

© Borgis

Legionella: prawo i rekomendacje w Polsce i na świecie

*Mariusz Żak¹, Piotr Zaborowski²

¹Klinika Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ordynator Oddziału: p.o. Ordynatora dr n. med. Maria Olszyńska-Krowicka

²Klinika Chorób Wewnętrznych, Gastroenterologii i Hepatologii, Szpital Uniwersytecki,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Kierownik: prof. dr hab. med. Piotr Zaborowski

LEGIONELLA: LAW AND RECOMMENDATIONS IN POLAND AND IN THE WORLD

Summary

Legionella sp. is an opportunist human pathogen. The bacteria is ubiquitous and displays tropism to artificial water systems. In Poland five years ago new regulations concerning quality of drinking water have been enforced. The regulations order to test warm water against *Legionella* sp. Awareness about the problem is rising systematically but national guidelines about prevention of *Legionella* infections are still not available in Poland. Quantitative identification of *Legionella* sp. with microbiological method based on cultivation is routinely used for infection risk assessment. This approach has many limitations and single water analysis with this method do not provide comprehensive results. European guidelines formed by EWGLI and WHO, as well as national guidelines of many developed countries place emphasis on the need for creating risk assessment and management plans for drinking water distribution systems and cooling towers. Detection of *Legionella* sp. is also a complex issue, several methods has been developed and the interpretation of result requires experienced microbiologist. The new methods take advantage of classic microbiological methods as well as molecular biology and put emphasis on ability to discriminate between viable and not viable cells as well as viable but viable not cultivable. Reduction of the time required for analysis is also significant because the microbiological cultivation last up to 14 days. It is also crucial to popularize the issue, because the systematic control of installations is the most effective way to minimize the risk of infection.

Key words: Legionellosis, risk assessment, water supply systems

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA BAKTERII Z RODZAJU *LEGIONELLA*

Bakterie z rodzaju *Legionella* są Gram-ujemnymi, tlenowymi pałeczkami powszechnie występującymi w środowisku. Rodzaj *Legionella* został ustanowiony w roku 1979, trzy lata po epidemii nietypowego zapalenia płuc wśród uczestników konwentu Legionu Amerykańskiego, w wyniku której zmarły 34 osoby (1). Głównym naturalnym rezerwuarem pałeczek *Legionella* są wszelkiego rodzaju środowiska wodne (2). Cykl życiowy tych bakterii składa się z dwóch faz: troficznej, zachodzącej w komórkach żernych organizmów eukariotycznych i infekcyjnej, w której bakterie przeżywają w środowisku wodnym (3). Po uwolnieniu do wody mikroorganizmy te są w stanie przeżyć do roku i tworzyć wraz z florą towarzyszącą biofilm (4, 5).

Dane epidemiologiczne pozwoliły na wyodrębnienie czynników ryzyka sprzyjających zakażeniu tymi bakteriami. Należą do nich: wiek, płeć, palenie papierosów oraz upośledzone działanie systemu odpornościowego. Grupą ryzyka są osoby z zaburzeniami odporności, im-

munosupresją, niewydolnością oddechową wymagające leczenia respiratorem oraz pacjenci po przeszczepach. Szczególnie podatni na infekcje są mężczyźni po 50. roku życia, palący papierosy, często podróżujący, korzystający z masażu wodnych, urządzeń do hydroterapii itp. Śmiertelność zdiagnozowanych przypadków legionellozy sięga 15-20% (6), a w przypadkach nieleczonych dochodzi do 50% (7).

Skuteczne leczenie legionellozy wymaga szybkiej interwencji medycznej, u podstawy której powinno znajdować się prawidłowe rozpoznanie. Obecnie w diagnostyce legionellozy złotym standardem jest hodowla mikrobiologiczna. W celu wykonania posiewu wykorzystuje się następujące rodzaje materiałów klinicznych: płwocina, BAL (ang. *broncho-alveolar lavage fluid*), aspirat z tchawicy, płyn opłucnowy, tkanka płucna lub krew (7).

W diagnostyce tej jednostki chorobowej zostały wykorzystane również inne metody diagnostyczne, są nimi:

- reakcja *real-time PCR* (8),
- oznaczanie miana przeciwciał w surowicy (9),

- oznaczanie obecności antygeny w moczu metodami immunochromatograficznymi oraz immunoenzymatycznymi (10, 11),
- bezpośrednia identyfikacja pałeczek *Legionella* w płynach ustrojowych i tkankach z wykorzystaniem wyznakowanych fluorescencyjnie specyficznych przeciwciał (12).

W Polsce według danych publikowanych przez PZN-NIZP w 2006 r. zgłoszono 89 przypadków choroby legionistów (z czego 76 przypadków stwierdzono w województwie mazowieckim), a w roku następnym odnotowano 28 przypadków. Według danych epidemiologicznych publikowanych przez WHO zapadalność w innych krajach na legionellozę w tym okresie była ponad dwadzieścia razy większa (13, 14). Powodem tych rozbieżności są niedoszacowane dane epidemiologiczne w Polsce. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy może być niewielka ilość laboratoriów posiadających doświadczenie w wykonywaniu badań diagnostycznych w kierunku legionellozy oraz mała ilość badań zlecanych w tym kierunku.

