



Olga Valciņa

***Legionella spp.* izplatība,  
ģenētiskā daudzveidība  
un virulences potenciāls**

Promocijas darbs zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes  
Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija  
Apakšnozare – citas medicīnas bāzes zinātņu,  
tai skaitā farmācijas, apakšnozares

Rīga, 2023

Olga Valciņa

ORCID 0000-0002-2012-9691

*Legionella* spp. izplatība,  
ģenētiskā daudzveidība  
un virulences potenciāls

Promocijas darbs zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija

Apakšnozare – citas medicīnas bāzes zinātņu,  
tai skaitā farmācijas, apakšnozares

Promocijas darba vadītāji:

*Dr. med.* profesore **Angelika Krūmiņa**,  
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

*Ph. D.* profesors, LZA īstenais loceklis **Aivars Bērziņš**,  
Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un  
vides zinātniskais institūts “BIOR”, Latvija

Rīga, 2023

## Anotācija

*Legionella* spp. ir viens no nozīmīgākajiem ar ūdeni saistītajiem patogēniem, kas var izraisīt gan novēršamus uzliesmojumus, gan sporādiskus gadījumus. Leģionellu izplatīšanās notiek ar baktērijas saturošiem ūdens aerosoliem. Aerosolu veidā baktērijas var izplatīties vairāku kilometru attālumā no primārā infekcijas avota, vienlaikus saglabājot dzīvotspēju. Leģioneloze ir novēršama slimība un atipiskas pneimonijas forma, ko izraisa *Legionella pneumophila* un radniecīgās baktērijas. Slimības klīniskās izpausmes variē no vieglas, pašlimitējošas gripai līdzīgas slimības (Pontiakas drudzis) līdz potenciāli letālai pneimonijai (leģionāru slimība).

**Pētījuma mērķis** bija izpētīt *Legionella* spp. izplatības tendences, ģenētisko daudzveidību un virulences potenciālu leģionelozes diagnostikai un profilaksei Latvijā.

**Materiāli un metodes.** Lai noteiktu *L. pneumophila* seroprevalenci vispārējā veselā populācijā un identificētu asociētos riska faktoros, tika paņemti 2007 asins paraugi no veseliem asins donoriem. Lai novērtētu *Legionella* spp. izplatību ūdensapgādes sistēmās, tika paņemti 1467 ūdens paraugi dažāda tipa ēkās. Ģenētiskās daudzveidības izpētei izvēlēti 137 *Legionella pneumophila* izolāti, un 58 izolātiem tika veikta virulences gēnu noteikšana. Visiem asins paraugiem veikta imūnfermentatīvā reakcija, lai noteiktu IgG antivielas pret *L. pneumophila* SG 1-6. Leģionellu noteikšana ūdenī un bioplēvēs veikta ar standartizētu metodi. Brīvi dzīvojošie viensūņņi noteikti morfoloģiski un ar trīs dažādiem PĶR protokoliem. Atdzīvinātiem *L. pneumophila* izolātiem veikta pilna genoma sekvencēšana ar Illumina MiSeq. Sekvencē bāzētā tipēšana veikta atbilstoši ESCMID izstrādātajai shēmai. cgMLST tipēšana veikta, izmantojot iepriekš aprakstītu protokolu. Virulences gēnu noteikšanai izmantota virulences faktoru datu bāze.

**Rezultāti.** *L. pneumophila* SG 1-6 seroprevalence asins donoriem bija 4,8 %, un 0,2 % donoru bija seropozitīvi pret *L. pneumophila* SG1. Seroprevalence bija augstāka sievietēm (5,9 %) nekā vīriešiem (3,3 %) un reģionos ar lielāku iedzīvotāju skaitu, sākot no 3,5 % lauku reģionos līdz 6,8 % galvaspilsētā Rīgā.

*Legionella* spp. prevalence ūdensapgādes sistēmās variēja no vidēji 25 % aukstā ūdens paraugos līdz 35 % karstā ūdens paraugos. Dominējošā *L. pneumophila* serogrupa (SG) bija SG 3, kas tika identificēta 208 no 482 gadījumiem (43,2 %). Vismaz viena brīvi dzīvojoša amēbu ģints konstatēta 77,2 % paraugu. Vidējā karstā ūdens temperatūra bija  $47,8 \pm 0,7$  °C. Temperatūras mērījumi parādīja, ka tikai 249 no 1275 karstā ūdens paraugiem temperatūra pārsniedza 55 °C.

Pētījumā iekļautie 137 *L. pneumophila* celmi sadalās 46 sekvenču tipos, turklāt 10 sekvenču tipi ir jauni, iepriekš pasaulē neregistrēti. Izmantojot cgMLST tipēšanu, iegūti 116 genotipi. Kopumā 58 dzīvojamo māju izolātiem tika identificēti 420 virulences gēni, no kuriem 260 gēni tika atrasti visos sekvencētajos *L. pneumophila* izolātos. Visos izolātos tika atklāti virulences gēni *enhC*, *htpB*, *omp28* un *mip*, kas liecina, ka visiem izolātiem ir iespējota adhēzija, piesaiste un iekļūšana saimniekšūnā. Virulences gēnu relatīvais biežums starp *L. pneumophila* izolātiem bija augsts.

**Secinājumi.** Daudzdzīvokļu māju iedzīvotāji ir pakļauti lielākam leģionelozes riskam nekā privātmājās dzīvojošie (OR = 2,23; p = 0,011); augstākais seropozitivitātes risks bija to ēku iedzīvotājiem, kas centralizēti saņēma karsto ūdeni (OR = 3,16; p = 0,001); augstā *Legionella* spp. prevalence ūdensapgādes sistēmās ir saistīta ar zemo karstā ūdens temperatūru (vid.  $47,8 \pm 0,7$  °C) un augsto brīvi dzīvojošo amēbu klātbūtni (84,2 %); *L. pneumophila* vides izolātiem bija liela SBT un cgMLST sekvenču tipu daudzveidība, un tika novērotas reģionālās klonālās ekspansijas pazīmes ar mūsu reģionam raksturīgo dominējošo sekvenču tipu grupu ST-338, ST-366 un ST-1104. Virulences gēnu relatīvais biežums liecina, ka *L. pneumophila* izolātiem piemīt augsts virulences potenciāls un plaša virulences faktoru klātbūtne.

**Atslēgvārdi:** leģionella, ģenētiskā daudzveidība, cgMLST tipēšana, virulence.

## Abstract

### **Prevalence, Genetic Diversity and Virulence Potential of *Legionella* spp.**

*Legionella* spp. is one of the most important water-borne pathogens that can cause both outbreaks and sporadic cases. *Legionella* is spread by water aerosols containing the bacteria. In the form of aerosols, bacteria can spread several kilometres from the primary source of infection while remaining viable. Legionellosis is a preventable disease and a form of atypical pneumonia caused by *Legionella pneumophila* and related bacteria. Clinical manifestations of the disease range from a mild, self-limiting flu-like illness (Pontiac fever) to potentially fatal pneumonia (Legionnaires' disease).

**The aim of the study** was to investigate *Legionella* spp. distribution trends, genetic diversity and virulence potential for diagnosis and prevention of legionellosis in Latvia.

**Materials and methods.** To assess the seroprevalence of *L. pneumophila* in the general healthy population and to identify associated risk factors, 2007 blood samples were collected from healthy blood donors. To evaluate *Legionella* spp. distribution in water supply systems, 1467 water samples were taken in different types of buildings. 137 *L. pneumophila* isolates were selected for the study of genetic diversity and virulence genes were determined for 58 isolates. Immunoenzymatic reaction was performed for all blood samples to detect IgG antibodies against *L. pneumophila* SG 1-6. Determination of *Legionella* spp. in water and biofilm samples was performed according to a standardized method. Free-living protozoa were determined morphologically and by three different PCR protocols. Whole genome sequencing of *L. pneumophila* isolates was performed with Illumina MiSeq. Sequence-based typing was performed according to the scheme developed by ESCMID. cgMLST typing was performed using the previously described protocol. The database of virulence factors was used to determine virulence determinants.

**Results.** The seroprevalence of *L. pneumophila* SG 1-6 in blood donors was 4.8 % and 0.2 % of donors were seropositive for *L. pneumophila* SG1. Seroprevalence was higher in women (5.9 %) than men (3.3 %), and in regions with a larger population, ranging from 3.5 % in rural regions to 6.8 % in the capital Riga. *Legionella* spp. prevalence in water supply systems varied from an average of 25 % in cold water samples to 35 % in hot water samples. The predominant *L. pneumophila* serogroup (SG) was SG 3, which was identified in 208 of 482 cases (43.2 %). At least one free-living amoeba genus was detected in at least 77.2 % of the samples. The average hot water temperature was  $47.8 \pm 0.7$  °C. Temperature measurements showed that only 249 out of 1275 hot water samples exceeded 55 °C. Overall, 137 *L. pneumophila* strains included in the study represented 46 sequence types, including new

10 sequence types, previously unrecorded in the world. Using cgMLST typing 116 genotypes were obtained. 420 virulence genes were identified of which 260 genes were found in all sequenced *L. pneumophila* isolates. Virulence factors encoding *enhC*, *htpB*, *omp28* and *mip* genes were detected in all isolates, suggesting that adhesion, attachment and entry into the host cell are enabled for all isolates. Relative frequency of virulence genes among *L. pneumophila* isolates was high.

**Conclusions.** Residents of apartment buildings are exposed to a higher risk of legionellosis than those living in private houses (OR = 2.23; p = 0.011). The highest risk of seropositivity was for residents of buildings with centralized hot water supply (OR = 3.16; p = 0.001). High *Legionella* spp. prevalence in water supply systems is related to low hot water temperature (average  $47.8 \pm 0.7$  °C) and high presence of free-living amoebae (84.2 %). Environmental isolates of *L. pneumophila* exhibited a high diversity of SBT and cgMLST sequence types and showed signs of regional clonal expansion, with ST-338, ST-366 and ST-1104 as the predominant sequence type group characteristic of our region. The relative frequency of virulence genes suggests that *L. pneumophila* isolates have a high virulence potential and the presence of a wide range of virulence factors.

**Keywords:** *Legionella*, genetic diversity, cgMLST typing, virulence.

## Saturs

Anotācija .....	2
Abstract .....	4
Darbā izmantotie saīsinājumi .....	8
Ievads .....	9
Darba mērķis .....	10
Darba uzdevumi .....	11
Darba hipotēze .....	11
Darba novitāte .....	11
1. Literatūras apskats .....	13
1.1. <i>Legionella</i> ģints baktērijas .....	13
1.1.1. Taksonomija un dažādu serogrupu un sugu asociācija ar leģionelozi .....	13
1.1.2. Leģionellu bioloģija .....	14
1.1.3. Leģionellu virulences faktori .....	16
1.2. Leģioneloze .....	19
1.2.1. Leģionāru slimība .....	19
1.2.2. Pontiakas drudzis .....	21
1.2.3. Ekstrapulmonālie gadījumi .....	21
1.3. Epidemioloģija .....	22
1.4. Transmisija un riska faktori .....	25
1.5. Laboratoriskās diagnostikas metodes .....	26
1.6. Svarīgākie vides elementi, kas veicina leģionelozes izplatību .....	29
1.6.1. Temperatūra .....	29
1.6.2. Bioplēves .....	29
1.6.3. Vienšūņi .....	31
1.7. Leģionelozes profilakse un kontrole ūdensapgādes sistēmās .....	33
2. Materiāli un metodes .....	36
2.1. Pētījuma shēma un norise .....	36
2.2. Pētījuma populācija un asins paraugu ņemšana .....	36
2.3. Dzeramā ūdens paraugu ņemšana ūdensapgādes sistēmās .....	38
2.4. Seroloģiskās metodes .....	40
2.5. Leģionellu mikrobioloģiskā identifikācija un uzskaitē .....	40
2.6. Brīvi dzīvojošo amēbu kultivēšana .....	41
2.7. Brīvi dzīvojošo amēbu sugu molekulārā identifikācija .....	42
2.8. Pētījumā izmantotie <i>Legionella</i> spp. izolāti .....	43
2.9. DNS ekstrakcija un pilna genoma sekvencēšana .....	44
2.10. Pilna genoma sekvencēšanas datu analīze .....	44
2.11. Virulences un pretantibiotiku rezistences gēnu identifikācija .....	45
2.12. Datu statistiskā apstrāde un analīze .....	45
3. Rezultāti .....	46
3.1. <i>L. pneumophila</i> seroprevalence asins donoru vidū .....	46
3.2. <i>Legionella</i> spp. izplatība dzeramā ūdens apgādes sistēmās un persistenci un kolonizāciju ietekmējošie faktori .....	50
3.2.1. Ūdens temperatūra .....	53
3.2.2. Brīvi dzīvojošo amēbu izplatība dzeramā ūdens apgādes sistēmās .....	55
3.3. <i>Legionella pneumophila</i> sekvencē bāzētās un cgMLST tipēšanas rezultāti .....	58
3.4. Virulences faktoros un pretantibiotiku rezistenci kodējošie gēni .....	63
4. Diskusija .....	69

4.1. <i>L. pneumophila</i> seroprevalence un saistītie faktori.....	69
4.2. <i>Legionella</i> spp. izplatība ūdensapgādes sistēmās un persistenci un kolonizāciju ietekmējošie faktori.....	72
4.3. <i>L. pneumophila</i> ģenētiskā daudzveidība .....	76
4.4. <i>L. pneumophila</i> virulences potenciāls .....	78
Secinājumi.....	82
Priekšlikumi .....	83
Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu .....	84
Literatūras saraksts.....	86
Pateicības.....	102
Pielikumi .....	103
1. pielikums .....	104
2. pielikums .....	105
3. pielikums .....	106



## Darbā izmantotie saīsinājumi

cgMLST	Pamata genoma multilokusu sekvenču tipēšana	<i>Core Genome Multilocus Sequence Typing</i>
DALY	Invaliditātes ietekmētie dzīves gadi	<i>disability adjusted life years</i>
DFA	Tiešā imūnfluorescence	<i>direct immunofluorescence assay</i>
ECDC	Eiropas Slimību profilakses un kontroles centrs	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EEZ	Eiropas Ekonomikas zona	<i>European Economic Area</i>
ES	Eiropas Savienība	<i>European Union</i>
ESCMID	Eiropas Klīniskās mikrobioloģijas un infekcijas slimību biedrība	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
ESGLI	ESCMID Leģionellu izpētes grupa	<i>ESCMID Study Group for Legionella Infections</i>
FLA	Brīvi dzīvojošās amēbas	<i>free living amoeba</i>
KVV	Kolonijas veidojošās vienības	<i>colony forming units</i>
LCV	Leģionellas saturoša vakuola	<i>Legionella containing vacuole</i>
LLAP	Leģionellām līdzīgi amebiāli patogēni	<i>Legionella like amoebal pathogens</i>
MIF	Nobriedusi intracelulāra forma	<i>mature intracellular form</i>
MK	Ministru kabinets	<i>Cabinet of Ministers</i>
NGS	Nākamās paaudzes sekvenčēšana	<i>Next Generation Sequencing</i>
PĶR	Polimerāzes ķēdes reakcija	<i>Polymerase chain reaction</i>
PVO	Pasaules Veselības organizācija	<i>World Health Organization</i>
QS	Kvorum sajūta	<i>Quorum sensing</i>
SBT	Sekvenčē bāzētā tipēšana	<i>Sequence based typing</i>
SG	Serogrupa	<i>Serogroup</i>
SPKC	Slimību profilakses un kontroles centrs	<i>Centre for Disease Prevention and Control</i>
VBNC	Dzīvotspējīga, bet nekultivējama	<i>Viable but not culturable</i>

## Ievads

Leģioneloze mūsdienās ir *Legionella* ģints baktēriju izraisīta infekcija, kuras izpausmes variē no viegla drudža (Pontiakas drudzis) līdz ātrai un potenciāli letālai pneimonijai (leģionāru slimība) (Phin, 2014). Cilvēka inficēšanās ar *Legionella* spp. parasti notiek, ieelpojot kontaminētus aerosolus, vai aspirācijas ceļā (Bollin et al., 1985). Leģioneloze pieder pie sapronozēm, infekcijām, kuras izraisa brīvi dzīvojoši organismi, kas noteiktos apstākļos var izraisīt infekciju un vairoties saimniekorganismā. Cilvēku inficēšana nav šo baktēriju galvenais mērķis (Kuris et al., 2014).

Leģionāru slimība joprojām ir nozīmīga potenciāli novēršama slimība un nāves cēlonis Eiropā. Lielākā daļa leģionāru slimības gadījumu ir sporādiski, taču katru gadu tiek ziņots par vairākiem uzliesmojumiem un ar ceļošanu saistītiem gadījumiem. ES/EEZ vidēji tiek ziņots par 1,9–2,5 gadījumiem uz 100 000 iedzīvotāju gadā. Ar Covid-19 saistītie ierobežojumi, visticamāk, nedaudz samazināja gadījumu skaitu Eiropā 2020. gadā. Ziņoto gadījumu skaits ES/EEZ arī 2020. gadā bija nevienmērīgs, no mazāk nekā 0,5 gadījumiem uz 100 000 iedzīvotāju līdz 5,7 gadījumiem uz 100 000 iedzīvotāju, un augstākais rādītājs bija Slovēnijā. Latvijā 2019. gadā ziņoti 2,2 gadījumi uz 100 000 iedzīvotāju, bet 2021. gadā 4,5 gadījumi uz 100 000 iedzīvotāju, turklāt vairāk nekā 85 % no visiem leģionāru slimības gadījumiem tika reģistrēti Rīgā un Pierīgā, kur gadījumu skaits uz 100 000 iedzīvotāju 2020. gadā sasniedza attiecīgi 6,0 un 4,5 (ECDC, 2022; SPKC, 2023). Leģionāru slimība pieder slimībām, par kurām obligāti jāziņo visās ES un EEZ valstīs. Tomēr gadījumu definīcijas dažādās valstīs atšķiras. Turklāt ir novērojamas neatbilstības starp valstīs izmantotajām laboratoriskās diagnostikas metodēm. Leģionāru slimības laboratoriskā diagnostika ir efektīva galvenokārt *L. pneumophila* 1. serogrupas izraisītajiem gadījumiem. Pieejamo metožu specifiskums un jutība pret pārējām serogrupām un sugām joprojām ir tālu no ideālā. Pašlaik liela daļa klīnisko gadījumu tiek identificēta, izmantojot urīna antigēna testu, kas ievērojami palielina *L. pneumophila* 1. serogrupas identifikācijas gadījumu skaitu, savukārt citas serogrupas un sugas, iespējams, netiek precīzi diagnosticētas.

Ir zināmas vairāk nekā 60 leģionellu sugas, tomēr vairāk nekā 90 % gadījumu leģionāru slimību izraisa *Legionella pneumophila*. Leģionellas ir visuresošas, tās ir konstatētas pazemes un virszemes ūdeņos, mitrās augsnēs, bet to galvenais rezervuārs ir cilvēka radīta ūdens vide, īpaši karstā ūdens sistēmas dzīvojamās ēkās, slimnīcās, pansionātos, viesnīcās un citās privātās un sabiedriskās ēkās, kur tās var kolonizēt krānus, dušas, dzesēšanas torņus, spa, strūklakas utt. Ļoti zemas leģionellu koncentrācijas dabiskajos biotopos var ievērojami palielināties karstā ūdensapgādes sistēmās, ja ēku apsaimniekošanā netiek ievēroti minimālās ūdens temperatūras

norādījumi oportūnistisku patogēnu kontrolei (Singh et al., 2022). Kontaminācija ir cieši saistīta ar cirkulējošā ūdens temperatūru (Kruse et al., 2016) un ūdens stagnāciju, kur izmaiņas ūdens plūsmā var atbrīvot bioplēvēs saistītās baktērijas (Nisar et al., 2020; Yu et al., 2019).

Cilvēks leģionellām ir gadījuma saimnieks, un tiek uzskatīts, ka šo baktēriju spēja inficēt cilvēkus ir ilgstošas baktēriju un viēnšūņu kopīgas evolūcijas rezultāts. Leģionellas var inficēt dažādas amēbas un viēnšūņus, un tām ir izstrādāti īpaši mehānismi, lai izvairītos no brīvi dzīvojošu viēnšūņu gremošanas sistēmas. Tie paši virulences faktori, kas palīdz *Legionella* inficēt viēnšūņus, palīdz arī inficēt cilvēka plaušu alveolu makrofāģus (Oliva et al., 2018). Brīvi dzīvojoši viēnšūņi nodrošina leģionellas ar barības vielām un papildu aizsardzību pret tādiem vides apstākļiem kā temperatūra un dezinfekcijas līdzekļi (Shaheen et al., 2019).

Vēl joprojām pasaulē nav pilnībā izprasti iemesli, kāpēc noteiktas leģionellu sugas un celmi ir saistīti ar cilvēku saslimšanas gadījumiem biežāk nekā citi, taču tiek uzskatīts, ka atsevišķu virulences faktorus kodējošo gēnu klātbūtne ir saistīta ar leģionellu virulences potenciālu jeb spēju izraisīt slimības. Svarīgākie leģionellu virulences faktori ir saistīti ar baktēriju virsmas struktūru un efektorolbaltumvielu sekrēcijas sistēmām (Gattuso et al., 2022). Horizontālās gēnu pārneses rezultātā no saimniekamēbām *Legionella* ir ieguvusi daudzus eikariotiem līdzīgus gēnus, kas regulē saimniekšūņu infekciju (Scheithauer et al., 2023). Daži no baktēriju efektoriem var veikt paralēlas funkcijas dažādos organismos, un patogēnās un nepatogēnās leģionellu sugās daži efektori var pārklāties vai aizstāt viens otru (Yang et al., 2023).

Iespēju saslimt ar leģionāru slimību var būtiski mazināt ar preventīviem pasākumiem, jo infekcijas avotu nevar pilnībā izskaust, tomēr inficēšanās riskus ir iespējams būtiski samazināt. Ūdens drošības plānu izstrādāšana un ieviešana, novērtējot katras konkrētas darbības riskus attiecībā uz *Legionella*, ir vispārpieņemta prakse. Šāds plāns nodrošinātu detalizētu un sistemātisku novērtējumu un apdraudējumu prioritāšu izveidi, radītu priekšnoteikumus kontroles pasākumiem un uzraudzības darbībām (ESGLI, 2017).

## **Darba mērķis**

Darba mērķis ir izpētīt *Legionella* spp. izplatības tendences, ģenētisko daudzveidību un virulences potenciālu leģionelozes diagnostikai un profilaksei Latvijā.

## Darba uzdevumi

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Izpētīt *Legionella pneumophila* seroprevalenci Latvijas asins donoru vidū un novērtēt seropozitivitātes asociētos faktorus.
2. Izpētīt *Legionella* spp. prevalenci un analizēt karstā ūdens temperatūras un brīvi dzīvojošo amēbu ietekmi uz leģionellu kolonizāciju un persistenci ūdens apgādes sistēmās.
3. Noskaidrot *Legionella pneumophila* cgMLST sekvenču tipu daudzveidību.
4. Identificēt *Legionella pneumophila* izolātu virulences gēnus un novērtēt to virulences potenciālu.

## Darba hipotēze

Ūdens apgādes sistēmās persistējošie *L. pneumophila* celmi neatkarīgi no to serogrupas, sekvenču tipa un virulences faktoru kopuma testēšanas brīdī var būt infekcijas ierosinātāji, kam piemīt augsts virulences potenciāls.

## Darba novitāte

Šis ir pirmais pētījums Latvijā, kas demonstrē *L. pneumophila* seropozitivitātes asociētos faktorus un dažādu serogrupu un sekvenču tipu *Legionella* spp. daudzveidību un prevalenci ūdensapgādes sistēmās. Pētījuma rezultāti parādīja, ka Latvijā dominējošās *L. pneumophila* serogrupas ir SG 2 un SG3 un šo serogrupu izraisītie leģionāru slimības gadījumi nav identificējami ar urīna antigēna testu, kas ir pasaulē un Latvijā visplašāk izmantotā diagnostikas metode. Mūsu pētījumā ir izolēti un sekvenčēti desmit pasaulē jauni *Legionella* spp. sekvenču tipi, kas papildina starptautisko *Legionella* spp. ģenētisko profilu datu bāzi.

## Autores personīgais ieguldījums

Promocijas darba autore formulēja pētniecības ideju un mērķus, nodrošinot pētījuma konceptualizāciju, izstrādāja pētījuma dizainu un metodoloģiju, veica pētījuma validāciju, nodrošinot vispārējo atkārtojamību un reproducējamību, veica pētījuma formālo analīzi, organizēja eksperimentālo daļu, piedalījās paraugu ņemšanā, testēšanā un datu analīzē, sagatavoja oriģinālo publikāciju uzmetumus un organizēja oriģinālo publikāciju pārskatīšanu un rediģēšanu, t. sk. nodrošinot komunikāciju ar žurnālu redaktoriem un recenzentiem un fināla versiju sagatavošanu. Pētījuma dati ir iekļauti četrās oriģinālās Q2 ranga žurnālu publikācijās, kur, izmantojot pirmā un pēdējā autora principu, autoru secība attēlo ieguldījuma apjomu un

katras publikācijas pēdējais autors nodrošināja virsuzraudzību pār pētījuma plānošanu, izpildi un sadarbību, t. sk. ārpus pētniecības komandas. Katrā publikācijā individuāli norādīts katra autora personīgais ieguldījums. Personīgais ieguldījums tiek sniegts saskaņā ar CRediT sistēmu (*Contributor Roles Taxonomy*, <https://www.casrai.org/credit.html>; Brand et al., 2015).

## 1. Literatūras apskats

Leģionāru slimības nosaukums nāk no vēsturiska incidenta, kad slimībai pirmo reizi tika pievērsta gan ārstu, gan plašas sabiedrības uzmanība. Veterānu organizācija “Amerikas leģions” 1976. gada jūlijā rīkoja 58. ikgadējo kongresu Filadelfijā, *Bellevue-Stratford* viesnīcā. No 4400 kongresa dalībniekiem ar smagu pneimoniju saslima 183 cilvēki un 29 (16 %) nomira. Slimības ierosinātājs tika izolēts no mirušo plaušu audiem un tika nosaukts par “*Legionella*” inficēto leģionāru piemiņai un “*pneumophila*” – norādot uz baktērijas radītajām patoloģijām plaušās (Fraser et al., 1977). Retrospektīvi leģionellu izraisīts leģionāru slimības pirmais uzliesmojums tika identificēts 1947. gadā (McDade, 1979).

### 1.1. *Legionella* ģints baktērijas

Kad leģionāru slimība pirmo reizi tika aprakstīta un tika raksturots no pacientiem izolētais baktēriju celms, tika izveidota jauna baktēriju ģints *Legionella*, kas iekļauta *Legionellaceae* dzimtā. Ģenētiski leģionellām vistuvākā baktērija ir *Coxiella burnetti*, Q drudža ierosinātāja, kam ir leģionellām līdzīgs intracelulārais dzīves cikls, un tām var būt kopīgi gēni, kuri saistīti ar to infekcijas procesiem (Chauhan et al., 2021).

#### 1.1.1. Taksonomija un dažādu serogrupu un sugu asociācija ar leģionelozi

*Legionella pneumophila* ir pirmā aprakstītā suga *Legionella* ģintī.

Pašlaik *Legionella* ģintī ir vismaz 65 sugas, kas veido 70 atšķirīgas serogrupas. *L. pneumophila* ir 16 serogrupas, pa divām serogrupām ir *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleii*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra* un *L. quinlivanii*, un pa vienai serogrupai ir pārējām sugām. Lielākoties leģionāru slimību izraisa *L. pneumophila*, tomēr arī citas sugas var izraisīt slimības, tostarp *L. anisa*, *L. birminghamensis*, *L. bozemanii*, *L. cincinnatiensis*, *L. erythra*, *L. feeleii*, *L. gormanii*, *L. hackeliae*, *L. jordanis*, *L. lansigensis*, *L. longbeachae*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. oakridgensis*, *L. parisiensis*, *L. sainthelensi*, *L. tusconensis* un *L. wadsworthii*.

Eiropā aptuveni 70 % gadījumu infekcijas ierosinātājs ir *L. pneumophila* 1. serogrupa, 20–30 % gadījumu izraisa citas *L. pneumophila* serogrupas un 5–10 % gadījumu infekcijas ierosinātājas ir bijušas citas leģionellu sugas (ECDC, 2022).

Lielākā daļa citu serogrupu – nevis *pneumophila* – izraisīto slimību ir pneimonijas. No ziņotajiem gadījumiem visbiežāk tiek konstatētas *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae* un citas *Legionella* sugas. *L. longbeachae* izraisa aptuveni 30 % leģionāru

slimības gadījumu Austrālijā un Jaunzēlandē, savukārt *L. micdadei* ir otrais biežākais leģionāru slimības ierosinātājs ASV un Eiropā (Gattuso et al., 2022).

Atsevišķas leģionellas nevar kultivēt uz klasiskām *Legionella* barotnēm, un tās nosauktas par “leģionellām līdzīgiem amebiāliem patogēniem” (LLAP) (*Legionella-like amoebal pathogens*). Šos organismus var izolēt tikai tad, ja tie tiek kultivēti kopā ar to viensūnas saimniekiem. Šādi celmi varētu būt cilvēka patogēni, tomēr to ir grūti pierādīt, jo ar klasiskām metodēm tos identificēt nevar. Salīdzinoši nesen 3 LLAP celmi tika nosaukti par *Legionella* sugām *Legionella drozanskii*, *Legionella rowbothamii* un *Legionella fallonii* (Adeleke et al., 2001).

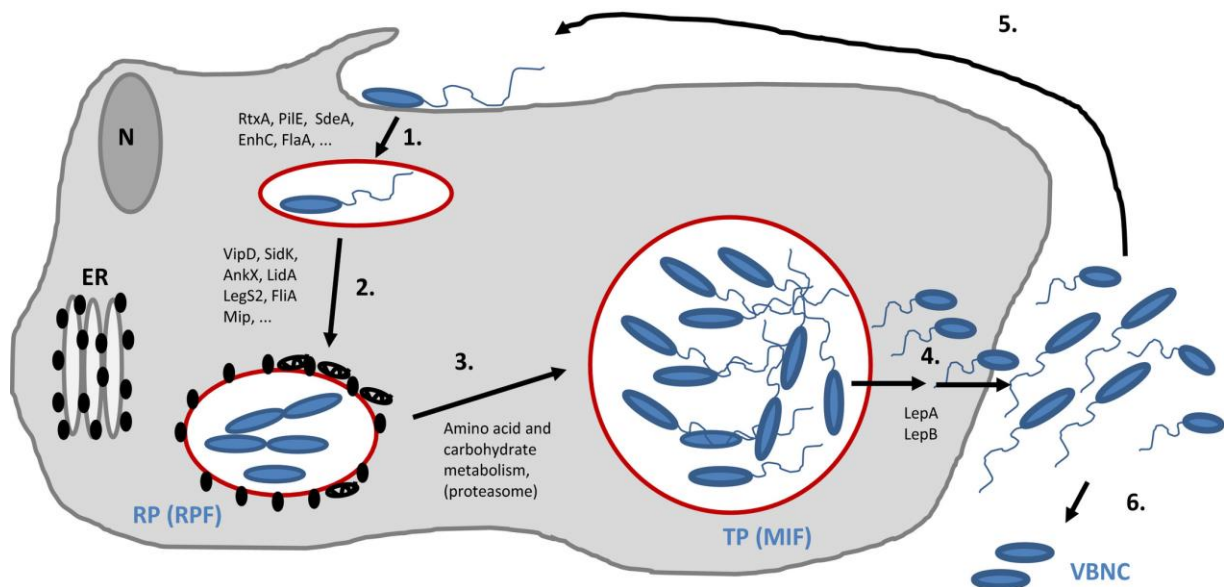
### 1.1.2. Leģionellu bioloģija

Leģionellas ir nūjiņveida gramnegatīvas obligāti aerobas baktērijas, aptuveni 0,3–0,9 μm platumā un 2–20 μm garumā, *in vitro* augšanai nepieciešams L-cisteīns un dzelzs sāļi (Diederer, 2008).

Leģionellas var eksistēt vairākās dzīves formās dažādos vides apstākļos un cilvēku organismā. Pēc invāzijas amēbā vai cilvēka makrofāgos *L. pneumophila* veido leģionellas saturošas fagosomas, kas ir unikāls veidojums ar komponentiem, iegūtiem no endosomām, mitohondrijiem un endoplazmatiskā tīkla. Fagosomas nodrošina leģionellu spēju izvairīties no sagremošanas un destrūkcijas (Abu Khweek et Amer, 2018).

Fagosoma kļūst par drošu nišu, kas nepieciešama baktēriju replikācijas fāzē. Šajā fāzē ir iesaistīti vairāki simti efektorproteīnu, kurus sintezē baktēriju Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēma (Lockwood et al., 2022).

Līdzīgi kā citas intracelulārās baktērijas, piemēram, *Coxiella*, leģionellas pārmaiņus var būt transmisīvā (virulentā) vai replikatīvā (nevirulentā) fāzē (1.1. attēls), kas nodrošina gan baktēriju izdzīvošanu ar barības vielām bagātā vai nabadzīgā vidē, gan baktēriju pānesi starp dažādām ekoloģiskajām nišām (Ge et al., 2022). Ja vidē ir pieejams daudz barības vielu, *Legionella* nonāk replikācijas fāzē, turklāt notiek tikai dažu virulences faktoru ekspresija. Savukārt pāreja uz transmisīvo fāzi notiek tad, ja ir ierobežots uzturvielu daudzums vai fagosoma vairs neatbalsta baktēriju tās replikācijas fāzē. Transmisijas fāzi raksturo palielināts kustīgums, izturība pret stresa faktoriem, izkļūšana no saimniekšūnas un vairāku virulences faktoru ekspresija (Eisenreich and Heuner, 2016). Izmantojot atgriezenisku divfāžu izplatības stratēģiju, *L. pneumophila* kontrolē enerģijas patēriņu, kas nepieciešams tās replikācijai. Replikācijas fāzē *L. pneumophila* ir metaboliski aktīva un, lai taupītu enerģijas līmeni, faktiski nav virulenta, savukārt transmisīvās formas laikā *L. pneumophila* pārvēršas virulentajā formā.



### 1.1. attēls. *Legionella* spp. un *Acanthamoeba* spp. kā saimniekšūnas mijiedarbība intracelulārā dzīves cikla laikā

1. Baktērijas piesaistās pie saimniekšūnas ar makropinocitozes vai fagocitozes palīdzību un nonāk vakuolā.
2. Ar efektorproteīnu sistēmas palīdzību tiek izveidota LCV. LCV iekšienē baktērijas diferencējas par replikatīvās fāzes formu (RPF) un sāk vairoties. 3. Leģionella vairojas, iesaista endoplazmatisko tīklu (ER), mitochondrijus. Kad barības vielu pieejamība samazinās, baktērijas diferencējas par vicaino transmisīvo formu (MIF). 4. Baktērijas atbrīvojas citosolā, kur tās turpina vairoties, pirms atbrīvojas no saimnieka šūnas.
- 5.–6. Metaboliski neaktīvā formā ir spējīga inficēt jaunu saimniekšūnu vai, ilgāku laiku uzturoties ūdenī pārvēršas par dzīvotspējīgu, bet nekultivējamu formu (VBNC). N – kodols, RP – replikatīvā fāze, TP – transmisīvā fāze. Attēls adaptēts no Eisenreich and Heuner, 2016.

Vidē *Legionella* spēj uzturēties kā brīvi dzīvojoša planktona baktērija vai veidot bioplēves un piesaistīties virsmām (Shaheen et al., 2019). Turklāt *L. pneumophila* spēj kļūt par nobriedušu intracelulāru formu (MIF), kas, lai arī ir ļoti inerta un atgādina cistu, ir ārkārtīgi infekcioza (Berk et al., 2008).

Leģionellas ir sastopamas dabiskā un mākslīgā ūdens vidē visā pasaulē, tās ir konstatētas pazemes un virszemes ūdeņos, mitrās augsnēs, uz ūdensaugiem, lietus mežos, bet to galvenais rezervuārs ir cilvēka radīta ūdens vide, īpaši karstā ūdens sistēmas dzīvojamās ēkās, slimnīcās, pansionātos, viesnīcās un citās privātās un sabiedriskās ēkās, kur tās var kolonizēt krānus, dušas galvas, dzesēšanas torņus, SPA, strūklakas utt. (Kessler et al., 2021; Paranjape et al., 2020). Leģionellas spēj izdzīvot visdažādākajos apstākļos – tās ir acidotolerantas (tās īsu laiku spēj izturēt pat īpaši skābās vidēs – pH 2,0), tās ir izolētas no vides paraugiem, kuru pH ir no 2,7 līdz 8,3. Leģionellas nespēj metabolizēt ogļhidrātus, un tām ir īpaši nepieciešams ogleklis un aminoskābes kā oglekļa un enerģijas avots. Citi mikroorganismi leģionellām dod iespēju vairoties, tātad tieši vai netieši piegādā izšķīdušās organiskās vielas, vai nu tās producējot dzīves laikā, vai atmirstot radot jaunas, tomēr leģionellas parasti tiek atklātas vidēs ar sliktu uzturvielu daudzumu, piemēram, ūdensapgādes sistēmās, kur tās ir izstrādājušas mehānismus aminoskābju iegūšanai, parazitējot un vairojoties viensūņos (Caicedo et al., 2019).



Mūsdienās visbiežākais leģionelozes izplatības avots ir cilvēka radītās ūdens apgādes sistēmas. Pirmais ziņojums par to, ka *Legionella* izplatās caur dzeramā ūdens apgādes sistēmu, parādījās 1980. gadā un bija saistīts ar nozokomiālu infekciju nieres transplantācijas pacientam. Kopš tā laika leģionellas ir konstatētas dažādu tipu ēkās, ieskaitot viesnīcas, dzīvojamās ēkas, ražotnes un kruīza kuģus. Ja *Legionella* reiz nonākusi ūdensapgādes sistēmā, turpmāk to iespējams izolēt no visiem tās posmiem – no ūdens sagatavošanas līdz piegādei patērētājam, jo ir daudz dažādu faktoru, kas ietekmē leģionellu spēju izdzīvot ūdensapgādes sistēmā (Singh et al., 2022).

### 1.1.3. Leģionellu virulences faktori

Galvenā leģionellu patogenitātes iezīme ir to spēja vairoties intracelulāri. Piesaiste pie saimniekšūnas, vai tā būtu viensūnas organisma šūna vai cilvēka makrofāgs, izdzīvošana šūnā un intracelulāra vairošanās raksturo baktērijas patogenitāti (Gattuso et al., 2022).

Virulences faktori tiek definēti kā proteīni un efektori, kas veicina makrofāgu inficēšanas procesu, intracelulāru vairošanos un saimnieka imūnās atbildes regulāciju. Cilvēks leģionellām ir gadījuma saimnieks, un šo baktēriju spēja inficēt cilvēku tiek uzskatīta par ilgas kopējas baktēriju un viensūņu evolūcijas rezultātu (Mondino et al., 2020). Jebkuras saimniekšūnas inficēšana ar *L. pneumophila* ir atkarīga no rīcībspējīgas Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēmas (Dot/Icm T4SS). Proteīnu substrāti, kuru translokāciju nodrošina Dot/Icm T4SS, tiek saukti par “efektoriem”, un ir pierādīts, ka tie modulē daudzus šūnu procesus viensūņos un cilvēka makrofāgos (Lockwood et al., 2022). *Legionella* ģintī ir identificēti aptuveni 6000 efektorproteīnu. Uz šo brīdi ir identificēti vairāk nekā 320 efektori, kuru translokāciju nodrošina tieši Dot/Icm T4SS, kas ir ievērojami vairāk nekā *L. pneumophila* tuvākajam radniekam *Coxiella burnetii* (Best et Abu Kwaik, 2018).

Proteīni un efektori, kas nodrošina baktēriju dabisko spēju inficēt viensūņus, nodrošina baktēriju spēju inficēt arī zīdītāju šūnas. Turklāt ne visi dabiskās parazitēšanas efektori nodrošina spēju inficēt cilvēku. Evolūcijas gaitā leģionellām ir izveidojies t.s. “lieko” proteīnu klāsts, kas pilda vienas un tās pašas vai līdzīgas funkcijas, tas nozīmē, ka daļa no baktēriju efektoriem var pildīt paralēlas funkcijas dažādos organismos, turklāt patogēnajām un nepatogēnajām sugām daļa efektoru var pārklāties vai aizvietot cits citu (Yang et al., 2023). Atsevišķu *L. pneumophila* efektoru individuāla dzēšana neizraisa intracelulārās replikācijas fenotipisku defektu, un tiek uzskatīts, ka tas ir saistīts ar daudzu efektoru funkcionālo dublēšanos. Efektoru dublēšanās notiek dažādos veidos: molekulārā līmenī, piesaistes mērķī, šūnu procesu līmenī vai pārneses ceļos (Ghosh et O'Connor, 2017). Labi pierādīta pārklāšanās

ir SidE efektoru saimē, kur SidE efektoru saimes locekļi veic vienu un to pašu funkciju vienā un tajā pašā saimniekšūnas mērķī. SidE, SdeA, SdeB un SdeC katalizē saimniekproteīnu retikulona 4 (Rtn4) un Rab33b ubikvitināciju (Qui et al., 2016). Visu četru šo efektoru dzēšana kopā, bet ne atsevišķi pasliktina intracelulāro augšanu, kuru var atjaunot, ievietojot tikai vienu no tiem (Best et Abu Kwaik, 2018).

