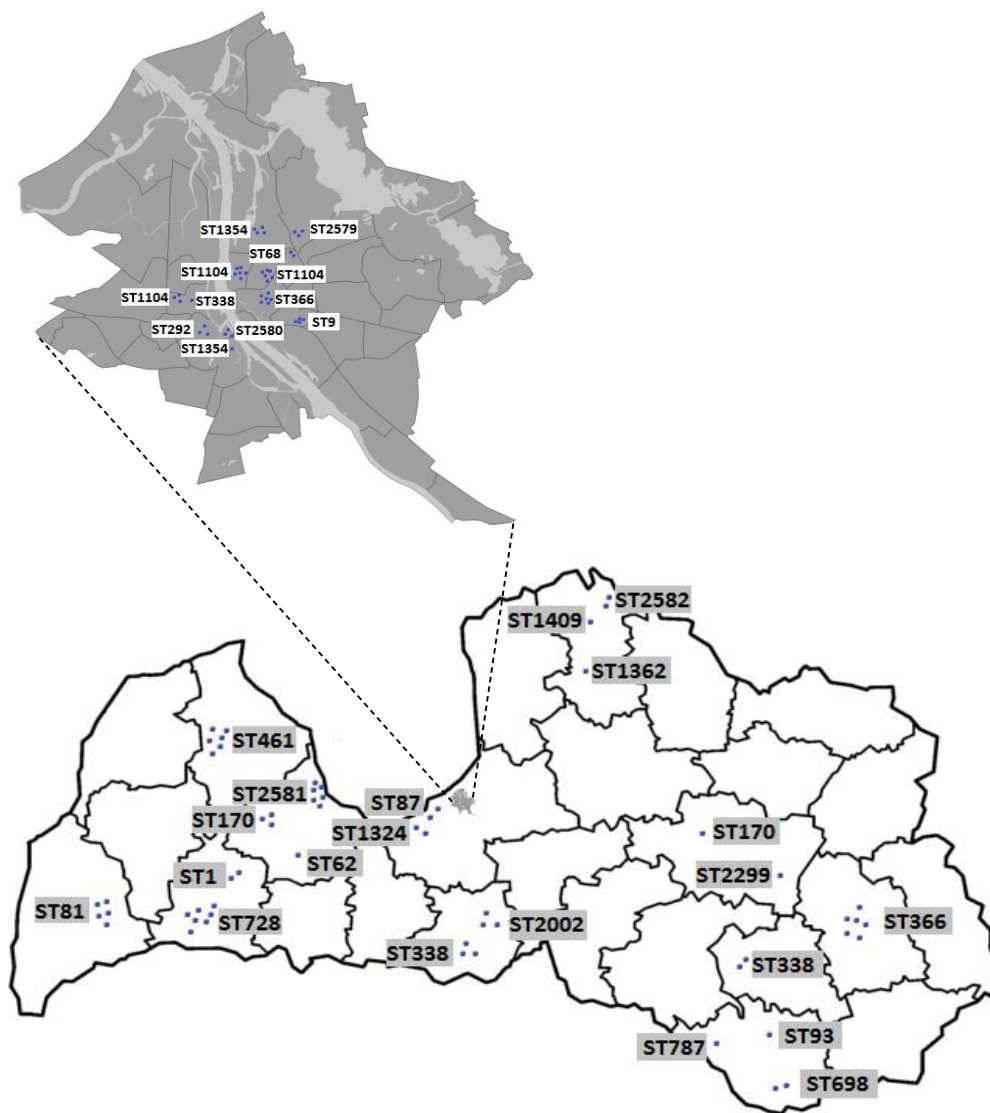
*L. pneumophila* SG 1 un SG 2 iegūti 5 sekvenču tipa numuri, SG 3 – 13, SG 6 un SG 9 – 2 sekvenču tipa numuri. ST 1354 iegūts divām dažādām serogrupām – SG 2 četriem izolātiem un SG 9 vienam izolātam (3.attēls). To varētu izskaidrot kā kļūdainu serogrupas noteikšanu, bet pētījumi liecina, ka arī dažādām serogrupām var būt viens un tas pats sekvenču tipa numurs (Levesque et al. 2016).

1. pielikumā apkopotie dati liecina, ka 11 viesnīcās konstatēti divi dažādi sekvenču tipi un tikai trijās viesnīcās identificēta viena serogrupa, bet divi atšķirīgi sekvenču tipi. Vienas ēkas ūdensapgādes sistēmā nav konstatēti vairāk kā divi dažādi *L. pneumophila* sekvenču tipi, iespējams, palielinot noņemto ūdens paraugu skaitu no vienas viesnīcas, tiktu konstatēta lielāka to dažādība. Sekvenču tipu dažādības novērtēšanai vienas ēkas ūdensapgādes ietvaros, nebūtu nepieciešams noņemt divus paraugus no viena krāna vai dušas klausules kā tas tika veikts šajā pētījumā, jo rezultāti liecina, ka gan pirms, gan pēc ūdens notecināšanas ir konstatēts viens un tas pats *L. pneumophila* sekvenču tips (šie rezultāti netiek attēloti). ST 1104 un ST 338 konstatēti trijās viesnīcās, ST 1354, ST 366 un ST 170 – divās, bet pārējie sekvenču tipi konstatēti tikai vienā viesnīcā.

Iepriekš veiktā līdzīgā pētījumā Latvijā identificēti 15 dažādi sekvenču tipi (Staškeviča 2016). No tiem 8 sekvenču tipi (ST 2192, ST 579, ST 421, ST 2191, ST 1271, ST 1261, ST 345, ST 553) ir tādi, kas nav konstatēti šajā pētījumā. Latvijas teritorijā (uz 04/2018) identificēts

41 *L. pneumophila* sekvenču tips (visi kā vides izolāti). Papildus tiem ir vēl divi – ST 963 un ST 1044, kuri reģistrēti kā klīniskie, ar ceļošanu saistītie izolāti. Kopumā EWGLI datubāzē reģistrēti vairāk nekā 2500 dažādi sekvenču tipi, kuru alēles ir unikālas (tām piešķirts nejaušs, vesels skaitlis), un to kombinācija katrā lokusā veido alēlisko profilu (Gaia et al. 2005; Mentasti et al. 2014).