REGULACJE PRAWNE DOTYCZĄCE LEGIONELLA SP.

W prawie polskim choroba legionistów została zakwalifikowana jako choroba zakaźna i jest wyszczególniona w ustawie z dnia 5 grudnia 2008 r. z późniejszymi zmianami o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi. Dziesiąta rewizja międzynarodowej klasyfikacji chorób i problemów zdrowotnych nakazuje rejestrację przypadków tej choroby jako choroby legionistów – A48.1 lub jako choroby legionistów bez objawów zapalenia płuc (gorączka Pontiac) – A48.2.

Problem związany z pałeczkami *Legionella* wiąże się głównie z ich obecnością w różnego rodzaju instalacjach wodnych. Główne zagrożenie związane jest ze skolonizowanymi systemami wody pitnej i otwartymi systemami wody chłodniczej. Polskim aktem prawnym, który podejmuje ten problem w odniesieniu do wody pitnej jest rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. z późniejszymi zmianami w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. W paragrafie 8.1 wskazane są cztery punkty instalacji ciepłej wody, z których powinna być pobrana ciepła woda do badania w kierunku obecności bakterii *Legionella* sp., są nimi:

1. wypływ ze zbiornika ciepłej wody lub najbliższy punkt czerpalny;
2. punkt czerpalny najdalej położony od zbiornika ciepłej wody;
3. miejsce powrotu wody do podgrzewacza;
4. wybrane punkty pośrednie, których liczba zależy od wielkości systemu.

Powszechne jest przekonanie, że problem pałeczek *Legionella* w wodzie przeznaczonej do spożycia dotyczy jedynie instalacji ciepłej wody. Znalazło to odzwierciedlenie w cytowanym wcześniej rozporządzeniu, które w swych zapisach nie zwraca uwagi na możliwość kolonizacji również instalacji zimnej wody. Rekomendacje innych krajów także nie do końca zauważają ten problem. Badania prowadzone na 4 niezależnych instalacjach budynków służby zdrowia w Niemczech wykazały, że

dalsze odcinki instalacji zimnej wody były skażone tymi mikroorganizmami w większym stopniu niż analogiczne odcinki ciepłej wody (15). Temperatura zimnej wody nie powinna przekraczać 20°C, natomiast ciepła woda powinna mieć co najmniej 55°C. Taki reżim temperaturowy uznawany jest za podstawowy sposób zapobiegania kolonizacji instalacji pałeczkami *Legionella*. Cytowane powyżej badania wykazały, że 28% badanych próbek wody o temperaturze < 15°C (w momencie pobierania próbek) zawierało pałeczki *Legionella*. W przypadku zimnej wody w okresie długotrwałe utrzymujących się wysokich temperatur w sezonie letnim zachowanie temperatury wody poniżej 20°C nie zawsze jest możliwe. Wady konstrukcyjne oraz niewłaściwie przeprowadzone prace konserwatorskie instalacji skutkujące złym odizolowaniem rur zimnej i ciepłej wody również mogą sprawiać, że w pewnych rejonach sieci powstaną warunki temperaturowe sprzyjające namnażaniu się tych mikroorganizmów. Analogiczna sytuacja może mieć miejsce na skutek samoogrzewania się zimnej wody w instalacji w wyniku małej cyrkulacji będącej efektem niskiego zużycia np. w czasie nocnym. Dlatego należy uznać, że temperatura zimnej wody poniżej 20°C nie wyklucza obecności tych bakterii w wodzie, a jedynie może stanowić czynnik zmniejszający ryzyko.

Zgodnie z wymaganiami mikrobiologicznymi, jakim powinna odpowiadać ciepła woda, zdefiniowanymi w punkcie D załącznika nr 1 do polskiego rozporządzenia, ilość jednostek tworzących kolonie *Legionella* sp. w 100 ml ciepłej wody nie powinna przekraczać 100 z zastrzeżeniem, że w zakładach opieki zdrowotnej zamkniętej na oddziałach, których przebywają pacjenci o obniżonej odporności, w tym objęci leczeniem immunosupresyjnym, pałeczki *Legionella* sp. powinny być nieobecne w próbce o objętości 1000 ml. W przypadku ilości powyżej 100 jtk/100 ml dla budynków użyteczności publicznej rozporządzenie w załączniku nr 7 stopniuje ryzyko ze strony instalacji i określa działania interwencyjne, jakim należy poddać sieć wraz z częstotliwością następnym badań wody w tym kierunku. Wartością graniczną powyżej której ryzyko ocenia się na bardzo wysokie, jest 10000 jtk/100 ml.