Leģionellām nozīmīgākie virulences faktori saistīti ar baktēriju virsmas struktūru un efektorproteīnu sekrēcijas sistēmām. Pie virsmas struktūrām pieder ārējās membrānas proteīns jeb MOMP, kas nodrošina baktēriju piesaisti pie makrofāga un iniciē imūno atbildi, IV tipa pili (T4P), makrofāgu infektivitātes potenciators jeb Mip (Shen et al., 2022).

Dot/Icm T4SS ir sarežģīta proteīnu sekrēcijas sistēma, kas atrodama daudzās gramnegatīvās baktērijās un ļauj pārnest proteīnus un citas makromolekulas tieši no vienas baktēriju šūnas uz citu vai arī nogādāt tās tieši saimniekšūnās infekcijas laikā. T4SS sastāv no liela skaita proteīna komponentu, kas apvienojas vairāku komponentu translokācijas kanālā vai piliem līdzīgā struktūrā, kas aptver baktēriju apvalku. T4SS var transportēt dažādas molekulas cauri baktēriju membrānām, tostarp DNS, RNS, olbaltumvielas un toksīnus. T4SS ir izšķiroša loma virulences faktoru nodrošināšanā, ļaujot baktērijām manipulēt ar saimniekšūnām un izvairīties no saimnieka imūnsistēmas (Mraz et al., 2022). *L. pneumophila* izmanto T4SS, lai saimniekšūnās piegādātu virkni efektorproteīnu, kas var izjaukt saimniekšūnu signalizācijas ceļus un veicināt baktēriju izdzīvošanu un replikāciju. Dot/Icm T4SS sistēma dalās sīkāk IVA tipa (T4ASS) un IVB tipa (T4BSS). *Legionella vir* homologa (*lvh*) lokuss veicina baktēriju konjugāciju, virulenci un izdzīvošanu vidē, *lvh* reģioni ir biežāk sastopami celmos, kas saistīti ar cilvēku slimībām. Gēnu klasteris, kas kodē T4ASS, saukts par *lvh*, nodrošina *lvh* reģiona mobilitāti *Legionella* ģintī, veicinot ģenētiskās informācijas apmaiņu starp sugām (Christensen et al., 2019).

Svarīgākie *L. pneumophila* virulences faktori un tos kodējošie gēni apkopoti 1.1. tabulā.

*Legionella pneumophila* virulences faktoros kodējošie gēni un funkcijas

Grupa	Gēns	Virulences faktors	Funkcija	Reference
Piesaiste pie saimniekšūnas un iekļūšana šūnā	<i>omp28</i>	MOMP, ārējās membrānas proteīns	Komplementa CR1 un CR3 alternatīvo ceļu aktivācija, fagocitozes inhibīcija, hemotakses uzlabošana	Bellinger-Kawahara et al., 1990
	<i>htpB</i>	Hsp60, karstuma šoka ( <i>Heat shock</i> ) proteīns	Adhēzija, invāzijas modulācija, citokīnu ekspresija makrofāgos	Hoffmann et al., 1999
	<i>pilB</i>	PilB, IV tipa pilu veidošanas proteīns	Adhēzija	Swanson et al., 2000
	<i>enhC</i>	EnhC, periplazmatiskais proteīns	Uzlabota iekļūšana makrofāgos, intracelulāra replikācija, izvairšanās no NOD1 receptoriem. Regulē saimniekšūnas imūno atbildi	Liu et al., 2008;
Post-translācijas modifikācijas	<i>mip</i>	Mip, makrofāgu infektivitātes potenciators	Saimniekšūnu penetrācija un intracelulāra replikācija	Helbig et al., 2003
Efektoru piegādes sistēmas	<i>dotA</i>	DotA, Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēmas proteīns	Intracelulāra replikācija makrofāgos, nepieciešama agrīnās invāzijas stadijās. Nav nepieciešama augšanai amēbās vai nematodēs	Mraz et al. 2022
	<i>icmO/dotL</i>	Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēmas savienošais proteīns	Translokācijas substrātu un sekrēcijas sistēmu sasaiste	Kim et al., 2020
	<i>legK1</i>	LegK1, Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēmas proteīns	Nf-kb aktivācija	Losick et al., 2010
	<i>lpnE</i>	LpnE, Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēmas proteīns	Leģionellu iekļūšana makrofāgos un alveolārajās šūnās	Voth et al., 2019
	<i>mavC</i>	MavC, Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēmas proteīns	Signālproteīns, inhibē saimnieka imunitāti	Gan et al., 2018
	<i>ravD</i>	RavD, Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēmas proteīns RavD	Nomāc endolizosomālo nobriešanu, inhibē NF-kB ceļu, neietekmē intracelulāro augšanu, regulē saimnieka imūno atbildi	Pike et al., 2019
	<i>lspC</i>	LspC, II tipa sekrēcijas sistēmas proteīns	Proteāžu, RNāžu, lipāžu, fosfolipāžu sekrēcijas kontrole	Rossier et al., 2003
	<i>rtxA</i>	RtxA, I tipa sekrēcijas sistēmas proteīns, RtxA	Piesaiste un iekļuve šūnā, replikācijas uzlabošana, citotoksicitāte un poru veidošanās	Cirillo et al., 2001

Grupa	Gēns	Virulences faktors	Funkcija	Reference
Efektoru piegādes sistēmas	<i>sidJ</i>	SidJ, Dot/Icm IV tipa sekrēcijas sistēmas proteīns	Kalmodulīna aktivēta glutamilāze, vairošanās makrofāgos un amēbās	Bhogaraju et al., 2019
	<i>lvhD4</i>	VirD4, <i>Legionella vir</i> homologs	Konjugācija un virulence, mijiedarbība ar ar Dot/Icm komponentiem	Segal et al., 1999
	<i>ankB/legAU13/ceg27</i>	Efektorproteīns	Leģionellu saturošu vakuolu veidošanas proteīnu nodrošināšana, intracelulāra replikācija, aminoskābju proteosomāla producēšana	Finsel et Hilbi, 2015
Metabolais faktors	<i>iraB</i>	IraB, Tri-peptīdu permeāze	Dzelzs uzņemšana	Viswanathan et al., 2000
Kustība	<i>fliD</i>	FliD, flagelīns	Viciņu veidošanās	Heuner et Steinert, 2003
Stresa regulācija	<i>katB</i>	KatB, bifunkcionāla katalāzes proksidāze	Zema ūdeņraža peroksidāzes līmeņa nodrošināšana šūnā, lai varētu notikt intracelulāra replikācija	Mraz et al. 2022
	<i>sodB</i>	SodB, dzelzs superoksīda dismutāze	Intracelulārā izdzīvošana un transmisija	Sadosky et al., 1994

## 1.2. Leģioneloze

Leģioneloze mūsdienās ir *Legionella* ģints baktēriju izraisīta infekcija, kuras izpausmes variē no viegla drudža (Pontiakas drudzis) līdz ātrai un potenciāli letālai pneimonijai (leģionāru slimība). Leģioneloze pieder pie sapronozēm, infekcijām, ko izraisa brīvi dzīvojošs organisms, kas noteiktos apstākļos var izraisīt infekciju un vairoties saimniekorganismā. Cilvēki nav šo baktēriju galvenais mērķis (Kuris et al., 2014).

### 1.2.1. Leģionāru slimība

Leģionāru slimībai nav raksturīgu pazīmju, un ne katrs, kas nonācis saskarē ar ierosinātāju, saslimst, tomēr vairākas klīniskās pazīmes tiek klasiski asociētas ar leģionāru slimību, nevis citiem pneimoniju cēloņiem. Leģionāru slimība ir atipiska pneimonija, kas var klīniski līdzināties pneimokoku vai citām bakteriālām pneimonijām, un joprojām notiek aktīvi pētījumi par metodēm, kā vienkāršāk atšķirt leģionāru slimību un pneimokoku pneimoniju, kam varētu būt līdzīgas klīniskās un radioloģiskās atrades (Saraya et al., 2018). Simptomu diapazons variē no vieglas slimības līdz smagai pneimonijai, kurai nepieciešama hospitalizācija.

Inkubācijas periods ir aptuveni 2–14 dienas, dažos gadījumos var tomēr sasniegt arī vairākas nedēļas. Paaugstināta ķermeņa temperatūra novērojama gandrīz visos gadījumos jau no pirmās slimības dienas. Var rasties prodromāla slimība ar tādiem simptomiem kā galvassāpes, mialģija, astēnija un anoreksija. Parasti novēro drudzi, kuņģa un zarnu trakta un

neiroloģiskas izpausmes. Kuņģa un zarnu trakta simptomi var būt izteikti un ietver caureju, sliktu dūšu, vemšanu un sāpes vēderā. Produktīvs klepus ar strutainām krēpām novērots aptuveni 50 % pacientu, un var rasties pleirīta sāpes krūtīs. Var būt ievērojamas galvassāpes, ko pavada apziņas traucējumi, krampji (Cunha et al., 2016). Gandrīz puse pacientu cieš no traucējumiem, kas saistīti ar nervu sistēmu, piemēram, apjukums, dezorientācija un halucinācijas, parasti šie simptomi parādās pirmajā slimības nedēļā. Bieži sastopamas nespecifiskas laboratorijas analīžu atrades, tostarp hiponatrēmija, samazināts fosfora līmenis serumā, paaugstināta kreatīnkināze, mioglobīnūrija, leikocitoze ar limfopēniju, augsts eritrocītu grimšanas ātrums un C reaktīvā olbaltuma līmenis, seruma feritīna līmeņa paaugstināšanās (vairāk nekā divas reizes) un mikroskopiska hematūrija (Cuhna et al., 2016).

Radioloģiski leģionāru slimība nav viegli atšķirama no citām pneimonijām. Radioloģiski izmaiņas redzamas jau trešajā dienā no slimības sākuma, un parasti izmaiņas sākas kā šķidrums uzkrāšanās plaušās, kas var progresēt, veidojot audu sabiezējumus (Poirier et al., 2017). Ja leģionāru slimība netiek ārstēta, slimība jau pirmajā nedēļā kļūst smagāka un iznākums var būt letāls. Biežākās komplikācijas ir elpošanas mazspēja, šoks, akūta nieru un citu orgānu mazspēja (Phin, 2014). Laikus sāka ārstēšana parasti spēj nodrošināt pilnīgu atveseļošanos, tomēr ilgtermiņā tieši slimības komplikācijas nosaka atveseļošanās gaitu. Pēc smagas infekcijas vēl vairākus mēnešus var būt novērojams nespēks, slikta atmiņa un nogurums. Retos gadījumos leģionāru slimība var progresēt līdz lēnai, pastāvīgai vai recidivējošai pneimonijai, kas definēta kā plaušu infiltrātu noturība ilgāk par 30 dienām pēc slimības sākuma (Pouderoux et al., 2020).

Lai gan daudzi cilvēki ikdienā saskaras ar *Legionella* spp., tikai neliela daļa, 0,01–6,45 % no viņiem, saslimst ar leģionāru slimību, piemēram, no ASV tiek ziņots par vidējo rādītāju 0,05 % saslimušo no visiem, kas bijuši pakļauti saskarei ar leģionellām (Wilson et al., 2022). Uzņēmība pret slimību ir saistīta ar smēķēšanu, lielāku vecumu, hroniskām sirds un asinsvadu vai elpceļu slimībām, diabētu, pārmērīgu alkohola lietošanu, onkoloģisku slimību un imūnsupresiju (Allgaier et al., 2021).

Leģionāru slimības terapija ir ārstēšana ar antibiotikām, komplikāciju un blakusslimību pārvaldība. Agrīna atbilstošu antibiotiku ievadīšana ir nozīmīgs atveseļošanās priekšnoteikums, tomēr tiek ziņots par novēlotu terapijas sākšanu – vidēji par sešām dienām (Viasus et al., 2022), turklāt novēlota terapija saistāma ar sliktāku prognozi. Ņemot vērā, ka  $\beta$  laktāma antibiotikas, ko parasti lieto, lai ārstētu bakteriālu sadzīvē iegūtu pneimoniju, ir neefektīvas leģionāru slimības ārstēšanai un ka leģionāru slimībai nav nekādu specifisku klīnisku pazīmju, ir saprātīgi nodrošināt empīrisku antibiotiku terapiju, kas ir efektīva arī pret *Legionella* spp. vidēji smagas

un smagas sadzīvē iegūtas un nozokomiālas pneimonijas ārstēšanai, līdz tiek noteikts specifisks ierosinātais.

Tā kā *Legionella* ir intracelulārs patogēns, kas mīt audos un alveolārajos makrofāgos, veiksmīga ārstēšana ir atkarīga no tādu antibiotiku lietošanas, kas sasniedz terapeitisku intracelulāru koncentrāciju makrofāgos, piemēram, makrolīdi, fluorhinoloni un ciklīnu grupa (Phin, 2014). Smagākajos leģionāru slimības gadījumos, kad nepieciešama intensīvā terapija, ieteicamās antibiotiku shēmas ietver fluorhinolonus monoterapijā vai kombinācijā ar makrolīdiem. Ņemot vērā arvien pieaugošos *Legionella* rezistences gadījumus pret fluorhinoloniem, kombinētā terapija tiek arvien vairāk atbalstīta, tomēr optimālais antibakteriālais režīms smagas leģionāru slimības ārstēšanai joprojām nav atrasts un dati ir pretrunīgi (Cecchini et al., 2017). Veicot septiņu gadu retrospektīvu pētījumu Itālijas Asti provincē, netika atrastas būtiskas mirstības atšķirības saistībā ar antibiotiku režīma izvēli. Rezultātu atšķirības bija saistītas ar vidējo ārstēšanas ilgumu, bet ne ar antibiotiku režīma izvēli (galvenokārt levofloksacīns vai azitromicīns) (Lupia et al., 2023). ASV zinātnieku grupa, veicot metaanalīzi, neatrada atšķirības starp fluorhinoloniem un makrolīdiem (Jasper et al., 2020).

### 1.2.2. Pontiakas drudzis

Pontiakas drudzis ir vieglākas formas gripai līdzīga slimība ar īsu inkubācijas periodu (parasti 30–90 h, vidēji 36 h) un augstu inficēšanās līmeni, kas var pārsniegt 90 %. Pirmais dokumentētais šīs leģionelozes formas uzliesmojums bija 1968. gadā Pontiakā Mičiganā un skāra vismaz 144 cilvēkus (Glick et al., 1978). Slimība ir pašlimitējoša, turpinās vidēji 2–5 dienas, un specifiska ārstēšana parasti nav nepieciešama. Galvenie simptomi ir drudzis, galvassāpes, nespēks un muskuļu sāpes (Iliadi et al., 2022).

Bakteriālie faktori, kas nosaka, vai konkrētais baktēriju celms izraisīs leģionāru slimību vai Pontiakas drudzi, joprojām nav noskaidroti. Pētot *Legionella feeleei* šūnu kultūrās, konstatēts, ka celms, kas bijis saistīts ar leģionāru slimību, uzrāda augstāku šūnu infekcijas ātrumu, spēcīgāku saimniekšūnu internalizāciju un lielāku citotoksicitāti nekā no Pontiakas drudža pacienta izolētais *L. feeleei* celms (Wang et al., 2015).

### 1.2.3. Ekstrapulmonālie gadījumi

Autopsijās pierādīts, ka *L. pneumophila* var izplatīties no respiratorās sistēmas uz citiem orgāniem un audiem. Leģionellas ir atrastas liesā, aknās, nierēs, miokardā, smadzenēs, sirdī, kaulu smadzenēs, locītavās, cirkšņa un intratorakālajos limfmezglos un gremošanas traktā. Leģionellas ir iesaistītas sinusīta, pankreatīta, peritonīta un pielonefrīta gadījumos cilvēkiem ar

novājinātu imunitāti. Tāpat ir ziņojumi par smadzeņu abscesiem, miokardītu, perikardītu un endokardītu, žultspūšļa, locītavu un ādas bojājumiem (Iliadi et al., 2022). Leģionāru slimības izpausmes ar eksantēmu tiek novērotas ārkārtīgi reti (Carter et al., 2022). Visbiežāk ekstrapulmonārajos gadījumos tiek izolēta *L. pneumophila*, taču vēl dažas sugas tiek minētas, kā infekcijas ierosinātāji – *L. micdadei* (Huang et al., 2019), *L. anisa* (Roussotte and Massy, 2022), *L. longbeachae* (Frostadottir et al., 2023).

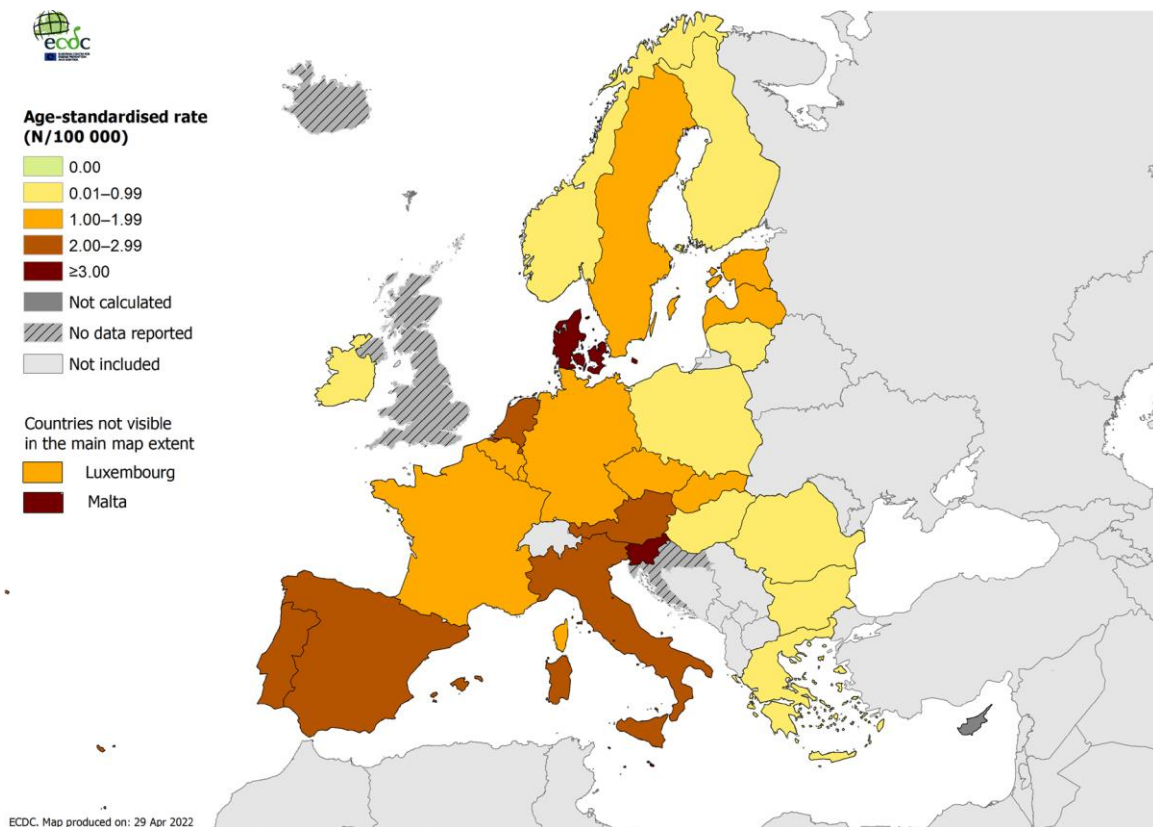
### 1.3. Epidemioloģija

Precīzs leģionelozes incidences līmenis pasaulē nav zināms, jo starp valstīm pastāv būtiskas atšķirības monitoringa un uzraudzības sistēmās, kas ir saistītas arī ar atšķirībām diagnostisko metožu izmantošanā. Lielākā daļa pieejamās epidemioloģiskās informācijas par leģionāru slimību nāk no ziņotajiem uzraudzības datiem vai slimības uzliesmojumu izmeklēšanas rezultātiem. Tiek lēsts, ka aptuveni 5 % sadzīvē iegūto pneimoniju var izraisīt *Legionella*, turklāt Eiropā šī proporcija varētu būt pat lielāka (Cilloniz et al., 2016). *Legionella* sugas pieder pie četriem biežākajiem sadzīvē iegūtu pneimoniju hospitalizāciju cēloņiem, kur 2–15 % no visiem hospitalizētiem gadījumiem cēlonis ir *Legionella* (Graham et al., 2022).

Leģionāru slimībai piemīt sezonālitate, maksimālā aktivitāte ir vasaras beigās līdz rudenim. Vairāki pētījumi ir saistījuši šo pieaugumu ar siltākiem un mitrākiem laikapstākļiem un augstāku relatīvo mitrumu šajos gadalaikos (Dunn et al., 2013).

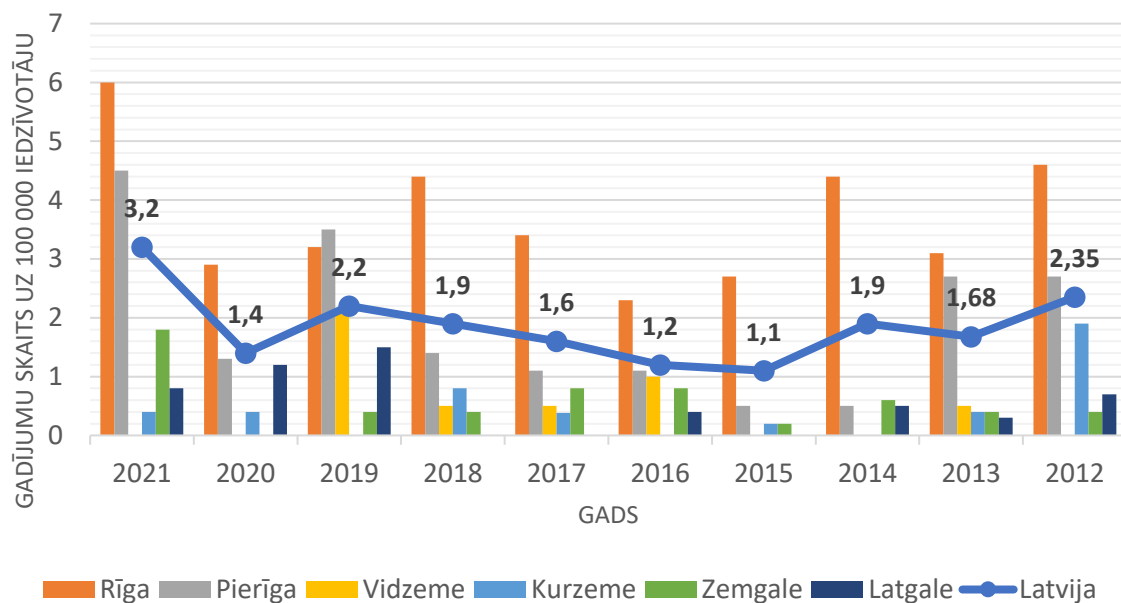
No 2016. līdz 2019. gadam ES/EEZ ziņoto gadījumu skaits pieauga visā teritorijā, tomēr reģistrēto gadījumu skaits 2020. gadā, salīdzinot ar 2019. gadu, ir samazinājies. Šo novēroto samazinājumu, iespējams, ir ietekmējusi Covid-19 pandēmija. Ceļojumu ierobežojumi un pārmaiņas sabiedrībā var būt izraisījušas atšķirības iedzīvotāju saskarē ar *Legionella* riska avotiem, tāpat arī, iespējams, veiktas izmaiņas testēšanas protokolos, kas varēja ietekmēt laboratoriski apstiprināto gadījumu skaitu, un nepietiekamu ziņošanu varēja izraisīt veselības aprūpes sistēmu spriedze Covid-19 dēļ (ECDC, 2022).

Ziņoto gadījumu skaits 2020. gadā ES/EEZ svārstījās no mazāk nekā 1,0 gadījuma uz 100 000 iedzīvotāju astoņās valstīs (Bulgārija, Somija, Grieķija, Īrija, Lietuva, Norvēģija, Polija, Rumānija) līdz 3,0 vai vairāk gadījumiem uz 100 000 iedzīvotāju trīs valstīs (Dānijā, Maltā un Slovēnijā) (1.2. attēls).



1.2. attēls. Leģionāru slimības gadījumu skaits uz 100 000 iedzīvotāju pa valstīm, ES/EEZ, 2020 (Avots: ECDC, 2022)

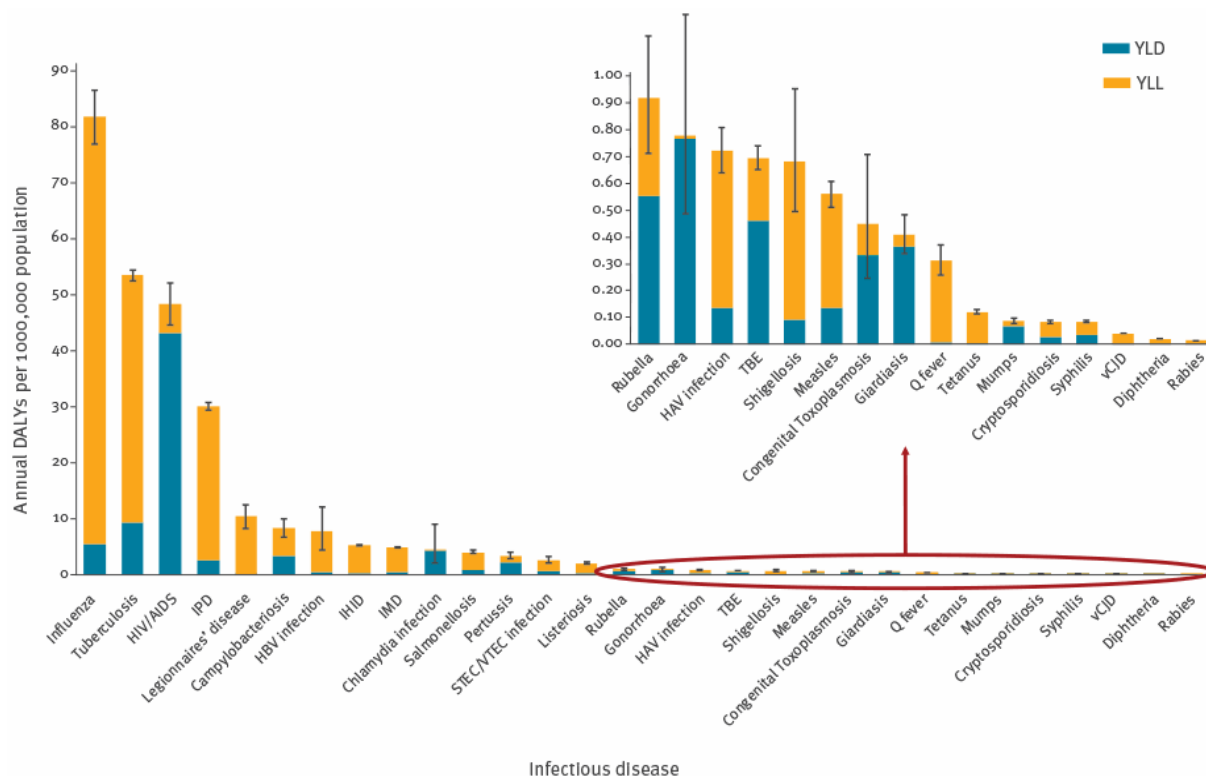
Latvijā pēdējo desmit gadu laikā vidēji reģistrēti 2,36 leģionāru slimības gadījumi uz 100 000 iedzīvotāju un, līdzīgi kā ES/EEZ, novērojama pieauguma tendence pēdējos gados (1.3. attēls).



1.3. attēls. Leģionāru slimības gadījumu skaits Latvijā un Rīgā, Pierīgā, Vidzemē, Kurzēmē, Zemgalē un Latgalē 2012.–2021. gadā (Avots: SPKC Epidemioloģijas biļeteni)



Eiropā veiktā pētījumā par infekcijas slimību ietekmi uz iedzīvotāju veselību, izmantojot kā rādītāju invaliditātes ietekmētos dzīves gadus (DALY), atklājās, ka leģionāru slimība radīja piekto augstāko slogu pēc gripas, tuberkulozes, cilvēka imūndeficīta vīrusa infekcijas/AIDS un invazīvas pneimokoku slimības (Cassini et al., 2018). Gandrīz visi leģionāru slimības DALY bija saistīti ar dzīves gadiem, kas zaudēti priekšlaicīgas nāves dēļ (1.4. attēls).



1.4. attēls. Vidējie gada DALY uz 100 000 iedzīvotāju atsevišķām infekcijas slimībām, ES/EEZ valstis, 2009.–2013. gads (Avots: Cassini et al., 2018)

Eiropā nāve iestājas vidēji 9,3–10,3 % leģionāru slimības pacientu, savukārt ASV un Jaunzēlandē mirstība ir zemāka – attiecīgi 7,8 % un 2,9 % (Beaute et al., 2017). Vecāku cilvēku, smēķētāju, cilvēku ar blakusslimībām vidū mirstība var būt augstāka. Tāpat arī nozokomiāliem gadījumiem un novēlotas ārstēšanas sākšanas gadījumā mirstības rādītāji pieaug (Dominguez et al., 2009). Būtiskas var būt arī atšķirības ne tikai starp valstīm, bet arī valstu iekšienē.

Zemāki mirstības rādītāji tiek skaidroti ar to, ka lielākā daļa pētījumu, kas ziņoja par augstu leģionellas pneimonijas izraisīto mirstību, galvenokārt balstījās uz pozitīvu urīna antigēna testu. Lai šis tests būtu pozitīvs, visticamāk, būs nepieciešama lielāka baktēriju slodze, kas atbilst augstākam slimības smagumam, savukārt ar PĶR metodēm var noteikt gadījumus ar zemāku baktēriju koncentrāciju un attiecīgi mazāk smagu slimību. Jaunzēlandes pētījumā tika pārbaudīti tikai hospitalizētie pacienti (Priest et al., 2019), un šis pētījums liecina, ka patiesais leģionāru slimības slogs, šķiet, ir novērtēts par zemu. Šis atklājums varētu ietekmēt arī

sabiedrībā iegūtas pneimonijas ārstēšanas vadlīnijas. Lielākā daļa pētījumu par sabiedrībā iegūtas pneimonijas cēloņiem neatklāj galveno patogēnu 30–70 % cilvēku, neskatoties uz visaptverošām mikrobioloģiskajām pārbaudēm. *Legionella* spp. varētu būt sadzīvē iegūtās pneimonijas cēlonis nozīmīgā nediferencēto pneimoniju daļā (Pletz et al., 2019).

#### 1.4. Transmisija un riska faktori

Inficēšanās parasti notiek, ieelpojot kontaminētus aerosolus vai aspirācijas ceļā. Līdz šim ir bijis tikai viens ziņojums no Portugāles (Correia et al., 2016) par iespējamu infekcijas nodošanu no cilvēka uz cilvēku, tomēr dati ir nepietiekami, lai uzskatītu šādu iespēju par nozīmīgu risku. Inficēts avots, piemēram, strūklaka, var izplatīt aerosolu jeb sīkus leģionellas saturošus ūdens pilienus. Gaisā lielākā daļa iztvaiko pietiekami ātri, atstājot sīkas daļiņas, kas ir pietiekami mazas. Daļiņas, kas mazākas par 5 μm var tikt dziļi ieelpotas. Leģioneloze tiek bieži asociēta ar avotiem, kas atrodas līdz 3,2 km attālumā, pētījumi rāda, ka šie attālumi var būt vēl lielāki (Fennelly, 2020).

Aerosolus spēj radīt dažādas sistēmas: ēku ūdensapgādes sistēmas, ieskaitot dušas, krānus, masāžas vannas un baseinus, dzesēšanas sistēmas, dzesēšanas torņi vai iztvaikošanas kondensatori, gaisa mitrinātāji un izsmidzināšanas sistēmas, mākslīgās elpināšanas iekārtas, zobārstniecības kabinetu aprīkojums, dekoratīvās strūklakas un ūdens aizkari, rūpniecisko iekārtu ūdens dzesēšanas sistēmas, putekļu slāpēšanas sistēmas, ko izmanto cementa un atkritumu pārstrādes jomā, augstspiediena mazgāšanas iekārtas, arī transportlīdzekļu mazgāšanas ierīces, zālienu laistīšanas sistēmas, karstie avoti un ūdenskritumi.

Visbiežāk inficēšanās notiek sadzīves ceļā cilvēku dzīvesvietās, sporta klubos, iepirkšanās centros, izklaides un rūpnieciskās ēkās. Ar ceļošanu saistītie gadījumi parasti saistīti ar uzturēšanos viesnīcās un kruīza kuģos, savukārt nozokomiālos gadījumos infekcijas avoti ir medicīnas aprīkojums, ventilācijas iekārtas, dušas un krāni ārstniecības iestādēs. Galvenais iemesls parasti ir neatbilstoši izveidotas vai slikti uzturētas dzesēšanas un ūdensapgādes sistēmas, neadekvāta personāla apmācība, nevienmērīga ūdens lietošana un apgāde īstermiņa uzturēšanās vietās, neregulāra vai neesoša ūdens temperatūras kontrole un zemi ūdens plūsmas rādītāji (Yu et al., 2019).

Leģionāru slimības riska faktori ietver hroniskas plaušu slimības, hroniskas kardiovaskulāras slimības, smēķēšanu, vecumu virs 50 gadiem, ārstēšanu ar glikokortikoidiem, solīdos un hematoloģiskos audzējus, citotoksisku terapiju, hronisku nieru mazspēju, diabētu, imūnsupresiju (Cunha et al., 2016). Orgānu transplantācijas recipientiem leģionāru slimība var sākties jebkurā posmā pēc transplantācijas, tā bieži sakrīt ar transplantētā orgāna atgrūšanas

gadījumiem un paaugstinātu mirstību (Mikulska et al., 2021). Nesenā pētījumā tika iegūti dati par iespējamiem jauniem riska faktoriem – piederību tumšādaino cilvēku rasei un jaunāku vecumu nekā iepriekš veiktajos pētījumos (Allgaier et al., 2021).

## 1.5. Laboratoriskās diagnostikas metodes

Leģionāru slimības laboratoriskās diagnostikas metodes ietver mikrobioloģijas “zelta standartu”, kas ir klasiskā mikrobioloģijas kultūru izdalīšana, urīna antigēna noteikšanu, tiešo mikroskopiju un imūnfluorescenci, antivielu noteikšanu un molekulārās metodes. Eiropā 2020. gadā 87 % gadījumu slimības diagnoze noteikta, balstoties uz urīna antigēna testu, 11 % gadījumu izmantota kultūru izdalīšana, un 11 % diagnožu izmantotas PQR metodes (ECDC, 2022).

Lai gan ir pieejamas modernas imunoloģiskās un molekulārās metodes (1.2. tabula), leģionāru slimības laboratoriskā diagnostika ir efektīva galvenokārt *L. pneumophila* 1. serogrupas izraisītajiem gadījumiem. Pieejamo metožu specifiskums un jutība pret pārējām serogrupām un sugām joprojām ir tālu no ideālā. Pašlaik liela daļa klīnisko gadījumu tiek identificēta, izmantojot urīna antigēna testu, kura pamatā ir lipopolisaharīdu noteikšana, un acīmredzot tieši tāpēc *L. pneumophila* 1. serogrupas identifikācijas gadījumu skaits pieaug, savukārt citas serogrupas un sugas, iespējams, netiek diagnosticētas un paliek neatpazītas (Graham et al., 2022). Tiek lēsts, ka urīna antigēna tests nekonstatē aptuveni 10 % leģionellas infekciju. Turklāt negatīvs rezultāts neizslēdz *Legionella* spp. kā patogēnu, tomēr urīna antigēna testa pilnveidošana turpinās arī šobrīd, piemēram, ir izstrādāti testi ribosomālo proteīnu L7/L12 noteikšanai urīnā, kas tiek uzskatīts par ļoti daudzsološu virzienu (Viasus et al., 2022).

1.2. tabula

### Leģionāru slimības laboratoriskās diagnostikas metožu salīdzinājums

(adaptēts no Bai et al., 2023 un Pierre, 2017)

Metode	Jutīgums (%)	Specifiskums (%)	Komentārs
<b>Klasiskā mikrobioloģiskā kultūru izdalīšana</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikrobioloģijas “zelta standarts”</li> <li>• Nepieciešamas 2–4 dienas, retāk līdz 14 dienām</li> <li>• Augsts specifiskums</li> <li>• Sarežģīti iegūt labas kvalitātes materiālu</li> <li>• Ietekmē sāka antibiotiku terapija</li> </ul>
Krēpas	5–70	100	
Bronhoalveolārs noskalojums vai transtraheāls aspirāts	30–90	100	
Plaušu biopsijas materiāls	90–99	100	
Asinis	10–30	100	
<b>Seroloģija</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serokonversijai var būt nepieciešamas 3–9 nedēļas</li> <li>• Antivielu veidošanos ietekmē pacienta imunitāte</li> </ul>
Serokonversija	70–90	95–99	
Viens atsevišķs paraugs	Nav zināms	50–70	

Metode	Jutīgums (%)	Specifiskums (%)	Komentārs
Urīna antigēns	69–100	99–100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Piemērots tikai 1. serogrupai, maz datu par citām serogrupām vai sugām</li> <li>Ļoti ātri rezultāti – (15 min.–3 h), bieži pirmais agrākais pozitīvais gadījums, pozitīvs var palikt vairākas nedēļas/mēnešus</li> <li>Aptuveni 8 % pacientu neizdala antigēnu ar urīnu</li> </ul>
<b>DFA (tiešā imunofluorescence)</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>Ļoti ātri (2–4 h)</li> <li>Ierobežota jutība</li> <li>Nepieciešama liela personāla pieredze</li> </ul>
Krēpas vai bronhoalveolārs noskalojums	25–75	95–99	
Plaušu biopsijas materiāls	80–90	99	
<b>PQR</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>Ātri</li> <li>Joprojām neskaidra pozitīvu gadījumu diagnostikas validitāte bez apstiprināšanas ar citām metodēm</li> <li>Iespējams noteikt visas <i>Legionella</i> sugas</li> <li>Ar <i>multiplex</i> metodi iespējams vienlaikus identificēt arī citus patogēnus</li> </ul>
Paraugi no elpošanas ceļiem	85–99	94–99	
Urīns, serums	33–99	98–98	
<b>Metagenomiska nākamās paaudzes sekvenčšana</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>Ātri un precīzi</li> <li>Pagaidām ļoti dārgi</li> <li>Iespējams vienlaikus identificēt arī citus patogēnus</li> <li>Nav iespējams salīdzināt sekvenčes starp dažādiem paraugiem</li> </ul>
Paraugi no elpošanas ceļiem, urīns, serums	Augstāka nekā PQR un kultivēšanas metodes		

Laboratoriskie testi leģionāru slimības diagnostikai būtu jāveic visiem pneimonijas riska grupas pacientiem, tostarp tiem, kuri ir smagi slimi ar vai bez leģionelozes klīniskajām pazīmēm, un tiem, kam nav citas diagnozes. Jo īpaši laboratoriskie testi būtu jāveic pneimonijas pacientiem, kas vecāki par 40 gadiem, imūnsupresētiem pacientiem un tiem, kas nereaģē uz bēta laktāma antibiotikām, varētu būt saskārušies ar infekcijas avotu uzliesmojuma laikā vai bijuši ceļojumā 10 dienas pirms slimības sākuma (WHO, 2007).

Pieaugošā PQR testēšanas kā ikdienas metodes pieejamība rada arī bažas par atklātā mikroorganisma klīnisko nozīmi. Šīs bažas attiecas ne tikai uz *Legionella* ģints baktērijām, bet arī uz citām ar aerosolu pārnēsātām mikroorganismu ģintīm ar daudzām sugām, no kurām daļa var būt patogēnas, bet daļa nepatogēnas. Uz PQR balstītas metodes var noteikt ļoti mazu mikroorganismu skaitu ar apšaubāmu virulenci, un spēja atšķirt ierosinātāja nēsāšanu no patiesas infekcijas var kļūt par izaicinājumu. Var pat tikt nodarīts kaitējums pacientiem un veicināta pretantibiotiku rezistences veidošanās, nevajadzīgi nozīmējot pretinfekcijas līdzekļus, ja ar PQR metodi atklātais patogēns ir mazāk nozīmīgs jauktā (piemēram, vīrusu-baktēriju)

infekcijā un netiek ņemts vērā galvenais patogēns. Tāpēc uz PĶR balstīto testu rezultāti jāinterpretē piesardzīgi un vienmēr jāvērtē klīniskajā kontekstā (Pletz et al., 2019).