Kopumā *L. pneumophila* konstatēta 9 Rīgas viesnīcās, iegūti 42 *L. pneumophila* izolāti un 9 dažādi sekvenču tipi (4. attēls). Latgalē iegūti 12 izolāti, 5 sekvenču tipi, Vidzemē (izņemot Rīgu) – 10 izolāti, 7 sekvenču tipi, Zemgalē – 6 izolāti, 2 sekvenču tipi, Kurzemē – 29 izolāti, 7 sekvenču tipi (4. attēls). Atšķirīgos Latvijas novados pārstāvēti tikai trīs no sekvenču tipiem – ST 338 (Rīgā, Latgalē un Vidzemē), ST 170 (Kurzemē un Vidzemē), ST 366 (Rīgā un Latgalē), pārējie sekvenču tipi konstatēti tikai vienā izolēšanas pilsētā.



4. attēls. *L. pneumophila* sekvenču tipu ģeogrāfiskā izplatība (\*izolātu skaits).  
 Figure 4. Geographic distribution of *L. pneumophila* sequence type (\*number of isolates).

Pētījumi liecina, ka sekvenču tipu izplatība ir atkarīga no izolātu ģeogrāfiskās atrašanās vietas. Piemēram, *L. pneumophila* serogrupas 1 sekvenču tips ST 47 ir pārstāvētākais Beļģijā, Francijā, Lielbritānijā un Nīderlandē, bet neviens izolāts ar šo sekvenču tipu nav reģistrēts kā izolāts no ASV vai Āzijas valstīm (Kozak-Muiznieks et al. 2014). Savukārt Kvebekā visvairāk ir izplatīts ST 62, kas ir saistīts ar sporādiskiem gadījumiem, kā arī diviem lieliem uzliesmojumiem (Levesque et al. 2016).

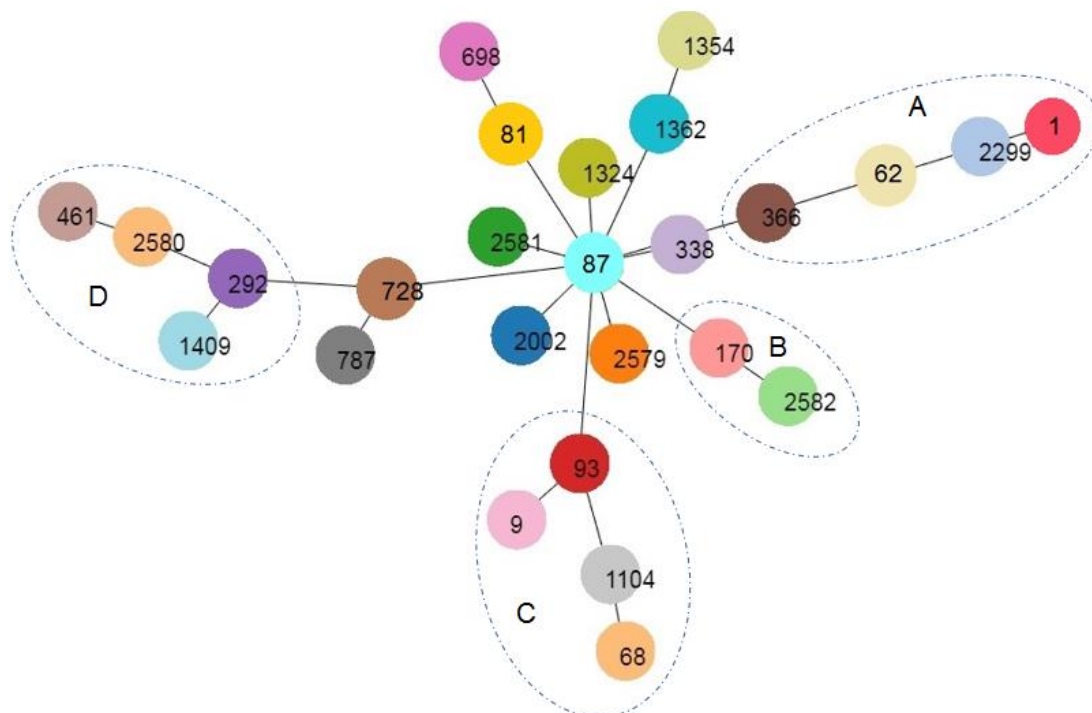
Ir veikti pētījumi, kuros aplūko vides izolātu sekvenču tipu dažādību atkarībā no ūdens sistēmas veida, kurā identificēta *L. pneumophila*. Tie ir atšķirīgi dzesēšanas torņos, vannas istabas ūdenī un dzeramajā ūdenī (Kozak-Muiznieks et al. 2014). Šajā pētījumā sekvenču tipu dažādība atkarībā no ūdens sistēmas veida netiek aplūkota, visi ūdens paraugi viesnīcās tiek noņemti no centralizētās ūdens padeves, bet uzmanība tiek pievērsta tam, kāda ūdensgūtne izmantota Rīgas viesnīcu apgādei ar ūdeni. Ūdens apgādei pazemes "Baltezera-Zaķumuižas" ūdensgūtņi izmanto 8 Rīgas viesnīcas, bet virszemes ūdensgūtņi no Rīgas HES ūdenskrātuves 10 viesnīcas (1. pielikums). *L. pneumophila* pozitīvi paraugi konstatēti 5 viesnīcās ar pazemes ūdensgūtņi un 4 viesnīcās ar virszemes ūdensgūtņi. ST 1354 un ST 1104 konstatēti viesnīcās gan ar pazemes, gan virszemes ūdensgūtņi. Lai secinātu, vai sekvenču tipu dažādība ir statistiski nozīmīgi atkarīga no ūdensgūtnes veida, ir nepieciešami papildus pētījumi ar daudz vairāk izolātiem tieši no Rīgas ūdensapgādes sistēmām gan ar pazemes, gan virszemes ūdensgūtņi.