Problem ten pośrednio został również zauważony w Rozporządzeniu Ministra Infrastruktury z dnia 12 kwietnia 2002 r. w sprawie warunków technicznych, jakim powinny odpowiadać budynki i ich usytuowanie z późniejszymi zmianami. W rozporządzeniu zmieniającym z dnia 12 marca 2009 r. znalazł się zapis dotyczący warunków technicznych, nakazujący takie konstruowanie sieci, aby reżim temperaturowy ciepłej wody w zakresie 55-60°C mógł być zachowany. Wprowadzono również do rozporządzenia zapis w § 120 ust. 2a mówiący, że „instalacja wodociągowa ciepłej wody powinna umożliwiać przeprowadzanie ciągłej lub okresowej dezynfekcji metodą chemiczną lub fizyczną (w tym okresowe stosowanie metody dezynfekcji cieplnej), bez obniżania trwałości instalacji i zastosowanych w niej wyrobów. Do przeprowadzenia dezynfekcji cieplnej niezbędne jest zapewnienie uzyskania w punktach czerpalnych tempe-

ratury wody nie niższej niż 70°C i nie wyższej niż 80°C”. Rozporządzenie to, mimo że nie wymienia bezpośrednio problemu, jakim jest kolonizacja instalacji pałeczkami *Legionella* sp., wprowadza regulacje, których stosowanie daje realne zmniejszenie ryzyka kolonizacji tych instalacji omawianymi mikroorganizmami, ponieważ utrzymanie odpowiedniej temperatury w całej sieci i przeprowadzanie okresowej dezynfekcji termicznej jest bardzo skutecznym sposobem zapobiegającym kolonizacji. Wymogi te dają również podstawę prawną do realizacji zaleceń zawartych w załączniku nr 7 rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, dotyczących dezynfekcji termicznej oraz chemicznej, która powinna być przeprowadzana w następujących sytuacjach:

1. w przypadku wyłączenia instalacji wodociągowej na dłużej niż 1 miesiąc;
2. jeśli instalacja lub jej część została wymieniona lub zabiegi konserwacyjne mogły prowadzić do jej zanieczyszczenia;
3. w instalacji wodociągowej w miejscu przebywania osób, u których wystąpiło podejrzenie lub stwierdzono zachorowanie na legionellozę.

W Polsce temat ryzyka dla zdrowia publicznego ze strony pałeczek *Legionella* sp. nie został wystarczająco spopularyzowany. Jedną z przyczyn niewielkiej świadomości problemu jest brak narodowych wytycznych dotyczących sposobu zarządzania ryzykiem oraz szczegółowych wytycznych dotyczących zarządzania instalacjami i urządzeniami mogącymi być potencjalnym źródłem infekcji tymi bakteriami. Jedną z publikacji poświęconych temu tematowi jest krótkie opracowanie Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny na temat zasad kontroli i zapobiegania namnażaniu się pałeczek *Legionella* w instalacjach i urządzeniach wytwarzających aerozol wodno-powietrzny w obiektach służby zdrowia (16). Publikacja ta przedstawia również zalecenia na temat ilości pałeczek *Legionella* sp. w wodzie otwartych systemów chłodniczych. Jako dodatkowy wskaźnik jakości mikrobiologicznej wody w wannie wieży chłodniczej wskazana jest ogólna liczba bakterii tlenowych. Autorzy sygnalizują również ogólne zasady postępowania w przypadku takich urządzeń, jak unity dentystryczne, inhalatory, nawilżacze powietrza, wanny z hydromasażem oraz klimatyzacja.

W krajach rozwiniętych zagadnieniu temu zostało poświęcone dużo więcej uwagi niż w Polsce. Wypracowano obiektywne schematy postępowania w celu minimalizacji ryzyka ze strony pałeczek *Legionella* bytujących w sztucznych systemach wodnych. Podstawowym dokumentem w bardzo szczegółowy sposób instruującym, jak należy minimalizować ryzyko infekcji są wytyczne Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) pt.: *Legionella and the prevention of legionellosis* (14). Publikacja ta we wstępie opisuje legionellozę jako jednostkę chorobową, jej epidemiologię, biologię oraz metody leczenia. Zwraca uwagę na wpływ obecności biofilmu na ryzyko kolonizacji instalacji tymi patogenami. Wyszczególnia czynniki ryzyka sprzyjające jego formowaniu się. W pu-

blikacji główny nacisk położony jest na minimalizowanie ryzyka poprzez wprowadzenie systemu kontroli dopasowanego indywidualnie do każdej instalacji mogącej stanowić ryzyko zakażenia. Budowanie takiego systemu powinno być przeprowadzane przez kompetentne w tej dziedzinie osoby, w oparciu o szczegółowe i aktualne plany instalacji. Jest to niezbędne do prawidłowego zdefiniowania czynników ryzyka i miejsc, które należy poddać szczególnej kontroli. Pozytywne efekty wdrożenia takiego systemu będą obserwowane jedynie w przypadku sumiennego przestrzegania opracowanych procedur przez systematycznie szkolony i kontrolowany personel. Kolejne rozdziały dedykowane są otwartym systemom wody chłodniczej, budynkom służby zdrowia, hotelom, statkom, basenom, gorącym źródłom. Kompendium to zawiera również cenne informacje na temat diagnostyki pałeczek *Legionella* sp.