*Legionella* vides uzraudzība tiek veikta, izmantojot standartizētu kultivēšanas metodi (ISO 11731), un pēdējos gados tika ieviesta reāllaika polimerāzes ķēdes reakcija (RT-PĶR), lai apstiprinātu negatīvus rezultātus vai ātri pārbaudītu ūdens paraugus epidēmijas notikumu laikā.

Jutības pret antimikrobiālajiem līdzekļiem noteikšana *Legionella* spp. gadījumā ir sarežģīta, jo leģionellas galvenokārt vairojas alveolu makrofāgos un monocītos. Tas nozīmē, ka antibiotikām vispirms jāspēj iekļūt šādās saimniekšūnās un pēc tam efektīvi iznīcināt baktērijas. Šī darbība ietekmē arī jutības pret antibakteriāliem līdzekļiem testēšanu, un daudzi ir mēģinājuši testēt jutību pret antibakteriāliem līdzekļiem, izmantojot baktēriju internalizētas šūnas, kas pieder pie dažādām cilvēka šūnu līnijām (Dunne et al., 2016).

Daudzi pētījumi ir pierādījuši leģionellu tipēšanas lietderību epidemioloģiskās izmeklēšanas veikšanai, kas ir nepieciešama, lai noteiktu saikni starp infekcijas avotiem un klīniskiem gadījumiem, kā arī lai īstenotu atbilstošus riska kontroles pasākumus. Epidemioloģiskajiem pētījumiem parasti tiek noteiktas divas *Legionella* celmu īpašības: seroloģiskā grupa (īpaši SG1) un genotips.

Nākamās paaudzes sekvencēšanas (NGS) attīstīšanās ir mainījusi mikrobioloģiju, padarot sabiedrības veselībai svarīgu patogēnu pilna genoma sekvencēšanu viegli pieejamu. NGS metožu izmantošana infekcijas slimību uzraudzībā kļūst par ierastu praksi un pamazām aizvieto “zelta standarta” metodes (Leopold et al., 2014). Ar molekulārām metodēm var ātri iegūt informāciju, lai identificētu un genotipētu dažādas leģionellas sugas un serogrupas. Pašlaik nav pieejama ideāla vispārīgi derīga un standartizēta tipēšanas metode, jo gan katram organismam var būt savas specifiskās atšķirības, gan katrai metodei ir savas priekšrocības un trūkumi.

Leģionellu molekulāro tipēšanu visbiežāk veic, izmantojot sekvencē balstīto tipizēšanu (SBT). *Legionella* sugām, kas nav *L. pneumophila*, bieži tiek izmantota makrofāgu inficētspējas potenciatora (*mip*) gēna amplifikācija (Girolamini et al., 2020). SBT tehnika ir multilokusu sekvenču tipēšanas (MLST) shēmu variants, ko izmanto baktēriju līniju identificēšanai. SBT tehniku izstrādāja Eiropas leģionāru slimības uzraudzības tīkla dalībnieki, un tā ir aprakstīta kā vienkārša, ātra metode *L. pneumophila* celmu tipēšanai (Fry et al., 2007). SBT tehnikas pamatā ir shēma, kas izstrādāta, apvienojot septiņus pamata (*housekeeping*) un virulences gēnus (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* un *neuA*). Tagad šī metode tiek uzskatīta par *Legionella* genotipu noteikšanas zelta standartu un ir noderīga *L. pneumophila* infekciju avotu identificēšanai, demonstrējot saikni starp klīniskajiem un vides izolātiem,

Multilokusu sekvenču tipēšanas shēmas genomiskā versija, ko *Moran-Gilad* un kolēģi izstrādāja 2015. gadā, tagad ir ļoti plaši izplatīta (Moran-Gilad et al., 2015). Autori ierosināja *core*-genoma tipēšanas shēmu, izmantojot 1521 gēnu. Šī sistēma ļauj veikt detalizētu salīdzinošu celmu analīzi, tiklīdz ir zināma to genoma secība. Šī sistēma ir ļoti viegli pieejama, to var viegli koplietot starp pētniekiem, kas strādā dažādos institūtos atšķirīgos kontinentos.

## **1.6. Svarīgākie vides elementi, kas veicina leģionelozes izplatību**

### **1.6.1. Temperatūra**

Temperatūra tiek uzskatīta par vienu no būtiskākajiem parametriem, kas ietekmē *Legionella* klātbūtni un koncentrāciju ūdenī. *L. pneumophila* ir izolēta no ūdeņiem ar plašu temperatūras diapazonu – no 5,7 °C līdz 63 °C, savukārt proliferācija parasti notiek temperatūrā no 25 °C līdz 45 °C, optimālā temperatūra ir  $35 \pm 2$  °C (Papagianeli et al., 2021). Sarežģītas dzeramā ūdens apgādes sistēmas, kondicionēšanas sistēmas, peldbaseini un burbuļvannas visbiežāk darbojas temperatūras diapazonā, kas ir ideāli piemērots leģionellu attīstībai, turklāt visas šīs sistēmas ir spējīgas veidot aerosolus, kas palielina leģionellu izplatīšanās iespēju.

Termisko dezinfekciju cita starpā var izmantot patogēna kontrolei. Ir pierādīts, ka pastāvīga temperatūra diapazonā no 55 °C līdz 60 °C ir efektīva pret *L. pneumophila* karstā ūdens sadales sistēmās, jo baktēriju populāciju var ātri samazināt. Termisko šoku var uzskatīt par alternatīvu ārkārtas situācijām apstākļos, kad termiskā dezinfekcija tiek panākta, paaugstinot ūdens temperatūru līdz 80 °C un pēc tam cirkulējot karsto ūdeni pa visu sistēmu uz laiku līdz trim dienām (ESGLI, 2017). *L. pneumophila* termiskā inaktivācija iepriekš ir aprakstīta vairākos pētījumos. Jau 1984. gadā konstatēts, ka *L. pneumophila* decimālais samazināšanās laiks jeb D vērtība (laiks, kas nepieciešams noteiktos apstākļos, lai iznīcinātu 90 % no konkrēto mikroorganismu daudzuma) būs attiecīgi 111, 27 un 6 min. 50 °C, 54 °C un 58 °C temperatūrā (Dennis et al., 1984). Jaunākos modeļos tiek izmantotas aplēstās D vērtības 0,23 minūtes ūdens temperatūrai 61 °C un 25,31 minūte ūdens temperatūrai 51 °C (Papagianeli et al., 2021). Tomēr ilgtermiņā regulāra termiskā šoka izmantošanas efektivitāte leģionellu kontrolei ir zema (Molina et al., 2022).

### **1.6.2. Bioplēves**

Drošs dzeramais ūdens patērētājam tiek piegādāts pa kilometriem garām caurulēm. Šīs caurules ir izklātas ar bioplēvi, kas ietekmē ūdens kvalitāti, izlaižot baktērijas dzeramajā ūdenī (Chan et al., 2019). Bioplēve ir organisku un neorganisku, dzīvu un mirušu materiālu kopums, kas atrodas uz virsmas. Bioplēves dzeramā ūdens cauruļu tīklos var izraisīt dažādas ūdens

kvalitātes un darbības problēmas – tās var būt atbildīgas par sadales sistēmas dezinfekcijas līdzekļu atlieku zudumu, paaugstinātu baktēriju līmeni, izšķīdušā skābekļa samazināšanos, garšas un smaržas izmaiņām, ūdens krāsainības problēmām, mikroorganismu izraisītu koroziju utt. (Makris et al., 2014). Ļoti bieži, īpaši uz vecu cauruļu iekšējās virsmas, veidojas nogulumu, tostarp katlakmens un bioplēvju konglomerāti, kas var būtiski ietekmēt gan ūdens kvalitāti, gan ūdensapgādes sistēmas caurplūdes spējas (1.5. attēls).



**1.5. attēls. Remontdarbu laikā izņemto karstā ūdens cauruļu fragmenti ar bioplēvju un nogulumu konglomerātiem**

Daudzdzīvokļu ēkas Rīgā, 2017. gada maijs. Fotogrāfiju autors D. Pūle.

Dažādu ar virsmām saistīto mikroorganismu aktivitāte un kolonizācija jeb “bioplēvju veidošanās” notiek kā uz dabiskām, tā arī mākslīgām virsmām. Mikroorganismi, ieskaitot *L. pneumophila*, var veidot bioplēves kā mehānismu, kas palīdz izdzīvot nelabvēlīgos apstākļos ar ierobežotu uzturvielu daudzumu, nelabvēlīgu temperatūru vai biocīdu klātbūtni (Patini et al., 2020; Talapko et al., 2020). Lai leģionellas izdzīvotu oligotrofos apstākļos, kur ir pieejams mazāk barības vielu, tām ir jāiekļaujas kopienās ar citām baktērijām, kas arī izskaidro *Legionella* spp. koncentrāciju mākslīgās ūdens vidēs, piemēram, karstajā ūdenī. Šādās kopienās iekļautie mikroorganismi spēj atvairīt tādus organismus, kuri nedos nekādu labumu jau esošajai kopienai (Talapko et Škrlec, 2022).

Mikroorganismu nostiprināšanās uz virsmām parasti notiek ar šūnas radītu ekstracelulāru polisaharīdu substances (glikokaliksu) palīdzību – to sauc par nespecifisko piesaistīšanos, kam seko “pioniermikroorganismu” kolonizācija, kuri var vairoties un veidot mikrokolonijas. Arī mikrokolonijas ir aizsargātas ar glikokaliksa slāni, tomēr jebkurā bioplēves veidošanās posmā daļa no tās var tikt atdalīta un ar ūdens plūsmu aiznesta tālāk, kur var nostiprināties uz citām virsmām. Eksopolisaharīdu slānis aizsargā bioplēvē esošās šūnas un arī atvieglo saziņu starp tām, nodrošinot bioķīmiskos signālus. Bioplēvēs ir atrasti ūdens kanāli,

kas palīdz izplatīt uzturvielas un signālmolekulas. Daudzi faktori ietekmē bioplēvju veidošanos un persistenci, un bioplēve dod iespēju piesaistīties dažādām baktēriju sugām dažādās bioplēves veidošanās stadijās no sākotnējās piesaistīšanās līdz ekstracelulārās matricēs veidošanai (Cont et al., 2020).

Bioplēves, kas var ietvert gan *Legionella*, gan viensūņus, nodrošina tajā esošajiem organismiem barības vielas un gāzu apmaiņu, kā arī pasargā mikroorganismus no biocīdiem, periodiskas temperatūras paaugstināšanās un vietās, kur virsmas ir apkaļķojušās vai rūsas skartas, – arī no mehāniskas atdalīšanas (Abdel-Nour et al., 2013).

Kvorumsajūta gramnegatīvajās baktērijās regulē dažādu procesu gēnu ekspresiju, tostarp bioplēvju veidošanos, un QS var būt nozīmīga loma leģionellu izplatīšanā bioplēvēs (Santajit et al., 2020). Baktērijas, kuras spēj izmantot QS, bieži tiek atrastas mākslīgā ūdens vidē, un tās var regulēt arī bioplēvju veidošanos (Pena et al., 2019).

### 1.6.3. Viensūņi

Pārtikas un vides patogēnie mikroorganismi dala vienu ekoloģisko nišu ar brīvi dzīvojošiem viensūņiem, un tiek uzskatīts, ka viensūņiem ir ļoti nozīmīga loma patogēno baktēriju persistencē ūdensapgādes sistēmās un dažādos pārtikas aprites ķēdes posmos. Viensūņi ir nozīmīgs vektors, kas nodrošina *Legionella* augšanu un izdzīvošanu dabiskā un mākslīgā vidē.

Brīvi dzīvojošām amēbām gremošana notiek fagolizosomās, kur fagocitozes ceļā tās barojas ar baktērijām, mikroskopiskajām sēnēm un aļģēm. Daži mikroorganismi ir kļuvuši rezistenti pret viensūņiem un, esot amēbas iekšienē, netiek sagrauti vai sagremoti. 2004. gadā tika radīts jauns jēdziens – “amēbu rezistenti mikroorganismi” (Greub et al., 2004). Brīvi dzīvojošās amēbās intracelulārie amēbu rezistentie mikroorganismi var būt patogēni vai simbiotiski.

Dabiskā vidē *L. pneumophila* vairojas, piemēram, amēbās ar intracelulāro fagosomu palīdzību, iespējams, veidojot proteāzes ar citotoksisku iedarbību un šādi radot lokālu audu destrukciju amēbās (Janda, 2010).

Vismaz 14 viensūņu sugās leģionellas spēj vairoties, t. sk. *Acanthamoeba*, *Naegleria* un *Vermamoeba* spp., *Tetrahymena pyriformis*, *Tetrahymena vorax*. Viensūņi nodrošina leģionellām aizsardzību pret biocīdiem un dezinfekcijas līdzekļiem, UV starojumu, tāpat viensūņos leģionellām daudz vieglāk izturēt citu vides apstākļu izmaiņas un ir iespēja izdzīvot aerosolos (Cervero-Aragó et al., 2015; Cervero-Aragó et al., 2014).

Lai arī brīvi dzīvojošie viensūņi parasti nav patogēni, atsevišķos gadījumos tie var būt cilvēku slimību izraisītāji, un pašlaik ir zinātniski pierādījumi par četrpārti dzīvojošo viensūņu



ģinšu pārstāvju izraisītām slimībām. Vairākas *Acanthamoeba* sugas (*A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetii*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhisodes*, *A. astronyxis*, *A. divionensis*) un tikai pa vienai sugai no pārējām trim amēbu ģintīm – *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* un *Sappinia diploidea* – var izraisīt centrālās nervu sistēmas slimības (Angelici et al., 2021).

Mehānismi, kas ir palīdzējuši baktērijām izvairīties no apēšanas, var kļūt par baktēriju virulences faktoriem (Sun et al., 2018), un leģionellām, kurām ir lielāka spēja ražot polisaharīdus, attiecīgi ir labāka spēja veidot bioplēves (Bigot et al., 2013). Vienstūņu cistās un trofozoītos iekļautās baktērijas ir pasargātas no biocīdu iedarbības. Dzīvotspējīgas *Legionella pneumophila* šūnas tika izolētas no *A. polyphaga* cistām pēc 18 stundu ilgas ekspozīcijas 50 mg/L brīvā hlora šķīdumā (Snelling et al., 2006). Ir novērota baktēriju rezistence pret antimikrobiālajiem preparātiem, kamēr tās atrodas trofozoītos vai jau pametušas vienschūnas saimnieku. Pagaidām vēl nav līdz galam izprasti pretantibiotiku rezistences mehānismi un tiek uzskatīts, ka rezistences palielināšanos var izraisīt vairāku faktoru kopums – gan vienschūna membrānas spēja aizturēt antibiotiku iekļūšanu tajā, gan metaboliskā inaktivācija amēbas ķermenī, gan arī iespēja, ka amēbā izdzīvo tikai selektīvi rezistenti baktēriju fenotipi. Amēbu iekšienē uzaugušās *L. pneumophila* ir daudz rezistentākas pret rifampīnu, ciprofloksacīnu un eritromicīnu nekā brīvi dzīvojošās leģionellas, turklāt brīvi dzīvojošām baktērijām rezistence pret rifampīnu bija pat 1000 reižu zemāka. Interesanti, ka daļa baktēriju, izkļūstot no amēbas, savas rezistences spējas ātri zaudē, kamēr citas rezistenci saglabā (Thomas et Ashbolt, 2011).

Labvēlīgos apstākļos šie mikroorganismi var lizēt saimnieka šūnu un liels daudzums mikroorganismu var tikt atbrīvots apkārtējā vidē, vai baktērijas saturošas amēbu fagosomas var tikt izstumtas ārpus amēbas šūnas, kas bieži vien notiek pirms iecistēšanās. Viena šāda izstumtā fagosome var saturēt līdz pat 100 cieši sapakotu *Legionella* baktēriju, turklāt cilvēkiem *Legionella* infekciozā deva tiek uzskatīta par ļoti zemu. Ir novērtēts, ka 90 % *A. polyphaga* un *A. castellanii* izstumto fagosomu, kas satur dzīvas *Legionella* baktērijas, ir pietiekami mazas, lai tās tiktu ieelpotas, tās ir mazākas par 5 μm diametrā, kas apstiprina hipotēzi, ka inficētie cilvēki, visticamāk, ir ieelpojuši ar baktērijām pildītu fagosomu, nevis brīvi dzīvojošās leģionellas (Berk et al., 1998). Turklāt izstumtās fagosomas ir izturīgākas pret ārējās vides apstākļiem nekā amēbu trofozoītu formas. Fagosomas ir izturējušas 24 h apstrādi ar biocīdiem dzesēšanas sistēmās, tās saglabā leģionellu dzīvotspēju arī pēc sasaldēšanas līdz -70 °C un sekojošas atkausēšanas līdz 35 °C, savukārt trofozoīti šajos pašos apstākļos parasti iet bojā. *A. polyphaga* labvēlīgos apstākļos spēj izveidot līdz pat 25 fagosomām 24 stundu laikā, un fagosomas pēc tam brīvi var pārvietoties ūdenī. Amēbām trofozoītu un cistu formā ir nepieciešama piesaiste fiziskam substrātam, savukārt tas nozīmē, ka biežāk tieši izstumtās

fagosomas, nevis pašas amēbas veicina leģionellu izplatīšanos ar aerosoliem (Bichai et al., 2008).

Vienšūņi ne vien var būt mikroorganismu gēnu apmaiņas vieta, bet arī spēj piedalīties šajā gēnu apmaiņas procesā. Ir rasti pierādījumi par horizontālo gēnu pārnesei starp amēbām un baktērijām (Gomez-Valero et al., 2019). Vienšūņi tiek saukti par “gēnu kausēšanas tīģeļiem”, “evolūcijas šūpuļiem” vai “inkubatoriem”, kuros notiek gēnu apmaiņa starp saimniekiem, baktērijām un vīrusiem. Intracelulārajiem patogēniem vienšūņi ir kalpojuši par “treniņu laukumu”, kas iemācījies tiem pielāgoties intracelulārai dzīvei cilvēka vai dzīvnieka makrofāgos. Vienšūņu stimulētai gēnu apmaiņai ir liela nozīme sabiedrības veselībā, piemēram, *T. pyriformis* darbojas kā mediators kanamicīna rezistences plazmīdu pārnesei starp divām *Escherichia coli* sugām, un ir pierādījumi par ceftriaksona rezistences gēnu pārnesei starp *Klebsiella* un *Salmonella*, kur vienšūnis darbojas kā mediators (Vaerrewijck et al., 2014).

Kā tieši amēbas kolonizē ūdensapgādes sistēmu, joprojām līdz galam nav skaidrs, tomēr pētījumi rāda, ka tieši bioplēvēm ir nenoliedzama loma šajā procesā. Ūdensapgādes sistēmas sedimentā amēbu daudzveidība ir lielāka un arī to skaits ir lielāks nekā tās pašas sistēmas bioplēvēs, savukārt amēbas no bioplēvēm var atbrīvoties lielos daudzumos un kolonizēt ūdens apgādes sistēmas lejteci (Thomas et Ashbolt, 2011).

### **1.7. Leģionelozes profilakse un kontrole ūdensapgādes sistēmās**

*Legionella* ierobežošana un profilakse ūdensapgādes sistēmās ir komplekss pasākums, kas ietver ne tikai regulāru uzraudzību un kontroli, bet arī sabiedrības izglītošanu, tostarp dažādas ūdens apgādes sistēmas apkalpojošo tehnisko darbinieku apmācības.

Galvenie *Legionella* risku kontroles uzdevumi ir nodrošināt pasākumus, kas novērš baktēriju iekļūšanu sistēmā, neļaujot tām arī neierobežoti augt un attīstīties sistēmas iekšienē, un samazināt saskari ar aerosolizētiem ūdens pilieniem.

Eiropā pašlaik tiek izmantotas Eiropas Slimību profilakses un kontroles centra Eiropas Leģionellu izpētes grupas (ESGLI) vadlīnijas par leģionellu profilaksi un kontroli, un tajās noteikts, ka jebkurā ūdensapgādes sistēmas vietā karstā ūdens temperatūrai jābūt ne mazākai kā 50 °C, bet ideāli 55 °C (ESGLI, 2017). Tātad šādai minimālajai temperatūrai ir jābūt karstā ūdens patēriņa brīdī.

Latvijā dzīvojamās mājās ūdens temperatūru regulē 2010. gada MK noteikumu Nr. 906 “Dzīvojamās mājas sanitārās apkopes noteikumi” 17. punkts, kurā noteikts, ka dzīvojamās mājas pārvaldītājam ir pienākums pastāvīgi nodrošināt karstā ūdens temperatūru izejā no siltummaiņa ne zemāku par 55 °C (MK noteikumi Nr. 906). MK noteikumos nav visaptveroši ietvertas ECDC ESGLI rekomendācijas, jo, nosakot minimālo temperatūru pie izejas no siltummaiņa, nav ņemts vērā temperatūras kritums, kurš rodas, ūdenim atdziesot ceļā pie patērētāja.

Lai ierobežotu leģionellu attīstību dzeramā ūdens apgādes sistēmās, aukstā ūdens temperatūrai jābūt ne augstākai par 25 °C, vēlams zem 20 °C, cirkulācijas sistēmā karstā ūdens temperatūrai jābūt aptuveni 60 °C, un piegādes brīdī patērētājam karstā ūdens temperatūra nedrīkst būt zemāka par 50 °C, šāda temperatūra piegādes brīdī jānodrošina ne ilgāk kā 1 minūti pēc karstā ūdens krāna atvēršanas. Vietās, kur jānodrošina izvairīšanās no apdegumiem, piemēram, bērnudārzos, jānodrošina alternatīvi leģionellu ierobežošanas pasākumi (ESGLI, 2017).

Bioplēvju veidošanās novēršana ir svarīgs *Legionella* kontroles pasākums. Ja bioplēve ir jau izveidojusies, kompleksā cauruļvadu sistēmā to ir ārkārtīgi grūti noņemt. Dažādi faktori var veicināt bioplēvju veidošanos, tostarp barības vielu klātbūtne, katlakmens un korozija, silta ūdens temperatūra un ūdens “stagnācija”, zems plūsmas ātrums cauruļvadu galos un rezervuāros. Katlakmens un korozija palielina bioplēvēm pieejamo virsmu un veido mikronišas, kas ir pasargātas no dezinfektantu cirkulācijas. Tie var palielināt arī barības vielu koncentrāciju un dzelzs saturu, kas nepieciešams leģionellu augšanai un attīstībai. Nekontrolētas bioplēves var sašaurināt caurules, pasliktinot plūsmu un radot stagnāciju, kas atkal palielina leģionellu izplatīšanās risku.

Neatbilstoša tīrīšana, samazināta dezinfektantu koncentrācija, palielināta sedimentācija un būvniecības un santehnikas materiāli arī var ietekmēt mikroorganismu bioplēvju veidošanos šādās sistēmās. Dabiski materiāli, tostarp gumijas starplikas, var nodrošināt barības vielām bagātu substrātu un veicināt kolonizāciju (Gleason et al., 2022). Vara caurules ir diezgan rezistentas pret kolonizāciju, taču, ja uz virsmas ir netraucēti sācies piesaistīšanās process, tad mikroorganismu bioplēve var izveidoties arī šajās caurulēs. Lielākajā daļā ūdensapgādes sistēmu, pat ja tās tiek teicami uzturētas, ir posmi, kas satur bioplēves. Līdz ar to, neveicot efektīvus kontroles pasākumus, piemēram, samazinot karstā ūdens temperatūru vai neveicot adekvātus dezinfekcijas pasākumus, mikroorganismi ļoti ātri savairojas, ko var noteikt šo sistēmu ūdens paraugos (Donohue et al., 2022).

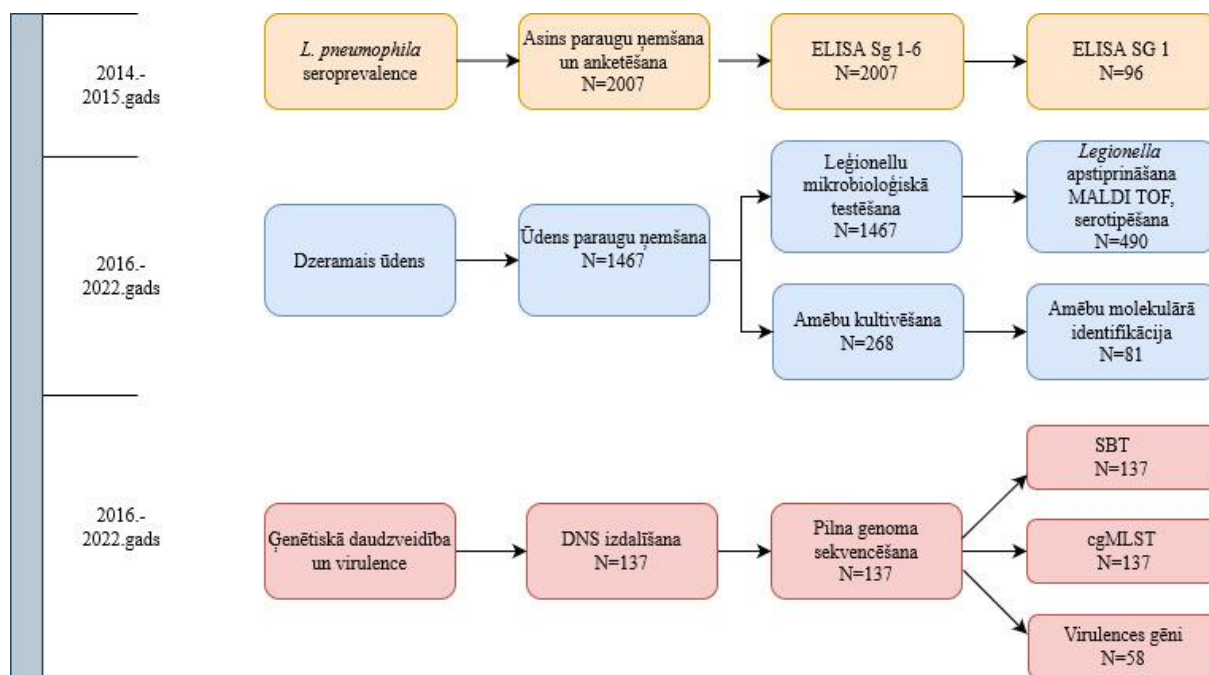
Risku saslimt ar leģionelozi var mazināt tikai ar preventīviem pasākumiem, jo infekcijas avotu nevar pilnībā izskaust. Vēlamā pieeja, ko rekomendē Pasaules Veselības organizācija un ESGLI, ir ūdens drošības plānu izstrādāšana un ieviešana, novērtējot katras konkrētas darbības risku attiecībā uz *Legionella*. Šāds plāns nodrošinātu detalizētu un sistemātisku novērtējumu un apdraudējumu prioritizāciju, radītu priekšnoteikumus kontroles pasākumiem un uzraudzības darbībām (ESGLI, 2017). Īpaši svarīga *Legionella* uzraudzība ir ārstniecības iestādēs, kur *Legionella* var radīt būtisku apdraudējumu pacientiem, tāpēc ārstniecības iestādes veido multidisciplināras komandas un holistiskus ūdens drošības plānus, analizē nozokomiālos gadījumus un uzliesmojumus, lai radītu drošu vidi (Nisar et al., 2022), turklāt riska novērtējums kopā ar regulāru monitoringu var sniegt būtiskus ieguvumus gan pacientiem, gan ārstniecības personām (Bavari et al., 2022).

Leģionāru slimība joprojām ir nozīmīga potenciāli novēršama slimība un nāves cēlonis Eiropā. Pašlaik liela daļa klīnisko gadījumu tiek identificēta, izmantojot urīna antigēna testu, kas ievērojami palielina *L. pneumophila* 1. serogrupas identifikācijas gadījumu skaitu, savukārt citas serogrupas un sugas, iespējams, netiek precīzi diagnosticētas. Vēl joprojām pasaulē nav pilnībā izprasti iemesli, kāpēc noteiktas leģionellu sugas un celmi ir saistīti ar cilvēku saslimšanas gadījumiem biežāk nekā citi, taču tiek uzskatīts, ka atsevišķu virulences faktorus kodējošo gēnu klātbūtne ir saistīta ar leģionellu virulences potenciālu jeb spēju izraisīt slimības. Iespēju saslimt ar leģionāru slimību var būtiski mazināt ar preventīviem pasākumiem, jo infekcijas avotu nevar pilnībā izskaust, tomēr inficēšanās riskus ir iespējams būtiski samazināt. Jaunas zināšanas par *Legionella* spp. izplatības tendencēm, ģenētisko daudzveidību un virulenci palīdz pilnveidot leģioneložu diagnostiku un profilaksi.

## 2. Materiāli un metodes

### 2.1. Pētījuma shēma un norise

Pētījums tika plānots trijās savstarpēji saistītās secīgās daļās no 2013. gada septembra līdz 2023. gada martam (2.1. attēls). Pēc sagatavošanās fāzes asins paraugu ņemšana sāka 2014. gada februārī, pēdējo sekvenčēšanas datu apstrāde tika veikta 2023. gada martā. Pirmajā pētījuma daļā tika pētīta seroprevalence pret *L. pneumophila* veseliem asins donoriem un ar seroprevalenci saistītie faktori. Otrajā pētījuma daļā tika izmantoti pirmajā pētījuma daļā iegūtie rezultāti un zināšanas un sekojoši ņemti dzeramā ūdens paraugi iedzīvotāju dzīvesvietās, sabiedriskās ēkās un viesnīcās, lai noskaidrotu *Legionella* spp. izplatību ūdensapgādes sistēmās un *Legionella* spp. persistenci un vairošanos ietekmējošos faktoros. Pēdējā pētījuma posmā tika veikta *L. pneumophila* izolātu pilna genoma sekvenčēšana un veikta ģenētiskās daudzveidības un virulences faktoros kodējošo gēnu izpēte.



2.1. attēls. Pētījuma hronoloģija un metodoloģija

### 2.2. Pētījuma populācija un asins paraugu ņemšana

Kopumā no 2014. gada februāra līdz 2014. gada oktobrim sadarbībā ar Valsts asinsdonoru centru no veseliem asins donoriem visā Latvijā tika paņemti 2007 asins paraugi. Lai izveidotu atbilstošu pētījuma izlasi, tika izmantoti pētījuma plānošanas fāzes laikā aktuālākās 2011. gadā notikušās tautas skaitīšanas dati (CSB, 2011). Saskaņā ar 2011. gada tautas skaitīšanas datiem Latvijā dzīvoja 1 250 000 pieaugušo iedzīvotāju, un pētījuma izlase izvēlēta 0,15–0,20 % apjomā no pieaugušajiem iedzīvotājiem, tātad pētījumā būtu jāiekļauj no

1875 līdz 2500 dalībnieku. Ņemot par pamatu tautas skaitīšanas datus, asins donori tika proporcionāli atlasīti, pamatojoties uz dzimumu un vecumu katrā reģionā, šim nolūkam tika izveidota darba tabula – plānotais asins donoru teritoriālais dzimumu un vecuma sadalījums, kas tika izmantota kā instruments, ar kura palīdzību tika nodrošināta pētījuma dalībnieku atlase katrā Latvijas reģionā (2.1. tabula).

2.1. tabula

**Plānotais asins donoru teritoriālais dzimumu un vecuma sadalījums**

Teritorija	19–35 gadi		36–50 gadi		51–64 gadi	
	Sievietes	Vīrieši	Sievietes	Vīrieši	Sievietes	Vīrieši
Aizkraukle	7	8	7	7	6	5
Alūksne	4	5	4	4	4	3
Balvi	4	5	5	5	4	4
Cēsis	10	11	10	10	9	8
Daugavpils	26	28	28	26	27	20
Dobeles	7	8	7	6	6	5
Gulbene	5	5	5	5	4	4
Jelgava	12	13	9	8	7	4
Jūrmala	6	6	6	5	6	4
Krāslava	4	5	5	6	5	5
Kuldīga	9	10	9	9	9	8
Liepāja	24	25	23	22	22	17
Limbaži	6	7	6	6	6	5
Ludza	5	6	6	6	5	5
Madona	7	8	7	7	7	6
Ogre	14	14	12	12	12	9
Preiļi	6	7	7	7	7	6
Rēzekne	14	15	14	14	13	11
Rīga	170	163	158	119	129	84
Saldus	7	7	6	6	6	5
Talsi	9	9	8	8	8	6
Tukums	11	11	10	9	9	8
Valka	9	10	9	9	9	8
Valmiera	12	13	11	11	10	8
Ventspils	11	11	11	10	10	8
<b>KOPĀ</b>	<b>399</b>	<b>410</b>	<b>383</b>	<b>337</b>	<b>340</b>	<b>256</b>
Kopā visi						<b>2125</b>

Valsts asinsdonoru centra speciālisti katrā izbraukuma reizē aicināja donorus piedalīties pētījumā ar mērķi sasniegt 2.1. tabulā norādīto dalībnieku skaitu. Pētījums apstiprināts RSU Ētikas komitejā (1. pielikums). Visiem pētījuma dalībniekiem tika izskaidrota pētījuma būtība. Pētījuma dalībnieki tika iekļauti pētījumā tikai pēc tam, kad bija saņemta rakstiska piekrišana dalībai pētījumā. Kopumā tika uzrunāti 2008 asins donori, tikai viens atteicās piedalīties pētījumā, nesniedzot papildu informāciju par atteikuma iemesliem.

Donori bija veseli brīvprātīgie, kas par dalību pētījumā nesaņēma atlīdzību. Katru donoru pirms asins nodošanas novērtēja sertificēts ārsts. Dalībnieki tika intervēti un aicināti aizpildīt anketu Valsts asinsdonoru centra darbinieka klātbūtnē. Pētījuma norise tika organizēta tā, lai būtiski neietekmētu un netraucētu asins ziedošanas procesu, tāpēc donoriem paredzētajā anketā nebija vairāk par desmit īsi atbildamiem jautājumiem (2. pielikums), kas tika saskaņots ar Valsts asinsdonoru centra vadību. Anketā tika iekļauti jautājumi par donoru sociāli demogrāfiskajām iezīmēm, tostarp vecumu, dzimumu, personīgajiem ieradumiem (smēķēšanu), dzīvesvietu, dzīvojamās ēkas tipu un vecumu, karstā ūdens apgādes sistēmas un ūdens sildītāja veidu, ūdens aerosolu iedarbību darbā, piemēram, automazgātavās, spa, zobārstniecības klīnikās un pārstrādes rūpnīcās, dušas lietošanu ārpus mājas, kā arī informācija par saslimšanu ar gripai līdzīgu slimību, pneimoniju un elpceļu slimībām iepriekšējā gadā.

### 2.3. Dzeramā ūdens paraugu ņemšana ūdensapgādes sistēmās

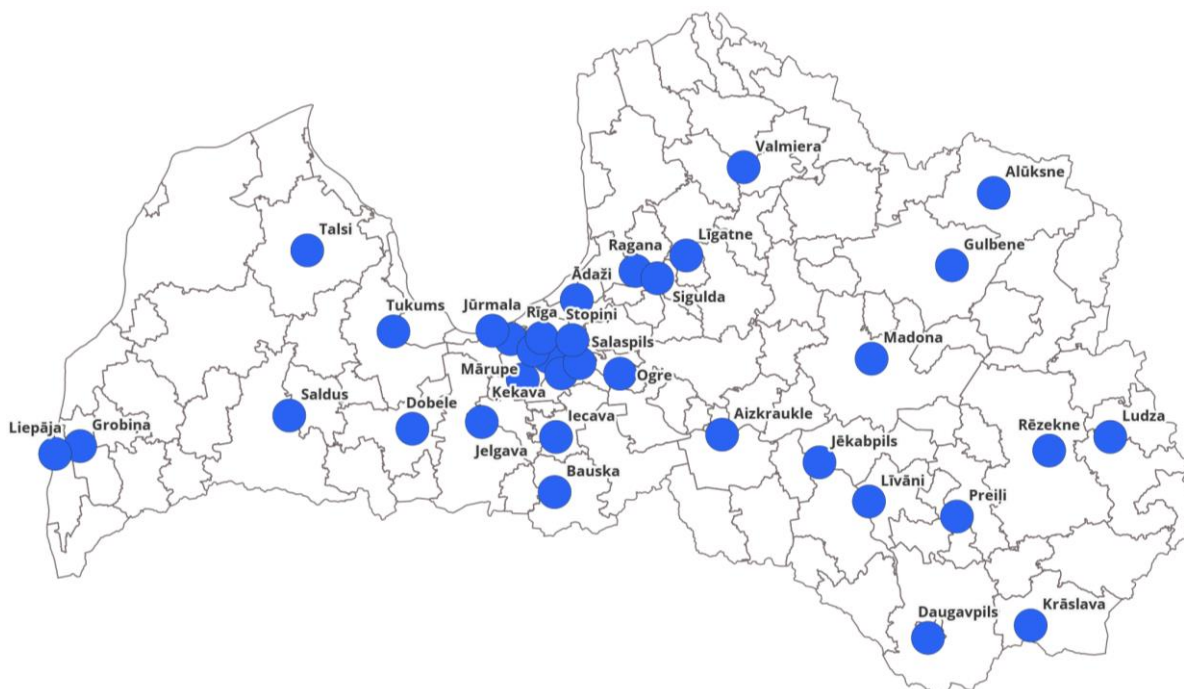
Pavisam tika paņemti 1467 ūdens paraugi, tajā skaitā 192 aukstā ūdens paraugi un 1275 karstā ūdens paraugi no daudzdzīvokļu ēkām, viesnīcām un sabiedriskām ēkām, tostarp sporta klubiem, birojiem u.c. (2.2. tabula).

2.2. tabula

**Dzeramā ūdens paraugu veidi un to avoti Latvijas pilsētās**

	Ēku skaits	Paraugu skaits	Karstais ūdens	Aukstais ūdens
<b>Dzīvojamās mājas</b>	<b>210</b>	<b>521</b>	<b>345</b>	<b>176</b>
Rīga	140	338	239	99
Citas pilsētas	70	183	106	77
<b>Viesnīcas</b>	<b>81</b>	<b>903</b>	<b>903</b>	–
Rīga	55	739	739	–
Citas pilsētas	26	164	164	–
<b>Citas ēkas</b>	<b>26</b>	<b>43</b>	<b>27</b>	<b>16</b>
Rīga	9	19	11	8
Citas pilsētas	17	24	16	8
<b>KOPĀ</b>	<b>317</b>	<b>1467</b>	<b>1275</b>	<b>192</b>

Paraugu ņemšanas plānā tika iekļautas ēkas, kas apgādātas ar dzeramo ūdeni no dažādiem ūdens avotiem – pazemes un attīrītiem virszemes ūdeņiem. Latvijā dzeramais ūdens iedzīvotājiem tiek nodrošināts, izmantojot pazemes avotus, un tikai Rīgā, Daugavas kreisajā krastā un daļēji Rīgas centrālajos rajonos, ūdensapgādes sistēmā tiek piegādāts attīrīts Daugavas ūdens. Paraugi ņemti Rīgā (1096 no 1467 paraugiem) un citās Latvijas pilsētās (371 no 1096 paraugiem) (2.2. attēls). Kopumā izlases plānā tika iekļautas 317 ēkas, no tām 204 Rīgā un 113 citās Latvijas apdzīvotās vietās.



2.2. attēls. Paraugu ņemšanas vietu ģeogrāfiskais izvietojums Latvijas teritorijā

Paraugu ņemšana veikta saskaņā ar standartu ISO 19458 (ISO 19458: 2006). Katrā dzīvojamā mājā tika ņemts vismaz viens karstā ūdens paraugs no dušas klausules. Papildu paraugi tika ņemti atkarībā no ēkas lieluma un iedzīvotāju atsaučības, un tie ietvēra aukstā ūdens paraugu no dušas klausules un karstā ūdens paraugu no krāna. Katrā viesnīcā paraugi tika ņemti no vismaz trīs vietām, piemēram, jaucējkrāniem un dušas klausulēm viesnīcu istabās, siltummezglos, sporta zālēs, ģērbtuvēs un spa telpās.

Pirms paraugu ņemšanas ūdens krāns tika atvērts un ūdens tika notecināts vismaz trīs minūtes. Ūdens notecināšana tika veikta, lai testēšanas rezultātus varētu attiecināt uz ūdensapgādes sistēmā cirkulējošo ūdeni, ne tikai uz noteiktā atzara ūdens apjomu no maģistrālā vada līdz patēriņa vietai, kur laikā, kad krāns ir aizvērts un ūdens netiek lietots, samazinās karstā ūdens temperatūra un/vai paaugstinās aukstā ūdens temperatūra un ūdens stagnācijas laikā var notikt būtiskas mikroorganismu sastāva izmaiņas. Viesnīcās, lai novērtētu ūdens kontamināciju ar *Legionella* spp. gan cirkulācijas laikā, gan uzreiz pēc krāna atvēršanas, paraugi tika paņemti gan pirms notecināšanas, gan pēc trīs minūšu notecināšanas.