### **3.3. Identificēto *L. pneumophila* sekvenču tipu filoģenētiskās attiecības**

Lai atspoguļotu iespējamās evolucionārās attiecības starp iegūtajiem 26 atšķirīgajiem *L. pneumophila* sekvenču tipiem, izmantojot *PHYLOViZ Online* datorprogrammu, kurā pētījumā iegūtie alēliskie profili un to atbilstošie sekvenču tipi tiek sajūgti ar pieejamajiem epidemioloģiskajiem datiem, tika izveidota *minimum-spaning tree* (MST) dendrogramma (5. attēls).

Izmantojot *eBurst Online* datorprogrammas algoritmu, tiek sagrupēti savstarpēji saistītie sekvenču tipi un ST 87 tiek izvirzīts kā iespējamais centrālais dibināšanas sekvenču tips, kurš raksturojas kā "*predicted founder*" jeb hipotētiskais priekštecis. Algoritms saistītos sekvenču tipus definē kā populācijā saistītos genotipus. Sekvenču tipi iedalās četrās grupās – A grupa ar četriem sekvenču tipiem – ST 366, ST 62, ST 2299 un ST 1, B grupa ar diviem sekvenču tipiem – ST 2582 un ST 170, C grupa ar četriem sekvenču tipiem – ST 1104, ST 68, ST 93 un ST 9, un D grupa ar četriem sekvenču tipiem – ST 292, ST 1409, ST 2580 un ST 461. Atsevišķi grupējas 11 sekvenču tipi – ST 728, ST 787, ST 698, ST 81, ST 1324, ST 1362, ST 1354, ST 338, ST 2002, ST 2579, ST 2581, kuri raksturojas kā "*singletons*", t.i. maz vai nav nemaz saistīti

ar citiem sekvenču tipiem. No centrālā sekvenču tipa tiek prognozēts iespējamais katras grupas dibināšanas sekvenču tips, A grupai tas ir ST 366, C grupai – ST 93 un D grupai ST 292, B grupai tas netiek izvirzīts.



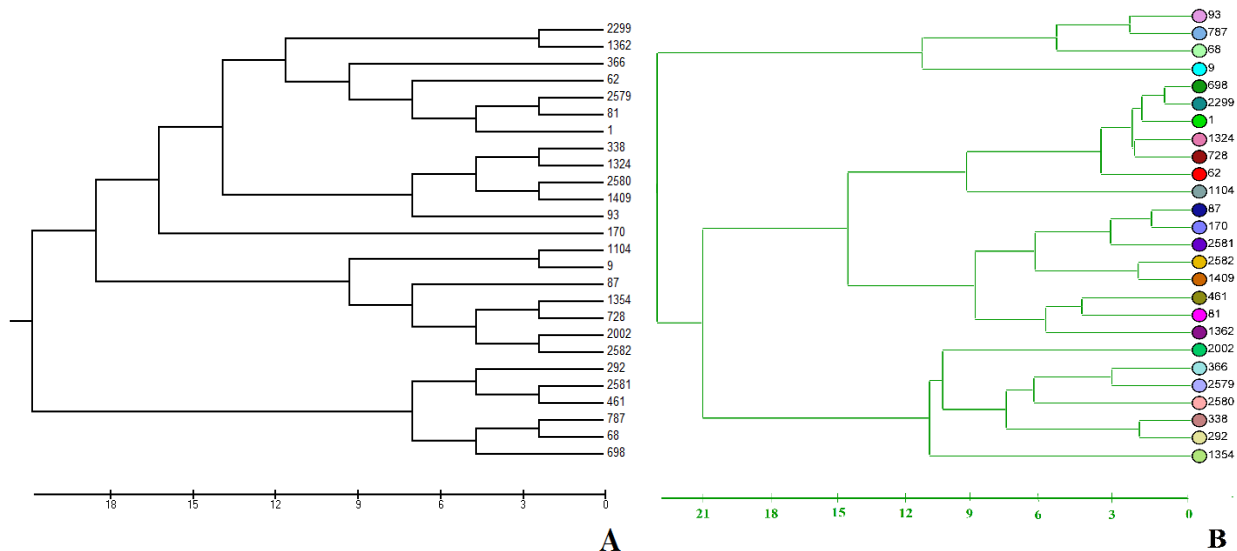
5. attēls. SBT iegūto 26 sekvenču tipu *minimum-spaning tree* dendrogramma.  
 Figure 5. *Minimum-spaning tree* obtained SBT profiles of 26 sequence type.

Visi “*singletons*” sekvenču tipi, izņemot ST 728, ST 81 un ST 1362, ir saistīti tikai ar vienu citu sekvenču tipu. Četriem no “*singletons*” sekvenču tipiem par iemeslu lielāki atšķirībai no pārējiem varētu būt tas, ka *neuA* gēna vietā ir tā homologs *neuAh*, ST 1362 (*neuAh*-207), ST 1324 (*neuAh*-203), ST 1354 (*neuAh*-207) un ST 2581 (*neuAh*-219) (9. tabula). ST 1354 un ST 1362 ir vienas un tās pašas serogrupas izolāti un dendrogrammā novietojas vienā atzarā, bet acīmredzot tie nav tik cieši saistīti, lai veidotu atsevišķu grupu. Sekvenču tipi dendrogrammas grupās neiedalās pēc serogrupas, jo A grupas sekvenču tipi ir gan SG 1, gan SG 2, gan SG3 izolāti, C grupas sekvenču tipi – SG 1, SG 3 un SG 9 izolāti, D grupas sekvenču tipi – SG 2, SG 3 un SG 9. (5. attēls; 9. tabula). Tikai B grupā nodalījušies vienas un tās pašas serogrupas izolāti ar sekvenču tipiem ST 170 un ST 2582. Sekvenču tipi katrā grupā ir arī ģeogrāfiski atšķirīgi, t.i. sargrupētajiem sekvenču tipiem nav saistību ar izolēšanas ģeogrāfisko vietu. Piemēram, A grupas sekvenču tipi ir Saldus, Madonas, Tukuma, Rēzeknes un Rīgas *L. pneumophila* izolāti (1. pielikums; 5.attēls).