W Europie, w roku 1986 została powołana organizacja zajmująca się problematyką infekcji bakteriami *Legionella* o nazwie The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI). Głównym celem EWGLI jest poszerzanie wiedzy na temat epidemiologicznych i mikrobiologicznych aspektów legionellozy. W ramach EWGLI ustanowiono The European Surveillance Scheme for Travel Associated Legionnaires' Disease (EWGLINET) z centralą znajdującą się w Londynie w Health Protection Agency – Centre for Infections. Obecnie EWGLINET przekształcono w ELDSNet (European Legionnaires' Disease Surveillance Network), którego koordynatorem jest ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Misją ELDSNet jest identyfikowanie czynników ryzyka, wspieranie działań prewencyjnych oraz monitorowanie trendów epidemiologicznych. Sieć ta obejmuje 27 krajów członkowskich Unii Europejskiej oraz Islandię i Norwegię. Ośrodki bezpośrednio współpracujące z ELDSNet i wykonujące obowiązki wynikające z uczestnictwa w programie są wyznaczane przez Ministerstwa Zdrowia poszczególnych państw. Polska jest reprezentowana przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Narodowy Instytut Leków oraz Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc.

EWGLI w roku 2005 opublikowała wytyczne dotyczące kontroli i prewencji legionellozy związanej z podróżowaniem pt.: *European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease* (17), których Polska jest sygnatariuszem. Wytyczne te stanowią bardzo bogate źródło informacji na temat problematyki związanej z pałeczkami *Legionella*. Dokument ten opisuje procedury zgłaszania i reagowania na przypadki legionellozy.

Na samym wstępie publikacji autorzy przekonują o opłacalności skutecznej kontroli instalacji w kierunku pałeczek *Legionella*, ponieważ znane były przypadki wysokich odszkodowań przyznawanych przez sądy na rzecz osób, które zachorowały na legionellozę w hotelach. Również informacje o przypadkach tej choroby często rozchodzą się szerokim echem w mediach, co jest najgorszą z możliwych reklam dla danego hotelu.

Wytyczne opisują sposób i harmonogram raportowania o przypadkach legionellozy, które powinny zostać

zachowane przez instytucje wyznaczone do współpracy z EWGLI. Duża część wytycznych jest poświęcona technicznym wskazówkom mającym na celu zapobieganie kolonizacji instalacji tymi patogenami, jak i minimalizowanie ryzyka poprzez utrzymywanie ilości komórek bakterii na dopuszczalnym niskim poziomie.

Wszystkie działania kontrolne i prewencyjne powinny być wprowadzane w oparciu o opracowany system zarządzania ryzykiem dla konkretnej instalacji. Podstawą tego systemu powinna być identyfikacja wszystkich czynników ryzyka i opracowany sposób kontroli. Opracowanie to zawiera przykładowe listy czynności sprawdzających, jakie należy wykonać dla różnego rodzaju instalacji w celu oceny i minimalizacji ryzyka. Szeroko opisuje różnego rodzaju środki chemiczne służące do dezynfekcji wody pitnej, jak również sposoby dezynfekcji fizycznej. W części tej przedstawione są wady i zalety poszczególnych sposobów uzdatniania wody. Rozdział ten może być szczególnie interesujący dla osób, w kompetencji których leży wybór sposobu zapobiegania kolonizacji danej instalacji.

Ponadto, na stronie internetowej ECDC podawane są do wiadomości publicznej nazwy hoteli, w których stwierdzono przypadki legionellozy, a które nie zgłosiły wprowadzenia odpowiednich działań interwencyjnych lub działania te zostały uznane za niewystarczające, przez co nie zmniejszają ryzyka zaistnienia kolejnych infekcji. Lista ta dotyczy tylko hoteli znajdujących się w krajach, które sygnowały wytyczne sformułowane przez EWGLI.

W Europie wiele krajów posiada narodowe wytyczne poświęcone problemowi związanemu z obecnością pałeczek *Legionella* sp. w różnego rodzaju instalacjach wodnych. Przykładem takiego opracowania są angielskie wytyczne pt.: Legionnaires' disease: The control of legionella bacteria in water systems. Dokument ten, opracowany przez Health and Safety Commission zawiera wytyczne bogate w informacje dotyczące oceny ryzyka, zarządzania nim oraz wiele czysto technicznych wskazań dotyczących eksploatacji instalacji wodnych. Są one opracowane w podobnym schemacie jak publikacja EWGLI, uzupełnione o normy prawne Wielkiej Brytanii. Podobne opracowania zostały przygotowane przez władze Belgii, Czech, Danii, Niemiec, Francji, Irlandii, Włoch, Łotwy, Malty, Norwegii, Portugalii, Hiszpanii oraz Szwajcarii. Opracowaniem również zasługującym na uwagę są wytyczne australijskie dotyczące otwartych systemów wody chłodniczej w odniesieniu do ryzyka związanego z obecnością w nich pałeczek *Legionella*, pt.: A guide to developing risk management plans for cooling tower systems. W publikacji tej opisane są różne typy wież chłodniczych, co jest szczególnie cenne przy identyfikacji miejsc, na które trzeba zwrócić szczególną uwagę przy ich inspekcji.