Saskaņā ar apsaimniekotāju vai iedzīvotāju sniegto informāciju mums bija zināma informācija par 132 daudzdzīvokļu mājām, kuru iedzīvotāju vidū ir iepriekš bijuši leģionāru slimības gadījumi. Par pārējām ēkām šādas informācijas nebija. Ēkas, kas bija saistītas ar leģionāru slimības gadījumiem, pēc slimības gadījuma paļāvās uz termisko dezinfekciju kā primāro ūdensapgādes sistēmu dezinfekcijas metodi. Ēkās bez leģionāru slimības vēstures



papildu preventīvās darbības, tostarp dezinfekcija vai *Legionella* monitorings, nav ieviestas. Visas šajā pētījumā iekļautās daudzdzīvokļu dzīvojamās ēkas bija vecākas par 30 gadiem.

Katrs dzeramā ūdens paraugs tika pildīts sterilā viena litra tilpuma pudelē, cieši aizskrūvējot korķi pēc parauga paņemšanas. Paraugu ņemšanas laikā tika mērīta ūdens temperatūra, izmantojot kalibrētu termometru, kurš tika ievietots ūdens strūklā, un pēc tam, kad vairs netika novērotas rādījumu izmaiņas, rādījums tika fiksēts un ierakstīts paraugu ņemšanas protokolā. Tika izmantoti speciāli aprīkoti transportlīdzekļi, lai temperatūrā no 0 °C līdz 6 °C nodrošinātu paraugu transportēšanu no parauga ņemšanas vietas uz testēšanas vietu. Paraugu laboratoriskā testēšana sākta ne vēlāk kā sešas stundas kopš paraugu ņemšanas.

#### **2.4. Seroloģiskās metodes**

Visiem 2007 asins paraugiem tika noteiktas gan IgG, gan IgM antivielas pret *L. pneumophila* SG 1–6, izmantojot netiešo imūnfermentatīvo metodi (*Vircell*, Granada, Spānija). Paraugi ar neskaidriem rezultātiem tika pārbaudīti atkārtoti. Saskaņā ar ražotāja norādēm tika pieņemts, ka paraugi ar indeksu zem 9 nesatur antivielas pret *L. pneumophila*, savukārt paraugi ar indeksu virs 11 satur antivielas pret *L. pneumophila*. Visi pozitīvie paraugi tika papildus testēti, nosakot *L. pneumophila* SG 1, izmantojot netiešo imūnfermentatīvo metodi (*L. pneumophila* SG 1 ELISA IgG, *Vircell*, Granada, Spānija).

#### **2.5. Leģionellu mikrobioloģiskā identifikācija un uzskaitē**

Viens litrs ūdens tika filtrēts caur poliamīda membrānfiltru (diametrs 47 milimetri) ar poru izmēru 0,45 μm (*Millipore*, *Molsheim*, Francija). Membrānfiltru tika resuspendēti Petri platē ar 5 ml sterila, destilēta ūdens un novietoti uz kratītāja (*Vortex Genius*, *IKA*, *Staufen*, Vācija) uz divām minūtēm, pēc tam izturēti istabas temperatūrā 10 minūtes. *Legionella* spp. noteikšana tika veikta saskaņā ar ISO 11731 standartu (ISO 11731: 2017). Kopā trīs 0,1 ml neapstrādātas, termiski apstrādātas un ar skābi apstrādātas parauga daļas tika uzskaitētas uz buferēta kokogļu rauga ekstrakta agara barotnes (*BCYE*, *Oxoid*, *Basingstoke*, Apvienotā Karaliste) un uz glicīna, vankomicīna, polimiksīna B, cikloheksimīda agara (*GVPC*, *Oxoid*, *Basingstoke*, Apvienotā Karaliste). Paraugiem, kuri paņemti pirms 2017. gada, tika izmantota tikai *GVPC* barotne. Plates tika inkubētas 36 ± 2 °C temperatūrā mitrā vidē 10 dienas un pārbaudītas katru dienu, sākot no trešās dienas. Vismaz trīs raksturīgas kolonijas no katras plates tika atlasītas subkultivēšanai uz platēm ar buferēta kokogļu rauga ekstrakta agara barotni ar L-cisteīnu (*BCYE*, *OXOID*, *Basingstoke*, Apvienotā Karaliste) un ar buferēta kokogļu rauga ekstrakta

agara barotni bez L-cisteīna (*BCYE-Cys*, *OXOID*, *Basingstoke*, Apvienotā Karaliste) un inkubētas vismaz 48 stundas  $36 \pm 2$  °C temperatūrā.

*Legionella* sugas identifikācijai aizdomīgās kolonijas tika identificētas ar matrices asistētu lāzera desorbcijas jonizāciju – nolidojuma laika masspektrometrijas metodi (*MALDI-TOF MS*, *Bruker*, Brēmene, Vācija). Šim nolūkam plānā kārtiņā uz plates ailēm tika uznesta baktēriju masa, katrā aizpildītajā ailē uzpilināts 1 µl HCCA (*HCCA* – *α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*) matrices (*Bruker*, Brēmene, Vācija) un pēc nožūšanas istabas temperatūrā plate ievietota iekārtā. Papildus, lai apstiprinātu *L. pneumophila*, tika izmantots aglutinācijas tests (*Thermo Fisher Scientific*, Bred, Nīderlande). Katras *L. pneumophila* serogrupas individuālai un precīzai noteikšanai tika izmantoti atsevišķi lateksa aglutinācijas serumi (*Pro-Lab Diagnostics*, *Richmond Hill*, Kanāda). Visas kolonijas no visām platēm tika saskaitītas un apstiprinātas. Rezultāts tika izteikts kā *Legionella* sugu un serogrupu koloniju veidojošo vienību skaits uz vienu litru ūdens (KVV/l). Visi apstiprinātie *Legionella* izolāti tika iegūti tīrkultūrās un pārnesti uz Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta “BIOR” kultūru mikroorganismu kolekciju ilgstošai uzglabāšanai.

## 2.6. Brīvi dzīvojošo amēbu kultivēšana

Brīvi dzīvojošo amēbu kultivēšana veikta atbilstoši iepriekš aprakstītiem protokoliem (Vaerewijck et al., 2010). Brīvi dzīvojošo amēbu kultivēšanai izmantots paraugs, kura sagatavošana aprakstīta 2.5. punktā. Brīvi dzīvojošo amēbu (*Free-living amoeba*, FLA) kultivēšanai Petri platei ar membrānfiltra gabaliņiem tika pievienoti 15 ml šķidras PAS (*Page's amoeba Saline*) barotnes ar diviem sterilizētiem (sterilizācija veikta sausā gaisa sterilizācijas skapī,  $+170 \pm 2$  °C, 2 h) rīsu graudiem (“Dobeles dzirnavnieks”, Dobeles, Latvija). PAS barotne tika sagatavota no divām izejvielām: pirmā saturēja NaCl (*Thermo Scientific*, *Waltham*, ASV) – 12,0 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (*Merck*, *Darmstadt*, Vācija) – 0,40 g,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (*Merck*, *Darmstadt*, Vācija) – 0,60 g uz litru ūdens, otrā:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (*Merck*, *Darmstadt*, Vācija) – 14,20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (*Thermo Scientific*, *Waltham*, ASV) – 13,60 g. Plates tika inkubētas četras līdz piecas dienas  $25 \pm 2$  °C temperatūrā. Pēc inkubācijas Petri plates tika pārbaudītas gaismas mikroskopā 400× palielinājumā, un tika veikta amēbu ģinšu mikroskopiskā identifikācija, izmantojot noteicējus (Smirnov, 1999; Smirnov et Brown, 2004).

## 2.7. Brīvi dzīvojošo amēbu sugu molekulārā identifikācija

Amēbu bagātināšanai pirms DNS ekstrakcijas tika izmantoti 70 µl šķīdras peptona rauga glikozes (PYG) barotnes (*Bioliife Italiana*, Milāna, Itālija). DNS ekstrakcija tika veikta ar *Flexi Gene DNA* komplektu (*QIAGEN*, Hilden, Vācija). DNS daudzums tika mērīts, izmantojot spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (*ThermoFisher Scientific*, Waltham, MA, ASV). Ja koncentrācija bija lielāka par 30 ng/µl, DNS tika atšķaidīta ar ūdeni, kurā nav ribonukleāzes.

*Acanthamoeba* noteikšanai tika veikta PĶR reakcija, izmantojot iepriekš aprakstītu protokolu (Schroeder et al., 2001). DF3 sekvenci saturošs amplikons ASA.S1 tika amplificēts ar PĶR, izmantojot ģintij specifiskus praimerus JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') un JDP2 (5'-TCTCACAAAGCTGCTAGGGAGTCA-3'). DNS amplifikācija tika veikta 50 µl reakcijas tilpumā, kas saturēja 4 µl DNS šablona, *HotStarTaq Plus Master Mix* (*QIAGEN*, Vācija) ar papildu 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> (*QIAGEN*, Vācija) un katra praamera galīgo koncentrāciju 500 nM. Kā pozitīvā kontrole tika izmantots references materiāls: *Acanthamoeba quina* ATCC-50241 un *Acanthamoeba castellanii* Neff. ATCC-30010. Kā negatīva kontrole tika izmantots no DNS un nukleāzēm brīvs ūdens DNS parauga vietā. PĶR apstākļi bija šādi: sākotnējais denaturēšanas posms piecas minūtes 95 °C, kam sekoja 40 cikli: 45 sekundes 95 °C, 45 sekundes 52 °C un 45 sekundes 72 °C temperatūrā. Tam sekoja pēdējais denaturēšanas posms ar 10 minūtēm 72 °C temperatūrā.

*Amoeboidae* un *Vahlkampfiidae* ģints sugu identifikācijai par pamatu tika ņemts iepriekš aprakstīts protokols (Le Calvez et al., 2012). Tika izmantoti divi amplifikācijas protokoli: *Vahlkampfiidae* DNS 150 bp fragmenta amplifikācijai tika izmantoti praimeru Vahl\_560F (5'AGGTAGTGACAAGMYRTAGYACT3') un Vahl\_730R (5'GGGCGTTTTAACTACARCAGTATTA3'). 18S rRNS gēns no brīvi dzīvojošām amēbām tika amplificēts ar PĶR, izmantojot praimerus Amo\_1400F (5'ATGCCGACCARSATYMGAG3') un Amo\_1540R (5'CAAGSTGTCYMGGGGAGTCAT3'), kas amplificē 130 bp fragmentu no *Acanthamoeba* genoma un 50 bp fragmentu no *Echinamoeba* un *Vermamoeba* genoma. DNS amplifikācija tika veikta 25 µl reakcijas tilpumā, kas saturēja 2 µl DNS šablona, 10xPĶR buferšķīduma (*Solis BioDyne*, Igaunija), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (*QIAGEN*, Vācija), 0,4 mM dNTP (*QIAGEN*, Vācija), polimerāzes (*Solis BioDyne*, Igaunija), katra praamera galīgā koncentrācija 0,5 µM. Kā pozitīvā kontrole tika izmantots references materiāls: *Vahlkampfia inornata* ATCC-30965 un *Acanthamoeba quina* ATCC-50241. Kā negatīvā kontrole tika izmantots no DNS un nukleāzēm brīvs ūdens DNS parauga vietā. PĶR nosacījumi bija šādi: sākotnējais denaturēšanas posms piecas minūtes 95 °C, kam sekoja 35 cikli: 30 sekundes 95 °C, 60 sekundes 50 °C un

60 sekundes 72 °C. Tam sekoja pēdējais denaturēšanas posms ar 10 minūtēm 72 °C temperatūrā.

*Vermamoeba* (iepriekš *Hartmanella*) ģints pārstāvju noteikšanai PĶR tika veikta, izmantojot iepriekš aprakstītu protokolu (Solgi et al., 2012). 18S rRNS gēns no amēbām tika amplificēts ar PĶR, izmantojot praimerus Hartm F (5'GCT CCA ATA GCG TAT ATT AA 3') un Hartm R (5' AGA AAG AGC TAT CAA TCT GT 3'). DNS amplifikācija tika veikta 25 µl reakcijas tilpumā, kas satur 5 µl DNS šablona, *HotStarTaq Plus Master Mix* (QIAGEN, Vācija) ar katra praимерa galīgo koncentrāciju 20 pM. Kā negatīvā kontrole tika izmantots no DNS un nukleāzēm brīvs ūdens DNS parauga vietā. PĶR nosacījumi bija šādi: sākotnējais denaturēšanas posms piecas minūtes 95 °C, kam sekoja 35 cikli: 60 sekundes 94 °C, 60 sekundes 50 °C un 60 sekundes 72 °C. Tam sekoja pēdējais posms ar 10 minūtēm 72 °C temperatūrā.

PĶR produkti tika sagatavoti sekvencēšanai pēc attīrīšanas, izmantojot USB ExoSAP-IT PĶR produktu attīrīšanu (*Affymetrix, Inc. USA*). *Big Dye Terminator* v3.1 komplekts tika izmantots (*ThermoFisher Scientific, Waltham, ASV*) saskaņā ar ražotāja protokolu. Etanola/nātrija acetāta izgulsnēšana tika izmantota, lai no sekvencēšanas reakcijām noņemtu neinkorporētos krāsvielu terminatorus. PĶR produkta sekvencēšana, izmantojot abus praimerus, tika veikta ar *Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Dati, kas iegūti pēc sekvencēšanas, tika apstrādāti ar *Mega (Molecular evolutionary genetics analysis)* programmatūru. Iegūto sekvenču homoloģijas analīze ar gēniem gēnu datu bankā tika veikta, izmantojot *BLAST* programmatūru no Nacionālā biotehnoloģijas informācijas centra (NCBI) vietnes.

## **2.8. Pētījumā izmantotie *Legionella* spp. izolāti**

Pētījuma vajadzībām no Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta "BIOR" Mikroorganismu kultūru kolekcijas tika izmantotas 137 *L. pneumophila* kultūras, kas reprezentē līdz šim konstatētās serogrupas (77 izolāti pieder pie 3. serogrupas (SG3), 27 pie SG2, 22 pie SG1, seši pie SG9, četri izolāti pārstāv SG6, viens izolāts pieder pie SG8) un iespējamās ģeogrāfiskās variācijas Latvijas teritorijā, kur 72 izolāti iegūti no dzīvojamā namu paraugiem Rīgā un 65 izolāti iegūti no ūdensapgādes sistēmām citās pilsētās.

Sasaldēti ( $-80 \pm 2$  °C) izolāti tika atdzīvināti un uzsēti uz buferēta kokogļū rauga ekstrakta agara barotnes (*BCYE, Oxoid, Basingstoke, Apvienotā Karaliste*) un inkubēti  $36 \pm 2$  °C temperatūrā 48–72 stundas.

## 2.9. DNS ekstrakcija un pilna genoma sekvencēšana

DNS ekstrakcija tika veikta pēc 48 stundu ilgas *L. pneumophila* inkubācijas  $36 \pm 2$  °C temperatūrā. Atsevišķas kolonijas tika suspendētas mēģenēs ar 500 µl nukleāzi nesaturoša ūdens un pēc tam homogenizētas (*Vortex Genius, IKA, Staufen, Vācija*), lai iegūtu viendabīgu suspensiju. Šūnu līze veikta, izmantojot termisko šoku – astoņu minūšu inkubāciju 100 °C temperatūrā. Mēģenes tika atdzesētas un centrifugētas (3 min. × 13 000 apgr./min.), lai iegūtu supernatantu, un aptuveni 400 µl supernatanta tika pārnesti uz jaunām mēģenēm. DNS koncentrācija tika noteikta ar spektrofotometru (*NanoDrop Technologies, Waltham, MA, ASV*).

DNS bibliotēkas tika sagatavotas ar *Illumina DNA Prep* DNS bibliotēku sagatavošanas komplektu (*Illumina, Sandiego, CA, ASV*). Sekvencēšana veikta ar *Illumina MiSeq* (*Illumina, Sandiego, CA*), izmantojot vai nu MiSeq reaģentu komplektu v2 ar 500 cikliem, vai v3 ar 600 cikliem (Cat# MS-102-2003 un MS-102-3003, *Illumina, Sandiego, CA, ASV*), lai katram izolātam iegūtu sapārotos (*paired-end*) nolasījumus vismaz 30× pārklājumā.

## 2.10. Pilna genoma sekvencēšanas datu analīze

Pilna genoma sekvencēšanas datus no nolasījumiem tika nogriezti (*trimmed*) zemas kvalitātes bāzes un sekvencēšanas adapteri, lietojot Trimmomatic v0.38 (Bolger et al., 2014). *De novo* rekonstrukcija (*assembly*) apgrieztajiem nolasījumiem tika veikta ar SPAdes assembler v3.14.0 (Prjibelski et al., 2020).

Sekvencē bāzētā tipēšana (SBT) veikta atbilstoši ESCMID *Legionella Study Group* (ESGLI) izstrādātajai SBT shēmai (Gaia et al., 2005; Mentasti et al., 2014), dati tika iegūti no pilna genoma sekvencēšanas rezultātiem, ņemot rekonstruētos genomus un neapstrādātos nolasījumus ar diviem dažādiem datu apstrādes rīkiem. Vispirms tika izmantots “legsta” (*In silico Legionella pneumophila Sequence Based Typing*) rīks (<https://github.com/tseemann/legsta/>), lai rekonstruētajos genomos identificētu katra SBT lokusa alēles. Tā kā vienā genomā var būt vairākas dažādas *mompS* gēna kopijas, tika izmantots specializēts *mompS* rīks (Gordon et al., 2017). SBT genotipi vizualizēti mazāko savienoto koku (*minimum spanning tree*) veidā ar GrapeTree v1.5.0 (Nascimento et al., 2016). Klonālo kompleksu un singletonu identifikācijai tika izmantots goeBurst algoritms (Feil et al., 2004; Francisco et al., 2009).

Pamata genoma multilokusu (cgMLST) genotipi tika noteikti saskaņā ar iepriekš izstrādāto *L. pneumophila* cgMLST shēmu (Moran-Gilad et al., 2015). cgMLST shēma, kas sastāv no 1521 lokusa, tika iepriekš apstrādāta un pielāgota izmantošanai alēļu nosaukšanai ar chewBBACA programmatūru v2.8.5 (Silva et al., 2018). Divi lokusi tika identificēti kā

paralogi, tāpēc gala cgMLST analīzē tika ņemti vērā tikai 1519 lokusi. CgMLST genotipi tika vizualizēti mazāko savienoto koku (*minimum spanning tree*) veidā ar *GrapeTree* v1.5.0 (Zhou et al., 2018).

## 2.11. Virulences un pretantibiotiku rezistences gēnu identifikācija

Sekvencētajiem *L. pneumophila* izolātiem, kuri iegūti no dzeramā ūdens paraugiem dzīvojamās mājās, veikta virulenci kodējošo gēnu identifikācija. Šim nolūkam tika izmantota virulences faktoru datu bāze (VFDB) (Liu et al., 2022). Datu bāzes ieraksti tika izgūti 2022. gada 12. novembrī un papildināti ar *lvr* un *lvh* lokusu DNS nukleotīdu sekvencēm (GenBank pievienošanās Y19029.1) un atsevišķi veikta *L. pneumophila* celma AA100 *rtxA* gēna novērtēšana (GenBank ID AF057703.1 nukleotīdu pozīcijas 949-4575). Uz BLAST balstītais rīks *abricate* v1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>) tika izmantots, lai pārbaudītu visus izolātus pret šo virulenci kodējošo gēnu datu bāzi. Jebkurš gēns tika uzskatīts par klātesošu genomā, ja BLAST identitāte vismaz 80 % tika atklāta vismaz 80 % no references sekvences garuma, kas ir būtisks kvalitātes parametrs. Turklāt *in silico* PĶR ar *rtx1/rtxA-rtx2/rtxA* un *rtx3/rtxA-rtx4/rtxA* praimeru pāriem (Samrakandi et al., 2002) tika simulēts, izmantojot iPCRess rīku no Exonerate v2.2.0 programmatūras pakotnes (Slater et Birney, 2005). Pretantibiotiku rezistences (AMR) gēnu klātbūtne tika noteikta, izmantojot ResFinder programmatūru v4.1.7 (versija 2022-05-24) un ar to saistīto datu bāzi (Bortolaia 2020). AMR gēniem tika izmantoti tādi paši identitātes un pārklājuma sliekšņi kā virulences gēniem.

## 2.12. Datu statistiskā apstrāde un analīze

Lai noteiktu ar *Legionella* saistītos seropozitivitātes faktoros asins donoriem, tika veikta loģistiskās regresijas analīze. Dati tika stratificēti pēc donoru dzīvesvietas. Mainīgie lielumi ietvēra vecumu, dzimumu, karstā ūdens apgādes sistēmu un iepriekšējās veselības epizodes. Visiem mainīgajiem tika veikta vienfaktora analīze, lai identificētu iespējamus riska faktoros, kas tika iekļauti daudzfaktoru loģistiskās regresijas modelī. Statistiskās analīzes tika veiktas, izmantojot SPSS v.22.0 (SPSS Inc., Čikāga, IL, ASV) un R versiju 4.2.3 (2023-03-15 ucrt), 2023 (*The R Foundation for Statistical Computing*, Vīne, Austrija).

Kontingences tabulas,  $\chi^2$  testi un ANOVA tika izmantoti, lai novērtētu saistību starp *Legionella* spp. un brīvi dzīvojošām amēbām un dažādiem faktoriem, tostarp temperatūru, kolonizācijas līmeni. Kartes tika izveidotas ar QGIS versiju 3.30.

### 3. Rezultāti

#### 3.1. *L. pneumophila* seroprevalence asins donoru vidū

Kopumā *L. pneumophila* SG 1–6 seroprevalence asins donoriem bija 4,8 % (3.1. tabula). Septiņās Latvijas pilsētās un apkārtējos novados (Balvi, Gulbene, Jelgava, Madona, Saldus, Talsi un Valka) netika konstatēts neviens seropozitīvs asins donors. Augstākie seroprevalences rādītāji konstatēti Ventspilī (18,2 %), Aizkrauklē (11,8 %), Rīgā (6,5 %), Rēzeknē (6,3 %), Cēsīs (6,2 %) un Daugavpilī (5,8 %).

3.1. tabula

*L. pneumophila* SG 1–6 seroprevalence asins donoriem Latvijas teritorijā

Teritorija <i>Kopā ar apkārtējiem novadiem un pagastiem</i>	Kopā		Vīrieši		Sievietes	
	Paraugu skaits	Pozitīvi (%)	Paraugu skaits	Pozitīvi (%)	Paraugu skaits	Pozitīvi (%)
Aizkraukle	51	6 (11,8)	23	1 (4,3)	28	5 (17,9)
Alūksne	25	1 (4,0)	12	1 (8,3)	13	0 (0)
Balvi	36	0 (0)	17	0 (0)	19	0 (0)
Cēsis	65	4 (6,2)	32	1 (3,1)	33	3 (9,1)
Daugavpils	171	10 (5,8)	85	4 (4,7)	86	6 (7,0)
Dobele	41	1 (2,4)	15	0 (0)	26	1 (3,8)
Gulbene	34	0 (0)	18	0 (0)	16	0 (0)
Jelgava	41	0 (0)	17	0 (0)	24	0 (0)
Jūrmala	31	1 (3,2)	10	1 (10,0)	21	0 (0)
Krāslava	35	1 (2,9)	19	0 (0)	16	1 (6,3)
Kuldīga	57	2 (3,5)	27	2 (7,4)	30	0 (0)
Liepāja	78	2 (2,6)	24	2 (8,3)	54	0 (0)
Limbaži	41	1 (2,4)	19	0 (0)	22	1 (4,5)
Ludza	34	1 (2,9)	19	0 (0)	15	1 (6,7)
Madona	46	0 (0)	23	0 (0)	23	0 (0)
Ogre	69	2 (2,9)	36	1 (2,8)	33	1 (3,0)
Preiļi	42	1 (2,4)	18	0 (0)	24	1 (4,2)
Rēzekne	80	5 (6,3)	39	1 (2,6)	41	4 (9,8)
Rīga	749	49 (6,5)	314	11 (3,5)	435	38 (8,7)
Saldus	55	0 (0)	25	0 (0)	30	0 (0)
Talsi	51	0 (0)	15	0 (0)	36	0 (0)
Tukums	53	2 (3,8)	18	0 (0)	35	2 (5,7)
Valka	53	0 (0)	27	0 (0)	26	0 (0)
Valmiera	36	1 (2,8)	19	1 (5,3)	17	0 (0)
Ventspils	33	6 (18,2)	15	3 (20,0)	18	3 (16,7)
<b>KOPĀ</b>	<b>2007</b>	<b>96 (4,8)</b>	<b>886</b>	<b>29 (3,3)</b>	<b>1121</b>	<b>67 (6,0)</b>

Seroprevalence pret pirmās serogrupas *L. pneumophila* bija 0,2 % (5 no 2007) asins donoru. Visas piecas SG1 seropozitīvās donores bija sievietes vecumā no 26 līdz 45 gadiem, no kurām trīs dzīvoja Rīgā, viena Ādažos un viena Aizkrauklē. Ādažos dzīvojošā donore dzīvoja privātmājā, visas pārējās sievietes dzīvoja daudzdzīvokļu ēkās ar centralizēto karstā ūdens apgādi, kas nav renovēta. Neviena no donorēm nesmēķēja, nebija ikdienā pakļauta ūdens

aerosolu iedarbībai un pēdējā gadā neslimoja ar leģionāru slimību, bronhītu vai gripai līdzīgu slimību. Visas, izņemot donori no Aizkraukles, pēdējā gada laikā bija lietojušas dušu ārpus dzīvesvietas.

Dzimums, vecums, smēķēšana un saslimšana pēdējā gada laikā ar leģionāru slimību, pneimoniju, bronhītu vai gripai līdzīgu slimību šajā pētījumā tika izskatīti kā individuālie faktori, kas var būt saistīti ar seropozitivitāti pret *L. pneumophila* (3.2. tabula). Kopumā seroprevalence sievietēm (5,9 %) bija augstāka nekā vīriešiem (3,3 %). Starp donoriem no 18–35 gadu un 36–50 gadu vecuma grupām būtiskas seroprevalences atšķirības netika konstatētas ( $p > 0,05$ ), kaut arī vīriešiem 36–50 gadu vecuma grupā seroprevalence bija zemāka. Abiem dzimumiem seropozitīvo donoru skaits pieauga 51–65 gadu vecuma grupā. Iepriekšējā gada laikā nevienam asins donoram netika apstiprināta leģionāru slimība. Saslimšanu ar pneimoniju norādīja deviņi donori, no kuriem tikai viena sieviete, kas dzīvo Rīgā, daudzdzīvokļu mājā ar centralizēto karstā ūdens apgādi, bija seropozitīva. No 2007 asins donoriem regulāri smēķēja 576 cilvēki, vidēji dienā izsmēķējot 8,2 cigaretes (mazākais norādītais izsmēķēto cigarešu skaits – 1 cigarete; lielākais – 30 cigaretes).

3.2. tabula

**Ar *L. pneumophila* SG 1-6 seroprevalenci saistītie individuālie faktori**

Vecuma grupa	Paraugu skaits/pozitīvie paraugi (%)		
	Kopā	Sievietes	Vīrieši
18–35 gadi	1109/51 (4,6)	584/33 (5,7)	525/18 (3,4)
36–50 gadi	581/27 (4,6)	354/21 (5,9)	227/6 (2,6)
51–65 gadi	317/18 (5,7)	183/13 (7,1)	134/5 (3,7)
<b>Smēķēšana</b>			
Jā	576/18 (3,1)	219/7 (3,2)	357/11 (3,1)
Nē	1419/78 (5,5)	896/60 (6,7)	523/18 (3,4)
<b>Slimības iepriekšējā gadā:</b>			
<b>Bronhīts</b>			
Jā	52/3 (5,8)	38/2 (5,3)	14/1 (7,1)
Nē	1927/93 (4,8)	1068/65 (6,1)	859/28 (3,3)
<b>Gripai līdzīga slimība</b>			
Jā	195/19 (9,7)	136/12 (8,8)	59/7(11,9)
Nē	1781/76 (4,3)	970/54 (5,6)	811/22 (2,7)

Urbanizācijas pakāpe, dzīvojamās ēkas tips, ēkas vecuma grupa, ūdens apgādes sistēmas renovācija, karstā ūdens sagatavošanas veids, ekspozīcija darbā un iešana dušā ārpus pastāvīgās dzīvesvietas šajā pētījumā tika izskatīti kā vides faktori, kas var būt saistīti ar seropozitivitāti pret *L. pneumophila* (3.3. tabula). Seroprevalence bija augstāka apdzīvotās vietās ar lielāku iedzīvotāju skaitu, sākot no 3,5 % laukos līdz 6,8 % galvaspilsētā Rīgā. Augstākā seroprevalence tika novērota sievietēm, kuras dzīvo Rīgā, daudzdzīvokļu ēkās ar centralizēto



karstā ūdens apgādi (11,2 %; 31 no 277). Zemākā seroprevalence tika konstatēta lauku teritorijās dzīvojošiem cilvēkiem bez centralizētas karstā ūdens sagatavošanas (0,9–2,5 %).

3.3. tabula

**Ar *L. pneumophila* SG 1–6 seroprevalenci saistītie vides faktori**

	Paraugu skaits/pozitīvie paraugi (%)		
	Kopā	Sievietes	Vīrieši
<b>Urbanizācija</b>			
Rīga	615/42 (6,8)	358/34 (9,5)	257/8 (3,1)
Pilsētas, ciemati	611/27 (4,4)	342/15 (4,4)	269/12 (3,3)
Lauku teritorijas	777/27 (3,5)	419/18 (4,3)	358/9 (2,5)
<b>Ēkas tips</b>			
Privātmāja	666/18 (2,7)	345/10 (2,9)	321/8 (2,5)
Daudzdzīvokļu ēka	1320/77 (5,8)	766/56 (7,3)	554/21 (3,8)
<b>Ēkas vecuma grupa</b>			
Būvēta pirms 1950	359/8 (2,2)	196/4 (2,0)	163/4 (2,5)
Būvēta 1951–1970	494/30 (6,1)	286/23 (8,0)	208/7 (3,4)
Būvēta 1971–1990	625/34 (5,4)	340/21 (6,2)	285/13 (4,6)
Būvēta pēc 1991	187/12 (6,4)	103/9 (8,7)	84/3 (3,6)
<b>Ūdensapgādes sistēmas renovācija</b>			
Jā	752/31 (4,1)	390/19 (4,9)	362/12 (3,3)
Nē	936/56 (6,0)	570/42 (7,4)	366/14 (3,8)
<b>Karstā ūdens sagatavošanas veids</b>			
Centralizēts/pašvaldības	1027/69 (6,7)	597/51 (8,5)	430/18 (4,2)
Elektriskais sildītājs	623/16 (2,6)	338/11 (3,3)	285/5 (1,8)
Gāzes sildītājs	107/5 (4,7)	66/3 (4,5)	41/2 (4,9)
Malkas sildītājs	224/5 (2,2)	112/1 (0,9)	112/4 (3,6)
<b>Ekspozīcija darbā</b>			
Jā	92/2 (2,2)	41/0 (0,0)	51/2 (3,9)
Nē	1898/93 (4,9)	1073/66 (6,2)	825/27 (3,3)
<b>Duša ārpus mājām</b>			
Jā	1201/65 (5,4)	654/44 (6,7)	547/21 (3,8)
Nē	730/26 (3,6)	424/19 (4,5)	306/7 (2,3)

Starp daudzdzīvokļu ēku iedzīvotājiem seropozitīvo gadījumu bija vairāk (5,8 %) nekā starp privātmāju iedzīvotājiem (2,7 %). Turklāt pozitīvo gadījumu skaits atšķīrās starp ēkām ar centralizēto karstā ūdens apgādes sistēmu (6,7 %), elektriskajiem ūdenssildītājiem (2,6 %), gāzes ūdens sildītājiem (4,7 %) un ūdens sildītāju, ko kurina ar malku (2,2 %); un tiem, kuriem ir renovētas (4,1 %) un nerenovētas ūdensapgādes sistēmas (6,0 %). Liela daļa (> 60 %) pētījuma dalībnieku apstiprināja, ka pēdējā gada laikā ir gājuši dušā ārpus savas dzīvesvietas (piemēram, sporta zālē, viesnīcā un slimnīcā). Kopumā netika novērotas būtiskas atšķirības starp donoriem, kuri izmantoja dušas tikai mājās, un tiem, kas gāja dušā arī citur ( $p > 0,05$ ). Tikai neliels skaits donoru (4,6 %) bija nepārtraukti pakļauti ūdens aerosoliem darbā, piemēram, automazgātavās, spa, zobārstniecības klīnikās un apstrādes rūpnīcās. Divi no tiem bija seropozitīvi, abi vīrieši, no Liepājas un Aizkraukles, viens darbā lietoja aizsargmasku, otrs nelietoja. Donors, kurš darbā lietoja aizsargmasku, dzīvoja daudzdzīvokļu ēkā ar centralizētu

karstā ūdens apgādi, savukārt otrs privātmājā. Abi donori bija lietojuši dušu ārpus dzīvesvietas. Anketu datu analīze neatklāja būtiskas atšķirības starp eksponēto un neeksponēto dalībnieku grupām vai aizsargmaskas nēsāšanas ietekmi ( $p > 0,05$ ).

Potenciālie *L. pneumophila* seroprevalences riska faktori tika novērtēti ar loģistiskās regresijas metodi. Vienfaktora analīzē dzimums tika identificēts kā riska faktors, un sievietes, visticamāk, ir biežāk seropozitīvas nekā vīrieši (OR = 1,88, 95 % TI 1,20–2,93) (3.4. tabula).

3.4. tabula

**Varbūtību attiecība (OR) un 95 % ticamības intervāls (TI) asociācijai starp *Legionella pneumophila* SG 1–6 seropozitivitāti un būtiskajiem faktoriem**

Faktors	OR	95 % TI
Dzimums ( $p = 0,005$ )		
Sieviete vs vīrietis	1,88	1,20–2,93
Ēkas tips ( $p = 0,011$ )		
Daudzdzīvokļu ēka vs privātmāja	2,23	1,32–3,76
Urbanizācija ( $p = 0,037$ )		
Rīga vs lauku teritorija	2,04	1,24–3,34
Pilsētas, ciemati vs lauku teritorija	1,28	0,75–2,21
Karstā ūdens sagatavošanas veids ( $p = 0,001$ )		
Centralizētais vs malkas	3,16	1,26–7,91
Elektriskais sildītājs vs malkas	1,16	0,42–3,19
Gāzes sildītājs vs malkas	2,15	0,61–7,58
Smēķēšana ( $p = 0,027$ )		
Jā vs nē	0,56	0,33–0,94
Iepriekšējās drudža epizodes ( $p = 0,001$ )		
Jā vs nē	2,42	1,43–4,10

Dzīvesvietas veids bija vēl viens riska faktors, ar OR = 2,23 un 95 % TI 1,32–3,76 daudzdzīvokļu māju iedzīvotājiem, salīdzinot ar tiem, kas dzīvo viengimenes mājās. Donori no pilsētām vai ciematiem un Rīgas biežāk bija seropozitīvi nekā lauku iedzīvotāji (attiecīgi OR = 1,28, 95 % TI 0,75–2,21 un OR = 2,04, 95 % TI 1,24–3,34). Iedzīvotāji no ēkām ar centralizēto karstā ūdens apgādes sistēmu biežāk bija *L. pneumophila* seropozitīvi (OR = 3,16, 95 % TI 1,26–7,91) nekā to ēku iedzīvotāji, kurās ir elektriskie ūdens sildītāji (OR = 1,16, 95 % TI 0,42–3,19), gāzes sildītāji (OR = 2,15, 95 % TI 0,61–7,58) vai ar malku kurināmas ūdens sildīšanas sistēmas. Iepriekšējās drudža epizodes tika identificētas kā riska faktors (OR = 2,42, 95 % TI 1,43–4,1), savukārt citas medicīniskās epizodes, tostarp pneimonija un bronhīts, nebija saistītas ar *L. pneumophila* seropozitivitāti. Citi iespējamie riska faktori, kas nav saistīti ar seropozitivitāti, bija donoru vecuma grupa, dzīvojamo ēku vecums, dzīvojamo ēku ūdensapgādes sistēmu renovācijas statuss, dušas izmantošana ārpus dzīvesvietas un aerosola iedarbība darbā. Vienfaktora analīzē identificētie riska faktori tika iekļauti

daudzfaktoru loģistiskās regresijas modelī. Karstā ūdens apgādes sistēmas veids dzīvojamās ēkās, dzimums un iepriekšējās drudža epizodes tika identificēti kā galvenie *L. pneumophila* seropozitivitātes riska faktori.

### 3.2. *Legionella* spp. izplatība dzeramā ūdens apgādes sistēmās un persistenci un kolonizāciju ietekmējošie faktori

Kopumā *Legionella* spp. tika konstatētas 490 no 1467 ūdens paraugiem (3.5. tabula). Vismaz viens *Legionella* spp. pozitīvs paraugs konstatēts 176 no 317 ēkām (55,5 %). Visās apdzīvotās vietās (Aizkraukle, Baloži, Bauska, Daugavpils, Gulbene, Olaine, Jelgava, Krāslava, Ludza, Līgatne, Līvāni, Madona, Ogre, Preiļi, Rēzekne, Salaspils, Saldus, Sigulda, Talsi, Tukums), kur paņemti vairāk nekā 5 paraugi, ir konstatēts vismaz viens *Legionella* spp. pozitīvs paraugs.

3.5. tabula

Kopējais paraugu skaits un *Legionella* spp. pozitīvi paraugi

Ēkas tips	Kopā testēti		<i>Legionella</i> spp. pozitīvi	
	Ēku skaits	Paraugu skaits	Ēku skaits (pozitīvi %)	Paraugu skaits (pozitīvi %)
<b>Dzīvojamās mājas</b>	<b>210</b>	<b>521</b>	<b>118 (56,2)</b>	<b>207 (39,7)</b>
Rīga	140	338	80 (57,2)	135 (39,9)
Citas pilsētas	70	183	38 (54,3)	72 (39,3)
<b>Viesnīcas</b>	<b>81</b>	<b>903</b>	<b>48 (59,3)</b>	<b>266 (29,4)</b>
Rīga	55	739	29 (52,7)	189 (25,6)
Citas pilsētas	26	164	19 (73,1)	77 (47,0)
<b>Citas ēkas</b>	<b>26</b>	<b>43</b>	<b>10 (38,5)</b>	<b>17 (39,5)</b>
Rīga	9	19	5 (55,6)	11 (57,9)
Citas pilsētas	17	24	5 (29,4)	6 (25,0)
<b>KOPĀ</b>	<b>317</b>	<b>1467</b>	<b>176 (55,5)</b>	<b>490 (33,4)</b>

Visbiežāk izolētā *Legionella* suga bija *L. pneumophila*, kas tika konstatēta 482 no 490 *Legionella* spp. pozitīvajiem paraugiem (98,4 %). *L. rubrilucens* konstatēta deviņos paraugos (1,8 %), un *L. anisa* konstatēta divos paraugos (0,4 %). Trijos gadījumos konstatēta divu *Legionella* sugu vienlaicīga kontaminācija. Divās dažādās ēkās vienā paraugu ņemšanas reizē konstatēta gan *L. pneumophila* klātbūtne, gan *L. rubrilucens*. Citā ēkā vienlaikus konstatēta *L. pneumophila* un *L. anisa*.

Karstajā ūdenī *Legionella* klātbūtne konstatēta biežāk ( $p < 0,05$ ) nekā aukstajā ūdenī (3.6. tabula). Ūdens paraugos, kas ņemti ārpus Rīgas, leģionellas konstatētas biežāk, tomēr dzīvojamām mājām šī atšķirība nav statistiski nozīmīga, kamēr viesnīcās ārpus Rīgas leģionellas tika konstatētas būtiski biežāk ( $p < 0,0001$ ).