Pētījumi liecina, ka efektīva metode *Legionella* populācijas struktūras aprakstīšanai ir pulsējošā lauka gēla elektroforēze, kas spēj atspoguļot *L. pneumophila* augsto ģenētisko polimorfismu un identificēt arī klonus, turklāt, kombinējot PFGE ar epidemioloģiskiem datiem,

iespējams noteikt epidemioloģiski saistītus vai nesaistītus celmus (Aurell et al. 2005; Qin et al. 2013). Būtu nepieciešami papildus uz DNS sekvenci bāzētās tipēšanas pētījumi, kuros tiek izmantoti ne tikai vides, bet arī klīniskie *L. pneumophila* izolāti. Šāda veida pētījumi varētu palīdzēt izsekot legionelozes saslimšanas uzliesmojumus, atklājot sporādisko, epidēmisko un endēmisko sekvenču tipu saistību (Aurell et al. 2005).

Lai novērtētu SBT metodē iegūto 26 sekvenču tipu filoģenētiskās attiecības, nesaistot ar epidemioloģiskiem datiem, tika izveidotas divas UPGMA dendrogrammas pēc *maximum composite likelihood* metodes (abās izmantoti tie paši izolāti) (6.attēls). A dendrogramma, izmantojot katra sekvenču tipa *asd* gēna sekvenci (*MEGA 5.2.2* datorprogramma), un B dendrogramma, balstoties uz MALDI-TOF MS proteīnu masas spektriem un iegūtajiem pīķiem (*BioNumerics* datorprogramma). Tieši *asd* gēns izmantots tādēļ, ka pētījumā *asd* alēles numuru dažādība bija vislielākā (11 varianti), turklāt arī Sanchez-Buso (2015) *L. pneumophila* filoģenētiskajai analīzei izmantoto izolātu *asd* gēna sekvenci.



6. attēls. UPGMA dendrogrammas 26 atšķirīgajiem sekvenču tipiem pēc *maximum composite likelihood* metodes. A – izmantojot *asd* gēna sekvenci, B – izmantojot masas spektrus.

Figure 6. UPGMA *maximum composite likelihood* dendrogramm of 26 different sequence types. A – obtained by *asd* gene sequence, B – obtained by mass spectra.

Tā kā dendrogrammas tiek veidotas balstoties uz dažāda veida iegūtajiem datiem, tad līdzības starp to klāsteriem un sekvenču tipu grupējumu nav saskatāmas. A dendrogrammā sekvenču tipi iedalās pēc *asd* gēna sekvences, attiecīgi pēc EWGLI piešķirtā alēles numura, piemēram, sekvenču tipi ar alēles numuru “3” iedalās vienā klāsterī. Sekvenču tipi ar atšķirīgiem alēles numuriem (*asd* – “19”, “20”, “1”, “14”, “17”) iedalās citā atsevišķā klāsterī.

B dendrogrammā sekvenču tipu filoģenētiskās attiecības izveidotas pēc MALDI-TOF MS identificēto *L. pneumophila* izolātu proteīnu masas spektriem un iegūtajiem pīķiem. Iespējams, tuvāk radniecīgo sekvenču tipu izolātiem ir atrodami proteīni un attiecīgi arī pīķu klātbūtne konkrētā masas spektra daļā, kas sargrupē tos vienā klāsterī, jo sekvenču tipi ST 68, ST 93 un ST 9 ir sargrupēti vienā klāsterī B dendrogrammā (UPGMA) un kā tuvāk radniecīgi sekvenču tipi tie ir sargrupēti arī *minimum-spaning tree* dendrogrammas C grupā.

MALDI-TOF MS rezultāti, kas iegūti identificējot visus *L. pneumophila* izolātus, nodrošina efektīvu to grupēšanu atkarībā no izolēšanas pilsētas, kā arī no sekvenču tipa (2. pielikums). Izlecošo izolātu novietojums varētu būt izskaidrojams ar iztrūkstošajiem pīķiem neatbilstošas masas spektru kvalitātes dēļ. Tādēļ uzticamāku rezultātu iegūšanai būtu nepieciešama katra izolāta vairākkārtēja identifikācija un visu iegūto masas spektru detalizēta analīze. Iespējams, turpmākie zinātniskie pētījumi spēs pierādīt, ka arī MALDI-TOF MS varēs izmantot ne tikai efektīvai mikroorganismu identifikācijai, bet arī to tipēšanai.

## Secinājumi

1. *Legionella pneumophila* ir bieži sastopama baktērija Latvijas viesnīcu ūdensapgādes sistēmās. 25 (65 %) no pētījumā iesaistītajām viesnīcām konstatēts vismaz viens *Legionella* pozitīvs paraugs.
2. *Legionella pneumophila* ir izplatīta visā Latvijas teritorijā, tās klātbūtne konstatēta 15 dažādu Latvijas pilsētu viesnīcu ūdensapgādes sistēmās.
3. Latvijā ir liela *Legionella pneumophila* sekvenču tipu daudzveidība (26 sekvenču tipi), bet vienas viesnīcas (ēkas) ūdensapgādes sistēmā nav konstatēti vairāk kā divi dažādi sekvenču tipi.
4. MALDI-TOF MS ir efektīva un ātra identifikācijas metode, ar kuras palīdzību identificēti visi pētījumā iegūtie 108 *Legionella* izolāti, no kuriem 99 *L. pneumophila* un 9 *L. rubrilucens*.
5. SBT jeb uz DNS sekvenci bāzētā tipēšana ir laikietilpīga, bet precīza *L. pneumophila* tipēšanas metode, ar kuras palīdzību iegūti 26 dažādi *Legionella pneumophila* sekvenču tipi.
6. Pētījumā iegūti četri jauni *L. pneumophila* sekvenču tipi – ST 2579, ST 2580, ST 2581 un ST 2582, kuri EWGLI datubāzē reģistrēti pirmo reizi.
7. Iegūtie alēliskie profili un to atbilstošie sekvenču tipi nodrošina MST dendrogrammas izveidi, kurā novērojama sekvenču tipu grupēšanās, balstoties uz iespējamām to evolucionārajām attiecībām. Iegūtas četras (A, B, C un D) grupas, tajās sekvenču tipi grupējas kā savstarpēji filoģenētiski saistīti.