Rola takich wytycznych jest niezwykle ważna, ponieważ stanowią one obiektywne źródło informacji na temat zagrożenia tymi mikroorganizmami. Opracowania takie, spójne z normami prawnymi danego kraju, stanowią podstawowe źródło informacji dla osób odpowiadających za prawidłowe funkcjonowanie instalacji tego typu i nie-

wątpliwie przyczyniają się do zwiększenia świadomości społecznej na temat tego zagrożenia. Wspólnym mianownikiem dla cytowanych wytycznych jest duży nacisk na minimalizowanie zagrożenia ze strony różnego rodzaju instalacji, poprzez opracowywanie planów zarządzania ryzykiem (PZR). Ich opracowywanie w ogólnym ujęciu powinno mieć następujące etapy:

- **Wyznaczenie zespołu do opracowania planu zarządzania ryzykiem.** W skład takiego zespołu powinna wchodzić osoba mająca wykształcenie techniczne w zakresie budowy i działania danej instalacji oraz osoba z doświadczeniem mikrobiologicznym.
- **Identyfikacja zagrożenia ze strony instalacji będącej celem zainteresowania.** Zespół na podstawie planów instalacji oraz jej inspekcji identyfikuje wszystkie punkty mogące sprzyjać rozwojowi pałeczek *Legionella*. Mogą być nimi ślepe odcinki instalacji ciepłej wody, niewłaściwa separacja rur doprowadzających ciepłą i zimną wodę, zbyt długie odcinki instalacji pozbawione cyrkulacji, niewłaściwe rozmieszczenie termostatycznych zaworów mieszających, obecność biofilmu i osadów, temperatura ciepłej wody poniżej 50°C, temperatura zimnej wody powyżej 20°C, obecność korozji oraz kamienia, rodzaj materiału, z jakiego wykonana jest instalacja.
- **Identyfikacja zagrożenia ze strony instalacji zewnętrznych.** Należy sprawdzić, czy w najbliższym sąsiedztwie budynku lub wieży chłodniczej, dla której jest opracowywany PZR nie znajdują się inne wieże chłodnicze mogące być źródłem skażenia wody lub czy te wieże nie stoją w pobliżu przewodów wentylacyjnych instalacji będącej w zainteresowaniu.
- **Ocena podatności na infekcję ze strony pracowników oraz użytkowników instalacji.** Należy pamiętać, że osoby starsze, będące w immunosupresji, z obniżoną odpornością cechuje większa podatność na infekcję patogenami oportunistycznymi, jakimi są pałeczki *Legionella*. W przypadku hoteli obserwuje się zwiększone korzystanie z ich usług przez osoby starsze, zazwyczaj bezpośrednio po sezonie wakacyjnym.
- **Uwzględnianie zdarzeń wewnętrznych i zewnętrznych oraz okresowości działania instalacji.** Przy analizie ryzyka dla wież chłodniczych należy uwzględnić prace ziemne wykonywane w sąsiedztwie wieży, ponieważ ziemia jest naturalnym źródłem tych mikroorganizmów, które wraz z pyłami mogą zanieczyścić wodę w wannie wieży chłodniczej. Wszelkiego rodzaju awarie instalacji, a w ich konsekwencji prace naprawcze, również mogą być przyczyną skażenia instalacji. W przypadku instalacji w budynkach typu hotele występują okresowe zmiany w jej eksploatacji. Bywa, że poza sezonem całe skrzydła są wyłączane okresowo z użytku, co zmniejsza cyrkulację wody, a przez to utrudnia zachowanie reżimu temperaturowego.

- **Przeprowadzenie czynności zmniejszających ryzyko.** Takimi czynnościami będzie usunięcie ślepych odcinków instalacji, poprawienie izolacji pionów ciepłej i zimnej wody, zamontowanie samopróżniających się głowic natrysków, czyszczenie zbiorników na ciepłą wodę, usunięcie zbędnych perlatorów, wymiana silnie skorodowanych elementów, zamontowanie skuteczniejszych odkraplaczy w wieżach chłodniczych itp.
- **Opracowanie i wdrożenie procedur monitorujących.** Na tym etapie należy wyznaczyć osoby do monitorowania temperatury wody w sieci w wyznaczonych miejscach w określonych przedziałach czasowych. Wyznaczyć kalendarz dotyczący czyszczenia, dezynfekcji, przegrzewania instalacji i jej elementów. W procedurach należy uwzględnić okresowe spuszczenie wody z punktów czerpalnych, które są rzadziej używane. Należy wyznaczyć częstotliwość badań wody w kierunku obecności pałeczek *Legionella*, jak również badań monitorujących stężenie biocydów w wodzie. Opracować sposób raportowania i archiwizowania pomiarów i czynności.