*Legionella* spp. izplatība aukstajā un karstajā ūdenī

Ēkas tips	Aukstais ūdens		Karstais ūdens	
	Paraugu skaits	Pozitīvi (%)	Paraugu skaits	Pozitīvi (%)
<b>Dzīvojamās mājas</b>	<b>176</b>	<b>44 (25)</b>	<b>345</b>	<b>163 (47,2)</b>
Rīga	99	28 (28,3)	239	107 (44,8)
Citas pilsētas	77	16 (20,8)	106	56 (52,8)
<b>Viesnīcas</b>	–	–	<b>903</b>	<b>266 (29,5)</b>
Rīga	–	–	739	189 (25,6)
Citas pilsētas	–	–	164	77 (47)
<b>Citas ēkas</b>	<b>16</b>	<b>4 (25)</b>	<b>27</b>	<b>13 (48,10)</b>
Rīga	8	4 (50)	11	7 (63,6)
Citas pilsētas	8	0	16	6 (37,5)
<b>KOPĀ</b>	<b>192</b>	<b>48 (25,0)</b>	<b>1275</b>	<b>442 (34,7)</b>

Veicot visu izdalīto *L. pneumophila* serotipēšanu, identificētas sešas serogrupas. Dominējošā *L. pneumophila* serogrupa bija SG 3, kas tika identificēta 208 no 482 gadījumiem (43,2 %). *L. pneumophila* SG 2 tika konstatēta 176 gadījumos (36,5 %) un SG 1 atrasta 66 izolātiem (13,7 %), savukārt 6. un 9. serogrupa tika novērota attiecīgi 15 un 16 gadījumos. Pētījuma laikā izdalīta tikai viena pie SG 8 piederoša *L. pneumophila*, kas atrasta Valmierā ņemtā karstā ūdens paraugā. Septiņos gadījumos vienā ūdens paraugā vienlaikus identificētas pie divām dažādām serogrupām piederošas *L. pneumophila*. Visos gadījumos kā viena no serogrupām bija SG 3, savukārt kā otra serogrupa piecos gadījumos bija SG 2 un pa vienam SG 9 un SG 1.

Novērotais *L. pneumophila* kolonizācijas līmenis svārstījās no 50 KVV/1L, kas ir metodes kvantifikācijas robeža, līdz  $1,7 \times 10^4$  KVV/1L ar vidējo vērtību  $1,8 \times 10^3$  KVV/1L. Karstā ūdens kolonizācija dzīvojamās mājās bija augstāka nekā viesnīcās ( $p < 0,001$ ), turklāt dzīvojamām mājām augstākie kontaminācijas līmeņi atrasti Rīgā. Savukārt viesnīcu vidū reģionu pilsētu viesnīcās *Legionella* konstatētas augstākā koncentrācijā ( $p < 0,01$ ). No visiem ūdens paraugiem 46,3 % gadījumu leģionellu koncentrācija pārsniedz 1000 KVV/1L. Dzīvojamās mājās 50,3 % un viesnīcās 32,1 % gadījumu leģionellu koncentrācija pārsniedz 1000 KVV/1L (3.7. tabula).

**Legionella spp. kolonizācija ūdens paraugos**

Ēkas tips	Karstais ūdens		Aukstais ūdens	
	Vidējais kolonizācijas līmenis, KVV/1L(max)	Virš 1000 KVV/1L %	Vidējais kolonizācijas līmenis, KVV/1L(max)	Virš 1000 KVV/1L %
Dzīvojamās mājas	$2,1 \times 10^3$ ( $1,3 \times 10^4$ )	50,3	$1,7 \times 10^3$ ( $1,7 \times 10^4$ )	31,2
Rīga	$1,8 \times 10^3$ ( $1,3 \times 10^4$ )	54,8	$1,6 \times 10^3$ ( $1,1 \times 10^4$ )	28,6
Citas pilsētas	$2,6 \times 10^3$ ( $1,3 \times 10^4$ )	42,4	$1,9 \times 10^3$ ( $1,7 \times 10^4$ )	35,0
<b>Viesnīcas</b>	<b><math>1,2 \times 10^3</math></b> <b>(<math>1,1 \times 10^4</math>)</b>	<b>32,1</b>	–	–
Rīga	$1,0 \times 10^3$ ( $1,1 \times 10^4$ )	28,4	–	–
Citas pilsētas	$1,6 \times 10^3$ ( $1,1 \times 10^4$ )	50,0	–	–

Kolonizācijas līmeņi neuzrādīja būtiskas atšķirības starp dzīvojamām ēkām ar zināmiem leģionāru slimības gadījumiem un tādām ēkām, kurām nebija saistības vai informācijas devējiem nebija informācijas par leģionāru slimības gadījumiem, izņemot *L. pneumophila* SG 3 kolonizācijas līmeņus, kas bija ievērojami augstāki daudzdzīvokļu ēkās, kas saistītas ar leģionāru slimības gadījumiem (3.8. tabula).

***L. pneumophila* dzīvojamo ēku ūdensapgādes sistēmu kolonizācija**

	<b><i>L. pneumophila</i> kolonizācijas līmeņi min.–max (vidēji), KVV/1L</b>		
	<b>Ēkas ar zināmiem leģionāru slimības gadījumiem</b>	<b>Ēkas bez zināmiem leģionāru slimības gadījumiem</b>	<b>p vērtība</b>
SG 1	$50 - 4,0 \times 10^3$ ( $8,4 \times 10^2$ )	$4,0 \times 10^2 - 5,5 \times 10^3$ ( $2,6 \times 10^3$ )	0,056
SG 2	$50 - 1,3 \times 10^3$ ( $1,5 \times 10^3$ )	$50 - 6,4 \times 10^3$ ( $2,1 \times 10^3$ )	0,158
SG 3	$50 - 1,7 \times 10^4$ ( $2,8 \times 10^3$ )	$1,0 \times 10^2 - 3,9 \times 10^3$ ( $8,2 \times 10^2$ )	0,033
Kopā	$50 - 1,7 \times 10^4$ ( $2,0 \times 10^3$ )	$50 - 6,4 \times 10^3$ ( $1,7 \times 10^3$ )	0,574

Viesnīcās *L. pneumophila* kolonizācijas līmeņu datu analīze (3.9. tabula) atklāja statistiski nenozīmīgu *L. pneumophila* samazināšanos pēc trīs minūšu ilgās ūdens notecināšanas ( $p = 0,16$ ). Tomēr dati arī parādīja, ka 53 % viesnīcu, kurās *L. pneumophila* līmenis pārsniedza 1000 KVV/1L (vidēji  $4,4 \times 10^3$  KVV/1L), ūdens notecināšana samazināja kolonizācijas līmeni zem 1000 KVV/1L (vidēji  $3,0 \times 10^2$  KVV/1L) ūdens patēriņa vietā.

***L. pneumophila* kolonizācijas līmenis pirms un pēc ūdens notecināšanas**

Kolonizācijas līmenis, KVV/1L	Pirms notecināšanas	Pēc notecināšanas
Min.	50	50
Max	$1,1 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$
Vidēji	$1,7 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^2$

**3.2.1. Ūdens temperatūra**

Vidējā karstā ūdens cirkulācijas temperatūra ūdensapgādes sistēmās bija  $47,8 \pm 0,7$  °C. Temperatūras mērījumi parādīja, ka tikai 249 no 1275 karstā ūdens paraugiem (19,5 %) temperatūra pārsniedza 55 °C. Pētījuma laikā netika konstatētas būtiskas atšķirības starp reģioniem, ēku tipiem, paraugu ņemšanas sezonu, tomēr dati rāda, ka vidējā karstā ūdens temperatūra bija zemāka ( $p < 0,0001$ ) gadījumos, kad ūdens paraugā konstatēta *Legionella* (3.10. tabula).

**Vidējā ūdens temperatūra ūdensapgādes sistēmās**

Ēkas tips	Cirkulācijas temperatūra		<i>Legionella</i> negatīvi paraugi		<i>Legionella</i> pozitīvi paraugi	
	Vidējā karstā ūdens t° °C	Vidējā aukstā ūdens t° °C	Vidējā karstā ūdens t° °C	Vidējā aukstā ūdens t° °C	Vidējā karstā ūdens t° °C	Vidējā aukstā ūdens t° °C
<b>Dzīvojamās mājas</b>	<b>51,0</b>	<b>13,4</b>	<b>51,3</b>	<b>12,9</b>	<b>50,6</b>	<b>14,7</b>
Rīga	49,9	13,7	50,1	13,1	49,7	15,4
Citas pilsētas	52,9	12,9	54,2	12,8	51,9	13,7
<b>Viesnīcas</b>	<b>46,9</b>	<b>12,4</b>	<b>48,0</b>	<b>12,4</b>	<b>44,4</b>	–
Rīga	48,3	12,4	49,0	12,4	46,0	–
Citas pilsētas	42,1	–	42,8	–	41,4	–
<b>Citas ēkas</b>	<b>38,2</b>	<b>15,3</b>	<b>40,8</b>	<b>12,9</b>	<b>30,5</b>	<b>20,0</b>
Rīga	51,0	18,9	51,0	15,5	–	20,0
Citas pilsētas	34,0	12,4	35,8	12,4	30,5	–
<b>KOPĀ</b>	<b>47,8</b>	<b>13,5</b>	<b>48,5</b>	<b>12,9</b>	<b>46,4</b>	<b>15,1</b>

Viesnīcās paraugu ņemšanas laikā tika mērīta karstā ūdens temperatūra pirms un pēc notecināšanas (3.11. tabula). Datu analīze parādīja, ka 35 % viesnīcu karstā ūdens temperatūra pēc notecināšanas nesasniedza 50 °C, savukārt 22 viesnīcās karstā ūdens temperatūra bija no 50 °C līdz 55 °C, savukārt 30 viesnīcās cirkulācijas temperatūra ūdens patēriņa vietā pārsniedza 55 °C. Karstā ūdens temperatūra pēc trīs minūšu notecināšanas paaugstinājās par 8,4–39,0 °C. Vidēji temperatūra pēc notecināšanas paaugstinājās par  $23,8 \pm 1,2$  °C.

**Karstā ūdens temperatūra viesnīcās pirms un pēc trīs minūšu notecināšanas**

Temperatūra, °C	Pirms notecināšanas	Pēc notecināšanas
Min.	16,2	27,7
Max	62,9	68,8
Vidēji	35,7 ± 0,7	49,8 ± 0,4
Moda	27,0	47,0

Vidējā ūdens temperatūra viesnīcās būtiski neatšķīrās starp Rīgu un citām pilsētām ne pirms ( $p = 0,97$ ), ne pēc ( $p = 0,66$ ) notecināšanas. Lai gan lielākajā daļā viesnīcu ūdens temperatūra nepārsniedza 55 °C, tika novērots, ka notecināšana var būtiski paaugstināt ūdens temperatūru patēriņa vietā ( $p < 0,0001$ ). Datu analīze neatklāja nekādas būtiskas attiecības starp karstā ūdens temperatūru un *L. pneumophila* kolonizācijas līmeni.

Karstā ūdens temperatūra bija augstāka ( $p < 0,0001$ ) dzīvojamās ēkās, kurās iepriekš bijuši saslimšanas gadījumi (3.12. tabula).

***Legionella* spp. prevalence dzīvojamās ēkās ar un bez iepriekšējiem leģionāru slimības gadījumiem**

	Ēkas ar zināmiem leģionāru slimības gadījumiem		Ēkas bez zināmiem leģionāru slimības gadījumiem		Kopā	
	Paraugu skaits/ pozitīvi (%)	Vidējā ūdens temperatūra, °C	Paraugu skaits/ pozitīvi (%)	Vidējā ūdens temperatūra, °C	Paraugu skaits/ pozitīvi (%)	Vidējā ūdens temperatūra, °C
Aukstais ūdens	120/22 (18,3 %)	12,9 ± 0,4	44/19 (43,2 %)	15,6 ± 0,7	164/41 (25,0 %)	13,5 ± 0,3
Karstais ūdens	242/107 (44,2 %)	52,1 ± 0,4	86/49 (57,0 %)	45,8 ± 1,1	328/156 (47,6 %)	50,7 ± 0,4

Ēkās ar zināmiem leģionāru slimības gadījumiem *Legionella* spp. prevalence aukstajā ūdenī bija ievērojami zemāka ( $p < 0,0001$ ), savukārt ēkās bez zināmiem leģionāru slimības gadījumiem būtiskas leģionellu klātbūtnes atšķirības aukstajā un karstajā ūdenī netika novērotas ( $p = 0,192$ ). Kopumā *Legionella* spp. prevalence bija augstāka gan aukstā ( $p < 0,01$ ), gan karstā ūdens paraugos daudzdzīvokļu ēkās bez zināmiem leģionāru slimības gadījumiem, lai gan karstajam ūdenim atšķirība nebija statistiski nozīmīga ( $p = 0,056$ ).

### 3.2.2. Brīvi dzīvojošo amēbu izplatība dzeramā ūdens apgādes sistēmās

Brīvi dzīvojošo amēbu klātbūtne noteikta 268 paraugos, no kuriem 101 paraugs paņemts Rīgā, Daugavas kreisā krasta un centra teritorijās, kas saņem apstrādātu virszemes ūdeni, un 167 paraugi paņemti Rīgā, Daugavas labā krasta mikrorajonos un Latvijas reģionos, kur ūdensapgādes sistēmā tiek izmantots pazemes ūdens.

Brīvi dzīvojošas amēbas novērotas 207 no 268 ūdens paraugiem (3.13. tabula), tai skaitā 37 aukstā ūdens paraugos (84,1 %) un 170 karstā ūdens paraugos (75,9 %). Vismaz viens brīvi dzīvojošas amēbas saturošs paraugs tika novērots 83 no 92 ēkām (90,2 %).

3.13. tabula

Kopējais paraugu skaits un brīvi dzīvojošās amēbas saturoši paraugi

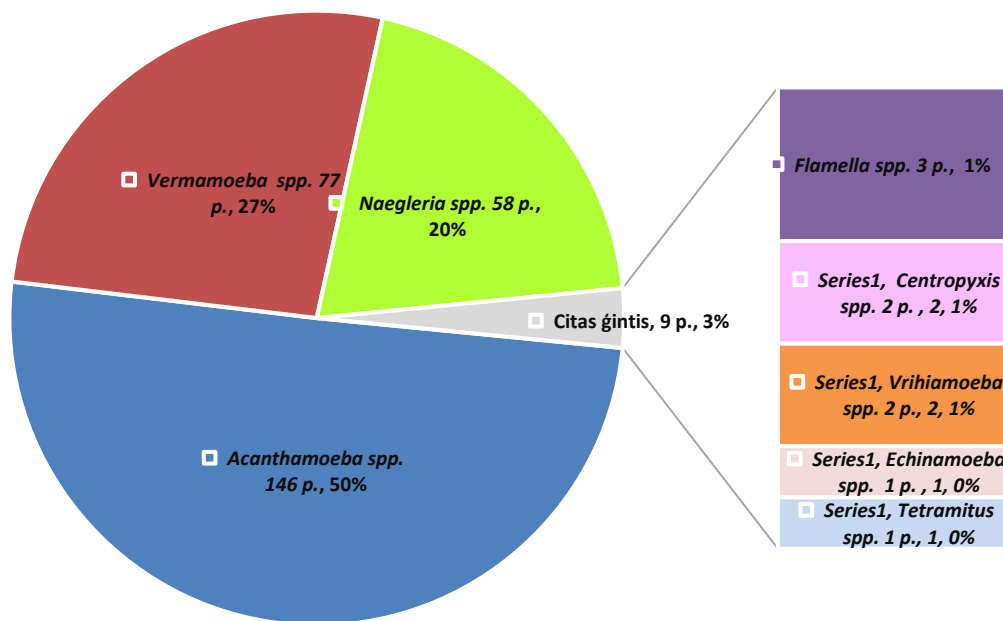
	Ūdens avots / paraugu skaits (pozitīvi; %)				Kopā
	Attīrīts virszemes ūdens		Pazemes ūdens		
	Aukstais ūdens	Karstais ūdens	Aukstais ūdens	Karstais ūdens	
<b>Daudzdzīvokļu ēkas</b>	4 (2; 50,0 %)	13 (6; 46,1 %)	24 (21; 87,5 %)	41 (31; 75,6 %)	82 (60; 73,2 %)
<b>Viesnīcas</b>	0 (0; 0,0 %)	75 (55; 73,3 %)	0 (0; 0,0 %)	68 (54; 79,4 %)	143 (109; 76,2 %)
<b>Sabiedriskas ēkas</b>	4 (4; 100,0 %)	5 (3; 60,0 %)	12 (10; 83,3 %)	22 (21; 95,4 %)	43 (38; 88,4 %)
<b>Starprezultāts</b>	8 (6; 75,0 %)	93 (64; 68,8 %)	36 (31; 86,1 %)	131 (106; 80,9 %)	268 (207; 77,2 %)
<b>Kopā</b>	101 (70; 69,3 %)		167 (137; 82,0 %)		

Hī kvadrāta testi neuzrādīja saistību starp ūdens veidu (t. i., aukstu vai karstu) un brīvi dzīvojošo amēbu klātbūtni ( $\chi^2 = 1,4$ ;  $p = 0,33$ ). Tomēr lielāka brīvi dzīvojošo amēbu daudzveidība tika novērota karstā ūdens paraugos ( $\chi^2 = 10,3$ ;  $p = 0,035$ ). Brīvi dzīvojošo amēbu klātbūtne bija ievērojami augstāka karstā ūdens paraugos, kuru temperatūra bija zemāka par 50 °C ( $\chi^2 = 21,3$ ;  $p < 0,0001$ ), savukārt aukstā ūdens temperatūrai nebija ietekmes uz brīvi dzīvojošo amēbu klātbūtni.

Paraugu ņemšanas sezonai un ēkas tipam pētījumā nebija saistības ar brīvi dzīvojošo amēbu klātbūtni (attiecīgi  $\chi^2 = 6,0$ ;  $p = 0,11$  un  $\chi^2 = 3,9$ ;  $p = 0,14$ ). Lielāka brīvi dzīvojošo amēbu sastopamība tika novērota paraugos no ēkām, kas saņēmušas dzeramo ūdeni no pazemes resursiem ( $\chi^2 = 5,8$ ;  $p = 0,024$ ), tomēr ūdens avotam nebija ietekmes uz amēbu daudzveidību ( $\chi^2 = 7,5$ ;  $p = 0,11$ ).

Kopumā tika identificētas astoņas brīvi dzīvojošo amēbu ģintis 207 paraugos (3.1. attēls). No visiem paraugiem vismaz pusē gadījumu konstatēta *Acanthamoeba* spp., savukārt tikai 3 % kopā veido piecas amēbu ģintis, tostarp *Flamella* spp., *Centropyxis* spp., *Vrihiamoeba* spp., *Echinamoeba* spp. un *Tetramitus* spp.





3.1. attēls. Identificēto brīvi dzīvojošo amēbu ģinšu izplatība dzeramā ūdens paraugos

Tikai viena amēbu ģintis tika novērota 47,4 % paraugu (127 no 268 gadījumiem). Divas dažādas amēbu ģintis konstatētas 69 paraugos (25,7 %), savukārt 10 gadījumos (3,7 %) konstatētas trīs ģintis, un vienā paraugā (0,4 %) – četras dažādas amēbu sugas. Visbiežāk novērotās amēbu ģinšu kombinācijas ir parādītas 3.14. tabulā.

3.14. tabula

Visbiežāk novērotās amēbu ģintis (%)

Amēbu ģintis	Paraugu skaits (%)
<i>Acanthamoebidae</i>	74 (27,6 %)
<i>Vahlkampfiidae</i>	29 (10,8 %)
<i>Vermamoebidae</i>	24 (9,0 %)
<i>Acanthamoebidae</i> + <i>Vermamoebidae</i>	43 (16,0 %)
<i>Acanthamoebidae</i> + <i>Vahlkampfiidae</i>	15 (5,6 %)

Brīvi dzīvojošo amēbu molekulārā identifikācija līdz sugai veikta 81 paraugam. Kopumā tika identificētas 13 brīvi dzīvojošo amēbu sugas (3.15. tabula). Tikai divas ģintis – *Acanthamoeba spp.* un *Naegleria spp.* – tika pārstāvētas ar vairāk nekā vienu sugu. No identificētajām sugām visizplatītākās bija *Vermamoeba vermiformis* (51,9 %), *Acanthamoeba castellanii* (13,6 %) un *Acanthamoeba polyphaga* (8,6 %). Pētījuma laikā nav identificēts ģintis *Centropyxis* pārstāvis, kas konstatēts divos aukstā ūdens paraugos kopā ar *A. triangularis*.

Identificētās brīvi dzīvojošo amēbu sugas

Ģints	Suga	Paraugu skaits
<i>Acanthamoeba</i>	<i>A. triangularis</i>	4
	<i>A. polyphaga</i>	7
	<i>A. castellanii</i>	11
	<i>A. haelayi</i>	2
	<i>A. quina</i>	1
	<i>A. lugdunensis</i>	1
<i>Vermamoeba</i>	<i>V. vermiformis</i>	42
<i>Naegleria</i>	<i>N. neopolaris</i>	6
	<i>N. fowleri</i>	1
<i>Echinamoeba</i>	<i>E. exudans</i>	1
<i>Tetramitus</i>	<i>T. dokdoensis</i>	1
<i>Vrihiamoeba</i>	<i>V. italica</i>	2
<i>Flamella</i>	<i>F. arnhemensis</i>	2
<b>Kopā</b>		<b>81</b>

*Legionella* spp. izplatība bija ievērojami augstāka paraugos ar mazāku brīvi dzīvojošo amēbu daudzveidību ( $\chi^2 = 64,9$ ;  $p < 0,0001$ ). Visbiežāk *Legionella* spp. tika novērota paraugos, kuros atrasta tikai viena amēbu ģints.

Brīvi dzīvojošo amēbu daudzveidībai nebija ietekmes uz *Legionella* sugām ( $\chi^2 = 1,9$ ;  $p = 0,758$ ), serogrupām ( $\chi^2 = 4,6$ ;  $p = 0,797$ ) vai uz koloniju veidojošo vienību skaitu ( $\chi^2 = 7,9$ ;  $p = 0,247$ ). Tikai divām amēbu ģintīm bija būtiska saistība ar *Legionella* spp. klātbūtni – *Acanthamoeba* spp., kas tika novērotas 146 paraugos ( $\chi^2 = 19,7$ ;  $p < 0,0001$ ), un *Vermamoeba* spp., kas tika novērotas 77 paraugos ( $\chi^2 = 7,8$ ;  $p = 0,006$ ), savukārt citām ģintīm nebija statistiski nozīmīgas ietekmes uz *Legionella* spp.

Tika novērota saikne starp brīvi dzīvojošu amēbu klātbūtni un *Legionella* spp. kontamināciju ( $\chi^2 = 58,5$ ;  $p < 0,0001$ ). Netika novēroti *Legionella* spp. pozitīvi gadījumi, ja nebija amēbu (3.16. tabula), un brīvi dzīvojošo amēbu un *Legionella* spp. vienlaicīga klātbūtne sasniedza 55,1 %.

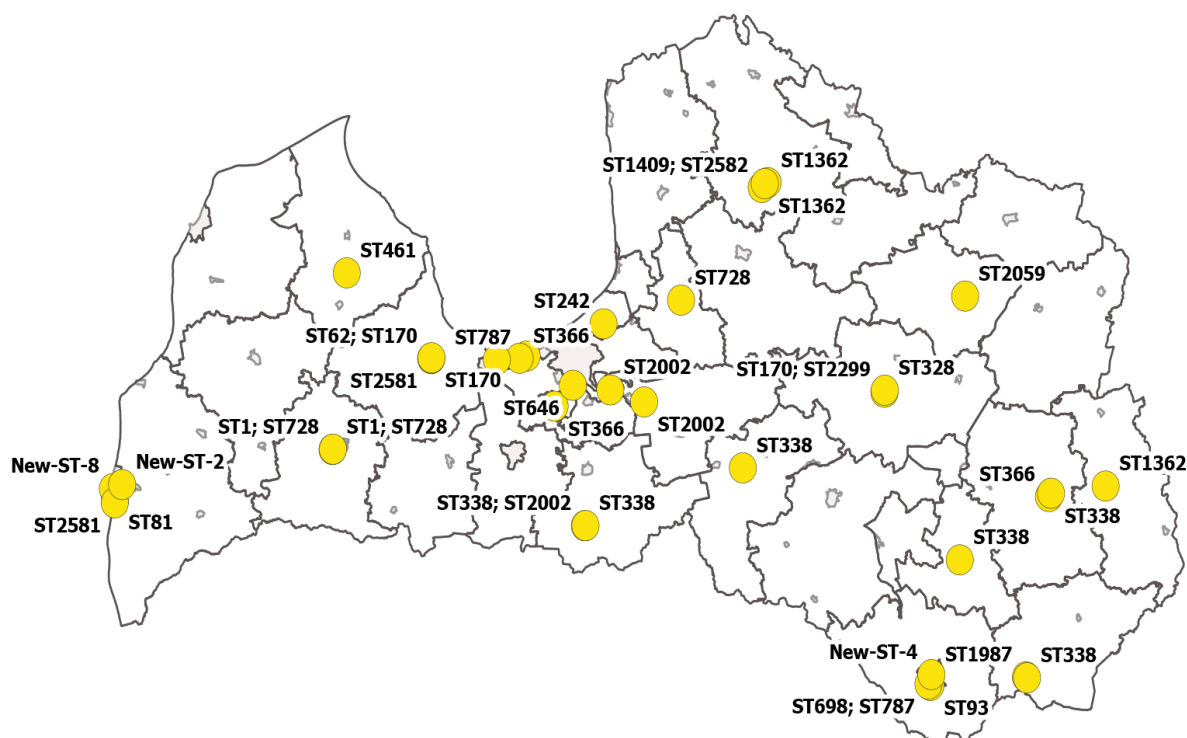
3.16. tabula

FLA un *Legionella* spp. vienlaicīga klātbūtne dzeramajā ūdenī

	<i>Legionella</i> spp. negatīvi paraugi (%)	<i>Legionella</i> spp. pozitīvi paraugi (%)
FLA negatīvi paraugi (%)	61 (100,0 %)	0 (0,0 %)
FLA pozitīvi paraugi (%)	93 (44,9 %)	114 (55,1 %)

### 3.3. *Legionella pneumophila* sekvenču bāzētās un cgMLST tipēšanas rezultāti

Veicot pilna genoma sekvenčēšanu un datu analīzi par septiņām alēlēm *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA* vai *neuAh*, tika iegūta informācija par visu 137 izolātu sekvenču tipiem. No 137 sekvenčētajiem *L. pneumophila* izolātiem 72 bija no Rīgas (3. pielikums) un 65 no Latvijas reģioniem (3.2. attēls).



3.2. attēls. *L. pneumophila* sekvenču tipu ģeogrāfiskā izplatība Latvijā

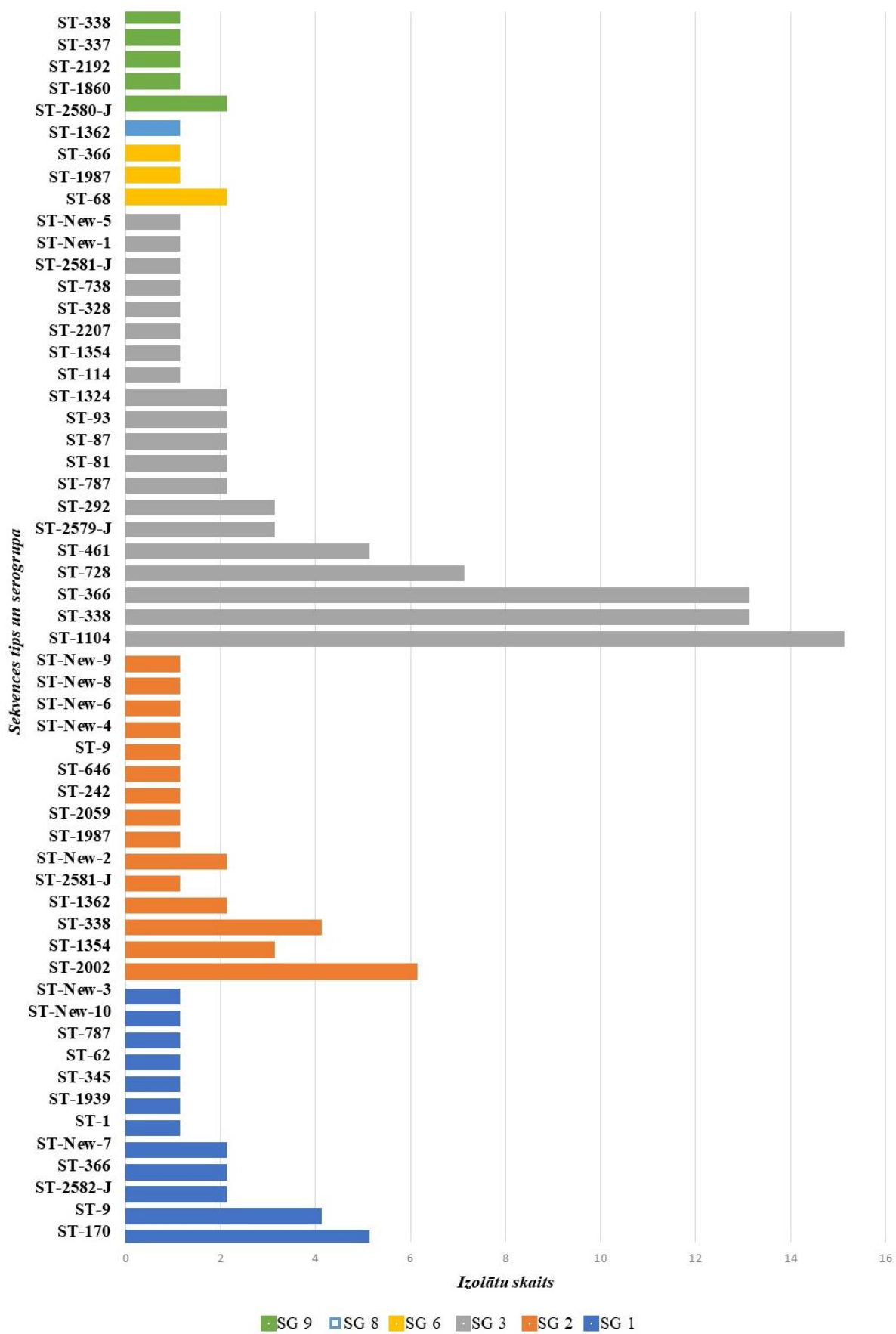
Pētījumā iekļautie 137 *L. pneumophila* celmi sadalās 46 sekvenču tipos, turklāt 10 sekvenču tipi ir jauni, iepriekš pasaulē neregistrēti, kuriem nav piešķirts sekvenču numurs starptautiskajā ESGLI datu bāzē (3.17. tabula).

3.17. tabula

Jauno *L. pneumophila* sekvenču tipu izolātu raksturojums un alēliskais profils

Izolāta Id	Gads	Pašvaldība	SG	Alēliskais profils	Sekvenču tips
Leg-20-2018	2018	Rīga	3	2,10,3,3,50,4,3	New-ST-1
Leg-21-2019	2019	Rīga	2	2,10,21,28,9,4,6	New-ST-2
Leg-48-2022	2022	Liepāja	2	2,10,21,28,9,4,6	New-ST-2
Leg-28-2019	2019	Rīga	1	2,10,17,3,9,4,6	New-ST-3
Leg-30-2019	2019	Daugavpils	2	2,10,17,3,9,4,9	New-ST-4
Leg-44-2020	2020	Rīga	3	2,22,3,28,50,4,3	New-ST-5
Leg-51-2022	2022	Rīga	2	2,10,3,3,50,4,6	New-ST-6
Leg-14-2018	2018	Rīga	1	6,10,19,3,98,4, jauna <i>neuA</i> alēle	New-ST-7
Leg-49-2022	2022	Rīga	1	6,10,19,3,17,4,11	New-ST-7
Leg-6-2017	2017	Liepāja	2	7,10,17,6,9,11,9	New-ST-8
Leg-34-2019	2019	Rīga	2	7,10,17,6,17,11,9	New-ST-9
Leg-53-2022	2022	Rīga	1	7,6,17,3,50,4,9	New-ST-10

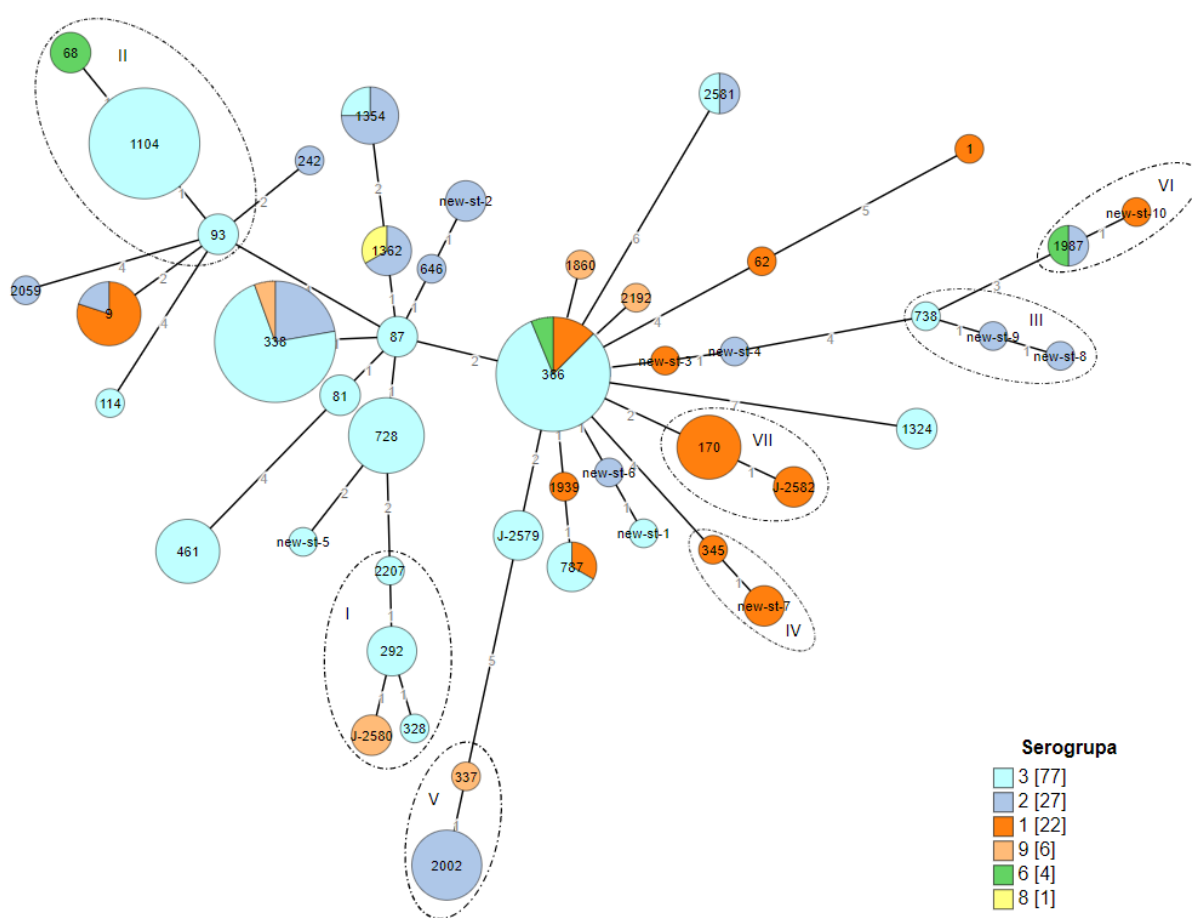
Visbiežāk sastopamie sekvenču tipi ir ST-338 (18 izolāti), ST-366 (16 izolāti) un ST-1104 (15 izolāti). No 46 pētījumā identificētajiem sekvenču tipiem 39 (78 %) tika novēroti katrs tikai vienas serogrupas *L. pneumophila* izolātiem, tomēr ir vairāki sekvenču tipi, kuru izolāti pieder pie vairāk nekā vienas serogrupas: ST-338 un ST-336 apvieno izolātus, kas pieder pie trim serogrupām, savukārt ST-9, ST-787, ST-1354, ST-1362 un ST-1987 *L. pneumophila* celmi pieder pie divām dažādām serogrupām (3.3. attēls). Četri sekvenču tipi ir ST-2579-J, ST-2580-J, ST-2581-J un ST-2582-J jau iepriekš tika reģistrēti EWGLI datu bāzē kā jauni vides izolātu sekvenču tipi no Latvijas.



3.3. attēls. *Legionella pneumophila* sekvenču tipi

Kopumā prezentēti 46 sekvenču tipi 137 izolātiem.

Izmantojot *GrapeTree* v.1.5.0 un *goeBurst* algoritmu, konstruēts mazākais savienotais koks (*minimum spanning tree*) ar 46 sekvenču tipiem, kur, sakrītot vismaz 5 alēlēm, identificēti un apvilkti septiņi klonālie kompleksi (3.4. attēls). Divi klonālie kompleksi veidojas vienas SG (SG1) ietvaros, pārējos kompleksos saistītie izolāti pieder pie dažādām SG. Vienīgais SG 8 izolāts nav iesaistīts nevienā klonālajā kompleksā. ST-366 ir centrālais sekvenču tips, kurš tiek raksturots kā “*predicted founder*” jeb hipotētiskais priekštecis. Kopumā divpadsmit sekvenču tipi ST-1, ST-9, ST-62, ST-114, ST-242, ST-461, ST-1324, ST-1354, ST-2059 un ST-2579-J, ST-2581-J un ST-New-5 identificēti kā *singletons*, t. i., tādi sekvenču tipi, kas ir maz vai nemaz saistīti ar citiem sekvenču tipiem.



3.4. attēls. Mazākā savienotā koka (*Minimum spanning tree*) vizualizācija 46 *L. pneumophila* sekvenču tipiem

Atsevišķu mezglu krāsa atbilst specifiskai serogrupai. Atzīmēti septiņi identificētie klonālie kompleksi, numurēti romiešu cipariem.

Izmantojot *GrapeTree* v.1.5.0 un *goeBurst* algoritmu, izveidots vēl viens mazākais savienotais koks (*minimum spanning tree*) ar 46 sekvenču tipiem un klonālajiem kompleksiem (3.5. attēls), šoreiz atsevišķo mezglu krāsas atbilst pilsētai, kurā ņemts ūdens paraugs.







*L. pneumophila* izolātu izcelsmes epidemioloģiskais un ģenētiskais raksturojums

<b>Izolāta Id</b>	<b>Gads</b>	<b>Pilsēta</b>	<b>SG</b>	<b>Saistība ar leģionāru slimības gadījumiem</b>	<b>Sekvenču tips</b>	<b>Virulences gēnu skaits</b>
Leg-1-2016	2016	Krāslava	6	Jā	1987	377
Leg-2-2016	2016	Rīga	3	Jā	87	372
Leg-3-2016	2016	Valmiera	8	Jā	1362	372
Leg-4-2017	2017	Rīga	9	Jā	2192	370
Leg-5-2017	2017	Rīga	9	Jā	337	358
Leg-6-2017	2017	Liepāja	2	Jā	New-ST-8	378
Leg-7-2017	2017	Rīga	2	Jā	338	375
Leg-8-2017	2017	Bauska	3	Jā	338	378
Leg-9-2017	2017	Rīga	2	Jā	1987	378
Leg-10-2017	2017	Rīga	3	Jā	738	376
Leg-11-2018	2018	Rīga	9	Jā	338	378
Leg-12-2018	2018	Aizkraukle	3	Nē	338	378
Leg-13-2018	2018	Liepāja	2	Jā	2581	344
Leg-14-2018	2018	Rīga	1	Jā	New-ST-7	374
Leg-15-2018	2018	Jūrmala	6	Jā	366	374
Leg-16-2018	2018	Rīga	1	Nē	345	374
Leg-17-2018	2018	Jūrmala	3	Nē	787	372
Leg-18-2018	2018	Rīga	1	Nē	787	372
Leg-19-2018	2018	Rīga	2	Nē	1354	312
Leg-20-2018	2018	Rīga	3	Nē	New-ST-1	372
Leg-21-2019	2019	Rīga	2	Jā	New-ST-2	374
Leg-22-2019	2019	Rīga	1	Jā	1939	374
Leg-23-2019	2019	Gulbene	2	Jā	2059	415
Leg-24-2019	2019	Rīga	3	Nē	1104	397
Leg-25-2019	2019	Rīga	2	Nē	9	396
Leg-26-2019	2019	Rīga	3	Nē	2207	360
Leg-27-2019	2019	Rīga	3	Nē	93	415
Leg-28-2019	2019	Rīga	1	Nē	New-ST-3	373
Leg-29-2019	2019	Madona	3	Jā	328	375
Leg-30-2019	2019	Daugavpils	2	Jā	New-ST-4	369
Leg-31-2019	2019	Ādaži	2	Jā	242	415
Leg-32-2019	2019	Salaspils	2	Jā	2002	363
Leg-33-2019	2019	Ogre	2	Jā	2002	357
Leg-34-2019	2019	Rīga	2	Nē	New-ST-9	377
Leg-35-2019	2019	Rīga	3	Nē	114	415
Leg-36-2019	2019	Rīga	3	Nē	87	373
Leg-37-2019	2019	Rīga	9	Nē	1860	371
Leg-38-2019	2019	Krāslava	2	Jā	338	378
Leg-39-2020	2020	Ludza	2	Jā	1362	376
Leg-40-2020	2020	Rīga	3	Jā	1354	328
Leg-41-2020	2020	Tukums	1	Jā	170	375
Leg-42-2020	2020	Rīga	3	Nē	338	371
Leg-43-2020	2020	Olaine	1	Jā	366	379

3.18. tabulas turpinājums

Isolāta Id	Gads	Pilsēta	SG	Saistība ar leģionāru slimības gadījumiem	Sekvences tips	Virulences gēnu skaits
Leg-44-2020	2020	Rīga	3	Jā	New-ST-5	371
Leg-45-2020	2020	Sigulda	3	Jā	728	373
Leg-46-2021	2021	Rīga	3	Jā	1104	412
Leg-47-2021	2021	Rēzekne	3	Jā	338	378
Leg-48-2022	2022	Liepāja	2	Jā	New-ST-2	372
Leg-49-2022	2022	Rīga	1	Jā	New-ST-7	374
Leg-50-2022	2022	Baloži	2	Jā	646	375
Leg-51-2022	2022	Rīga	2	Nē	New-ST-6	372
Leg-52-2022	2022	Rīga	2	Nē	2002	360
Leg-53-2022	2022	Rīga	1	Nē	New-ST-10	390
Leg-54-2022	2022	Rīga	2	Nē	338	375
Leg-55-2022	2022	Rīga	3	Nē	338	375
Leg-56-2022	2022	Rīga	3	Nē	2581	344
Leg-57-2022	2022	Rīga	2	Nē	338	375
Leg-58-2022	2022	Rīga	1	Nē	366	375

Visiem sekvencētajiem *L. pneumophila* izolātiem tika atrasts tikai viens pretantibiotiku rezistences gēns – aph(9)-la, kas kodē pretantibiotiku rezistences faktoru spektinomicīna fosfotransferāzi.