## Pateicības

Izsaku pateicību maģistra darba konsultantei mg.biol. Olgai Valciņai par iespēju izstrādāt maģistra darbu Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR", kā arī par ieteikumiem un labojumiem darba rakstīšanas laikā. Vēlos pateikties maģistra darba vadītājai dr.biol.,asoc.prof. Vizmai Nikolajevai par vērtīgiem ieteikumiem, labojumiem un padomiem maģistra darba tapšanā. Pateicos Svetlanai Makarovai un Genādijam Konviseram par palīdzību *L. pneumophila* izolēšanā, kultivēšanā un serogrupu noteikšanā. Vēlos pateikties Laurai Alksnei par MALDI-TOF MS izmantošanu *L. pneumophila* identifikācijā, kā arī par konsultācijām un palīdzību datu apstrādē. Izsaku pateicību Jūlijai Trofimovai par ieteikumiem un konsultācijām SBT metodes izpildes laikā. Pateicos Artjomam Mališevam par palīdzēšanu PCR amplifikācijas produktu iegūšanā.

## Literatūras saraksts

1. Amodeo M.R., Murdoch D.R., Pithie A.D. 2010. Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* and *Legionella pneumophila*: comparison of clinical features, host-related risk factors, and outcomes. – *Clinical Microbiology and Infection*, 16(9): 1405 – 1407.
2. Anonīms 1998. Latvijas standarts LVS EN ISO 11731:1998. Ūdens kvalitāte – *Legionella* sugu noteikšana un uzskaitē, 16 lpp.
3. Arslan-Aydogdu E.O., Kimiran A. 2018. An investigation of virulence factors of *Legionella pneumophila* environmental isolates. – *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1): 189 – 199.
4. Aurell H., Farge P., Meugnier H., Gouy M., Forey F., Lina G., Vandenesch F., Etienne J., Jerraud S. 2005. Clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 cannot be distinguished by sequence analysis of two surface protein genes and three housekeeping genes. – *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1): 282 – 289.
5. Bartlett J.G. 2008. Is activity against “atypical” pathogens necessary in the treatment protocols for community-acquired pneumonia? Issues with combination therapy. – *Clinical Infectious Diseases*, 47: 232 – 236.
6. Bartram J., Chartier Y., Lee J.V., Pond K., Surman-Lee S. 2007. *Legionella* and the prevention of legionellosis. World Health Organization, 252 pp.
7. Beaute J., Zucs P., de Jong B. 2013. European Legionnaires' Disease Surveillance Network. – Legionnaires' disease in Europe, 2009-2010. – *Euro Surveillance*, 18(10): 20417.
8. Blanky M., Rodriguez-Martinez S., Halpern M., Friedler E. 2015. *Legionella pneumophila*: From potable water to treated greywater; quantification and removal during treatment. – *Science of the Total Environment*, 533: 557–565
9. Boer J.W.D., Nijhof J., Friesema I. 2006. Risk factors for sporadic community-acquired Legionnaires' disease. A 3-year national case–control study. – *Journal of the Royal Institute of Public Health*, 120: 566–571.
10. Borella P., Montagna M.T., Stampi S., Stancanelli G., Romano-Spica V., Triassi M., Marchesi I., Bargellini A., Tato D., Napoli C., Zanetti F., Leoni E., Moro M., Scaltriti S., D'Alcala G.R., Santarpia R., Boccia S. 2005. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. – *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10): 5805 – 5813.
11. Bosch T., Euser S.M., Landman F., Bruin J.P., Ijzerman E.P., W. den Boer J., Schouls L.M. 2015. Whole-genome mapping as a novel high-resolution typing tool for *Legionella pneumophila*. – *Journal of Clinical Microbiology*, 53(10): 3234 – 3238.
12. Brenner D. J., Krieg N.R., Staley J.T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition, volume two, part B. USA: Springer Science + Business Media, 1106 pp.
13. Bruker D. 2014. MALDI Biotyper Compass User Manual Revision 1. Germany: Bruker Daltonic, Inc, 270 pp.

14. Cazalet C., Rusniok C., Bruggemann H., Zidane N., Magnier A., Ma L., Tichit M., Jarraud S., Bouchier C., Vandenesch F., Kunst F., Etienne J., Glaser P., Buchrieser C. 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. – *Nature Genetics*, 36: 1165 – 1173.
15. Chasqueira M.J., Rodrigues L., Nascimento M., Ramos M., Marques T. 2014. Genetic diversity and evolutionary relationships among *Legionella pneumophila* clinical isolates, Portugal, 1987 to 2012. – *Euro Surveill*, 19(46): 1 – 7.
16. Cunha B.A. 2010. Legionnaires' disease: clinical differentiation from typical and other atypical pneumonias. – *Infectious Disease Clinics of North America*, 24: 73 – 105.
17. Declerck P. 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. – *Environmental Microbiology*, 12(3): 557 – 566.
18. Diederens B.M.W. 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. – *Journal of Infection*, 56: 1 – 12.
19. Dilger T., Melzl H., Gessner A. 2016. Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. – *Journal of Microbiological Methods*, 127: 154 – 159.
20. Dilger T., Melzl H., Gessner A. 2018. *Legionella* contamination in warm water systems: a species-level survey. – *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221: 199 – 210.
21. Ditommaso S., Giacomuzzi M., Rivera S.R.A., Zotti C.M. 2014. Does better identification of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains by Sequence-Based Typing (SBT) allow for the implementation of more effective contamination control strategies and more targeted intervention measures? – *Microchemical Journal*, 115: 126 – 129.
22. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2016. Legionnaires' Disease in Europe, 2014. Stockholm: ECDC, 30 pp.
23. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2017. Legionnaires' disease. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC, 7 pp.
24. ELDSNet (European Legionnaires' Disease Surveillance Network). 2017. European Centre for Disease Prevention and Control technical document. Operating procedures for the surveillance of travel associated Legionnaires' disease in the EU/EEA. Stockholm: ECDC, 25 pp.
25. Fraser D.W., Tsai T.R., Orenstein W., Parkin W.E., Beecham H.J., Sharrar R.G., Harris J., Mallison G.F., Martin S.M., McDade J.E., Shepard C.C., Brachman P.S. 1977. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. – *The New England Journal of Medicine*, 297: 1189 – 1197.
26. Gaia V., Casati S., Tonolla M. 2011. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. – *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 40 – 44.