Rolą badań wody w kierunku obecności pałeczek *Legionella* jest w pierwszej kolejności dopuszczenie wody i instalacji do użytku. Badania te również odzwierciedlają skuteczność działań podjętych w ramach programu zarządzania ryzykiem. Wyniki, mieszczące się poza przyjętymi normami, powinny skutkować rewizją PZR i wdrożeniem odpowiednich modyfikacji, których skuteczność powinna być potwierdzona satysfakcjonującym wynikiem kolejnego badania. Również sam temat badań wody jest zagadnieniem złożonym. Poniżej przedstawiono kilka metod powszechnie stosowanych w identyfikacji pałeczek *Legionella*, jak również takich, które ze względu na swe zaawansowanie nie są rutynowo stosowane.

IDENTYFIKACJA PAŁECZEK *LEGIONELLA* W PRÓBKACH WODY

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi definiuje metodę, jaką powinna być analizowana woda na obecność pałeczek *Legionella*. Metodę badania opisuje norma PN – EN ISO 11731-2: 2008. Procedura zakłada filtrację wody metodą filtrów membranowych, płukanie filtra kwaśnym buforem (pH 2,2) w celu inaktywacji flory towarzyszącej, a następnie inkubację filtra na podłożu GVPC przez około 10 dni. Testem potwierdzającym jest przesianie domniemanych kolonii *Legionella* na podłoże BCYE z cysteiną i bez cysteiny. Przy analizie wyników z metod hodowlanych należy pamiętać, że obecność w próbce wody bakterii z rodzaju *Pseudomonads* może powodować osłabienie wzrostu bakterii z rodzaju *Legionella* na pożywkach syntetycznych, co niewątpliwie może zaniżyć wynik. Obecność w badanej próbce bakterii produkujących cysteinę i wydzielających ją na zewnątrz komórki może spowodować, że w teście potwierdzającym na podłożu

BCYE pozbawionym cysteiny bakterie *Legionella* będą rosły, co również może wpłynąć na zafałszowanie wyniku (18). Sama procedura filtracji oraz płukanie prefiltrowanej próbki buforem o niskim pH jest czynnikiem stresującym dla bakterii, co może mieć wpływ na ich późniejszą hodowlę. Należy również pamiętać, że część bakterii może znajdować się we wnętrzu ameb, których są one pasożytami oraz że pałeczki te często występują w postaci agregatów po kilkadziesiąt komórek, dając na pożywce mikrobiologicznej pojedynczą kolonię. Wszystko to w połączeniu z brakiem danych na temat dokładnych korelacji pomiędzy ilością bakterii w wodzie a ryzykiem wystąpienia legionellozy sprawia, że interpretacja wyników wymaga doświadczenia i głębokiej znajomości problemu.

W ostatnich latach stworzono kilka metod opartych m.in. na biologii molekularnej, umożliwiających szybsze i bardziej jednoznaczne identyfikowanie pałeczek *Legionella* w próbkach wody. Jedną z technik wykorzystywanych do tego celu jest intensywnie rozwijająca się w ostatnich latach technologia *real-time PCR*. Metoda ta polega na ilościowej ocenie poprzez amplifikację markerowych sekwencji DNA (19). Na rynku pojawiło się wiele zestawów do identyfikacji pałeczek *Legionella* w próbkach wody opartych na tej technice. Pozwalają one na identyfikację *Legionella* sp., jak również *Legionella pneumophila*. Testy te wykorzystują kontrolę wewnętrzną, która unieważnia uzyskanie wyników fałszywie ujemnych, na skutek obecności w badanej wodzie inhibitorów reakcji PCR. Czas analizy z wykorzystaniem tej metody jest skrócony z 10-14 dni do kilku godzin. W przypadku metod opartych na reakcji PCR czynnikiem ograniczającym ich zastosowanie są związki będące inhibitorami tej reakcji. Ich obecność jest możliwa szczególnie w przypadku próbek wody przemysłowej. W celu eliminacji inhibitorów reakcji PCR z analizowanej próbki opracowano metodę detekcji wykorzystującą immunomagnetyczną metodę izolacji pałeczek *Legionella* z próbki wody. Metoda polega na zastosowaniu specyficznych przeciwciał sprzężonych z kulkami metalu. Przeciwciała opłaszczają komórki bakterii i pozwalają na ich izolację w silnym polu magnetycznym. W dalszym etapie wykorzystywana jest reakcja *real-time PCR* do ilościowej identyfikacji pałeczek *Legionella* (20).

Do wyeliminowania wpływu substancji mogących hamować reakcję PCR zastosowano również metodę *semi-nested PCR*. Polega ona na przeprowadzeniu dwóch rund replikacyjnych z dwoma zestawami starterów. W pierwszym etapie przeprowadzana jest reakcja PCR z parą starterów oskrzydlających sekwencję docelową, natomiast w drugiej rundzie przygotowana jest nowa reakcja, w której matrycą jest produkt pierwszej reakcji PCR. Jeden ze starterów użyty w drugiej rundzie replikacyjnej hybryduje wewnątrz odcinka będącego produktem pierwszej reakcji, natomiast drugi starter jest identyczny z dowolnym starterem z pierwszej reakcji. Przygotowanie drugiej reakcji rozcieńcza ewentualne inhibitory, a użycie różnych starterów zwiększa specyficzność reakcji przy zachowaniu jej czułości (21).