Katram no 58 izolātiem atrasti 260 (62,1 %) virulences gēni. Vidēji katrs virulences gēns atrasts 52 izolātiem. Šajā pētījumā tika izvēlēti 11 gēni, kuriem ir būtiska nozīme *L. pneumophila* spējā inficēt cilvēkus: *enhC*, *htpB*, *omp28*, *mip*, *mavC*, *legK1*, *sidj*, *lvhD4*, *lpnE*, *lspC* un *rtxA*.

Gēni *enhC*, *htpB*, *omp28*, *mip*, *lpnE* un 11 gēni no *lsp* gēnu saimes atrasti visiem *L. pneumophila* 58 izolātiem (3.19. tabula).

Virulences gēnu relatīvais biežums *L. pneumophila* izolātos

Virulences gēns	Pozitīvie izolāti / testētie izolāti	Relatīvais biežums, %									
		Kopā	Izolāti no ekām ar zināmiem legionelozes gadījumiem, n = 34	Izolāti no ekām bez zināmiem legionelozes gadījumiem, n = 24	SG 1 n = 10	SG 2 n = 21	SG 3 n = 20	SG 6 n = 2	SG 8 n = 1	SG 9 n = 4	
<i>enhC</i>	58/58	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>hipB</i>	58/58	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>omp28</i>	58/58	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>mip</i>	58/58	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>mavC</i>	54/58	93	94	92	100	90	100	90	100	100	100
<i>legK1</i>	57/58	98	100	96	100	95	100	100	100	100	100
<i>sidJ</i>	54/58	93	94	92	100	100	100	95	100	100	25
<i>IvhD4</i>	48/58	83	85	79	100	76	100	80	50	100	100
<i>IpnE</i>	58/58	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>IspC</i>	58/58	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>rtxA AA100</i>	23/58	40	32	50	10	38	55	0	100	100	50

Netika novērotas būtiskas atšķirības gēnu relatīvajā biežumā ( $p > 0,05$ ) starp ēkām, kas saistītas ar leģionāru slimības gadījumiem, un ēkām, kurās leģionāru slimības gadījumu nebija, un starp dažādām serogrupām, izņemot *sidJ*, kas SG 9 izolātos bija retāk nekā SG 1, SG 2 un SG 3 izolātos ( $p < 0,05$ ), un PĶR simulētajam *rtxA*, kas SG 1 izolātos bija retāk nekā SG 3 izolātos ( $p < 0,05$ ).

Kopumā visos izolātos tika novēroti 260 gēni (62,1 %), tostarp *enhC*, *htpB*, *omp28*, *mip*, *lpnE* (3.7. attēls) un 11 *lsp* saimes gēni. *Core Genome SNP* dendrogramma parāda tās pašas grupas kā cgMLST minimālais aptverošais koks, un atsevišķie *leg* saimes virulences gēni, kas atrodami tikai 7 izolātos no 58, atrodas grupā, kas izveidota ap ST1104.

*Mav* saimi pārstāvēja 13 identificēti gēni, no kuriem deviņi tika atrasti visos 58 izolātos, savukārt *mavC* atrasts 54, *mavG* 53, *mavH* 55 un *mavI* 57 izolātos. Kopumā ir identificēti 29 *leg* saimes virulences gēni. *Leg* gēnu izplatība *L. pneumophila* izolātos variēja no 12 % līdz 100 %, tomēr mazāk nekā 50 izolātos no 58 ir konstatēti tikai 8 *leg* saimes gēni. No 11 virulences gēniem, kas pārstāv *sid* saimi, *sidA*, *sideE*, *sidF* un *sidK* tika atrasti visos 58 izolātos. *SidG* un *sidH* tika uzskatīti par retākajiem un tika atrasti attiecīgi 6 un 13 izolātos. Visi 11 identificētie *lvh* saimes gēni tika atrasti 46 izolātos, izņemot *lvhB2*, kas konstatēts tikai 27 dzīvojamo ēku izolātos.



3.7. attēls. Maksimālās varbūtības koks (*maximum-likelihood tree*), kas veidots no 58 *L. pneumophila* celmu pamata gēnu līdzināšanas

Parauga izcelsmes pilsēta un SBT tips ir norādītas iekavās aiz katra nosaukuma, izolāti, kas nāk no ēkām ar iepriekšējiem leģionāru slimības gadījumiem, izcelti treknrakstā. Krāsaini kvadrāti norāda katra izolāta serogrupu. Zaļo kvadrātu panelis parāda *L. pneumophila* virulences un pretantibiotiku rezistences gēnu sadalījumu starp visiem izolātiem. Zaļi aizpildīti kvadrāti norāda uz gēna klātbūtni, bet tukši kvadrāti norāda uz gēna neesamību attiecīgajā *L. pneumophila* izolātā.

## 4. Diskusija

### 4.1. *L. pneumophila* seroprevalence un saistītie faktori

Regulāra un ilgstoša saskare ar *Legionella* spp. saturošiem ūdens aerosoliem apkārtējā vidē cilvēkiem izraisa imūnās atbildes reakcijas un antivielu veidošanos, kas izmērāmā līmenī var saglabāties vairākus mēnešus un pat gadus, neizraisot nekādus simptomus. Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka Latvijā vidējā seroprevalence pret 1.–6. serogrupas *L. pneumophila* bija 4,6 %, turklāt tā bija atkarīga no urbanizācijas pakāpes un variēja no vidēji 3,5 % laukos līdz 9,5 % Rīgā daudzdzīvokļu māju iemītniekiem.

Galvenais leģionellu rezervuārs ir cilvēku radīta ūdens vide, un vairāki pētījumi ir ziņojuši par *Legionella* kontamināciju sadzīves ūdens apgādes sistēmās kā ievērojamu problēmu (Dilger et al., 2018; Felice et al., 2019; Gleason et al., 2023), turklāt arī iepriekš veiktajos seroprevalences pētījumos antivielas pret leģionellām biežāk konstatētas pilsētu iedzīvotājiem, kas tikai apstiprina to, ka pilsētās *Legionella* ir endēmiska (Graham et al., 2020). Iepriekšējie pētījumi Dānijā atklāja 22,9 % seroprevalences līmeni asins donoru vidū (Rudbeck et al., 2008), savukārt Zviedrijā veseliem cilvēkiem seroprevalence bija aptuveni 1,0 % (Darelid et al., 2003). Dienvideiropā, Itālijā, seroprevalence pret *L. pneumophila* SG 1–6 bija 3,4 % un 16,4 % pret *L. pneumophila* SG 7-14 (Borella et al., 2008), savukārt Francijā veiktā pētījumā, kurā bija iekļauti pakļauti un neeksponēti darbinieki rūpniecības objektos, tika novērota zema izplatība 2,8 % (Daniau et Cabanes, 2010). Galvenie faktori, kas ir pamatā atšķirībām novērotajos *L. pneumophila* seroprevalences līmeņos, ir atšķirīgas testēšanas metodes un pētījuma dizaina atšķirības.

Tika novērotas būtiskas atšķirības ( $p = 0,005$ ) *L. pneumophila* seroprevalencei starp sievietēm (5,9 %) un vīriešiem (3,3 %) atšķirībā no iepriekš definētajiem leģionāru slimības riska faktoriem (Den Boer et al., 2006). Leģionāru slimības incidences dati arī liecināja par vīriešu pārsvaru (ECDC, 2022). Arī Japānā tika ziņots par ievērojami augstāku vīriešu un sieviešu proporciju pacientiem ar *L. pneumophila* SG 1, salīdzinot ar pacientiem ar citām *L. pneumophila* serogrupām (Amemura-Maekawa et al., 2010). Augstā seroprevalence Latvijas sieviešu vidū, iespējams, skaidrojama ar lielāku ūdens aerosolu iedarbību māsasaimniecības darbu laikā. Sievietes var pastāvīgi tikt pakļautas nelielām *Legionella* devām, kas neizraisa saslimšanu, bet tikai izraisa imūnreakciju (Rozentale et al., 2011), tomēr daudz ticamāka ir versija par infekcijas slimību dzimumdimorfisma ģenētiskajiem cēloņiem (Gay et al., 2021). Vairāki galvenie regulējošie un vielmaiņas proteīni, kas piedalās signālu pārraidē, apoptozē un ogļhidrātu metabolismā, ir kodēti X hromosomā, un to polimorfie varianti ir plaši izplatīti populācijā (Spolarics et al., 2017). Sievietes varētu būt izturīgākas pret leģionāru slimību *Toll-*

*like* receptoru (TLR) polimorfisma dēļ, kuru aizsargājošai lomai varētu būt saistība ar rezistenci pret leģionellām un citiem imunogēnētiskiem faktoriem (Hawn et al., 2005). TLR7/8 sinerģija ir ievērojama parādība cilvēka imunitātē pret patogēnām infekcijām. Gan TLR7, gan TLR8 atrodas X hromosomā, un tiek uzskatīts, ka tiem ir svarīga loma atšķirīgu imūnreakciju izraisīšanā vīriešiem un sievietēm (Mukherjee et al., 2019).

Pētījuma laikā tika novērota interesanta saistība starp smēķēšanu un seropozitivitāti. Saskaņā ar pētījuma rezultātiem seroprevalence smēķējošo sieviešu vidū bija zemāka nekā nesmēķētāju vidū. Tikai 3,2 % smēķējošo sieviešu donoru bija *L. pneumophila* seropozitīvas, savukārt nesmēķētāju vidū seropozitivitāte sasniedza 6,7 % (OR = 0,46). Tas varētu būt saistīts ar smēķēšanas nomācošo ietekmi uz humorālās imunitātes aizsargfunkcijām. Kā ziņots iepriekšējos pētījumos, tabakas smēķēšana bija saistīta ar zemāku IgG līmeni (Feldman et al., 2013), turklāt cēlonis varētu būt saistīts ar jau pieminēto *Toll-like* receptoru polimorfismu. TLR2 ir nozīmīga loma *L. pneumophila* atpazīšanā, un ir zināms, ka TLR6 un TLR1 mijiedarbojas ar TLR2 slimības agrīnā atpazīšanā. Zinātnieku grupa Holandē pētīja TLR1, TLR2 un TLR6 polimorfismu 98 leģionāru slimības pacientiem un 268 cilvēkiem kontrolgrupā (Misch et al., 2013). Netika atrasta saistība starp TLR1 un TLR2 polimorfismu ar leģionāru slimības gadījumiem, taču TLR6 polimorfisms 359T > C (rs5743808) bija saistīts ar paaugstinātu leģionāru slimības risku (OR = 5,83), turklāt šis risks būtiski pieaugu smēķētāju vidū. Pētījuma autori uzskata, ka TLR6 polimorfisms 359T > C var būt arī atsevišķs instruments, lai identificētu ģenētiski palielinātu leģionāru slimības risku.

Kā papildu skaidrojums apvērstam rezultātam smēķējošo sieviešu vidū var būt pētījuma populācijas ierobežojumi, jo donori pārstāv veselīgāko sabiedrības daļu, un šis pētījums nebija īpaši vērsts uz smēķētāju grupu izpēti.

Tikai neliels skaits donoru (4,6 %) bija nepārtraukti pakļauti ūdens aerosoliem darbā, piemēram, automazgātavās, spa, zobārstniecības klīnikās un apstrādes rūpnīcās, un tikai divi no tiem bija seropozitīvi, turklāt viens pētījuma dalībnieks norādīja, ka darbā tiek lietoti individuālie aizsardzības līdzekļi. Pētījumi rāda, ka virkne profesiju, kas saistītas ar ūdens aerosoliem un dzesēšanas sistēmām, varētu būt pakļautas lielākam leģionelozes riskam (Principe et al., 2017), kā vienu no riska kategorijām izceļot veselības aprūpes sistēmas darbiniekus, īpaši zobārstniecības speciālistus, tomēr rezultāti ir samērā pretrunīgi. Pētnieku grupa no Bulgārijas ziņo, ka *Legionella* antivielu seroprevalences līmenis veselības aprūpes un zobārstniecības personāla vidū var būt saistīts ar darba vides risku, jo īpaši, ja darba laikā netiek sistemātiski un regulāri lietoti individuālie aizsardzības līdzekļi un nav izveidota sistēma ūdens sistēmu regulārai uzraudzībai un profilaktiskai apkopei (Kevorkyan et al., 2017), savukārt veiktā metaanalīze liecina, ka nav zinātnisku pierādījumu tam, ka zobārstniecības speciālistiem

būtu augstāks profesionālais risks (Petti and Vitali, 2017). Tomēr, kā atzīst paši pētnieki, var būt nozīmīgas atšķirības starp dažādām ūdensapgādes sistēmu īpašībām un infekciju kontroles vadlīniju ieviešanu, kas var būtiski ietekmēt risku.

Dati par iepriekšējām veselības epizodēm neliecināja par asins donoriem, kuru anamnēzē būtu leģionāru slimība. Tāpat būtiskas atšķirības netika novērotas donoriem ar un bez pneimonijas vai bronhīta epizodēm iepriekšējā gadā. Tomēr pēdējā gada laikā novērotas būtiskas atšķirības (OR = 2,42; p = 0,001) abu dzimumu un visu vecuma grupu donoriem, kuri cieta no gripai līdzīgas slimības, kas varētu liecināt par nediagnostificētiem Pontiakas drudža gadījumiem nepietiekamas diagnostikas dēļ (Hamilton et al., 2018).

Dzīvesvietas veids, urbanizācijas pakāpe un karstā ūdens sagatavošanas sistēmas veids bija nozīmīgākie mūsu pētījumā identificētie vides faktori. Daudzdzīvokļu māju iedzīvotāji bija pakļauti lielākam riskam nekā privātmājās dzīvojošie (OR = 2,23; p = 0,011). Turklāt teritorijas ar lielāku iedzīvotāju blīvumu bija saistītas ar lielāku seropozitivitātes varbūtību (OR = 1,89; p = 0,046). Tāpat lielākais seropozitivitātes risks bija to ēku iedzīvotājiem, kas saņēma karsto ūdeni centralizēti un nevarēja ietekmēt ne karstā ūdens temperatūru, ne kopējo ūdensapgādes sistēmas stāvokli (OR = 3,16; p = 0,001). Proti, karstā ūdens sagatavošanas veidam bija visnozīmīgākā ietekme daudzfaktoru loģistikās regresijas analīzē. Šie atklājumi saskan ar iepriekšējo vides pētījumu rezultātiem, kur leģionellas izplatība bija augstāka ēkās ar centralizētām karstā ūdens apgādes sistēmām (Kruse et al., 2016). Mūsu pētījuma rezultāti nesniedz pierādījumus par to, vai ēkas vecums ietekmē *L. pneumophila* seroprevalenci. Vairāk nekā 67 % dalībnieku dzīvoja ēkās, kas celtas no 20. gadsimta 50. līdz 90. gadiem, un ūdensapgādes sistēmu renovācija vairumā gadījumu netika veikta. Tomēr iepriekš veiktie pētījumi apstiprina, ka gan vecās, gan jaunuzceltās ēkās leģionellu kontaminācijas iespējamība ir vienāda un tieši sanācijas pasākumi var uzlabot sabiedrības veselību (Donohue et al., 2022).

Pētījumā kā galvenais ar *L. pneumophila* seropozitivitāti saistītais faktors tika noteikts centralizēta karstā ūdens apgādes sistēma dzīvojamās mājās. Atbilstoši ēku apsaimniekošanai var būt izšķiroša nozīme iedzīvotāju veselības nodrošināšanā. Ēku apsaimniekotājiem būtu jānodrošina vismaz ēku ūdensapgādes sistēmas apkope, dezinfekcija un atbilstošas cirkulācijas temperatūras uzturēšana. Efektīvās leģionelozes profilakses stratēģijās jāiekļauj gan sabiedrības, gan ēku pārvaldnieku izglītošana, uz risku balstītu monitoringa programmu izstrāde un rūpīga laboratoriskās diagnostikas metožu izvēle vides un klīnisko gadījumu izmeklēšanā.



#### 4.2. *Legionella* spp. izplatība ūdensapgādes sistēmās un persistenci un kolonizāciju ietekmējošie faktori

Leģionāru slimība ir novēršama slimība, kuras sastopamība turpina pieaugt, un centralizēta ūdens apgāde dzīvojamās ēkās ir nozīmīgs sporādisku leģionāru slimības gadījumu avots. Viesnīcām kā galvenajam viesmīlības nozares elementam var būt svarīga loma ne tikai tūrisma veicināšanā, bet arī sabiedrības veselības aizsardzībā. Latvija kā ceļojumu galamērķis ir minēta Eiropas Slimību profilakses un kontroles centra gada pārskatos par leģionāru slimības gadījumiem, kas saistīti ar ceļošanu (ECDC, 2022). Pētījuma rezultāti parādīja, ka leģionellas ir izplatītas dzeramajā ūdenī Latvijā un ūdensapgādes sistēmas daudzdzīvokļu ēkās, viesnīcās, sporta klubos un biroju ēkās var kļūt par potenciāliem leģionellu infekcijas avotiem.

Pētījumā ir izvērtēta leģionellu izplatība un daudzveidība 210 dzīvojamās daudzdzīvokļu namos, 81 viesnīcā un 26 sabiedriskās ēkās visā Latvijā. Kopumā leģionellas tika konstatētas 55,6 % ēku un 33,4 % ūdens paraugu, tostarp 56,2 % dzīvojamo ēku un 39,7 % mājsaimniecībās ņemtu paraugu. Šie rezultāti ievērojami pārsniedz citu valstu pētījumos ziņotos datus par dzīvojamām mājām – 20,7 % Vācijā (Dilger et al., 2018) un 32,7 % (Kruse et al., 2016), un divos ziņojumos no Itālijas, kur leģionellu prevalences karstā ūdens sistēmās variēja no 19,8 % (Felice et al., 2019) līdz 26 % (Totaro et al., 2017). ASV vismaz viens *Legionella* pozitīvs paraugs tika konstatēts 15 % viengimenes māju (Gleason et al., 2023). Līdzīgi pētījumi Japānā atklāja leģionellu prevalenci 6,5 % ūdens paraugu, izmantojot kultivēšanas metodi (Kuroki et al., 2017), savukārt Apvienotajā Karalistē leģionellas tika konstatētas 8 % ūdens paraugu, kas ņemti mājsaimniecības dušās (Collins et al., 2017). Abos pētījumos *Legionella* tika analizēta arī, izmantojot otro metodi – cilpas mediētu izotermisko amplifikāciju Japānā un kvantitatīvo PQR Apvienotajā Karalistē, un novērotā *Legionella* prevalences variēja attiecīgi līdz 47,8 % un 31 %. Ņemot vērā uz DNS balstīto metožu būtību, iespējams, ka mūsu pētījumā leģionellu sastopamība būtu vēl lielāka, ja tiktu izmantotas papildu molekulārās metodes.

Iepriekšējos pētījumos par leģionellu izplatību viesnīcu ūdensapgādes sistēmās ziņots par līdzīgu *Legionella* prevalenci: 20,7 % paraugu no 62,95 % Grieķijas viesnīcu saturēja *Legionella* spp. (Papadakis et al., 2021), 25,6 % ņemto paraugu no 57,15 % viesnīcu Itālijā (De Filippis et al., 2017), 15,9 % karstā ūdens paraugu no 65,4 % atlasīto objektu Baleāru salās, Spānijā (Domenech-Sanchez, Laso, Berrocal et Alberti, 2022), un 17 % paraugu no 60 % izlasē iekļauto viesnīcu Izraēlā (Yakunin et al., 2020). Leģionellas tika konstatētas arī 25,7 % paraugu no viesnīcām Bosnijā un Hercegovinā (Bešič et al., 2021). Viszemākā *Legionella* izplatība tika novērota Kanāriju salās – tikai 8,5 % paraugu no karstā ūdens sadales sistēmām tika konstatēti piesārņoti (Domenech-Sanchez, Laso et Alberti, 2022). Kopumā, izņemot Domenecha-Sančesa

pētījumu (Domenech-Sanchez, Laso et Alberti, 2022), ir konstatēta diezgan līdzīga *Legionella* izplatība. *Legionella* prevalence dažādās valstīs un dažādos pētījumos var ievērojami atšķirties, tomēr ir diezgan grūti salīdzināt datus, jo bija būtiskas atšķirības paraugu ņemšanas plānos, kas aptvēra gan lielas monitoringa programmas, gan ērtuma izlases paraugu ņemšanai un arī mērķtiecīgas paraugu ņemšanas programmas, reaģējot uz leģionāru slimības uzliesmojumiem. Dažādās valstīs var būt atšķirīgas uzraudzības un kontroles prasības un nepieciešamās minimālās karstā ūdens temperatūras robežas. Turklāt Latvija atrodas mērenā klimata joslā atšķirībā no vairuma iepriekšējos pētījumos aplūkoto valstu, piemēram, Itālija, Spānija un Izraēla atrodas subtropu klimata joslā. Lai gan klimatiskie apstākļi var palielināt risku saslimt ar leģionāru slimību (De Giglio et al., 2019), novērotā *Legionella* izplatība Latvijā bija vairāk līdzīga *Legionella* prevalencei dienvidu valstīs, kas var liecināt, ka skaidru prasību trūkums attiecībā uz ūdens temperatūru ļauj leģionellām izplatīties ūdensapgādes sistēmās.

Jāatzīmē, ka pozitīvo paraugu īpatsvars viesnīcās ārpus Rīgas bija ievērojami lielāks (47 %), savukārt tikai 25,6 % paraugu no Rīgas viesnīcām bija pozitīvi. Rīgas pilsētā ūdensapgādei tiek izmantoti attīrīti virszemes ūdeņi, savukārt pazemes ūdeņi reģionos netiek papildus attīrīti. Līdz ar to var pieņemt, ka Rīgā ienākošais komunālais ūdens ir labāk dezinficēts. Taču, mūsdiā, galvenais iemesls zemākai *Legionella* prevalencei viesnīcās Rīgā varētu būt labāka apsaimniekošanas prakse un augstāki kvalitātes standarti, jo lielākā daļa galvaspilsētas viesnīcu pieder starptautiskām viesnīcu ķēdēm. No otras puses, reģionālās viesnīcas visbiežāk ir mazākas un mazāk noslogotas, kā rezultātā var rasties bieža ūdens stagnācija, kas veicina leģionellu vairošanos un persistenci.

Par 13 % biežāk ūdens piesārņojums ar leģionellām konstatēts to ēku paraugos, kurām iepriekš nav bijis saistību ar leģionāru slimības gadījumiem. Karstā ūdens vidējā temperatūra šādās ēkās bija par septiņiem grādiem zemāka (vidēji 45,8 °C) nekā ēkās, kurās iepriekš bijuši saslimšanas gadījumi (vidēji 52,1 °C). Pašlaik Latvijā netiek regulēta karstā ūdens temperatūra cirkulācijas laikā vai patēriņa vietās un pārvaldniekiem un namu apsaimniekotājiem ir pienākums nodrošināt tikai temperatūras atbilstību pie izejas no siltummaiņa, kas nedrīkst būt zemāka par 55 °C saskaņā ar Ministru kabineta noteikumiem (MK noteikumi Nr. 906). Ja ņem vērā ievērojamo ūdens cirkulācijas cauruļvadu kopējo garumu, temperatūras zudumus ūdens apgādes sistēmā no siltummaiņa līdz dušas galviņām, tad novērotā karstā ūdens temperatūra ūdens patēriņa vietās 45,8 °C ir likumsakarīga ēkās, kurās nav bijis leģionāru slimības gadījumu. Turpretim pēc leģionāru slimības gadījuma apsaimniekotājiem ir pienākums veikt dezinfekcijas procedūras, *Legionella* monitoringu un preventīvās darbības, lai gan trūkst regulēta periodiskuma un vadlīniju. Tāpēc ēkās, kurās iepriekš bijuši leģionāru slimības

gadījumi, apsaimniekotāji, iespējams, ir apzinīgāki, un pastiprinātās piesardzības dēļ šajās ēkās tika novērota augstāka karstā ūdens temperatūra un zemāka kultivējamo leģionellu prevalence.

Augsta leģionellu izplatība ūdenī Latvijā varētu būt saistīta ar neefektīvu ūdensapgādes sistēmas uzturēšanu, jo ūdens temperatūra ir viens no galvenajiem faktoriem leģionellu noturībai un izplatībai ēku ūdensapgādes sistēmās (Singh, 2022; Kruse, 2016). Mūsu pētījumā vidējā karstā ūdens temperatūra bija 47,8 °C, kas ir piemērota leģionellu dzīvotspējas uzturēšanai, un tikai 19,5 % karstā ūdens paraugu temperatūra bija virs 55 °C. Temperatūra 55 °C iepriekš tika identificēta kā robežpunkts, virs kura ir spēcīga negatīva leģionellu kolonizācijas tendence (Rasheduzzaman et al., 2020), kas būtu vēlamā minimālā temperatūra ūdens patēriņa vietā, lai izvairītos no leģionellu izplatīšanās (Lévesque et al., 2004; ESGLI, 2017). Zemajai temperatūrai ūdens apgādes sistēmās var būt vairāki skaidrojumi. Pirmkārt, tas attiecas uz kopējo ekonomisko situāciju un sabiedrības izpratni par enerģijas taupīšanu. Otrkārt, īpaši sabiedriskajās ēkās un viesnīcās, tas var būt saistīts ar personāla kompetences trūkumu, un, treškārt, lielā daļā veco ēku, kurās nav veikta pilnīga ūdensapgādes sistēmas renovācija, nav pieejami tehniskie risinājumi, kā paaugstināt temperatūru, jo vecās iekārtas nav piemērotas temperatūras uzturēšanai virs 55 °C. Tomēr temperatūras paaugstināšana vien nenodrošinās būtiskus uzlabojumus bez nepieciešamās sistēmas atjaunošanas un recirkulācijas (Gavalda et al., 2019).

Šajā pētījumā tika novērota cieša līdzība ar Ungārijā veikto pētījumu, kur laikā no 2006. līdz 2013. gadam kopumā tika ņemti 1809 ūdens paraugi 168 dažādās ēkās, un 60 % ēku bija kolonizējušas leģionellas, 46 % karstā ūdens paraugu bija *Legionella* pozitīvi (Barna et al., 2016). Arī galvenie iemesli augstajam piesārņojumam abās valstīs ir līdzīgi. Ungārijas autori min zemo karstā ūdens temperatūru un atbilstošas uzraudzības un riska pārvaldības trūkumu.

No visiem *Legionella* pozitīviem paraugiem *L. pneumophila* konstatēta 98 % gadījumu. Trijos gadījumos tā tika konstatēta kopkultūrā ar *L. anisa* un *L. rubrilucens*, šādi gadījumi aprakstīti arī iepriekšējos pētījumos (Papadakis et al., 2021; Domenech-Sanchez et al., 2022 (*Eurosurveillance*)), tomēr klasiskā kultivēšanas metode (EN ISO 11731:2017) nav izstrādāta ar mērķi atrast un identificēt visas leģionellu sugas paraugā, tāpēc jāņem vērā, ka citas *Legionella* sugas, kas nav *L. pneumophila*, bieži vien netiek identificētas.

Pētījumā tika identificētas sešas *L. pneumophila* serogrupas, no kurām dominēja SG 3 (43,2 %), SG 2 (36,5 %) un SG 1 (13,7 %). Šie rezultāti saskan ar šajā darbā aprakstītu zemo *Legionella* SG 1 antivielu izplatību veseliem donoriem Latvijā (0,2 %), kur dzīvošana daudzdzīvokļu mājā ar centralizētu karstā ūdens padevi tika konstatēta kā galvenais vides riska faktors, kas saistīts ar seropozitivitāti, un seroprevalence pret *L. pneumophila* SG 2–6 lielo pilsētu daudzdzīvokļu māju iedzīvotājiem sasniedza 9,5 %. Pasaulē *L. pneumophila* SG 1 tiek

uzskatīta par galveno leģionāru slimības izraisītāju (ECDC, 2022), un attiecīgi klīnisko gadījumu diagnostikas metodes ir pielāgotas pirmās serogrupas identificēšanai. Tāpēc īpaši jāatzīmē, ka pirmās izvēles tests joprojām ir urīna antigēna tests, kas ir specifisks tieši pirmās serogrupas *L. pneumophila* izraisītiem gadījumiem, un tikai 11 % leģionāru slimības gadījumu Eiropā ir apstiprināti ar metodēm, kas paredz kultūras izolēšanu (ECDC, 2022), tāpēc ir iespējams, ka leģionāru slimības gadījumi, kas saistīti ar citām serogrupām, joprojām ir nepietiekami diagnosticēti. Līdz 2022. gada beigām Latvijā leģionāru slimības klīnisko gadījumu identificēšana un apstiprināšana pārsvarā tika veikta, izmantojot urīna antigēna testu un ar kultivēšanu nesaistītas diagnostikas metodes, attiecīgi klīniskie izolāti vēl nav iegūti, un dati par klīnisko izolātu raksturojumu Latvijā nav pieejami. Līdz ar to varētu uzskatīt, ka patiesais leģionāru slimības gadījumu skaits Latvijā ir nepietiekami diagnosticēts un par maz ziņots. Ievērojams cēlonis ir gadījumi, kad mums izdevās vienlaikus ūdens paraugā atrast pie divām dažādām serogrupām piederošus *L. pneumophila* celmus. Inficēšanās laikā cilvēks vienlaikus var sastapties ar vairākiem leģionellu tipiem, kuriem turklāt teorētiski var būt dažādas imunoloģiskās un pretantibiotiku rezistences īpašības, tāpēc klīniskiem gadījumiem atbilstošu diagnostikas metožu izvēle var būt īpaši nozīmīga.

Brīvi dzīvojošo amēbu sastopamība bija ievērojami lielāka, vidēji 77,2 % paraugu saturēja vismaz vienu amēbu ģinti, un atkarībā no parauga veida brīvi dzīvojošo amēbu prevalence varēja sasniegt 95 %. Visbiežāk tika identificēta *Acanthamoeba* (54,5 % no visiem paraugiem) un *Vermamoeba* (28,7 %), kam sekoja *Vahlkampfia* amēbas, tomēr vairāk nekā 20 % paraugu tika identificēta vairāk nekā viena amēbu ģints vienlaikus, visbiežāk *Acanthamoeba* un *Vermamoeba* tika atrastas kopā. Līdzīgi rezultāti iegūti arī citos pētījumos, kur brīvi dzīvojošas amēbas tika konstatētas dzeramā ūdens un vides paraugos (Magnet et al., 2015; Pagnier et al., 2015; Javanmard et al., 2017; Dendana et al., 2018; Üstüntürk-Onan et al., 2018), bioplēvēs (Declerk et al., 2007; Hsu et al., 2011), rūpnieciskajos ūdeņos (Scheikl et al., 2014) un dzesēšanas torņos (Scheikl et al., 2016).

Pētījuma laikā ņemtajos paraugos *Legionella* vienmēr tika izolēta kopā ar brīvi dzīvojošām amēbām un nebija tādu paraugu, kas satur *Legionella*, ja netika atrastas amēbas. Leģionellu un amēbu vienlaikus sastopamība ūdens sistēmās var liecināt par paaugstinātu veselības apdraudējumu ūdensapgādes sistēmas proksimālajās zonās, kur parasti tiek novērota zemāka temperatūra (Cervero-Arago et al., 2014). Papildu *Legionella* aizsardzībai pret ārējās vides apstākļiem brīvi dzīvojošās amēbas spēj uzturēt dzīvotspējīgus, bet nekultivējamus celmus (Dietersdorfer et al., 2018) un nodrošināt ilgstošu *Legionella* persistenci un transmisiju (Denoncurt et al., 2014).

Patlaban Latvijā nepastāv regulējums par riska pārvaldības plānu ieviešanu un regulāru vides monitoringu attiecībā uz *Legionella* spp., un vairumā gadījumu ēku apsaimniekošanā *Legionella* risks netiek ņemts vērā. Tādējādi minimālās prasības karstā ūdens temperatūrai patēriņa vietās Latvijā nav reglamentētas. Daudzās valstīs ir pamatnostādnes un noteikumi leģionāru slimības profilaksei, tomēr *Legionella* kontroles regulējums dažādās valstīs ir atšķirīgs (Kenhove et al., 2019). Lielākā daļa vadlīniju un noteikumu ir vērstas uz *Legionella* kontroli, neņemot vērā brīvi dzīvojošo amēbu klātbūtni. Pašreizējā *Legionella* kontroles pieeja ietver *Legionella* spp. ar kultūrā balstītām metodēm un neļauj novērtēt reālo leģionelozes slogu un risku sabiedrības veselībai (Shaheen et al., 2019). Šajā pētījumā iegūtie dati var palīdzēt koncentrēties uz leģionellu un brīvi dzīvojošo amēbu plašo izplatību, ciešu mijiedarbību un ilgstošu noturību, kas var veicināt jaunu ūdens drošības pieeju izstrādi, ņemot vērā potenciāli jaunus mērķus, piemēram, dzīvotspējīgus, bet ne kultivējamus patogēnus un viensūņus.

*Legionella* riska pārvaldības pasākumu un kontroles procedūru trūkums var veicināt tālāku *Legionella* izplatību ūdens apgādes sistēmās un izraisīt periodiskus leģionelozes uzliesmojumus. Turklāt lielais ar leģionellām saistīto amēbu biežums liecina, ka tradicionālās uzraudzības metodes var nebūt pietiekamas leģionellu kontrolei. Papildu mērķtiecīgu brīvi dzīvojošo amēbu riska pārvaldības plānu izstrāde un ieviešana var būtiski uzlabot *Legionella* kontroles procedūras.

### **4.3. *L. pneumophila* ģenētiskā daudzveidība**

Mūsu pētījumā, veicot pilna genoma sekvencēšanu 137 *L. pneumophila* izolātiem, tika atklāta liela sekvenču tipu daudzveidība – kopumā 46 sekvenču tipi, no kuriem 14 ir tikai Latvijai raksturīgi tipi, turklāt tika identificētas desmit jaunas, iepriekš neaprakstītas sekvences, kurām vēl nav piešķirts sekvences tipa numurs. Sekvencē bāzētā tipēšana joprojām ir molekulārās mikrobioloģijas zelta standarts *Legionella* spp. celmu novērtēšanā – gan lai analizētu leģionelozes uzliesmojumus, gan lai identificētu jaunus infekcijas avotus, tādus kā gaisa mitrinātāji vai dārzkopības putekļi un mitra augsne. *Legionella* spp. plašā ģenētiskā daudzveidība ir aprakstīta arī iepriekš veiktos pētījumos, piemēram, Izraēlā veiktā pētījumā 78 izolātiem tika identificēti 27 dažādi sekvenču tipi (Yakunin et al., 2020), Slovēnijā 88 *L. pneumophila* izolāti sadalījās 33 sekvenču tipos (Keše et al., 2021), Kanādā 141 leģionāru slimības sporādiskais gadījums piederēja 57 dažādiem sekvenču tipiem (Levesque et al., 2016). Visos šajos pētījumos identificēti arī jauni sekvenču tipi. Jaunu tipu identifikācija liecina, ka *Legionella* spp. celmu ģenētiskā kompozīcija ir reģionā unikāla un var būtiski atšķirties no aprakstītajiem humānajiem un vides izolātiem citās valstīs (Jiang et al., 2021). Rekombinācija

un gēnu transfērs starp *Legionella* sugām un celmiem ir galvenais iemesls lielajai ģenētiskajai daudzveidībai (Herwaldt et al., 2018; Cazalet et al., 2004).

Pētījumā identificēti septiņi *L. pneumophila* klonālie kompleksi, kuru veidošanā nebija novērotas būtiskas ģeogrāfiskās sakarības vai saistība ar specifisku serogrupu. Tikai divi klonālie kompleksi CC IV un CC VII veidoti no vienu serogrupu – SG 1 – pārstāvošiem sekvenču tipiem, tomēr CC IV saturēja tikai izolātus no Rīgas, kamēr CC VII ir izolāti no Valmieras, Tukuma un Madonas. Līdzīgi novērojumi tika konstatēti arī citos pētījumos, kad no viena dzesēšanas torņa iegūtie *L. pneumophila* celmi iekļauti atšķirīgos klonālajos kompleksos (Nakanishi et al., 2019; Kozak-Muiznieks et al., 2014).

Viena no galvenajām SBT metodes priekšrocībām ir spēja salīdzināt *L. pneumophila* sekvenču tipus ar izolātiem citur pasaulē. Šajā pētījumā konstatēts, ka visplašāk pārstāvētie sekvenču tipi ir ST-338, ST-366 un ST-1104, kur katram tipam atrasti vismaz 10 *L. pneumophila* celmi, un vēl vismaz 17 Latvijā atrastie sekvenču tipi ir minēti citos pētījumos kā klīniskie izolāti sporādiskos gadījumos, uzliesmojumos un ar ceļošanu saistītos gadījumos dažādās pasaules valstīs (Vekens et al., 2012; Pancer K., 2013; Lévesque, et al., 2016; Kozak-Muiznieks et al., 2014; Keše et al., 2021; Sreenath et al., 2020), kas dod pamatu uzskatīt, ka Latvijā ūdensapgādes sistēmās persistējošie *L. pneumophila* celmi noteiktos apstākļos var radīt saslimšanas risku sabiedrībai.

SBT metode tiek izmantota ne tikai, lai novērtētu *Legionella* spp. ģenētisko daudzveidību, salīdzinātu klīniskos un vides izolātus, bet arī lai identificētu *L. pneumophila* populācijas klonālo ekspansiju un reģionālās īpatnības. Pasaulē gan starp klīniskajiem, gan starp vides izolātiem plaši pārstāvēts ir ST-1 (Amemura-Maekawa et al., 2010; Tijet et al., 2010; Guo et al., 2015; Mercante et al., 2018), tomēr mūsu pētījums parāda, ka Latvijā situācija būtiski atšķiras, jo no 137 vides *L. pneumophila* celmiem, kuriem noteikts sekvenču tips, ST-1 konstatēts tikai vienam. Pētnieki to skaidro ar reģionā lokāli ierobežotu sekvenču tipu ekspansiju (Kozak-Muiznieks et al., 2014). Piemēram, vairākās Eiropas valstīs – Beļģijā (Vekens et al., 2012), Lielbritānijā (Harrison et al., 2009), Francijā (Ginevra et al., 2008) un Nīderlandē (Den Boer et al., 2008) – dominē ST-47, turklāt ST-47 konstatēts ne tikai klīniskajos paraugos un ūdenī, bet arī augsnē (Schalk et al., 2014). Latvijā ST-47 nav atrasts, tomēr jāatzīmē, ka datu par Baltijas jūras reģionu ir maz, tuvākie pētījumi nāk no Polijas, kur arī ST-47 netiek minēts (Pancer K., 2013), kas var atbilst teorijai par lokāliem ģenētiskajiem variantiem. Būtisku pienesumu *L. pneumophila* izolātu ģenētiskās daudzveidības un epidemioloģiskajos pētījumos varētu sniegt no cilvēku bioloģiskā materiāla izolētu *Legionella* spp. celmu izpēte līdz ar vides izolātu datu izpēti, tomēr Latvijā klīnisko izolātu iegūšana līdz šim nav bijusi sekmīga un notiek paļaušanās uz urīna antigēna testu, kas ir

piemērots tikai SG 1 leģionellu ierosinātās leģionāru slimības diagnostikai (Phin et al., 2014). Arī citās valstīs urīna antigēna tests ir biežākā izvēle leģionāru slimības diagnostikai, pat uzliesmojumu gadījumos tikai dažiem pacientiem var tikt paņemti krēpu vai bronhoalveolāro noskalojumu paraugi uzskatīti par galveno leģionāru slimības ierosinātāju (Guyard et al., 2011).

Mūsu pētījumā, izmantojot cgMLST genotipu vizualizāciju, redzams, ka, salīdzinot ar SBT, tie izolāti, kas ar SBT parādās kā viens mezgls (*node*), cgMLST gadījumā tiek klasificēti kā atšķirīgi izolāti, piemēram, ST-728, ST-1104, ST-651, kas apstiprina teoriju, ka cgMLST tipēšanas metode, kas analizē 1519 lokusus, nodrošina daudz labāku izšķirtspēju *L. pneumophila* novērtēšanā nekā SBT shēma, kuras pamatā ir tikai septiņu lokusu alēļu profilu analīze (Moran-Gilad et al., 2015). Labākai metodes izšķirtspējai var būt īpaša nozīme epidemioloģiskajā izmeklēšanā, kad jāapstiprina saistība starp saslimšanas gadījumu un iespējamo infekcijas avotu (Wüthrich et al., 2019; van Belkum et al., 2007).

Zinātnieku grupa kopā ar ESGLI komandas biedriem pašlaik izstrādā jaunu tipēšanas shēmu, kas gan Covid-19 pandēmijas ietvaros ir aizkavējusies, bet paredzams, ka tiks izmantota cgMLST shēma ar aptuveni 50 gēniem. Tas piedāvās labāko kompromisu starp iegūstamās izšķirtspējas uzlabošanu un labas epidemioloģiskās atbilstības saglabāšanu. Tiek ierosināts, ka šādu shēmu varētu izmantot kā daļu no lielākas hierarhiskas shēmas, kas sastāvētu no 7 SBT gēniem un 50, 100, 500 gēnu un pilna pamata (*core*) gēnu komplekta (~ 1500). Izolātiem varētu piešķirt “tipu” katrā līmenī, ļaujot vajadzības gadījumā izmantot ārkārtīgi augsto pilna genoma sekvencēšanas piedāvāto izšķirtspēju (David et al., 2016). Vienlaikus tiek attīstītas NGS metodes, kas dod iespēju veikt augstas izšķirtspējas tipēšanu, izvairoties no baktēriju tīrkultūras iegūšanas fāzes, tādējādi nodrošinot epidemioloģisko izpēti arī gadījumos, kad izolāta iegūšana nav iespējama, piemēram, virulentu, bet nekultivējamu *Legionella* spp. infekciju gadījumos (Domazetovska et al., 2022).

#### **4.4. *L. pneumophila* virulences potenciāls**

Pētījuma laikā 137 *L. pneumophila* vides izolātiem tika identificēti 420 virulences gēni, no kuriem 260 gēni tika atrasti visos sekvencētajos *L. pneumophila* celmos. Ar baktērijas virsmas struktūrām saistītos virulences faktoros kodējošie gēni *enhC*, *htpB*, *omp28* un *mip* tika atklāti visos izolātos, kas liecina, ka visiem izolātiem ir iespējota adhēzija, piesaiste un iekļūšana saimniekšūnā. Lielākā gēnu grupa, kas kodē T4SS efektorus, bija pietiekami mainīga, tomēr mēs nekonstatējām nevienu *L. pneumophila* celmu, kurā šīs virulences gēnu saimes gēni

vispār nebūtu pārstāvēti. Plašais efektorus kodējošo gēnu klāsts liecina par augstu *L. pneumophila* genoma plastiskumu un efektoru dublēšanos, kas ir svarīga leģionellu iezīme (Best et Abu Kwaik, 2018). Labi izveidota dublēšanās ir SidE efektoru saimē, kur SidE efektoru saimes locekļi veic līdzīgas funkcijas attiecībā uz vienu un to pašu saimniekšūnas mērķi. SidE, SdeA, SdeB un SdeC katalizē saimniekproteīnu ubikvitināciju, un visu četru šo efektoru dzēšana kopā, bet ne atsevišķi pasliktina intracelulāro augšanu, ko var atjaunot, ievietojot tikai vienu no tiem (Ghosh et O'Connor, 2017).

Mūsu pētījumā *lvh* lokuss konstatēts visiem *L. pneumophila* izolātiem. *Icm/dot* gēni kodē IVB tipa sekrēcijas sistēmu un ir atbildīgi par intracelulāro replikāciju, savukārt *Legionella vir* homologs jeb *lvh* lokuss sagatavo proteīnus IVA tipa sekrēcijas sistēmai, kas veicina konjugāciju un virulenci, mijiedarbojoties ar Dot/Icm komponentiem (de Buck et al., 2007; Kozak et al., 2010). Pētījumā Grieķijā *lvh* lokuss konstatēts 93 % *L. pneumophila* SG2-14 celmiem (Katsiaflaka et al., 2016), līdzīgā pētījumā Austrālijā *lvh* saimes gēni SG1 *L. pneumophila* izolātiem konstatēti 57 % vides izolātu un 78 % klīnisko izolātu (Huang et al., 2006). Jāņem vērā, ka abos šajos pētījumos izmantotas atšķirīgas analīžu metodes un specifiski *lvh* lokusa gēni netika meklēti. Mūsdienās joprojām notiek jaunu gēnu funkciju izpēti un visas *lvh* lokusa gēnu grupas funkcijas vēl nav aprakstītas, tomēr ir pētījumu rezultāti, kas apstiprina, ka arī videi, kurā augušas leģionellas pirms saskares ar saimniekšūnu, ir nozīme. *lvh* lokusa gēns *lvhB2* ir cieši saistīts ar baktērijas spēju inficēt makrofāgus vai amēbas atkarībā no temperatūras, kādā *Legionella* augusi pirms kontakta. Gēnam *lvhB2* ir liela nozīme baktērijas spējā inficēt, ja baktērija pirms tam dzīvojusi zemākā temperatūrā (Ridenour et al., 2003).

Sākotnējās analīzes laikā tika novērota ievērojama atšķirība *rtxA* pozitīvo izolātu izplatībā, salīdzinot ar citiem pētījumiem. Pārbaudot genomus pret virulences faktoru datu bāzi, *rtxA* gēna trūka visos izolātos, un tas bija krasā pretrunā ar citiem pētījumiem (Sawczyn-Domanska, 2021; Sreenath, 2020; Zeng et al., 2019), kuros no 20,69 % līdz 100 % *L. pneumophila* izolātu bija *rtxA* pozitīvi. Tomēr, lai noteiktu *rtxA* gēna klātbūtni, visi šie pētījumi balstījās uz PĶR metodēm. Parasti izmantotie *rtx1/rtxA-rtx2/rtxA* un *rtx3/rtxA-rtx4/rtxA* praimeru ir izstrādāti, pamatojoties uz *L. pneumophila* celma AA100 DNS sekvenci (Samrakandi et al., 2002), un tie ir paredzēti tikai diviem aptuveni 540–630 bp gariem gēna fragmentiem. Ir zināms, ka pašam *rtxA* ir modulāra struktūra, un tam ir ļoti mainīgs garums un sekvenču līdzība starp dažādiem *L. pneumophila* celmiem (D'Auria et al., 2008). Tādējādi mēs izvirzījām hipotēzi, ka šo divu PĶR mērķa vietu trūkums ne vienmēr norāda uz visu iespējamo *rtxA* gēna variantu neesamību.



Lai pārbaudītu šo hipotēzi, tika simulēta PĶR *in silico*, izmantojot divus iepriekš minētos praimeru pārus un *L. pneumophila* references sekvences, kas tika izmantotas, lai raksturotu *rtxA* modulāro struktūru (D`Auria et al., 2008). Tikai AA100 celma sekvenca radīja abus *in silico* PĶR produktus, apstiprinot hipotēzi. Turklāt *rtxA* reference (YP\_123037), kas tika iekļauta attiecīgajā virulences faktoru datu bāzes redakcijā, arī neradīja nevienu no diviem paredzētajiem *in silico* PĶR produktiem. Tā kā *rtxA* sekvenca no celma AA100 bija īsākā no pieejamajām referencēm un tajā ir konservēti reģioni, kas atrodas *rtxA* sākumā un beigās, tā tika izmantota kā reference uz BLAST balstītam *rtxA* gēna skrīningam *L. pneumophila* genomos. Tādējādi var secināt, ka metode precīzai *rtxA* klātbūtnes noteikšanai ir rūpīgi jāizvērtē un jāņem vērā acīmredzami gan PĶR metožu, gan uz izlīdzināšanu bāzēto skaitļošanas metožu un references datu bāzu ierobežojumi.

Leģionāru slimību parasti ārstē ar makrolīdiem un/vai fluorhinoloniem. Lai gan pretantibiotiku rezistence *Legionella* infekciju gadījumā līdz šim nav radījusi nozīmīgas problēmas, pētījumi rāda, ka atsevišķu *L. pneumophila* celmu rezistence pret eritromicīnu, ciprofloksacīnu, rifampīnu un azitromicīnu (Jia et al., 2019) ir iespējama. Šajā pētījumā visos *L. pneumophila* izolātos tika konstatēts tikai viens aminoglikozīdu O-fosfotransferāzes *aph(9)*- la gēns, kas ir atbildīgs par rezistenci pret spektinomicīnu, tomēr šis rezultāts nav uzskatāms par nozīmīgu, jo leģionāru slimības ārstēšanai spektinomicīns tiek lietots ļoti reti (Svetlicic et al., 2023).

Augstā prevalence, liela ģenētiskā daudzveidība un plašais virulences gēnu klāsts, kas novērots visos Latvijas dzīvojamo ēku izolātos, liecina, ka visi leģionellu celmi, kas persistē ūdensapgādes sistēmās, ir uzskatāmi par potenciāli patogēniem. Turklāt gēnu pārkārtošanās un gēnu transfērs no dažādiem vides eikariotu saimniekiem ļauj neatkarīgi un paralēli parādīties jauniem patogēniem celmiem (David et al., 2016; Gomez-Valero et Buchrieser, 2019).

Virulences potenciāla novērtēšana tikai pēc noteiktus virulences faktorus kodējošo gēnu klātbūtnes nesniedz pilnīgu skaidrību, jo leģionellu genoms ir ļoti dinamisks – tajā ir liela mobilā daļa, kas galvenokārt sastāv no IV tipa sekrēcijas sistēmām (Gomez-Valero et al., 2014). Ciešā *Legionella* spp. saistība ar viensūņiem un makrofāgiem un līdzevolūcija ir radījusi molekulāru mijiedarbību starp patogēnu un saimnieku, piemēram, horizontālo gēnu pārnesi. Leģionellas ir ieguvušas eikariotiem līdzīgus proteīnus no visām dzīvo organismu grupām – augiem, dzīvniekiem, sēnēm un arhejiem – nepieredzēti lielā skaitā un lielā daudzveidībā (Gomez-Valero and Buchrieser, 2019), turklāt horizontālais gēnu transfērs notiek katru reizi, kad leģionellas nonāk saskarsmē ar citiem leģionellu celmiem, citām leģionellu sugām un citiem organismiem, un, lai arī pamata genoms paliek nemainīgs, virulences faktorus kodējošo gēnu apmaiņa novērota regulāri (de Felipe et al., 2005; Sandeep et al., 2016). Tieši tāpēc ir

novērojama tik liela leģionellu ģenētiskā daudzveidība, un laboratorijas apstākļos veiktie testi nevar nodrošināt tos pašus apstākļus, kādi tie bijuši baktērijām pirms plaušu makrofāgu inficēšanas, turklāt nav iespējams paredzēt, vai gēnu pārnese nav notikusi jau laboratorijā dažādos ar parauga bagātināšanu un koncentrāciju saistītos etapos. Tāpēc pat viena klastera ietvaros viena uzliesmojuma laikā var būt atšķirīgi klīniskie iznākumi, jo papildus pacienta imūnsistēmas stāvoklim arī patogēnu daudzveidībai var būt ietekme uz klīnisko iznākumu (McAdam et al., 2014).

Iepriekš publicētos pētījumos tika izvirzīta versija, ka tikai noteikta *Legionella* spp. vides izolātu kopa spēj izraisīt cilvēku slimības, ko apstiprināja arī salīdzinošās genomikas pētījumi, ka *L. pneumophila* klīniskie un vides izolāti ir ģenētiski atšķirīgi (Gomez-Valero et al., 2014), turklāt klīnisko izolātu vidū novērota daudz mazāka ģenētiskā daudzveidība, tomēr vairāki pētījumi rāda, ka cilvēku infekcija nav saistīta ar kādu īpaši virulentu celmu izplatību vidē un atsevišķu *L. pneumophila* celmu spēja izraisīt slimības, visticamāk, ir saistīta ar šo baktēriju spēju persistēt un attīstīties cilvēka radītā ūdens vidē, kas var kļūt par inficēšanās vietu (Sousa et al., 2018).

Mūsu pētījumā analizētajiem 137 *L. pneumophila* vides izolātiem ir konstatēta liela ģenētiskā daudzveidība un ievērojama būtisko virulences faktoru klātbūtne, kas apstiprina hipotēzi, ka cilvēka radītā ūdens vidē persistējošie *L. pneumophila* celmi neatkarīgi no to serogrupas, sekvenču tipa un virulences faktoru komplekta testēšanas brīdī ir jāuztver kā potenciāls infekcijas ierosinātājs un jāveic visi nepieciešami profilakses un kontroles pasākumi. Inficēšanās ar leģionellām notiek, ieelpojot baktērijas saturošu ūdens aerosolu, un baktēriju koncentrācijai var būt izšķiroša nozīme (Sousa et al., 2018), tieši tāpēc galvenais leģionāru slimības profilakses veids ir kontrolēt *Legionella* spp. augšanu ūdens inženiersistēmās, un visaptveroša, uz pierādījumiem balstīta *Legionella* spp. kontroles plāna izstrādāšana un ieviešana būtiski var samazināt leģionelozes risku.

## Secinājumi

1. Daudzdzīvokļu māju iedzīvotāji ir pakļauti lielākam leģionelozes riskam nekā privātmājās dzīvojošie (OR = 2,23; p = 0,011).
2. Augstākais seropozitivitātes risks ir to ēku iedzīvotājiem, kas centralizēti saņem karsto ūdeni (OR = 3,16; p = 0,001).
3. Augstā *Legionella* spp. prevalence ūdensapgādes sistēmās ir saistīta ar zemo karstā ūdens temperatūru (vid.  $47,8 \pm 0,7$  °C) un augsto brīvi dzīvojošo amēbu klātbūtni (84,2 %).
4. *L. pneumophila* vides izolātiem ir liela SBT un cgMLST sekvenču tipu daudzveidība un tiek novērotas reģionālās klonālās ekspansijas pazīmes ar mūsu reģionam raksturīgo dominējošo sekvenču tipu grupu ST-338, ST-366 un ST-1104.
5. Virulences gēnu relatīvais biežums liecina, ka *L. pneumophila* izolātiem piemīt augsts virulences potenciāls un plaša virulences faktoru klātbūtne.

## Priekšlikumi

- Ņemot vērā, ka lielo pilsētu daudzdzīvokļu ēku ar centralizēto karstā ūdens apgādi iedzīvotāji ir pakļauti ikdienas leģionelozes riskam, tieši šīm ēkām ir prioritāri nepieciešama visaptveroša, pierādījumos balstīta *Legionella* spp. kontroles plāna izstrādāšana un ieviešana.
- Pilnveidojot leģionelozes diagnostikas algoritmu, ir jāņem vērā lokālā *L. pneumophila* celmu izplatība un jāizmanto vismaz divas testēšanas metodes, kas ietver arī dažādu SG un genotipu identifikāciju, piemēram, PQR balstītās metodes un klasiskā kultivēšanas metode.
- Jāievieš cgMLST metode klīnisko un vides izolātu genotipēšanā, kas sniegs drošu un uzticamu epidemioloģiskās izmeklēšanas instrumentu.

## Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu

### Publikācijas starptautiski recenzējamos zinātniskajos izdevumos:

1. **Valciņa, O.**; Pūle, D.; Lucenko, I.; Krastiņa, D.; Šteingolde, Ž.; Krūmiņa, A.; Bērziņš, A. **2015**. *Legionella pneumophila* Seropositivity-Associated Factors in Latvian Blood Donors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13 (1), 58. <https://doi.org/10.3390/ijerph13010058>.
2. **Valciņa, O.**; Pūle, D.; Mališevs, A.; Trofimova, J.; Makarova, S.; Konvisers, G.; Bērziņš, A.; Krūmiņa, A. **2019**. A. Co-Occurrence of Free-Living Amoeba and *Legionella* in Drinking Water Supply Systems. *Medicina*, 55 (8), 492. <https://doi.org/10.3390/medicina55080492>.
3. **Valciņa, O.**; Pūle, D.; Ķibilds, J.; Lazdāne, A.; Trofimova, J.; Makarova, S.; Konvisers, G.; Ķimse, L.; Krūmiņa, A.; Bērziņš, A. **2023**. A. Prevalence and Genetic Diversity of *Legionella* spp. In Hotel Water-Supply Systems in Latvia. *Microorganisms*, 11 (3), 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030596>.
4. **Valciņa, O.**; Pūle, D.; Ķibilds, J.; Labecka, L.; Terentjeva, M.; Krūmiņa, A.; Bērziņš, A. **2023**. Evaluation of Genetic Diversity and Virulence Potential of *Legionella pneumophila* Isolated from Water Supply Systems of Residential Buildings in Latvia. *Pathogens*, 12 (7), 884. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070884>.

### Mutiski ziņojumi konferencēs:

1. **Valciņa, O.**, Pūle, D., Makarova, S., K., Bērziņš, A., Krūmiņa, A. 2013. *Legionella pneumophila* izplatība dzeramā ūdens apgādes sistēmā daudzdzīvokļu māsājniecībās Rīgā. RSU 2013. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija.
2. **Valciņa, O.**, Pūle, D., Mališevs, A., Trofimova, J., Staskevica, A., Makarova, S., Grantina-Ievina, L., Berzins, A.; Krumina, A. 2019. Diversity and factors associated with occurrence of *Legionella pneumophila* in drinking water supply systems. Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge For Use in Practice”, Riga, Latvia.

### Konferenču tēzes:

1. **Valciņa, O.**, Pūle, D., Makarova, S., Meistere, J., Bērziņš, A., Krūmiņa, A. 2014. Paraugu ņemšanas plāna nozīmīgums *Legionella pneumophila* kontrolei. // RSU 2014. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija.
2. **Valciņa, O.**, Krastiņa, D., Pūle, D., Bērziņš, A., Krūmiņa, A. **2015**. Seroprevalence of *Legionella* in blood donors and occurrence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in Riga. // RSU 2015. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija.
3. **Valciņa, O.**, Krastiņa, D., Pūle, D., Bērziņš, A., Krūmiņa, A. 2015. *Legionella pneumophila* seropositivity associated factors in Latvian blood donors. // 8<sup>th</sup> International Conference on Biodiversity Research, Daugavpils, Latvija.
4. Pūle, D., Mališevs, A., **Valciņa, O.** 2016. Development of Water Supply System Model for Artificial Contamination with *Legionella*: Preliminary Results. // 58<sup>th</sup> International Scientific Conference of Daugavpils University, Daugavpils, Latvija.
5. **Valciņa, O.**, Pūle, D., Mališevs, A., Trofimova, J., Makarova, S., Grantina-Ievina, L., Berzins, A.; Krumina, A. 2017. Co-occurrence of *Legionella* spp. and free living protozoja in drinking water supply systems in Latvia. // The 9<sup>th</sup> International Conference on Legionella, Rome, Italy.
6. **Valciņa, O.**, Staškeviča, A., Pūle, D., Bērziņš, A. 2018. Diversity of *Legionella* in hot water distribution systems in Latvian hotels. // ESCMID Study group for *Legionella* infections (ESGLI) Conference 2018, Lyon, France.

7. Püle, D., **Valçı̇na, O.** 2019. Formation of *Legionella* Containing Biofilm in Small-Scale Water Supply System Model. // ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI) Conference 2019, Athens, Greece.

## Literatūras saraksts

1. Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D., Guyard, C., 2013. Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 21660–21675. <https://doi.org/10.3390/ijms141121660>
2. Abu Khweek, Arwa, Amer, A.O., 2018. Factors mediating environmental biofilm formation by *Legionella pneumophila*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00038>
3. Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshvar, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M., Harrison, T.G., Weyant, R.S., Birtles, R.J., Raoult, D., Halablab, M.A., 2001. *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 1151–1160. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1151>
4. Allgaier, J., Lagu, T., Haessler, S., Imrey, P.B., Deshpande, A., Guo, N., Rothberg, M.B., 2021. Risk factors, management, and outcomes of *Legionella* pneumonia in a large, nationally representative sample. *Chest*. 159, 1782–1792. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.12.013>
5. Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Helbig, J.H., Chang, B., Kaneko, A., Watanabe, Y., Isobe, J., Nukina, M., Nakajima, H., Kawano, K., Tada, Y., Watanabe, H., 2010. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *Journal of Medical Microbiology*. 59, 653–659. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.017509-0>
6. Angelici, M.C., Walochnik, J., Calderaro, A., Lynora Saxinger, Dacks, J.B., 2021. Free-living amoebae and other neglected protistan pathogens: Health emergency signals? *European Journal of Protistology*. 77, 125760–125760. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2020.125760>
7. Bai, L., Yang, W., Li, Y., 2023. Clinical and Laboratory Diagnosis of *Legionella* Pneumonia. *Diagnostics*. 13, 280. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020280>
8. Barna, Z., Kádár, M., Kálmán, E., Scheirich Szax, Anita, Vargha, M., 2016. Prevalence of *Legionella* in premise plumbing in Hungary. *Water Research*. 90, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.004>
9. Bavari, S., Mirkalantari, S., Masjedian Jazi, F., Darban-Sarokhalil, D., Marani, G., 2022. Risk assessment and quantitative measurement along with monitoring of *Legionella* in hospital water sources. *New Microbes and New Infections*. 45, 100948. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100948>
10. Beauté, J., 2017. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Eurosurveillance*. 22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2017.22.27.30566>
11. Bellinger-Kawahara, C., Horwitz, M.A., 1990. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 172, 1201–1210. <https://doi.org/10.1084/jem.172.4.1201>
12. Berk, S.G., Faulkner, G., GarduñoE., Joy, M.C., Ortiz-Jimenez, M.A., GarduñoR.A., 2008. Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena* spp. Does not require bacterial replication and depends on a Dot/Icm-Mediated survival mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 2187–2199. <https://doi.org/10.1128/aem.01214-07>
13. Bešić, A., Karakaš, S., Obradović, Z., Mušović, A., Hrapović, E., 2021. Travel-related epidemiological studies of legionellosis in Federation of Bosnia and Herzegovina. *Health and Technology*. 11, 971–979. <https://doi.org/10.1007/s12553-021-00584-0>
14. Best, A., Abu Kwaik, Y., 2018. Evolution of the Arsenal of *Legionella pneumophila* Effectors To Modulate Protist Hosts. *mBio*. 9. <https://doi.org/10.1128/mbio.01313-18>

15. Bhogaraju, S., Bonn, F., Mukherjee, R., Adams, M., Pfliegerer, M.M., Galej, W.P., Matkovic, V., Lopez-Mosqueda, J., Kalayil, S., Shin, D., Dikic, I., 2019. Inhibition of bacterial ubiquitin ligases by SidJ–calmodulin catalysed glutamylation. *Nature*. 572, 382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1440-8>
16. Bichai, F., Payment, P., Barbeau, B., 2008. Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: a review. *Canadian Journal of Microbiology*. 54, 509–524. <https://doi.org/10.1139/w08-039>
17. Bigot, R., Bertaux, J., Frere, J., Berjeaud, J.-M., 2013. Intra-amoeba multiplication induces chemotaxis and biofilm colonization and formation for *Legionella*. *PLoS ONE*. 8, e77875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077875>
18. Boer, J.W.D., Nijhof, J., Friesema, I., 2006. Risk factors for sporadic community-acquired Legionnaires' disease. A 3-year national case–control study. *Public Health*. 120, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2006.03.009>
19. Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
20. Bollin, G.E., Plouffe, J.F., Para, M.F., Hackman, B., 1985. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Applied and Environmental Microbiology*. 50, 1128–1131. <https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1128-1131.1985>
21. Borella, P., Bargellini, A., Marchesi, I., Rovesti, S., Stancanelli, G., Scaltriti, S., Moro, M., Montagna, M.T., Tatò, D., Napoli, C., Triassi, M., Montegrosso, S., Pennino, F., Zotti, C.M., Ditommaso, S., Giacomuzzi, M., 2008. Prevalence of anti-legionella antibodies among Italian hospital workers. *Journal of Hospital Infection*. 69, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.03.004>
22. Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R.L., Rebelo, A.R., Florensa, A.F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J.K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B.B., Malhotra-Kumar, S., 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 75, 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
23. Brand A, Allen L, Altman M, Hlava M, Scott J. Beyond authorship: attribution, contribution, collaboration, and credit. *Learned Publishing*. 2015;28(2):151-155. doi:<https://doi.org/10.1087/20150211>
24. Caicedo, C., Rosenwinkel, K.-H. ., Exner, M., Verstraete, W., Suchenwirth, R., Hartemann, P., Nogueira, R., 2019. *Legionella* occurrence in municipal and industrial wastewater treatment plants and risks of reclaimed wastewater reuse: Review. *Water Research*. 149, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.080>
25. Carter, C., Corley, E.A., Canepa, H.M., Schmalzle, S.A., 2022. Legionnaires' disease presenting with exanthem; Case and review of previously published cases. *IDcases*. 27, e01376–e01376. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01376>
26. Cassini, A., Colzani, E., Pini, A., Mangen, M.-J.J., Plass, D., McDonald, S.A., Maringhini, G., Lier, van, Haagsma, J.A., Havelaar, A.H., Kramarz, P., Kretzschmar, M.E., 2018. Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013. *Eurosurveillance*. 23. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2018.23.16.17-00454>
27. Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, 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. <https://doi.org/10.1038/ng1447>



28. Cecchini, J., Tuffet, S., Sonnevile, R., Fartoukh, M., Mayaux, J., Roux, D., Kouatchet, A., Boissier, F., Tchir, M., Thyrault, M., Maury, E., Jochmans, S., Mekontso Dessap, A., Brun-Buisson, C., de Prost, N., 2017. Antimicrobial strategy for severe community-acquired legionnaires' disease: a multicentre retrospective observational study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72, 1502–1509. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx007>
29. SPKC, Centre of Disease Prevention and Control of Latvia, 2023. Epidemiological Reports | SPKC Epidemioloģijas biļeteni. <https://www.spkc.gov.lv/lv/epidemiologijas-biletteni> (accessed 04.02.2023).
30. Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A., Araujo, R.M., 2015. Effect of common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on free legionella and amoebae-associated legionella. *PLOS ONE*. 10, e0134726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134726>
31. Cervero-Aragó, S., Sommer, R., Araujo, R.M., 2014. Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free *Legionella* and *Legionella* associated with its amoebae hosts. *Water Research*. 67, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.023>
32. Chan, S., Pullerits, K., Keucken, A., Persson, K.M., Paul, C.J., Rådström, P., 2019. Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. *Biofilms and Microbiomes*. 5. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0082-9>
33. Chauhan, D., Shames, S.R., 2021. Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. *Virulence*. 12, 1122–1144. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1903199>
34. Christensen, L.M., Sule, P., Strain, M., Cirillo, J.D., 2019. *Legionella pneumophila* p45 element influences host cell entry and sensitivity to sodium. *PLOS ONE*. 14, e0218941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218941>
35. Cilloniz, C., Martin-Loeches, I., Garcia-Vidal, C., San Jose, A., Torres, A., 2016. Microbial Etiology of Pneumonia: Epidemiology, Diagnosis and Resistance Patterns. *International Journal of Molecular Sciences*. 17, 2120. <https://doi.org/10.3390/ijms17122120>
36. Cirillo, S.L.G., Bermudez, L.E., El-Etr, S.H., Duhamel, G.E., Cirillo, J.D., 2001. *Legionella pneumophila* Entry Gene *rtxA* Is Involved in Virulence. *Infection and Immunity*. 69, 508–517. <https://doi.org/10.1128/iai.69.1.508-517.2001>
37. Collins, S., Stevenson, D., Bennett, A., Walker, J., 2017. Occurrence of *Legionella* in UK household showers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 220, 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.12.001>
38. Cont, A., Rossy, T., Al-Mayyah, Z., Persat, A., 2020. Biofilms deform soft surfaces and disrupt epithelia. *eLife*. 9. <https://doi.org/10.7554/elife.56533>
39. Contributor Roles Taxonomy; CASRAI. <https://casrai.org/> (accessed 26.08.23).
40. Correia, A.M., Ferreira, J.S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., Gonçalves, J., Antunes, D.M., Almeida, S., Mendes, A., Guerreiro, M., Sampaio, D.A., Vieira, L., Machado, J., Simões, M.J., Gonçalves, P., Gomes, J.P., 2016. Probable person-to-person transmission of legionnaires' disease. *New England Journal of Medicine*. 374, 497–498. <https://doi.org/10.1056/nejmc1505356>
41. CSB, Oficiālās statistikas portāls, n.d. Iedzīvotāju skaits un raksturojošie rādītāji | Oficiālās statistikas portāls [WWW Document]. [stat.gov.lv](http://stat.gov.lv). URL <https://stat.gov.lv/lv/statistikas-temas/iedzivotaji/iedzivotaju-skaits> (accessed 06.02.23).
42. Cunha, B.A., Burillo, A., Bouza, E., 2016. Legionnaires' disease. *The Lancet*. 387, 376–385. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)60078-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)60078-2)
43. D'Auria, G., Jiménez, N., Peris-Bondia, F., Pelaz, C., Latorre, A., Moya, A., 2008. Virulence factor *rtx* in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. *BMC Genomics*. 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-14>

44. Daniau, C., Cabanes, P.-A., 2010. Seroprevalence survey of antibodies against *Legionella pneumophila* among exposed and nonexposed personnel at industrial sites. *Environnement, Risques & Santé*. 9, 209–216. <https://doi.org/10.1684/ers.2010.0350>
45. Darelid, J., Löfgren, S., Malmvall, B.-E., Olinder-Nielsen, A., Briheim, G., Hallander, H., 2003. *Legionella pneumophila* serogroup 1 antibody kinetics in patients with legionnaires' disease: Implications for serological diagnosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 35, 15–20. <https://doi.org/10.1080/0036554021000026998>
46. David, S., Mentasti, M., Tewolde, R., Aslett, M., Harris, S.R., Afshar, B., Underwood, A., Fry, N.K., Parkhill, J., Harrison, T.G., 2016. Evaluation of an Optimal Epidemiological Typing Scheme for *Legionella pneumophila* with Whole-Genome Sequence Data Using Validation Guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*. 54, 2135–2148. <https://doi.org/10.1128/JCM.00432-16>
47. De Buck, E., Anné, J., Lammertyn, E., 2007. The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology*. 153, 3948–3953. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012039-0>
48. De Felipe, K.S., Pampou, S., Jovanovic, O.S., Pericone, C.D., Ye, S.F., Kalachikov, S., Shuman, H.A., 2005. Evidence for Acquisition of *Legionella* Type IV Secretion Substrates via Interdomain Horizontal Gene Transfer. *Journal of Bacteriology*. 187, 7716–7726. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7716-7726.2005>
49. De Filippis, Patrizia, Mozzetti, C., Amicosante, M., D'Alò, Gian Loreto, Messina, A., Varrenti, D., Giammattei, R., Giorgio, D., Corradi, S., D'Auria, A., Fraietta, R., Gabrieli, R., 2017. Occurrence of *Legionella* in showers at recreational facilities. *Journal of Water and Health*. 15, 402–409. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.296>
50. Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., Ollevier, F., 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research*. 41, 3159–3167. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.011>
51. Den Boer, J.W., Bruin, J.P., Verhoef, L.P.B., Van der Zwaluw, K., Jansen, R., Yzerman, E.P.F., 2008. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002–2006. *Clinical Microbiology and Infection*. 14, 459–466. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01973.x>
52. Dendana, F., Trabelsi, H., Neji, S., Sellami, H., Kammoun, S., Makni, F., Feki, J., Cheikhrouhou, F., Ayadi, A., 2018. Prevalence of free living amoeba in the domestic waters reservoirs in Sfax, Tunisia. *Experimental Parasitology*. 193, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.007>
53. Dennis, P.J., Green, D., Jones, B.P.C., 1984. A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *Journal of Applied Bacteriology*. 56, 349–350. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01359.x>
54. Denoncourt, A.M., Paquet, V.E., Charette, S.J., 2014. Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00240>
55. Diederer, B.M.W., 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection*. 56, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.09.010>
56. Dietersdorfer, E., Kirschner, A., Schrammel, B., Ohradanova-Repic, A., Stockinger, H., Sommer, R., Walochnik, J., Cervero-Aragó, S., 2018. Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Research*. 141, 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.058>
57. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.011>
58. Domazetovska, A., Jensen, S.O., Gray, M., Radzieta, M., Maley, M., 2022. Culture-Free Phylogenetic Analysis of *Legionella pneumophila* Using Targeted CRISPR/Cas9 Next-Generation Sequencing. *Microbiology Spectrum*. 10. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00359-22>

59. Doménech-Sánchez, A., Laso, E., Albertí, S., 2022. Determination of *Legionella* spp. prevalence in Spanish hotels in five years. Are tourists really at risk? *Travel Medicine and Infectious Disease*. 46, 102269. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102269>
60. Doménech-Sánchez, A., Laso, E., Berrocal, C.I., Albertí, S., 2022. Environmental surveillance of *Legionella* in tourist facilities of the Balearic Islands, Spain, 2006 to 2010 and 2015 to 2018. *Eurosurveillance*. 27. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2022.27.21.2100769>
61. Dominguez, A., Alvarez, J., Sabria, M., Carmona, G., Torner, N., Oviedo, M., Cayla, J., Minguell, S., Barrabeig, I., Sala, M., Godoy, P., Camps, N., 2009. Factors influencing the case-fatality rate of Legionnaires' disease. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 13, 407–412.
62. Donohue, M.J., Mistry, J.H., Tucker, N., Vesper, S.J., 2022. Hot water plumbing in residences and office buildings have distinctive risk of *Legionella pneumophila* contamination. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 245, 114023. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114023>
63. Dunn, C.E., Rowlingson, B., Bhopal, R.S., Diggle, P., 2013. Meteorological conditions and incidence of Legionnaires' disease in Glasgow, Scotland: application of statistical modelling. *Epidemiology and Infection*. 141, 687–696. <https://doi.org/10.1017/s095026881200101x>
64. Dunne, M.W., Picot, N., van Belkum, A., 2017. Laboratory tests for legionnaire's disease. *Infectious Disease Clinics of North America*. 31, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.10.012>
65. ECDC, 2022. Legionnaires' disease – annual epidemiological report for 2020 [WWW Document]. European Centre for Disease Prevention and Control. URL <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2020> (accessed 21.12.2022).
66. Eisenreich, W., Heuner, K., 2016. The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS Letters*. 590, 3868–3886. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12326>
67. ESGLI, 2017. ESGLI European technical guidelines for the prevention, control and investigation of infections caused by *Legionella* species. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-technical-guidelines-prevention-control-and-investigation-infections> (accessed 21.12.2022).
68. Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2004. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*. 186, 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1518-1530.2004>
69. Feldman, C., Anderson, R., 2013. Cigarette smoking and mechanisms of susceptibility to infections of the respiratory tract and other organ systems. *The Journal of Infection*. 67, 169–184. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.05.004>
70. Felice, A., Franchi, M., De Martin, S., Vitacolonna, N., Iacumin, L., Civilini, M., 2019. Environmental surveillance and spatio-temporal analysis of *Legionella* spp. in a region of northeastern Italy (2002–2017). *PLOS ONE*. 14, e0218687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218687>
71. Fennelly, K.P., 2020. Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control. *The Lancet Respiratory Medicine*. 8, 914–924. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30323-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30323-4)
72. Finsel, I., Hilbi, H., 2015. Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: how to kill one bird with many stones. *Cellular Microbiology*. 17, 935–950. <https://doi.org/10.1111/cmi.12450>
73. Francisco, A.P., Bugalho, M., Ramirez, M., Carriço, J.A., 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*. 10, 152. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-152>

74. 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. *New England Journal of Medicine*. 297, 1189–1197. <https://doi.org/10.1056/nejm197712012972201>
75. Frostadottir, D., Wasserstrom, L., Lundén, K., Dahlin, L.B., 2023. *Legionella longbeachae* wound infection: case report and review of reported *Legionella* wound infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1178130>
76. Fry, N.K., Afshar, B., Bellamy, W., Underwood, A.P., Ratcliff, R.M., Harrison, T.G., 2007. Identification of *Legionella* spp. by 19 European reference laboratories: results of the European Working Group for *Legionella* Infections External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator gene and dedicated online tools. *Clinical Microbiology and Infection*. 13, 1119–1124. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01808.x>
77. Gaia, V., Fry, N.K., Afshar, B., Christian L.P., 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 Clinical Microbiology*. 43, 2047–2052. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.5.2047-2052.2005>
78. Gan, N., Nakayasu, E.S., Hollenbeck, P.J., Luo, Z.-Q., 2018. *Legionella pneumophila* inhibits immune signalling via MavC-mediated transglutaminase-induced ubiquitination of UBE2N. *Nature Microbiology*. 4, 134–143. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0282-8>
79. Garner, E., Brown, C.L., Schwake, D.O., Rhoads, W.J., Arango-Argoty, G., Zhang, L., Jospin, G., Coil, D.A., Eisen, J.A., Edwards, M.A., Pruden, A., 2019. Comparison of Whole-Genome Sequences of *Legionella pneumophila* in Tap Water and in Clinical Strains, Flint, Michigan, USA, 2016. *Emerging Infectious Diseases*. 25, 2013–2020. <https://doi.org/10.3201/eid2511.181032>
80. Gattuso, G., Rizzo, R., Lavoro, A., Spoto, V., Porciello, G., Montagnese, C., Cinà, D., Cosentino, A., Lombardo, C., Mezzatesta, M.L., Salmeri, M., 2022. Overview of the clinical and molecular features of *legionella pneumophila*: Focus on novel surveillance and diagnostic strategies. *Antibiotics*. (Basel, Switzerland) 11, 370. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030370>
81. Gavaldà, L., Garcia-Nuñez, M., Quero, S., Gutierrez-Milla, C., Sabrià, M., 2019. Role of hot water temperature and water system use on *Legionella* control in a tertiary hospital: An 8-year longitudinal study. *Water Research*. 149, 460–466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.032>
82. Gay, L., Melenotte, C., Lakbar, I., Mezouar, S., Devaux, C., Raoult, D., Bendiane, M.-K., Leone, M., Mège, J.-L., 2021. Sexual Dimorphism and Gender in Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*. 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.698121>
83. Ge, Z., Yuan, P., Chen, L., Chen, J., Shen, D., She, Z., Lu, Y., 2022. New Global Insights on the Regulation of the Biphasic Life Cycle and Virulence Via ClpP-Dependent Proteolysis in *Legionella pneumophila*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 21, 100233. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100233>
84. Ghosh, S., O'Connor, T.J., 2017. Beyond Paralogs: The Multiple Layers of Redundancy in Bacterial Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00467>
85. Giglio, D., Fasano, F., Diella, G., Lopuzzo, M., Napoli, C., Apollonio, F., Brigida, S., Calia, C., Campanale, C., Marzella, A., Pousis, C., Rutigliano, S., Triggiano, F., Caggiano, G., Montagna, M.T., 2019. *Legionella* and legionellosis in touristic-recreational facilities: Influence of climate factors and geostatistical analysis in Southern Italy (2001–2017). *Environmental Research*. 178, 108721. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108721>
86. Ginevra, C., Forey, F., Campèse, C., Reyrolle, M., Che, D., Etienne, J., Jarraud, S., 2008. Lorraine strain of *Legionella pneumophila* serogroup 1, France. *Emerging Infectious Diseases*. 14, 673–675. <https://doi.org/10.3201/eid1404.070961>

87. Girolamini, L., Salaris, S., Lizzadro, J., Mazzotta, M., Pascale, M.R., Pellati, T., Cristino, S., 2020. How molecular typing can support legionella environmental surveillance in hot water distribution systems: A hospital experience. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17, 8662. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228662>
88. Gleason, J.A., Cohn, P.D., 2022. A review of legionnaires' disease and public water systems – Scientific considerations, uncertainties and recommendations. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 240, 113906. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113906>
89. Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., Kassanoff, I., 1978. Pontiac Fever: An Epidemic of Unknown Etiology in a Health Department: Clinical and Epidemiologic Aspects. *American Journal of Epidemiology*. 107, 149–160. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112517>
90. Gomez-Valero, L., Buchrieser, C., 2019. Intracellular parasitism, the driving force of evolution of *Legionella pneumophila* and the genus *Legionella*. *Genes & Immunity*. 20, 394–402. <https://doi.org/10.1038/s41435-019-0074-z>
91. Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Rolando, M., Neou, M., Dervins-Ravault, D., Demirtas, J., Rouy, Z., Moore, R.J., Chen, H., Petty, N.K., Jarraud, S., Etienne, J., Steinert, M., Heuner, K., Gribaldo, S., Médigue, C., Glöckner, G., Hartland, E.L., Buchrieser, C., 2014. Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires disease. *Genome Biology*. 15, 505. <https://doi.org/10.1186/preaccept-1086350395137407>
92. Gordon, M., Yakunin, E., Valinsky, L., Chalifa-Caspi, V., Moran-Gilad, J., 2017. A bioinformatics tool for ensuring the backwards compatibility of *Legionella pneumophila* typing in the genomic era. *Clinical Microbiology and Infection*. 23, 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.002>
93. Graham, F.F., Finn, N., White, P., Hales, S., Baker, M.G., 2022. Global perspective of legionella infection in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 19, 1907. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031907>
94. Graham, F.F., Hales, S., White, P.S., Baker, M.G., 2020. Review Global seroprevalence of legionellosis – a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63740-y>
95. Greub, G., Raoult, D., 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*. 17, 413–433. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.413-433.2004>
96. Guo, J., Liang, T., Hu, C., Lv, R., Yang, X., Cui, Y., Song, Y., Yang, R., Zhu, Q., Song, Y., 2015. Sequence types diversity of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water sources in Guangzhou and Jiangmen, China. *Infection, Genetics and Evolution*. 29, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.023>
97. Guyard, C., Low, D.E., 2011. *Legionella* infections and travel associated legionellosis. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 9, 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.05.006>
98. Hamilton, K.A., Prussin, A.J., Ahmed, W., Haas, C.N., 2018. Outbreaks of Legionnaires' Disease and Pontiac Fever 2006–2017. *Current Environmental Health Reports*. 5, 263–271. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0201-4>
99. Harrison, T.G., Afshar, B., Doshi, N., Fry, N.K., Lee, J.V., 2009. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 28, 781–791. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0705-9>
100. Hawn, T.R., Verbon, A., Janer, M., P, Z.L., Beutler, B., Aderem, A., 2005. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102, 2487–2489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409831102>

101. Helbig, J.H., König, B., Knospe, H., Bubert, B., Yu, C., Lück, C.P., Riboldi-Tunncliffe, A., Hilgenfeld, R., Jacobs, E., Hacker, J., Fischer, G., 2003. The PPIase Active Site of *Legionella pneumophila* Mip Protein Is Involved in the Infection of Eukaryotic Host Cells. *Biological Chemistry*. 384. <https://doi.org/10.1515/bc.2003.013>
102. Herwaldt, L.A., Marra, A.R., 2018. *Legionella*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 31, 325–333. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000468>
103. Heuner, K., Steinert, M., 2003. The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *International Journal of Medical Microbiology*. 293, 133–143. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00259>
104. Hoffman, P.C., Garduno, R.A., 1999. Surface-Associated Heat Shock Proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: Roles in Pathogenesis and Immunity. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 7, 58–63. <https://doi.org/10.1155/s1064744999000125>
105. Hsu, B.-M., Huang, C.-C., Chen, J.-S., Chen, N.-H., Huang, J.-T., 2011. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Research*. 45, 5171–5183. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.019>
106. Huang, B., Yuan, Z., Heron, B.A., Gray, B.R., Eglezos, S., Bates, J.R., Savill, J., 2006. Distribution of 19 major virulence genes in *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and water in Queensland, Australia. *Journal of Medical Microbiology*. 55, 993–997. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46310-0>
107. Huang, Y., Ma, Y., Miao, Q., Pan, J., Hu, B., Gong, Y., Lin, Y.-W., 2019. Arthritis caused by *Legionella micdadei* and *Staphylococcus aureus*: metagenomic next-generation sequencing provides a rapid and accurate access to diagnosis and surveillance. *Annals of Translational Medicine*. 7, 589–589. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.09.81>
108. Iliadi, V., Staykova, J., Iliadis, S., Konstantinidou, I., Sivykh, P., Romanidou, G., Vardikov, D.F., Cassimos, D., Konstantinidis, T.G., 2022. *Legionella pneumophila*: The Journey from the Environment to the Blood. *Journal of Clinical Medicine*. 11, 6126. <https://doi.org/10.3390/jcm11206126>
109. ISO, International Organization for Standardization, n.d. ISO 19458:2006 Water quality – Sampling for microbiological analysis. ISO. URL <https://www.iso.org/standard/33845.html> (accessed 11.18.2020).
110. ISO, International Organization for Standardization, n.d. ISO 11731:2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*. ISO. URL <https://www.iso.org/standard/61782.html> (accessed 11.18.2020).
111. Janda, W.M., 2010. Amoeba-resistant bacteria: Their role in human infections. *Clinical Microbiology Newsletter*. 32, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2010.11.001>
112. Jasper, A.S., Musuuza, J.S., Tischendorf, J.S., Stevens, V.W., Gamage, S.D., Osman, F., Safdar, N., 2020. Are Fluoroquinolones or Macrolides Better for Treating *Legionella* Pneumonia? A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 72, 1979–1989. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa441>
113. Javanmard, E., Niyayati, M., Lorenzo-Morales, J., Lasjerdi, Z., Behniafar, H., Mirjalali, H., 2017. Molecular identification of waterborne free living amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Vermamoeba*) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran. *Experimental Parasitology*. 183, 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.016>
114. Jia, X., Ren, H., Nie, X., Li, Y., Li, J., Qin, T., 2019. Antibiotic Resistance and Azithromycin Resistance Mechanism of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63. <https://doi.org/10.1128/AAC.00768-19>

115. Jiang, L., Zhao, S., Cai, X., Mu, D., Zhang, X., Kang, J., Zhao, L., Chen, Y., 2021. Sequence-based typing of clinical and environmental *Legionella pneumophila* isolates in Shenyang, China. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* (English ed.). 39, 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2020.06.018>
116. Katsiaflaka, A., Pournaras, S., Kristo, I., Mouchtouri, V.A., Kyritsi, M., Velonakis, E., Vatopoulos, A.C., Hadjichristodoulou, C., 2016. Epidemiological Investigation of *Legionella pneumophila* Serogroup 2 to 14 Isolates from Water Samples by Amplified Fragment Length Polymorphism and Sequence-Based Typing and Detection of Virulence Traits. *Applied and Environmental Microbiology*. 82, 6102–6108. <https://doi.org/10.1128/aem.01672-16>
117. Kenhove, V., Dinne, K., Janssens, A., Laverge, J., 2019. Overview and comparison of *Legionella* regulations worldwide. *American Journal of Infection Control*. 47, 968–978. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.10.006>
118. Keše, D., Obreza, A., Rojko, T., Kišek, Tjaša Cerar, 2021. *Legionella pneumophila* – Epidemiology and characterization of clinical isolates, Slovenia, 2006–2020. *Diagnostics*. 11, 1201. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11071201>
119. Kessler, M.A., Osman, F., Marx, J., Pop-Vicas, A., Safdar, N., 2021. Hospital-acquired *Legionella* pneumonia outbreak at an academic medical center: Lessons learned. *American Journal of Infection Control*. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.02.013>
120. Kevorkyan, A., Tomova, I., Raycheva, R., Stoeva, V., Stoilova, Y., Lalabonova, H., Kondeva, V., 2017. *Legionella pneumophila* antibodies in serum samples from medical and dental personnel: a seroepidemiological survey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 31, 588–593. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1290549>
121. Kim, H., Kubori, T., Yamazaki, K., Kwak, M.-J., Park, S.-Y., Nagai, H., Vogel, J.P., Oh, B.-H., 2020. Structural basis for effector protein recognition by the Dot/Icm Type IVB coupling protein complex. *Nature Communications*. 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16397-0>
122. Kozak, N.A., Buss, M., Lucas, C.E., Frace, M., Govil, D., Travis, T., Olsen-Rasmussen, M., Benson, R.F., Fields, B.S., 2010. Virulence Factors Encoded by *Legionella longbeachae* Identified on the Basis of the Genome Sequence Analysis of Clinical Isolate D-4968. *Journal of Bacteriology*. 192, 1030–1044. <https://doi.org/10.1128/jb.01272-09>
123. Kozak-Muiznieks, N.A., 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, 201–211. <https://doi.org/10.1128/jcm.01973-13>
124. Kruse, E.-B., Wehner, A., Wisplinghoff, H., 2016. Prevalence and distribution of *Legionella* spp in potable water systems in Germany, risk factors associated with contamination, and effectiveness of thermal disinfection. *American Journal of Infection Control*. 44, 470–474. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.10.025>
125. Kuris, A.M., Lafferty, K.D., Sokolow, S.H., 2014. Saprosonis: a distinctive type of infectious agent. *Trends in Parasitology*. 30, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.06.006>
126. Kuroki, T., Watanabe, Y., Teranishi, H., Izumyama, S., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., 2017. *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in Japanese households. *Epidemiology and Infection*. 145, 1398–1408. <https://doi.org/10.1017/s0950268817000036>
127. Le Calvez, T., Trouilhé, M.-C., Humeau, P., Moletta-Denat, M., Frère, J., Héchard, Y., 2012. Detection of free-living amoebae by using multiplex quantitative PCR. *Molecular and Cellular Probes*. 26, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2012.03.003>
128. Leopold, S.R., Goering, R.V., Witten, A., Harmsen, D., Mellmann, A., 2014. Bacterial Whole-Genome Sequencing Revisited: Portable, Scalable, and Standardized Analysis for Typing and Detection of Virulence and Antibiotic Resistance Genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 52, 2365–2370. <https://doi.org/10.1128/jcm.00262-14>

129. Lévesque, B., Lavoie, M., Joly, J., 2004. Residential water heater temperature: 49 or 60 degrees celsius? *Canadian Journal of Infectious Diseases*. 15, 11–12. <https://doi.org/10.1155/2004/109051>
130. Lévesque, S., Lalancette, C., Bernard, K., Pacheco, A.L., Dion, R., Longtin, J. and Tremblay, C. 2016. Molecular Typing of *Legionella pneumophila* Isolates in the Province of Quebec from 2005 to 2015. *PLOS ONE*. 11 (10): e0163818.
131. Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., Yang, J., 2022. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*. 50, D912–D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
132. Liu, M., Conover, G.M., Isberg, R.R., 2008. *Legionella pneumophila* *EnhC* is required for efficient replication in tumour necrosis factor  $\alpha$ -stimulated macrophages. *Cellular Microbiology*. 10, 1906–1923. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01180.x>
133. Lockwood, D.C., Amin, H., Costa, T.R.D., Schroeder, G.N., 2022. The *Legionella pneumophila* Dot/Icm type IV secretion system and its effectors. *Microbiology*. 168. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001187>
134. Losick, V.P., Haenssler, E., Moy, M.-Y., Isberg, R.R., 2010. LnaB: a *Legionella pneumophila* activator of NF- $\kappa$ B. *Cellular Microbiology*. 12, 1083–1097. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01452.x>
135. Lupia, T., Corcione, S., Shbaklo, N., Rizzello, B., De Benedetto, I., Concialdi, E., Navazio, A.S., Penna, M., Brusa, M.T., De Rosa, F.G., 2023. *Legionella pneumophila* Infections during a 7-Year Retrospective Analysis (2016–2022): Epidemiological, Clinical Features and Outcomes in Patients with Legionnaires' Disease. *Microorganisms*. 11, 498. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020498>
136. Magnet, A., Peralta, R.H.S., Gomes, T.S., Izquierdo, F., Fernandez-Vadillo, C., Galvan, A.L., Pozuelo, M.J., Pelaz, C., Fenoy, S., Águila, D., 2015. Vectorial role of *Acanthamoeba* in *Legionella* propagation in water for human use. *Science of The Total Environment*. 505, 889–895. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.064>
137. Makris, K.C., Andra, S.S., Botsaris, G., 2014. Pipe Scales and Biofilms in Drinking-Water Distribution Systems: Undermining Finished Water Quality. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 44, 1477–1523. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.790746>
138. McAdam, P.R., Vander Broek, C.W., Lindsay, D.S., Ward, M.J., Hanson, M.F., Gillies, M., Watson, M., Stevens, J.M., Edwards, G.F., Fitzgerald, J.R., 2014. Gene flow in environmental *Legionella pneumophila* leads to genetic and pathogenic heterogeneity within a Legionnaires' disease outbreak. *Genome Biology*. 15. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0504-1>
139. McDADDE, J.E., 1979. Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Annals of Internal Medicine*. 90, 659. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-90-4-659>
140. 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-acetylneuraminyl transferase gene. *Clinical Microbiology and Infection*. 20, O435–O441. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12459>
141. Mercante, J.W., Caravas, J.A., Ishaq, M.K., Kozak-Muiznieks, N.A., Raphael, B.H., Winchell, J.M., 2018. Genomic heterogeneity differentiates clinical and environmental subgroups of *Legionella pneumophila* sequence type 1. *PLOS ONE*. 13, e0206110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206110>
142. Mikulska, M., Tridello, G., Hoek, J., Gil, L., Yáñez, L., Labussière-Wallet, H., Passweg, J., Xhaard, A., Pioltelli, P., Caillot, D., Michel, G., Veelken, H., Blaise, D., Bruno, B., Botella Garcia, C., Itälä-Remes, M., Crawley, C., Bourhis, J.-H., Kaare, A., Arcese, W., 2021. Legionellosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Nature. Bone Marrow Transplant*. 56. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01333-7>



143. Misch, E.A., Verbon, A., Prins, J.M., Skerrett, S.J., Hawn, T.R., 2013. A TLR6 polymorphism is associated with increased risk of Legionnaires' disease. *Genes & Immunity*. 14, 420–426. <https://doi.org/10.1038/gene.2013.34>
144. MK, Ministru kabinets, 2010. MK Nr. 906, 2010.28.09. Dzīvojamās mājas sanitārās apkopes noteikumi. LIKUMI.LV. URL <https://likumi.lv/ta/id/218830-dzivojamas-majas-sanitaras-apkopes-noteikumi> (accessed 05.05.2023).
145. Molina, J.J., Bennassar, M., Palacio, E., Crespi, S., 2022. Low Efficacy of Periodical Thermal Shock for Long-Term Control of Legionella spp. in Hot Water System of Hotels. *Pathogens*. 11, 152. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020152>
146. Mondino, S., Schmidt, S., Rolando, M., Escoll, P., Gomez-Valero, L., Buchrieser, C., 2020. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 15, 439–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032742>
147. Moran-Gilad, J., Prior, K., Yakunin, E., G, H.T., Underwood, A., Lazarovitch, T., Valinsky, L., Lück, C., Krux, F., Agmon, V., Grotto, I., Harmsen, D., 2015. Design and application of a core genome multilocus sequence typing scheme for investigation of Legionnaires' disease incidents. *Eurosurveillance*. 20. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.28.21186>
148. Mraz, A.L., Weir, M.H., 2022. Knowledge to predict pathogens: *Legionella pneumophila* lifecycle systematic review part II growth within and egress from a host cell. *Microorganisms*. 10, 141. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010141>
149. Mukherjee, S., Huda, S., Sinha Babu, S.P., 2019. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scandinavian Journal of Immunology*. 90. <https://doi.org/10.1111/sji.12771>
150. Nakanishi, N., Nomoto, R., Tanaka, S., Arikawa, K., Iwamoto, T., 2019. Analysis of Genetic Characterization and Clonality of *Legionella pneumophila* Isolated from Cooling Towers in Japan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16, 1664. <https://doi.org/10.3390/ijerph16091664>
151. Nascimento, M., Sousa, A., Ramirez, M., Francisco, A.P., Carriço, J.A., Vaz, C., 2016. PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics*. 33, 128–129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw582>
152. Nisar, M.A., Ross, K.E., Brown, M.H., Bentham, R., Hinds, J., Whiley, H., 2022. Molecular screening and characterization of *Legionella pneumophila* associated free-living amoebae in domestic and hospital water systems. *Water Research*. 226, 119238. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119238>
153. Nisar, M.A., Ross, K.E., Brown, M.H., Bentham, R., Whiley, H., 2020. Water Stagnation and Flow Obstruction Reduces the Quality of Potable Water and Increases the Risk of Legionellosis. *Frontiers in Environmental Science*. 8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.611611>
154. Oliva, G., Sahr, T., Buchrieser, C., 2018. The life cycle of *L. pneumophila*: Cellular differentiation is linked to virulence and metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00003>
155. Pagnier, I., Valles, C., Raoult, D., Scola, L., 2015. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microbial Pathogenesis*. 80, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.02.006>
156. Pancer, K., 2013. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water distribution systems as a complementary element of risk assessment of legionellosis in Poland. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*. 20, 436–440.
157. Papadakis, A., Keramarou, M., Chochlakis, D., Sandalakis, V., Mouchtouri, Varvara, A., Psaroulaki, A., 2021. *Legionella* spp. Colonization in water systems of hotels linked with travel-associated legionnaires' disease. *Water*. 13, 2243. <https://doi.org/10.3390/w13162243>

158. Papagianeli, S.D., Aspidou, Z., Didos, S., Chochlakis, D., Psaroulaki, A., Koutsoumanis, K., 2021. Dynamic modelling of *Legionella pneumophila* thermal inactivation in water. *Water Research*. 190, 116743. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116743>
159. Paranjape, K., Bédard, É., Whyte, L.G., Ronholm, J., Prévost, M., Faucher, S.P., 2020. Presence of *Legionella* spp. in cooling towers: the role of microbial diversity, *Pseudomonas*, and continuous chlorine application. *Water Research*. 169, 115252. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115252>
160. Patini, R., Mangino, G., Martellacci, L., Quaranta, G., Masucci, L., Gallenzi, P., 2020. The effect of different antibiotic regimens on bacterial resistance: A systematic review. *Antibiotics*. 9, 22. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010022>
161. Pena, R.T., Blasco, L., Ambroa, A., González-Pedrajo, B., Fernández-García, L., López, M., Bleriot, I., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T.K., Tomás, M., 2019. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Frontiers in Microbiology*. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01100>
162. Petti, S., Vitali, M., 2017. Occupational risk for *Legionella* infection among dental healthcare workers: meta-analysis in occupational epidemiology. *BMJ Open*. 7, e015374. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-015374>
163. 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. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(14\)70713-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(14)70713-3)
164. Pierre, D.M., Baron, J., Yu, V.L., Stout, J.E., 2017. Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 16. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0229-6>
165. Pike, C.M., Boyer-Andersen, R., Kinch, L.N., Caplan, J.L., Neunuebel, M.R., 2019. The *Legionella* effector RavD binds phosphatidylinositol-3-phosphate and helps suppress endolysosomal maturation of the *Legionella*-containing vacuole. *Journal of Biological Chemistry*. 294, 6405–6415. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.007086>
166. Pletz, M.W., Ewig, S., Welte, T., 2019. PCR-based routine diagnostics uncover hidden burden of Legionnaires' disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 19, 681–683. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(19\)30171-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30171-9)
167. Poirier, R., Rodrigue, J., Villeneuve, J., Lacasse, Y., 2017. Early Radiographic and Tomographic Manifestations of Legionnaires' Disease. *Canadian Association of Radiologists Journal*. 68, 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.carj.2016.10.005>
168. Poudroux, C., Ginevra, C., Descours, G., Ranc, A.-G., Beraud, L., Boisset, S., Magand, N., Conrad, A., Bergeron-Lafaurie, A., Jarraud, S., Ader, F., 2020. Slowly or Nonresolving Legionnaires' Disease: Case Series and Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*. 70, 1933–1940. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz538>
169. Priest, P.C., Slow, S., Chambers, S.T., Cameron, C.M., Balm, M.N., Beale, M.W., Blackmore, T.K., Burns, A.D., Drinković, D., Elvy, J.A., Everts, R.J., Hammer, D.A., Huggan, P.J., Mansell, C.J., Raeder, V.M., Roberts, S.A., Robinson, M.C., Sathyendran, V., Taylor, S.L., Thompson, A.W., 2019. The burden of Legionnaires' disease in New Zealand (LegiNZ): a national surveillance study. *The Lancet Infectious Diseases*. 19, 770–777. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(19\)30113-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30113-6)
170. Principe, L., Tomao, P., Visca, P., 2017. Legionellosis in the occupational setting. *Environmental Research*. 152, 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.018>
171. Prjibelski, Andrey D, Puglia, G.D., Antipov, D., Bushmanova, E., Giordano, D., Mikheenko, A., Vitale, D., Lapidus, A., 2020. Extending rnaSPAdes functionality for hybrid transcriptome assembly. *BMC Bioinformatics*. 21. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03614-2>
172. Qiu, J., Sheedlo, M.J., Yu, K., Tan, Y., Nakayasu, E.S., Das, C., Liu, X., Luo, Z.-Q., 2016. Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors. *Nature*. 533, 120–124. <https://doi.org/10.1038/nature17657>

173. Rasheduzzaman M, Singh R, Haas CN, Gurian PL., 2020. Required water temperature in hotel plumbing to control *Legionella* growth. *Water Research*. 182:115943. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115943>.
174. Ridenour, D.A., Cirillo, S.L.G., Feng, S., Samrakandi, M.M., Cirillo, J.D., 2003. Identification of a Gene That Affects the Efficiency of Host Cell Infection by *Legionella pneumophila* in a Temperature-Dependent Fashion. *Infection and Immunity*. 71, 6256–6263. <https://doi.org/10.1128/iai.71.11.6256-6263.2003>
175. Rossier, O., R, Starkenburg S, P, Cianciotto N, 2003. *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of legionnaires' disease pneumonia. *Infection and Immunity*. 72, 310–321. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.310-321.2004>
176. Roussotte, M., Massy, E., 2022. Case report of arthritis caused by *Legionella anisa* and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*. 22. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07475-3>
177. Rozentale, B., Bormane, A., Perevoščikovs, J., Lucenko, I., Brila, A., 2011. Increase of cases of legionellosis in Latvia, 2011. *Eurosurveillance*. 16. <https://doi.org/10.2807/ese.16.45.20009-en>
178. Rudbeck, M., Mølbak, K., Uldum, S., 2007. High prevalence of antibodies to *Legionella* spp. in Danish blood donors. A study in areas with high and average incidence of Legionnaires' disease. *Epidemiology and Infection*. 136, 257–262. <https://doi.org/10.1017/s0950268807008606>
179. Sadosky, A.B., Wilson, J.V., Steinman, H.M., Shuman, H.A., 1994. The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *Journal of Bacteriology*. 176, 3790–3799. <https://doi.org/10.1128/jb.176.12.3790-3799.1994>
180. Samrakandi, M.M., Cirillo, S.L.G., Ridenour, D.A., Bermudez, L.E., Cirillo, J.D., 2002. Genetic and Phenotypic Differences between *Legionella pneumophila* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 1352–1362. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1352-1362.2002>
181. Sandeep, J., Cox, D., Wolff, B., Morrison, S.S., Kozak-Muiznieks, N.A., Frace, M., Didelot, X., Castillo-Ramirez, S., Winchell, J., Read, T.D., Dean, D., 2016. Dynamics of genome change among *Legionella* species. *Scientific Reports*. 6. <https://doi.org/10.1038/srep33442>
182. Santajit, S., Seesuy, W., Mahasongkram, K., Sookrung, N., Pumirat, P., Ampawong, S., Reamtong, O., Chongsa-Nguan, M., Chaicumpa, W., Indrawattana, N., 2020. Human single-chain variable fragments neutralize *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule, 3O-C12-HSL, and prevent cells from the HSL-mediated apoptosis. *Frontiers in Microbiology*. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01172>
183. Saraya, T., Nunokawa, H., Ohkuma, K., Watanabe, T., Sada, M., Inoue, M., Honda, K., Oda, M., Ogawa, Y., Tamura, M., Yokoyama, T., Kurai, D., Kimura, H., Ishii, H., Goto, H., Takizawa, H., 2018. A Novel Diagnostic Scoring System to Differentiate between *Legionella pneumophila* Pneumonia and *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia. *Internal Medicine*. 57, 2479–2487. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.0491-17>
184. Sawczyn-Domańska, A., 2021. Detection of *Legionella* spp. and occurrence of virulence genes: *lvh*, *rtxA* and *enhC* in water samples from artificial water systems. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 28, 617–620. <https://doi.org/10.26444/aaem/143745>
185. Schalk, J.A.C., Euser, S.M., van Heijnsbergen, E., Bruin, J.P., den Boer, J.W., de Roda Husman, A.M., 2014. Soil as a source of *Legionella pneumophila* sequence type 47. *International Journal of Infectious Diseases*. 27, 18–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.009>
186. Scheikl, U., Sommer, R., Kirschner, A., Rameder, A., Schrammel, B., Zweimüller, I., Wesner, W., Hinker, M., Walochnik, J., 2014. Free-living amoebae (FLA) co-occurring with legionellae in industrial waters. *European Journal of Protistology*. 50, 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2014.04.002>
187. Scheikl, U., Tsao, H.-F., Horn, M., Indra, A., Walochnik, J., 2016. Free-living amoebae and their associated bacteria in Austrian cooling towers: a 1-year routine screening. *Parasitology Research*. 115, 3365–3374. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5097-z>

188. Scheithauer, L., Karagöz, M.S., Mayer, B.E., Steinert, M., 2023. Protein sociology of ProA, Mip and other secreted virulence factors at the *Legionella pneumophila* surface. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1140688>
189. Schroeder, M.J., Booton, C.G., Hay, J., Niszl, I., Seal, V.D., Markus, B.M., Fuerst, A.P., Byers, J.T., 2001. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 1903–1911. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.5.1903-1911.2001>
190. Segal, G., Russo, J.J., Shuman, H.A., 1999. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*. 34, 799–809. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01642.x>
191. Shaheen, M., Scott, C., Ashbolt, N.J., 2019. Long-term persistence of infectious *Legionella* with free-living amoebae in drinking water biofilms. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 222, 678–686. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.04.007>
192. Shen, Y., Xu, J., Zhi, S., Wu, W., Chen, Y., Zhang, Q., Zhou, Y., Deng, Z., Li, W., 2022. MIP From *Legionella pneumophila* Influences the Phagocytosis and Chemotaxis of RAW264.7 Macrophages by Regulating the lncRNA GAS5/miR-21/SOCS6 Axis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.810865>
193. Silva, M., Machado, M.P., Silva, D.N., Rossi, M., Moran-Gilad, J., Santos, S., Ramirez, M., Carriço, João André, 2018. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microbial Genomics*. 4. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000166>
194. Singh, R., Chauhan, D., Fogarty, A., Rasheduzzaman, M., Gurian, P.L., 2022. Practitioners' Perspective on the Prevalent Water Quality Management Practices for *Legionella* Control in Large Buildings in the United States. *Water*. 14, 663. <https://doi.org/10.3390/w14040663>
195. Slater, G., Birney, E., 2005. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics*. 6, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-31>
196. Smirnov, A., Brown, S., 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*. 3, 148–190.
197. Smirnov, A.V., 1999. An illustrated survey of gymnamoebae isolated from anaerobic sediments of the Niva bay (*Rhizopoda*, *Lobosea*). *Ophelia*. 50, 113–148. <https://doi.org/10.1080/00785326.1999.10409392>
198. Snelling, W.J., Moore, J.E., McKenna, J.P., Lecky, D.M., Dooley, J.S.G., 2006. Bacterial–protozoa interactions; an update on the role these phenomena play towards human illness. *Microbes and Infection* 8, 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.09.001>
199. Solgi, R., Niyiyati, M., Haghighi, A., Mojarad, E.N., 2012. Occurrence of Thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria* spp. in Hot Springs of Ardebil Province, Northwest Iran. *Iranian journal of parasitology*. 7, 47–52.
200. Sousa, P.S., Silva, I.N., Moreira, L.M., Veríssimo, A., Costa, J., 2018. Differences in Virulence Between *Legionella pneumophila* Isolates From Human and Non-human Sources Determined in *Galleria mellonella* Infection Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00097>
201. Spolarics, Z., Peña, G., Qin, Y., Donnelly, R.J., Livingston, D.H., 2017. Inherent X-Linked Genetic Variability and Cellular Mosaicism Unique to Females Contribute to Sex-Related Differences in the Innate Immune Response. *Frontiers in Immunology*. 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01455>
202. Sreenath, K., Chaudhry, R., Vinayaraj, E.V., Dey, A.B., Kabra, S.K., Thakur, B., Guleria, R., 2020. Distribution of Virulence Genes and Sequence-Based Types Among *Legionella pneumophila* Isolated From the Water Systems of a Tertiary Care Hospital in India. *Frontiers in Public Health*. 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.596463>

203. Sun, S., Noorian, P., McDougald, D., 2018. Dual role of mechanisms involved in resistance to predation by protozoa and virulence to humans. *Frontiers in Microbiology*. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01017>
204. Svetlicic, E., Jaén-Luchoro, D., Klobucar, R.S., Jers, C., Kazazic, S., Franjevic, D., Klobucar, G., Shelton, B.G., Mijakovic, I., 2023. Genomic characterization and assessment of pathogenic potential of *Legionella* spp. isolates from environmental monitoring. *Frontiers in Microbiology*. 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1091964>
205. Swanson, S.M., Hammer, K.B., 2000. *Legionella pneumophila* Pathogenesis: A fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology*. 54, 567–613. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.567>
206. Talapko, J., Frauenheim, E., Juzbašić, M., Tomas, M., Matic, S., Jukić, M., Samardžić, M., Škrlec, I., 2022. *Legionella pneumophila*—Virulence factors and the possibility of infection in dental practice. *Microorganisms*. 10, 255. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020255>
207. Talapko, J., Škrlec, I., 2020. The principles, mechanisms, and benefits of unconventional agents in the treatment of biofilm infection. *Pharmaceuticals*. 13, 299. <https://doi.org/10.3390/ph13100299>
208. Thomas, J.M., Ashbolt, N.J., 2011. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environmental Science & Technology*. 45, 860–869. <https://doi.org/10.1021/es102876y>
209. Tijet, N., Tang, P., Romilowych, M., Duncan, C., Ng, V., Fisman, D.N., Jamieson, F., Low, D.E., Guyard, C., 2010. New Endemic *Legionella pneumophila* Serogroup I Clones, Ontario, Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 16, 447–454. <https://doi.org/10.3201/eid1603.081689>
210. Totaro, M., Valentini, P., Costa, A., Frendo, L., Cappello, A., Casini, B., Miccoli, M., Privitera, G., Baggiani, A., 2017. Presence of *Legionella* spp. in hot water networks of different Italian residential buildings: A three-year survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14, 1296. <https://doi.org/10.3390/ijerph14111296>
211. Üstüntürk-Onan, M., Walochnik, J., 2018. Identification of free-living amoebae isolated from tap water in Istanbul, Turkey. *Experimental Parasitology*. 195, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.002>
212. Vaerewijck, M.J.M., Baré, J., Lambrecht, E., Sabbe, K., Houf, K., 2014. Interactions of foodborne pathogens with free-living protozoa: Potential consequences for food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13, 924–944. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12100>
213. Vaerewijck, M.J.M., Sabbe, K., Van Hende, J., Baré, J., Houf, K., 2010. Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04783.x>
214. Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 13, 1–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>
215. Vekens, E., Soetens, O., De Mendonça, R., Echahidi, F., Roisin, S., Deplano, A., Eeckhout, L., Achtergael, W., Piérard, D., Denis, O., Wybo, I., 2012. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical isolates from Belgium between 2000 and 2010. *Eurosurveillance*. 17. <https://doi.org/10.2807/ese.17.43.20302-en>
216. Viasus, D., Gaia, V., Manzur-Barbur, C., Carratalà, J., 2022. Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment. *Infectious Diseases and Therapy*. 11. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00635-7>
217. Viswanathan, K.V., Edelstein, H.P., Pope, D., Cianciotto, P.N., 2000. The *Legionella pneumophila* *iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infection and Immunity*. 68, 1069–1079. <https://doi.org/10.1128/iai.68.3.1069-1079.2000>

218. Voth, K.A., Ivy, C., Straaten, K., Li, L., Boniecki, M.T., Cygler, M., 2019. The structure of *Legionella* effector protein LpnE provides insights into its interaction with Oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein. *The FEBS Journal*. 286, 710–725. <https://doi.org/10.1111/febs.14710>
219. Wang, C., Saito, M., Tanaka, T., Amako, K., Yoshida, S., 2015. Comparative analysis of virulence traits between a *Legionella feeleii* strain implicated in Pontiac fever and a strain that caused Legionnaires' disease. *Microbial Pathogenesis*. 89, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.004>
220. Wilson, A., Canter, K.G., Abney, S.E., Gerba, C.P., Myers, E., Hanlin, J., Reynolds, K.A., 2022. An application for relating *Legionella* shower water monitoring results to estimated health outcomes. *Water Research*. 221, 118812–118812. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118812>
221. World Health Organization, 2007. Legionella and the prevention of legionellosis. World Health Organization.
222. Wüthrich, D., Gautsch, S., Spieler-Denz, R., Dubuis, O., Gaia, V., Moran-Gilad, J., Hinic, V., Seth-Smith, H.M., Nickel, C.H., Tschudin-Sutter, S., Bassetti, S., Haenggi, M., Brodmann, P., Fuchs, S., Egli, A., 2019. Air-conditioner cooling towers as complex reservoirs and continuous source of *Legionella pneumophila* infection evidenced by a genomic analysis study in 2017, Switzerland. *Eurosurveillance*. 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.4.1800192>
223. Yakunin, E., Kostyal, E., Agmon, V., Grotto, I., Valinsky, L., Moran-Gilad, J., 2020. A snapshot of the prevalence and molecular diversity of *Legionella pneumophila* in the water systems of Israeli hotels. *Pathogens*. 9, 414. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060414>
224. Yang, J.-L., Li, D., Zhan, X.-Y., 2023. Concept about the Virulence Factor of *Legionella*. *Microorganisms*. 11, 74. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010074>
225. Yu, A.T., Kamali, A., Vugia, D.J., 2019. *Legionella* Epidemiologic and Environmental Risks. *Current Epidemiology Reports*. 6, 310–320. <https://doi.org/10.1007/s40471-019-00207-3>
226. Zeng, L.Z., Liao, H.Y., Luo, L.Z., He, S.S., Qin, T., Zhou, H.J., Li, H.X., Chen, D.L., Chen, J.P., 2019. An Investigation on the Molecular Characteristics and Intracellular Growth Ability among Environmental and Clinical Isolates of *Legionella pneumophila* in Sichuan Province, China. *Biomedical and Environmental Sciences*. 32, 520–530. <https://doi.org/10.3967/bes2019.069>
227. Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Sergeant, M.J., Luhmann, N., Vaz, C., Francisco, A.P., Carriço, João André, Achtman, M., 2018. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Research*. 28, 1395–1404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>

## Pateicības

Vēlos izteikt vislielāko pateicību par iedrošinājumu, pacietību un veltīto laiku saviem darba vadītājiem **prof. Angelikai Krūmiņai** un **prof. Aivaram Bērziņam**.

Īpašs paldies **Dainai Pūlei** par spēju sarežģītos zinātniskās domas lidojumos atrast loģisku pavedienu un struktūru, spēju analizēt un apstrādāt datus, prasmi diskutēt un ģenerēt idejas.

Pateicība visam institūta “BIOR” Medicīnas mikrobioloģijas un mikroorganismu genoma izpētes grupas kolektīvam un, jo īpaši, **Svetlanai Makarovai, Jurim Ķibildam, Genādijam Koviseram, Laimai Ķimsei, Artjomam Mališevam** un **Andrai Utinānei** par paraugu ņemšanas izbraukumu organizēšanu un augsta līmeņa laboratorisko testēšanu.

Paldies institūta “BIOR” patogēno mikroorganismu kultūru kolekcijas vadītājai **Laurai Alksnei** par *Legionella* spp. izolātu kolekcijas veidošanu un uzturēšanu.

Paldies Valsts asinsdonoru centra komandai un, jo īpaši, **Ingrīdai Sisenei, Anitai Ķezberei, Sarmītei Midegai** un **Irēnai Senkovai** par asins paraugu ņemšanu.

Pateicība **Tatjanai Afanasjevai** par tehnisko palīdzību un padomiem.

Esmu ļoti pateicīga savai ģimenei – vīram Uģim un meitai Martai – par viņu iecietību un sapratni.

## **Pielikumi**



## RSU Ētikas komitejas lēmums

Veidlapa Nr. E-9 (2)

## RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007  
Tel. 67409101

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Asoc. prof. Olafs Brūvers	Dr.theo.	teologs
2. Professore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3. Docente Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4. Asoc. prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5. Professore Regīna Kleina	Dr.med.	patalogs
6. Asoc. prof. Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
7. Asoc. prof. Viesturs Liguts	Dr.med.	toksikologs
<b><u>Pieteikuma iesniedzējs:</u></b>	<b>Olga Valciņa, doktorante</b> Medicīnas fakultāte	
<b><u>Pētījuma nosaukums:</u></b>	„Legionella pneumophila molekulārā epidemioloģija”	
<b><u>Iesniegšanas datums:</u></b>	30.10.2013.	
<b><u>Pētījuma protokols:</u></b>	Izskatot augstāk minētā pētījuma pieteikuma materiālus (protokolu) ir redzams, ka pētījuma mērķis tiek sasniegts veicot ar dalībniekiem (bez kāda apdraudējuma veselībai) klīnisko paraugu ņemšanu un laboratoriskās analīzes, kā arī vides paraugu analīzi, iegūto datu apstrādi un analīzi, kā arī izsakot priekšlikumus. Personu (dalībnieku) datu aizsardzība, brīvprātīga informēta piekrišana piedalīties pētījumā un konfidencialitāte tiek nodrošināta. Līdz ar to pieteikums atbilst pētījuma ētikas prasībām.	
<b><u>Izskaidrošanas formulārs:</u></b>	ir	
<b><u>Piekrišana piedalīties pētījumā:</u></b>	ir	
<b><u>Komitejas lēmums:</u></b>	piekrist pētījumam	

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers

Tituls: Dr. miss., asoc. prof.

Paraksts

Ētikas komitejas sēdes datums: 31.10.2013.\*

## Pētījuma dalībnieka anketa



Anketas numurs: \_\_\_\_\_

Datums: \_\_\_\_\_ Intervētāja kods \_\_\_\_\_

„*Legionella pneumophila* molekulārā epidemioloģija”

## Asins donoru seroprevalences pētījuma dalībnieka anketa

## Labdien!

Esam Jums pateicīgi, ka piekritāt piedalīties pētījumā „*Legionella pneumophila* molekulārā epidemioloģija”, kurā tiks iegūti dati par antivielu pret *Legionella pneumophila* prevalenci Latvijas asins donoru vidū. Pētījuma sadaļas mērķis ir novērtēt seropozitivitātes asociētos faktorus, t.sk. tiks ņemti ūdens paraugi dzīvojamās ēkās, kuros tiks noteikta *Legionella* klātbūtne un skaits.

Paldies, ka veltīsiet tam laiku – Jūsu sniegtā informācija būs ļoti noderīga *Legionella* spp. ierobežošanas stratēģijas izstrādei. Jūsu atbildes un analīžu rezultāti tiks izmantoti pētījumā tikai apkopotā veidā.

## 1. Dzimums

 vīrietis       sievietē

## 2. Vecums, (pilni gadi) \_\_\_\_\_

3. Vai Jūs dzīvojiet privātmājā:  jā  nē

## 4. Dzīvesvieta

Apdzīvota vieta, pilsēta, ciems, novads

\_\_\_\_\_

Iela \_\_\_\_\_

Ja dzīvojiet daudzdzīvokļu ēkā, lūdzu, norādiet ēkas numuru \_\_\_\_\_

Kurā gadā celta ēka \_\_\_\_\_

Vai bijusi ūdensvada renovācija  jā  nē

Pasta indekss \_\_\_\_\_

## 5. Karstā ūdens apgādes veids Jūsu mājās:

- Centralizētā apgāde
- Elektriskais boileris
- Gāzes caurteces sildītājs

Cits: \_\_\_\_\_

## 6. Vai Jums ikdienā ir regulāra saskarsme ar ūdens aerosoliem (darbs ar izsmidzināšanas sistēmām, rūpnieciskām un medicīnas iekārtām, strūklakām, burbuļvannām u.tml.)

 jā  nē

Ja atbilde bija jā, lūdzu, norādiet, vai izmantojiet aizsargmasku:

 jā  nē
7. Vai Jūs smēķējat?  jā  nē

Ja jā, tad norādiet vidējo cigarešu skaitu dienā \_\_\_\_\_

8. Vai esiet slimojis (slimojusi) ar *Legionāru* slimību?
 jā  nē

## 9. Vai pēdējā gada laikā Jūs esiet slimojis (slimojusi) ar:

Pneimoniju (plaušu karsoni)  jā  nēBronhītu  jā  nē

Gripai līdzīgu saslimšanu vai citām augšējo elpceļu slimībām

 jā  nē
10. Vai pēdējā gada laikā Jūs esiet bijis dušā ārpus mājām  nē
 jā viesnīcā       jā ciemos       jā darbā       jā slimnīcā

Paldies par Jūsu veltīto laiku! Mēs to ļoti novērtējam!