27. Gaia V., Fry N.K., Afshar B., Luck P.C., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R., Harrison T.G. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. – *Journal of Microbiological Methods*, 43(5): 2047 – 2052.
28. Gomez-Valero L., Rusinok C., Buchrieser C. 2009. *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics. – *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 727 – 739.
29. Gong X., Li J., Zhang Y., Hou S., Qu P., Yang Z., Chen S. 2017. Molecular typing of *Legionella pneumophila* from air-conditioning cooling waters using *mip* gene, SBT and FAFLP methods. – *Journal of Microbiological Methods*, 139: 1 – 7.
30. Graham F.F., White P.S., Harte D.J., Kingham S.P. 2011. Changing epidemiological trends of legionellosis in New Zealand, 1979-2009. – *Epidemiology & Infection*, 140(8): 1481 – 1496.
31. Harrison T.G., Doshi N., Fry N.K., Joseph C.A. 2007. Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. – *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 78 – 85.
32. Helbig J.H., Bernander S., Castellani Pastoris M., Etienne J., Gaia V., Lauwers S., Lindsay D. Luck P.C., Marques T., Mentula S., Peeters M.F., Pelaz C., Struelens M., Uldum S.A., Wewalka G., Harrison T.G. 2002. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. – *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 21:710 – 716.
33. Hornei B., Ewig S., Exner M., Tartakovsky I., Lajoie L., Dangendorf F., Surman-Lee S., Fields B. 2007. Legionellosis. In: *Legionella and the Prevention of Legionellosis*. Bartram J., Chartier Y., Lee J. V., Pond K., Surman-Lee S. (Eds.), WHO, 1 – 27.
34. Kanatani J., Isobe J., Norimoto S., Kimata K., Mitsui C., Amemura-Maekawa J., Kura F., Sata T., Watahiki M. 2017. Prevalence of *Legionella* species isolated from shower water in public bath facilities in Toyama Prefecture, Japan. – *Journal of Infection and Chemotherapy*, 23: 265 – 270.
35. Khodr A., Kay E., Gomez-Valero L., Ginevra C., Doublet P., Buchrieser C., Jarraud S. 2016. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. – *Infection, Genetics and Evolution*, 43: 108 – 122.
36. Koster W., Egli T. Ashbolt N., Botzenhart K., Burlion N., Endo T., Grimont P., Guillot E., Mobilat C., Newport L., Niemi M., Payment P., Prescott A., Renaud P., Rust A. 2003. – Analytical methods for microbiological water quality testing. In: *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*. Dufour A., Snozzi M., Koster W., Bartram J., Ronchi E., Fewtrell L. (Eds.), OECD Publications, 237 – 292.
37. Kozak-Muiznieks N., Lucas C.E., Brown E., Pondo T., Taylor T.H., Frace M., Miskowski D., Winchell J.M. 2014. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. – *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1): 201 – 211.
38. Lediņš V. 2007. Ūdensapgāde un kanalizācija. Rīga: RTU izdevniecība, 209 lpp.

39. Levesque S., Lalancette C., Bernard K., Pacheco A.L., Dion R., Longtin J., Trembly C. 2016. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates in the Province of Quebec from 2005 to 2015. – *PLOS ONE Journal*, 11(10): 1 – 12.
40. Lowry P.W., Tompkins L.S. 1993. Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. – *American Journal of Infection Control*, 21(1): 21 – 27.
41. Madigan M.T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms, eleventh edition. USA: Pearson/ Benjamin Cummings, 987 pp.
42. Mengue L., Richard F.J., Caubet Y., Rolland S., Hechard Y., Samba-Louaka A. 2017. *Legionella pneumophila* decreases velocity of *Acanthamoeba castellanii*. – *Experimental Parasitology*, 183: 124 – 127.
43. Mentasti M., Underwood A., Lück C., Kozak-Muiznieks N.A., Harrison T.G., Fry N.K. 2014. Extension of the *Legionella pneumophila* sequence-based typing scheme to include strains carrying a variant of the *N*-acylneuraminase cytidylyltransferase gene. – *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (7): 435 – 441.
44. Messonnier N., Breysse P. 2017. Developing a water management program to reduce *Legionella* growth & spread in buildings. A practical guide to implementing industry standards. Centers for Disease Control and Prevention. CDC, 32 pp.
45. Ministru kabineta noteikumi Nr. 332. 2015. Noteikumi par Latvijas būvnormatīvu LBN 221-15 „Ēku iekšējais ūdensvads un kanalizācija”. Rīga: “Latvijas Vēstnesis”, 113 lpp.
46. Moliner C., Ginevra C., Jarraud S., Flaudrops C., Bedotto M., Couderc C., Etienne J., Fournier P.E. 2010. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. – *Journal of Medical Microbiology*, 59: 273–284.
47. Murdoch D.R. 2003. Diagnosis of *Legionella* Infection. – *Clinical Infectious Diseases*, 36: 64 – 9.
48. Nomura F. 2015. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. – *Biochimica et Biophysica Acta*, 1854: 528–537.
49. Phin N., Parry-Ford F., Harrison T., Stagg H.R., Zhang N., Kumar K., Lortholary O., Zumla A., Abubakar I. 2014. Epidemiology and clinical management of Legionnaires’ disease. – *The Lancet Infectious Diseases*, 14: 1011 – 1021.
50. Qin T., Yan G., Ren H., Zhou H., Wang H., Xu Y., Zhao M., Guan H., Li M., Shao Z. 2013. High prevalence, genetic diversity and intracellular growth ability of *Legionella* in hot spring environments. – *PLOS ONE Journal*, 8(3): 1 – 11.
51. Rodriguez-Sanchez B., Marin M., Sanchez-Carrillo C., Cercenado E., Ruiz A., Rodriguez-Creixems M., Bouza E. 2014. Improvement of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of difficult-to-identify bacteria and its impact in the workflow of a clinical microbiology laboratory. – *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79: 1 – 6.