Należy jednak pamiętać, że techniki molekularne, które opierają się na detekcji mikroorganizmu poprzez wykrycie swoistego DNA, będą wykrywały także martwe komórki bakteryjne, które nie stanowią zagrożenia dla zdrowia publicznego. Najnowocześniejsze metody ilościowej identyfikacji pałeczek *Legionella* umożliwiają różnicowanie komórek żywych od martwych.

Przykładem takiej metody jest technika wykorzystująca reakcję *real-time PCR* w połączeniu z wykorzystaniem właściwości monoazydku etydyny (EMA). Metoda ta, która wymaga jeszcze standaryzacji, pozwala na amplifikację i ilościową ocenę żywych komórek *Legionella*. EMA selektywnie wnika do martwych komórek bakterii *Legionella* sp., oddziałuje z DNA, czego efektem jest fragmentacja materiału genetycznego, co uniemożliwia w kolejnym etapie jego amplifikację podczas reakcji *real-time PCR* (22).

Opracowano również technikę wykorzystującą mikroskopię epifluorescencyjną umożliwiającą ilościową analizę bakterii z rodzaju *Legionella*, z jednoczesnym odróżnieniem komórek żywych od martwych. Metoda IDS (ang. *immunological double-staining*) wykorzystuje przeciwciała specyficzne dla *Legionella* sp. wyznakowane fluorescencyjnie, jak również odczynnik ChemChrome V6, który po wnikięciu do komórki bakteryjnej jest przekształcany przez enzym esterazę, dając produkt mający właściwości fluorescencyjne. Reakcja przekształcenia zachodzi tylko w żywych komórkach. Analiza w metodzie IDS polega na filtracji wody, inkubacji ze specyficznymi przeciwciałami i odczynnikami ChemChrome V6, a w ostatnim etapie na analizie filtrów membranowych pod mikroskopem epifluorescencyjnym (23).

W prowadzonych badaniach wielokrotnie wykazano różnice w ilościowej identyfikacji pałeczek *Legionella* w próbkach analizowanych metodami opartymi na technice PCR oraz hodowli mikrobiologicznej (24, 25). Jak już wspomniano, wiąże się to z detekcją przez technikę PCR martwych komórek bakteryjnych, które zachowały swą integralność strukturalną, ale również komórek, które pozostają żywe, lecz nie poddają się hodowli na pożywkach mikrobiologicznych (VBNC, ang.: *viable but not culturable*). Pałeczki *Legionella* mogą stać się komórkami VNBC na skutek działania chloru, a następnie odzyskać zdolność do namnażania na podłożach mikrobiologicznych po pasażowaniu w komórkach ameb *Acanthamoeba polyphaga* (26).

Na rynku pojawiło się wiele testów komercyjny wykorzystujących zwłaszcza metody oparte na technologii *real-time PCR*. Ciekawym testem łączącym hodowlę mikrobiologiczną oraz metodę molekularną jest test ScanVIT-Legionella. W pierwszym etapie próbka wody jest filtrowana metodą filtrów membranowych, a następnie inkubowana na podłożu GVPC. Inkubacja trwa 44-48 godzin, a następnie przy użyciu oligonukleotydowych sond wyznakowanych znacznikami fluorescencyjnymi znakowane są mikrokolonie, które wyrosły podczas inkubacji. Sondy są specyficzne dla gatunku *L. pneumophila*, jak i *Legionella* sp. Analiza z użyciem skanera umożliwia ilościową analizę próbki już 50 godzin od momentu jej pobrania.

W badaniach porównujących hodowlę mikrobiologiczną z oznaczeniami przy użyciu reakcji PCR, metodą immunofluorescencyjną oraz testem z użyciem odczynnika ChemChrome V6 wykazano, że komórki poddane stężeniu chloru o wartości 0,5 ppm przez 24 godziny nie rosną na podłożach GVPC i BCYE, natomiast wykazują aktywność metaboliczną wykrywaną z użyciem odczynnika ChemChrome V6. Aktywność metaboliczna malała proporcjonalnie do wzrostu stężenia chloru i była zauważalna jeszcze przy stężeniu 30 ppm. W praktyce oznacza to, że w niektórych przypadkach negatywny wynik badania przy użyciu metod mikrobiologicznych może nie odzwierciedlać stanu faktycznego. Wykazano również, że stężenie chloru w przedziale 0,5-30 ppm nie wpływa na detekcję pałeczek *Legionella* przy użyciu metody immunofluorescencyjnej. W badaniach wykazano, że stężenia chloru powyżej 3 ppm dają wynik negatywny w reakcji PCR (27).

PODSUMOWANIE

Dane epidemiologiczne wskazują na rosnącą ilość przypadków legionellozy zaistniałych w miejscu zamieszkania i nabytej w czasie podróży (14). Wiąże się to niewątpliwie z doskonaleniem metod diagnostycznych, które coraz skuteczniej potrafią identyfikować tę jednostkę chorobową. Systematyczna kontrola stanu instalacji wodnych, poprzez badanie wody w kierunku obecności pałeczek *Legionella*, to podstawowy element skutecznego monitorowania instalacji. W prawidłowej ocenie niezwykle ważna jest również prawidłowa interpretacja uzyskanego wyniku badania wody. Należy wziąć pod uwagę rodzaj metody, jaki został użyty do analizy wody, stężenie środka dezynfekującego, jego rodzaj oraz skład flory towarzyszącej wraz z obecnością ameb. Proces oceny ryzyka ze strony instalacji wodnych jest złożony i wieloetapowy. Brak spójnych i jednoznacznych wytycznych niewątpliwie przyczynia się do słabej świadomości społecznej tego problemu w Polsce. Zmienić to może popularyzacja dokumentów EWGLI i WHO, której powinny się podjąć instytucje i jednostki, w kwestii których znajduje się problematyka chorób zakaźnych przenoszonych przez wodę. Ich szczegółowe, polskojęzyczne opracowania powinny stać się obowiązkową lekturą dla osób bezpośrednio odpowiedzialnych za zarządzanie instalacjami wody użytkowej. □

Piśmiennictwo

1. Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE: Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med* 1979; 90: 656-658.
2. Manz W, Amann R, Szewzyk R et al.: In situ identification of *Legionellae* using 16S rRNA targeted oligonucleotide probes and microscopy. *Microbiology* 1995; 141: 29-39.
3. Fields BS: *Legionellae* and Legionnaires' disease. [In:] Hurst CJ: *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology Press, Washington DC 1997; 666-675.
4. Martinelli F, Caruso A, Moschini L et al.: A comparison of *Legionella pneumophila* occurrence in hot water tanks and instantaneous devices in domestic, nosocomial, and community environments. *Curr Microbiol* 2000; 41: 374-376.
5. Murga R, Forster TS, Brown E et

- al.: Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiol* 2001; 147: 3121-3126. **6.** Stypułkowska-Misiurewicz H, Pancer K: Legionelloza – nowe zagrożenie w Polsce. *Przegl Epidemiol* 2002; 56: 567-76. **7.** Rokosz N, Rastawicki W, Zasada AA, Baczeńska-Rej M: Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń układu oddechowego wywołanych przez pałeczki *Legionella pneumophila*. *Pneumonol Alergol* 2010; 1: 54-59. **8.** Dideren B, De Jong C, Marmouk F et al.: Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *J Med Microbiol* 2007; 56: 94-101. **9.** Pancer K, Pawińska A, Rabczenko D: Odpowiedź odpornościowa w klasie IgM na zakażenie *Legionella pneumophila* u dzieci. *Przegl Epidemiol* 2007; 61: 401-407. **10.** Rojas A, Navarro M, Fornés F: Value of serological testing for diagnosis of legionellosis in outbreak patients. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4020-4025. **11.** Wever P, Yzerman E, Kuijper E et al.: Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2738-2739. **12.** Hayden R, Uhl J, Qian X et al.: Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2618-2626. **13.** Palusińska-Szych M, Cendrowska-Pinkosz M: Występowanie i chorobotwórczość bakterii z rodziny *Legionellaceae*. *Postępy Hig Med Dośw* 2008; 62: 337-353. **14.** Bartram J, Chartier Y, Lee JV et al.: *Legionella* and the prevention of legionellosis. WHO Press 2007; 1-252. **15.** Arvand M, Jungkind K, Hack A: Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: Do we know the true dimension? *Euro Surveill* 2011. **16.** Krogulska B, Matuszewska R, Pancer K, Stypułkowska-Misiurewicz H: Zasady kontroli i zapobiegania namnażania się pałeczek *Legionella* w instalacjach i urządzeniach wytwarzających aerosol wodno-powietrzny w obiektach służby zdrowia. PZH-NIZP 2007. **17.** Joseph C, Lee J, Wijngaarden J et al.: European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease. EWGLI 2005. **18.** Leoni E, Legnani PP: Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 27-33. **19.** Stølhaug A, Bergh K: Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 6394-6398. **20.** Yanez MA, Carrasco-Serrano C, Barbera VM, Catalan V: Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and Real-Time PCR amplification of the dotA gene. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 3433-3441. **21.** Hiroshii M, Yamamoto H, Arima K et al.: Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2489-2494. **22.** Chang B, Sugiyama K, Taguri T et al.: Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 147-153. **23.** Delgado-Viscogliosi P, Simonart T, Parent V et al.: Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 4086-4096. **24.** Behets J, Declerck P, Delaedt Y et al.: Development and evaluation of a TaqMan duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. *J Microbiol Methods* 2007; 68: 137-144. **25.** Declerck P, Behets J, Lammertyn E et al.: Detection and quantification of *Legionella pneumophila* in water samples using competitive PCR. *Can J Microbiol* 2006; 52: 584-590. **26.** Garcia MT, Jones S, Pelaz C et al.: *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol* 2007; 9: 1267-1277. **27.** Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S et al.: A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *Legionellae* that can recover their cultivability. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4817-4824.

nadesłano: 13.07.2011
zaakceptowano do druku: 09.08.2011

Adres do korespondencji:
*Mariusz Żak
ul. Niepodległości 17/22, 05-600 Grójec
tel.: 603 800 217
e-mail: mariuszzakster@gmail.com