52. Sabat A.J., Budimir A., Nashev D., Sa-Leao R., Van Dijn J.M., Laurent F., Grundmann H., Friedrich A.W. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. – *Euro Surveillance*, 18(4): 1 – 15.
53. Sanchez-Buso L., Coscolla M., Palero F., Camaro M.L., Gimeno A., Moreno P., Escribano I., Perezagua M.M.L., Colomina J., Vanaclocha H., Gonzalez-Candelas F. 2015. Geographical and temporal structures of *Legionella pneumophila* sequence types in Comunitat Valenciana (Spain), 1998 to 2013. – *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20): 7106 – 7113.
54. Sanchez-Buso L., Olmos M.P., Camaro M.L., Adrian F., Calafat J.M., Gonzalez-Candelas F. 2015. Phylogenetic analysis of environmental *Legionella pneumophila* isolates from endemic area (Alcoy, Spain). – *Infection, Genetics and Evolution*, 30: 45 – 54.
55. Sanders E.R. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. – *Journal of Visualized Experiments*, 63: 1 – 18.
56. Santos T., Capelo J.L., Santos H.M., Oliveira I., Marinho C., Goncalves A., Araújo J.E., Poeta P., Igrejas G. 2015. Use of MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting to characterize *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. – *Journal of Proteomics*, 127: 321 – 331.
57. Scholz C.F.P., Jensen A., Lomholt H.B., Bruggemann H., Kilian M. 2014. A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of *Propionibacterium acnes* *In vivo*. – *PLOS ONE Journal*, 9(8): 1 – 8.
58. Setiani B.E., Elegado F.B., Perez M.T.M., Mabesa R.C., Dizon E.I., Sevilla C.C. 2015. API *Listeria* rapid kit for confirmatory phenotypic conventional biochemical test of the prevalence *Listeria monocytogenes* in selected meat and meat products. – *Procedia Food Science*, 3: 445 – 452.
59. Shevchuk O., Jager J., Steinert M. 2011. Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. – *Frontiers in Microbiology*, 2(74):1 – 12.
60. Sibley C.D., Peirano G., Church D.L. 2012. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. – *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 505 – 521.
61. Staškeviča A. 2016. *Legionella pneumophila* identifikācija, izmantojot MALDI-TOF MS un SBT metodes. Bakalaura darbs. Rīga, LU Bioloģijas fakultāte Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedra, 60 lpp.
62. Subbaram K., Kannan H., Masadeh M. M. A. 2017. Isolation, identification, characterization and antibiotic sensitivity profile of pathogenic *Legionella pneumophila* isolates from different water sources. – *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5): 411 – 415.
63. Surman-Lee S., Fields B., Hornei B., Ewig S., Exner M., Tartakovsky I., Lajoie L., Dangendorf F., Bentham R., Cabanes P.A., Fourrier P., Trouvet T., Wallet F. 2007. Legionellosis. In: *Legionella and the Prevention of Legionellosis*. Bartram J., Chartier Y., Lee J. V., Pond K., Surman-Lee S. (Eds.), WHO, 29 – 38.

64. Welker M., Moore E.R.B. 2011. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. – *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 2 – 11.
65. Woodhead M. 2002. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. – *European Respiratory Journal*, 36: 20 – 27.
66. Zbikowska E., Kletkiewicz H., Walczak M., Burkowska A. 2014. Coexistence of *Legionella pneumophila* bacteria and free-living amoebae in lakes serving as a cooling system of a power plant. – *Water, Air, and Soil Pollution*, 225 (8): 2066.

# Pielikumi

*Legionella pneumophila* izplatība un sekvenču tipu daudzveidība pētījumā iesaistītajās viesnīcās. To saistība ar ēkas un ūdensapgādes sistēmas parametriem.

Prevalence and sequence type diversity of *Legionella pneumophila* in water supply systems hotels involved in the study. Relevance of the building and water supplies parameter.

Viesnīcas Nr.	Izolātu skaits	Serogrupa	Sekvenču tips	Min. t° C	Max. t° C	Ēkas uzbūvēšanas gads	Pilsēta	Ūdengūtve P/V
1.	0	-	-	27°	49°	1873	Rīga	V
2.	5	SG 3 SG 6	2579 68	27°	48°	1978	Rīga	P
3.	0	-	-	29°	48°	2015	Rīga	V
4.	3	SG 3	292	38°	56°	1995	Rīga	V
5.	4	SG 1	9	41°	48°	1986	Rīga	P
6.	0	-	-	34°	56°	1820	Preiļi	P
7.	2	SG 3	338	20°	42°	2009	Preiļi	P
8.	0	-	-	27°	51°	2012	Rīga	V
9.	0	-	-	27°	62°	2007	Rīga	V
10.	4	SG 2	1354	33°	45°	1886	Rīga	P
11.	6	SG 3	1104	34°	54°	1996	Rīga	P
12.	0	-	-	27°	54°	2008	Rīga	P
13.	0	-	-	24°	63°	2010	Rīga	P
14.	6	SG 3	366	34°	51°	1991	Rēzekne	P
15.	0	-	-	27°	52°	2016	Rēzekne	P
16.	4	SG 3	1104 338	25°	41°	2008	Rīga	V
17.	4	SG 9	2580 1354	27°	47°	2011	Rīga	V
18.	0	-	-	31°	54°	2011	Rīga	V
19.	0	-	-	32°	47°	2007	Rīga	V
20.	6	SG 3	366	28°	44°	1999	Rīga	V
21.	1	SG 3	93	30°	60°	2000	Daugavpils	P
22.	3	SG 3 SG 6	787 698	35°	47°	1970	Daugavpils	P
23.	6	SG 3	1104	30°	57°	2010	Rīga	P
24.	0	-	-	32°	47°	2012	Rīga	P
25.	5	SG 2 SG 3	2002 338	25°	58°	2007	Bauska	P
26.	0	-	-	25°	38°	2016	Bauska	P
27.	0	-	-	23°	55°	2010	Bauska	P
28.	5	<i>L. rubrilucens</i>	-	27°	44°	1986	Jelgava	P
29.	0	-	-	23°	58°	1890	Sigulda	P
30.	1	<i>L. rubrilucens</i>	-	42°	60°	1980	Līgatne	P
31.	6	<i>L. rubrilucens</i> SG 3	- 1324 87	39°	46°	1979	Jūrmala	P
32.	6	SG 3	2581	30°	49°	1988	Tukums	P
33.	4	SG 1	170 62	39°	47°	2005	Tukums	P
34.	6	SG 3	461	22°	58°	1976	Talsi	P
35.	2	SG 1 SG 2	170 2299	32°	44°	1985	Madona	P
36.	3	SG 1 SG 2	2582 1409	29°	46°	2001	Valmiera	P

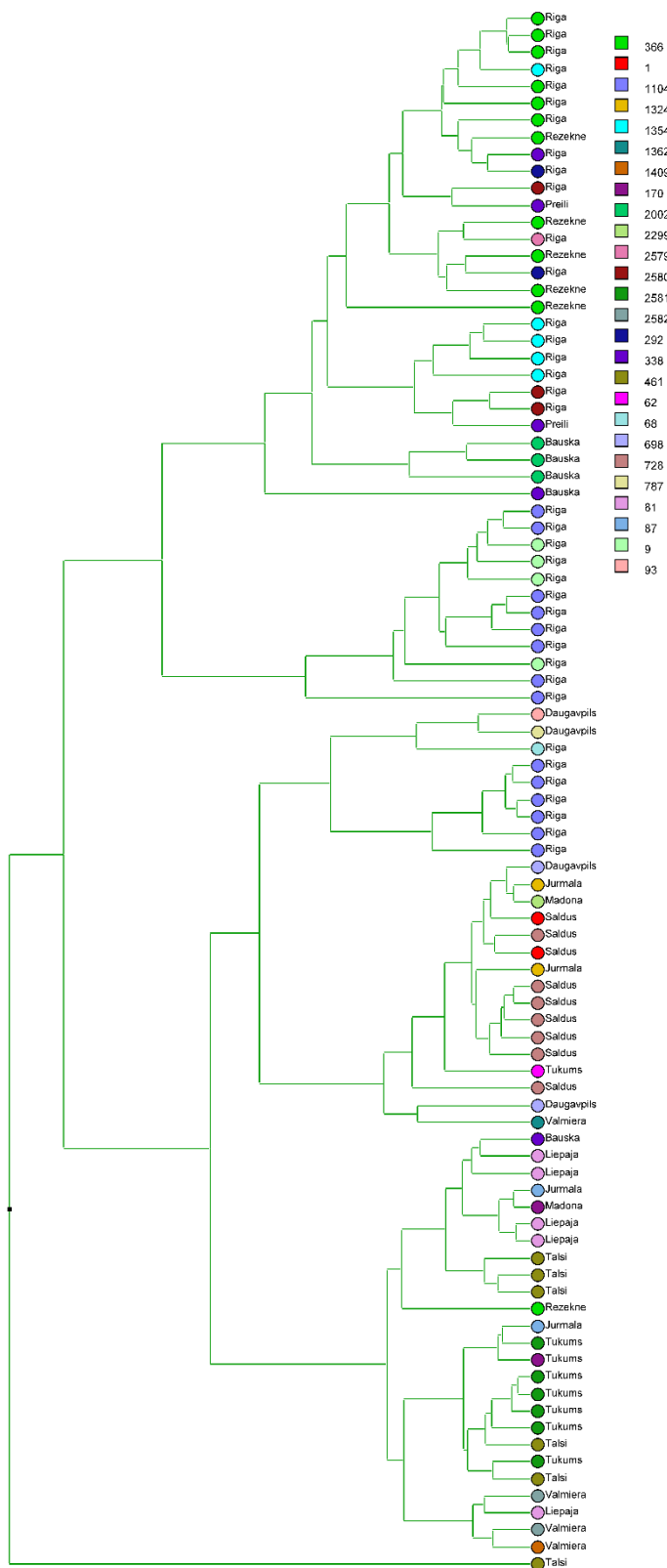
1. pielikuma turpinājums

Viesnīcas Nr.	Izolātu skaits	Serogrūpa	Sekvenču tips	Min. t° C	Max. t° C	Ēkas uzbūvēšanas gads	Pilsēta	Ūdensgūtnes P/V
37.	2	<i>L. rubrilucens</i> SG 2	- 1362	48°	51°	1994	Valmiera	P
38.	6	SG 1 SG 3	1 728	28°	51°	1987	Saldus	P
39.	5	SG 3	81	21°	48°	2000	Liepāja	P
40.	3	SG 1 SG 3	1 728	32°	62°	1989	Saldus	P

\*SG – serogrūpa; P – pazemes; V – virszemes

*L. pneumophila* izolātu UPGMA dendrogramma, izmantojot MALDI-TOF MS iegūtos masas spektrus. To sadalījums atkarībā no izolēšanas pilsētas un sekvenču tipa.

UPGMA dendrogramm of *L. pneumophila* isolates obtained by MALDI-TOF MS mass spectra. Distribution depending of isolation city and sequence type.



Maģistra darbs “*Legionella pneumophila* izplatība un sekvenču tipu daudzveidība Latvijas viesnīcu ūdensapgādes sistēmās” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Andžela Staškeviča

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr.biol., asoc. prof. Vizma Nikolajeva

Recenzents: Dr.biol., asoc. prof. Nils Rostoks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē

Lietvede: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

28.05.2018.

Komisijas sekretārs: