



Olga Valciņa

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

Promocijas darba kopsavilkums 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



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Olga Valciņa

ORCID 0000-0002-2012-9691

Legionella spp. izplatība,
ģenētiskā daudzveidība
un virulences potenciāls

Promocijas darba kopsavilkums 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

Promocijas darbs izstrādāts Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā “BIOR”, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

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

Dr. med. vet., Ph. D. profesors **Aivars Bērziņš**,
Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts
“BIOR”, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesore **Juta Kroiča**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. vet. profesore **Anda Valdovska**,
Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte

Ph. D. asociētā profesore **Tarja Pitkänen**,
Helsinki Universitāte, Somijas Veselības un labklājības institūts

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Medicīnas bāzes zinātņu, tai skaitā farmācijas, promocijas padomes atklātā sēdē 2023. gada 28. decembrī plkst. 15.00 Hīpokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16, un attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. asociētais profesors **Ingus Skadiņš**

Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi.....	5
Ievads.....	6
Darba mērķis.....	8
Darba uzdevumi.....	8
Darba hipotēze.....	8
Darba novitāte.....	8
1. Materiāli un metodes.....	10
1.1. Pētījuma shēma un norise.....	10
1.2. Pētījuma populācija un asins paraugu ņemšana.....	10
1.3. Dzeramā ūdens paraugu ņemšana ūdensapgādes sistēmās.....	11
1.4. Seroloģiskās metodes.....	13
1.5. <i>Legionella</i> mikrobioloģiskā identifikācija un uzskaitē.....	13
1.6. Brīvi dzīvojošo amēbu kultivēšana.....	14
1.7. Brīvi dzīvojošo amēbu sugu molekulārā identifikācija.....	14
1.8. Pētījumā izmantotie <i>Legionella</i> spp. izolāti.....	16
1.9. DNS ekstrakcija un pilna genoma sekvencēšana.....	16
1.10. Pilna genoma sekvencēšanas datu analīze.....	17
1.11. Virulences un pretantibiotiku rezistences gēnu identifikācija.....	18
1.12. Datu statistiskā apstrāde un analīze.....	18
2. Rezultāti.....	20
2.1. <i>L. pneumophila</i> seroprevalence asins donoru vidū.....	20
2.2. <i>Legionella</i> spp. izplatība dzeramā ūdens apgādes sistēmās un persistenci un kolonizāciju ietekmējošie faktori.....	23
2.2.1. Ūdens temperatūra.....	27
2.2.2. Brīvi dzīvojošo amēbu izplatība dzeramā ūdens apgādes sistēmās.....	29
2.3. <i>Legionella pneumophila</i> sekvencē bāzētās un cgMLST tipēšanas rezultāti.....	31
2.4. Virulences faktoros un pretantibiotiku rezistenci kodējošie gēni.....	36
3. Diskusija.....	39
3.1. <i>L. pneumophila</i> seroprevalence un saistītie faktori.....	39
3.2. <i>Legionella</i> spp. izplatība ūdensapgādes sistēmās un persistenci un kolonizāciju ietekmējošie faktori.....	43
3.3. <i>L. pneumophila</i> ģenētiskā daudzveidība.....	48
3.4. <i>L. pneumophila</i> virulences potenciāls.....	51
Secinājumi.....	56
Priekšlikumi.....	57

Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu.....	58
Literatūras saraksts.....	60
Pateicības.....	73
Pielikumi	74
1. pielikums	75
2. pielikums	76

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	European Union
ESCMID	Eiropas Klīniskās mikrobioloģijas un infekcijas slimību biedrība	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
ESGLI	ESCMID Leģionellu izpētes grupas	<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	Cabinet of Ministers
NGS	Nākamās paaudzes sekvenčēšana	<i>Next Generation Sequencing</i>
PĶR	Polimerāzes ķēdes reakcija	<i>Polymerase chain reaction</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. 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 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.

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. 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 viensūņu kopīgas evolūcijas rezultāts. Tie paši virulences faktori, kas palīdz *Legionella* inficēt viensūņus, palīdz arī inficēt cilvēka plaušu alveolu makrofāgus (Oliva et al., 2018). Brīvi dzīvojoši viensūņi 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 pārnese rezultātā no saimniekamēbām *Legionella* ir ieguvusi daudzus eikariotiem līdzīgus gēnus, kas regulē saimniekšūnu 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

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

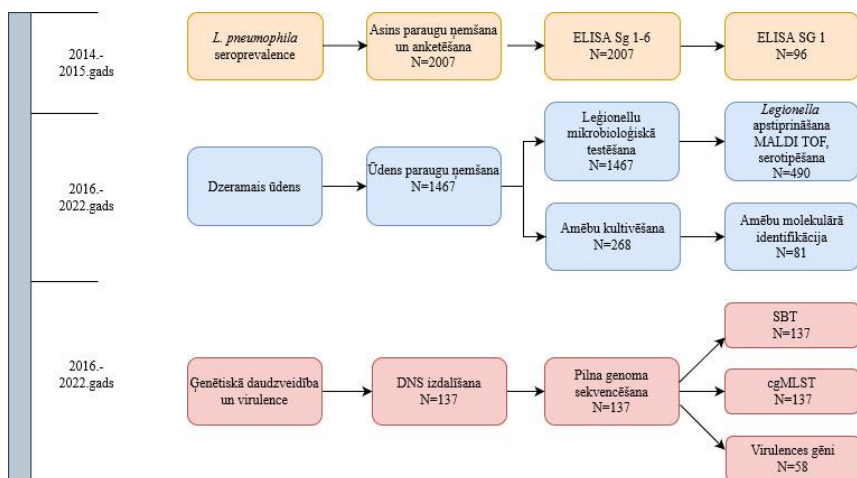
Šis ir pirmais pētījums Latvijā, kas demonstrē *L. pneumophila* seropozitivitātes asociētos faktorus un dažādu serogrupu un sekvenču tipu *Legionella* spp. daudzveidību un prevalenci ūdensapgādes sistēmās. Pētījuma rezultāti parādīja, ka Latvijā dominējošās *L. pneumophila* serogrupas ir SG 2 un SG 3 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.

1. Materiāli un metodes

1.1. Pētījuma shēma un norise

Pētījums tika plānots trijās savstarpēji saistītās secīgās daļās no 2013. gada septembra līdz 2023. gada martam (1.1. attēls). Pēc sagatavošanās fāzes asins paraugu ņemšana sāka 2014. gada februārī, pēdējo sekvencēšanas datu apstrāde tika veikta 2023. gada martā.



1.1. attēls. Pētījuma hronoloģija un metodoloģija

1.2. Pētījuma populācija un asins paraugu ņemšana

Kopumā no 2014. gada februāra līdz 2014. gada oktobrim sadarbībā ar Valsts asinsdonoru centru no veselīgiem 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. Tabula tika izmantota kā instruments, ar kura palīdzību tika nodrošināta pētījuma dalībnieku atlase katrā Latvijas reģionā.

Valsts asinsdonoru centra speciālisti katrā izbraukuma reizē aicināja donorus piedalīties pētījumā ar mērķi sasniegt 2.4. tabulā norādīto dalībnieku skaitu. Pētījums apstiprināts RSU Ētikas komitejā (1. pielikums). Katru donoru pirms asins nodošanas novērtēja sertificēts ārsts. Dalībnieki tika intervēti un aicināti aizpildīt anketu Valsts asinsdonoru centra darbinieka klātbūtnē (2. pielikums). 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.

1.3. Deramā 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. Paraugu ņemšanas plānā tika iekļautas ēkas, kas apgādātas ar dzeramo ūdeni no dažādiem ūdens avotiem – pazemes un attīrītiem virszemes ūdeņiem. Paraugi ņemti Rīgā (1096 no 1467 paraugiem) un citās Latvijas pilsētās (371 no 1096 paraugiem). Kopumā izlases plānā tika iekļautas 317 ēkas, no tām 204 Rīgā un 113 citās Latvijas apdzīvotās vietās.

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 trim 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. 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. 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. 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.

1.4. 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).

1.5. *Legionella* mikrobioloģiskā identifikācija un uzskaitē

Viens litrs ūdens tika filtrēts caur poliamīda membrānfiltru (diametrs 47 milimetri) ar poru izmēru 0,45 μm (*Millipore*, *Molsheim*, Francija). Membrānfiltri 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 uzsētas 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), plates tika inkubētas 36 ± 2 °C. 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 ± 2 °C temperatūrā.

Legionella sugas identifikācijai aizdomīgās kolonijas tika identificētas ar matricēs asistētu lāzera desorbcijas jonizāciju – nolidojuma laika masspektrometrijas metodi (*MALDI-TOF MS*, Bruker, Brēmene, Vācija). Papildus, lai apstiprinātu *L. pneumophila*, tika izmantots aglutinācijas tests (*Thermo Fisher Scientific, Bred*, Nīderlande) un atsevišķi lateksa aglutinācijas serumi (*Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill*, Kanāda). Rezultāts tika izteikts kā *Legionella* sugu un serogrupu koloniju veidojošo vienību skaits uz vienu litru ūdens (KVV/l).

1.6. Brīvi dzīvojošo amēbu kultivēšana

Brīvi dzīvojošo amēbu kultivēšana veikta atbilstoši iepriekš aprakstītiem protokoliem (Vaerewijck et al., 2010). Brīvi dzīvojošo amēbu (*Free-living amoeba*, FLA) kultivēšanai Petri platei ar membrānfiltra gabaliņiem tika pievienoti 15 ml šķidrās PAS (*Page's amoeba Saline*) barotnes ar diviem sterilizētiem (sterilizācija veikta sausā gaisa sterilizācijas skapī, $+170 \pm 2$ °C, 2 h) rīsa graudiem (“Dobeles dzirnavnieks”, Dobeles, Latvija). Plates tika inkubētas četras līdz piecas dienas 25 ± 2 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas Petri plates tika pārbaudītas gaismas mikroskopā $400\times$ palielinājumā, un tika veikta amēbu ģinšu mikroskopiskā identifikācija, izmantojot noteicējus (Smirnov, 1999; Smirnov et Brown, 2004).

1.7. Brīvi dzīvojošo amēbu sugu molekulārā identifikācija

Amēbu bagātināšanai pirms DNS ekstrakcijas tika izmantoti 70 μ l šķidrās peptona rauga glikozes (PYG) barotnes (*Biolife 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). References materiāls: *Acanthamoeba quina* ATCC-50241 un *Acanthamoeba castellanii* Neff. ATCC-30010 tika izmantots kā pozitīvā kontrole, savukārt kā negatīva kontrole tika izmantots no DNS un nukleāzēm brīvs ūdens DNS parauga vietā.

Amoeboidea un *Vahlkampfiidae* ģints sugu identifikācijai par pamatu tika ņemts iepriekš aprakstīts protokols (Le Calvez et al., 2012). 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.

Vermamoeba (iepriekš *Hartmanella*) ģints pārstāvju noteikšanai PĶR tika veikta, izmantojot iepriekš aprakstītu protokolu (Solgi et al., 2012). Kā negatīvā kontrole tika izmantots no DNS un nukleāzēm brīvs ūdens DNS parauga vietā.

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. 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.

1.8. 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 un iespējamās ģeogrāfiskās variācijas Latvijas teritorijā, kur 72 izolāti iegūti no dzīvojamo namu paraugiem Rīgā un 65 izolāti iegūti no ūdensapgādes sistēmām citās pilsētās.

Visi pētījumā izmantotie sasaldētie (-80 ± 2 °C) izolāti tika atdzīvināti un uzsēti uz buferēta kokogļu rauga ekstrakta agara barotnes (*BCYE*, *Oxoid*, *Basingstoke*, Apvienotā Karaliste) un inkubēti 36 ± 2 °C temperatūrā 48–72 stundas.

1.9. DNS ekstrakcija un pilna genoma sekvenčšana

DNS ekstrakcija tika veikta pēc 48 stundu ilgas *L. pneumophila* inkubācijas 36 ± 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 apr./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). Sekvenčšana 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, San Diego, CA, ASV*), lai katram izolātam iegūtu sapārotos (*paired-end*) nolasījumus vismaz $30 \times$ pārklājumā.

1.10. 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).

1.11. 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.

1.12. 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 faktorus, 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, χ^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.

2. Rezultāti

2.1. *L. pneumophila* seroprevalence asins donoru vidū

Kopumā *L. pneumophila* SG 1–6 seroprevalence asins donoriem bija 4,8 %. Seroprevalence pret pirmās serogrupas *L. pneumophila* bija 0,2 % (5 no 2007) asins donoru. 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* (2.1. tabula). Kopumā seroprevalence sievietēm (5,9 %) bija augstāka nekā vīriešiem (3,3 %). No 2007 asins donoriem regulāri smēķēja 576 cilvēki, vidēji dienā izsmēķējot 8,2 cigaretes (mazākais norādītais izsmēķēto cigarešu skaits – viena cigarete; lielākais – 30 cigaretes).

2.1. tabula

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

Vecuma grupa	Paraugu skaits/pozitīvie paraugi (%)		
	Kopā	Sievietes	Vīrieši
	2007/96 (4,8)	1121/67 (5,9)	886/29 (3,3)
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)
Smēķēšana			
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)
Slimības iepriekšējā gadā:			
Bronhīts			
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)
Gripai līdzīga slimība			
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* (2.2. 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 %).

2.2. tabula

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

Urbanizācija	Paraugu skaits/pozitīvie paraugi (%)		
	Kopā	Sievietes	Virieši
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)
Ēkas tips			
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)
Ēkas vecuma grupa			
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)
Ūdensapgādes sistēmas renovācija			
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)
Karstā ūdens sagatavošanas veids			
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)
Ekspozīcija darbā			
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)
Duša ārpus mājām			
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)

Liela daļa (> 60 %) pētījuma dalībnieku apstiprināja, ka pēdējā gada laikā ir gājuši dušā ārpus savas dzīvesvietas. 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. 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) (2.3. tabula).

2.3. 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
Iepriekšējas 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 analizē 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.

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

Kopumā *Legionella* spp. tika konstatētas 490 no 1467 ūdens paraugiem (2.4. tabula). Vismaz viens *Legionella* spp. pozitīvs paraugs konstatēts 176 no 317 ēkām (55,5 %).

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

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 (2.5. 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 (%)
Dzīvojamās mājas	176	44 (25)	345	163 (47,2)
Rīga	99	28 (28,3)	239	107 (44,8)
Citas pilsētas	77	16 (20,8)	106	56 (52,8)
Viesnīcas	–	–	903	266 (29,5)
Rīga	–	–	739	189 (25,6)
Citas pilsētas	–	–	164	77 (47)
Citas ēkas	16	4 (25)	27	13 (48,10)
Rīga	8	4 (50)	11	7 (63,6)
Citas pilsētas	8	0	16	6 (37,5)
KOPĀ	192	48 (25,0)	1275	442 (34,7)

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*. 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 (2.6. tabula).

2.6. 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
Viesnīcas	$1,2 \times 10^3$ ($1,1 \times 10^4$)	32,1	–	–
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	–	–

Viesnīcās *L. pneumophila* kolonizācijas līmeņu datu analīze (2.7. tabula) atklāja statistiski nenozīmīgu *L. pneumophila* samazināšanos pēc 3 minūšu 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.

2.7. tabula

***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	$1,7 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^2$

2.2.1. 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 tipi, paraugu ņemšanas sezonu, tomēr dati rāda, ka vidējā karstā ūdens temperatūra bija zemāka ($p < 0,0001$) gadījumos, kad ūdens paraugā konstatēta *Legionella* (2.8. tabula).

2.8. 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
Dzīvojamās mājas	51,0	13,4	51,3	12,9	50,6	14,7
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
Viesnīcas	46,9	12,4	48,0	12,4	44,4	0,0
Rīga	48,3	12,4	49,0	12,4	46,0	–
Citas pilsētas	42,1	–	42,8	–	41,4	–
Citas ēkas	38,2	15,3	40,8	12,9	30,5	20,0
Rīga	51,0	18,9	51,0	15,5	–	20,0
Citas pilsētas	34,0	12,4	35,8	12,4	30,5	–
KOPĀ	47,8	13,5	48,5	12,9	46,4	15,1

Viesnīcās paraugu ņemšanas laikā tika mērīta karstā ūdens temperatūra pirms un pēc notecināšanas (2.9. tabula). Datu analīze parādīja, ka 35 % viesnīcu karstā ūdens temperatūra pēc notecināšanas nesasniedza 50 °C, 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 (2.10. 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 t° °C	Paraugu skaits/ pozitīvi (%)	Vidējā ūdens t° °C	Paraugu skaits/ pozitīvi (%)	Vidējā ūdens t° °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 ($p = 0,056$).

2.2.2. 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 (2.11. 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 %).

2.11. 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	
Daudzdzīvokļu ēkas	4 (2; 50,0 %)	13 (6; 46,1 %)	24 (21; 87,5 %)	41 (31; 75,6 %)	82 (60; 73,2 %)
Viesnīcas	0 (0; 0,0 %)	75 (55; 73,3 %)	0 (0; 0,0 %)	68 (54; 79,4 %)	143 (109; 76,2 %)
Sabiedriskas ēkas	4 (4; 100,0 %)	5 (3; 60,0 %)	12 (10; 83,3 %)	22 (21; 95,4 %)	43 (38; 88,4 %)
Starprezultāts	8 (6; 75,0 %)	93 (64; 68,8 %)	36 (31; 86,1 %)	131 (106; 80,9 %)	268 (207; 77,2 %)
Kopā	101 (70; 69,3 %)		167 (137; 82,0 %)		

Hī kvadrāta testi neuzrādīja saistību starp ūdens tipu (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. 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.

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 3 ģintis, un vienā paraugā (0,4 %) – četras dažādas amēbu sugas.

Brīvi dzīvojošo amēbu molekulārā identifikācija līdz sugai veikta 81 paraugam. Kopumā tika identificētas 13 brīvi dzīvojošo amēbu sugas: *Acanthamoeba triangularis*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. haelayi*, *A. quina*, *A. lugdunensis*, *Vermamoeba vermiformis*, *Naegleria neopolaris*, *N. Fowleri*, *Echinamoeba exudans*, *Tetramitus dokdoensis*, *Vrihiamoeba italica*, *Flamella arnhemensis*. No identificētajām sugām visizplatītākās bija *V. vermiformis* (51,9 %), *A. castellanii* (13,6 %) un *A. polyphaga* (8,6 %). Pētījuma laikā nav

identificēts ģints *Centropyxis* pārstāvis, kas konstatēts divos aukstā ūdens paraugos kopā ar *A. triangularis*.

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.

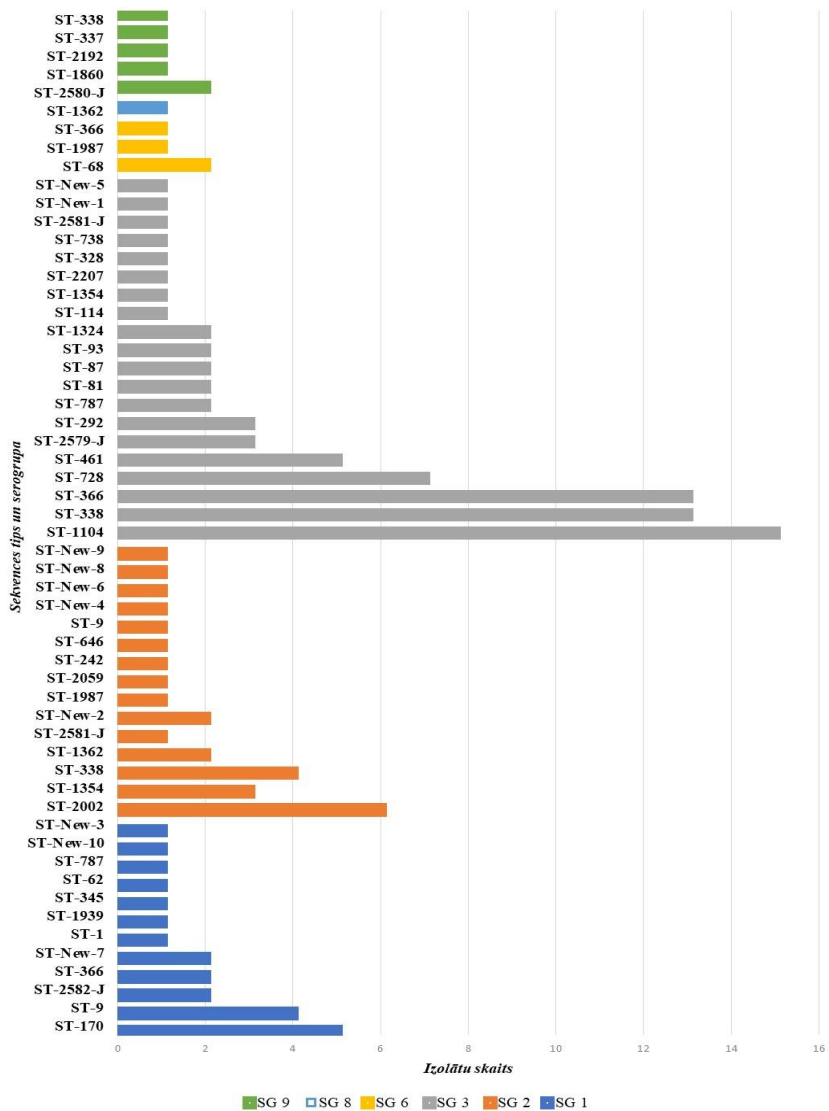
Brīvi dzīvojošo amēbu daudzveidībai nebija ietekmes uz *Legionella* sugām ($\chi^2 = 1,9$; $p = 0,758$), serogrupām ($\chi^2 = 4,6$; $p = 0,797$) vai uz koloniju veidojošo vienību skaitu ($\chi^2 = 7,9$; $p = 0,247$). Tikai divām amēbu ģintīm bija būtiska saistība ar *Legionella* spp. klātbūtni – *Acanthamoeba* spp., kas tika novērotas 146 paraugos ($\chi^2 = 19,7$; $p < 0,0001$), un *Vermamoeba* spp., kuras 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 un brīvi dzīvojošo amēbu un *Legionella* spp. vienlaicīga klātbūtne sasniedza 55,1 %.

2.3. *Legionella pneumophila* sekvencē bāzētās un cgMLST tipēšanas rezultāti

Veicot pilna genoma sekvencēšanu 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 sekvencētajiem *L. pneumophila* izolātiem 72 bija no Rīgas (3. pielikums) un 65 no Latvijas reģioniem (4. pielikums).

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.

Visbiežāk sastopamie sekvenču tipi ir ST-338 (18 izolāti), ST-366 (16 izolāti) un ST-1104 (15 izolāti). No 46 pētījumā identificētajiem sekvenču tiem 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 (2.1. 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.



2.1. attēls. *Legionella pneumophila* sekvenču tipi

Kopumā prezentēti 46 sekvenču tipi 137 izolātiem.

2.4. Virulences faktoros un pretantibiotiku rezistenci kodējošie gēni

Virulenci kodējošo gēnu izpēte veikta visiem 58 *L. pneumophila* celmiem, kas izolēti no dzīvojamo māju ūdens paraugiem. Kopumā 58 sekvenčētos *L. pneumophila* genomos tika atrasti 420 virulences gēni, kas pārstāv 59 gēnu saimes. Gēnu skaits vienā izolātā svārstījās no 312 līdz 415, vidēji vienā izolātā bija 375 virulences gēni, un līdzīga gēnu daudzveidība tika novērota starp izolātiem no ēkām, kas saistītas ar leģionelozes gadījumiem, un ēkām bez zināmiem leģionelozes gadījumiem.

Visiem sekvenčētajiem *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*.

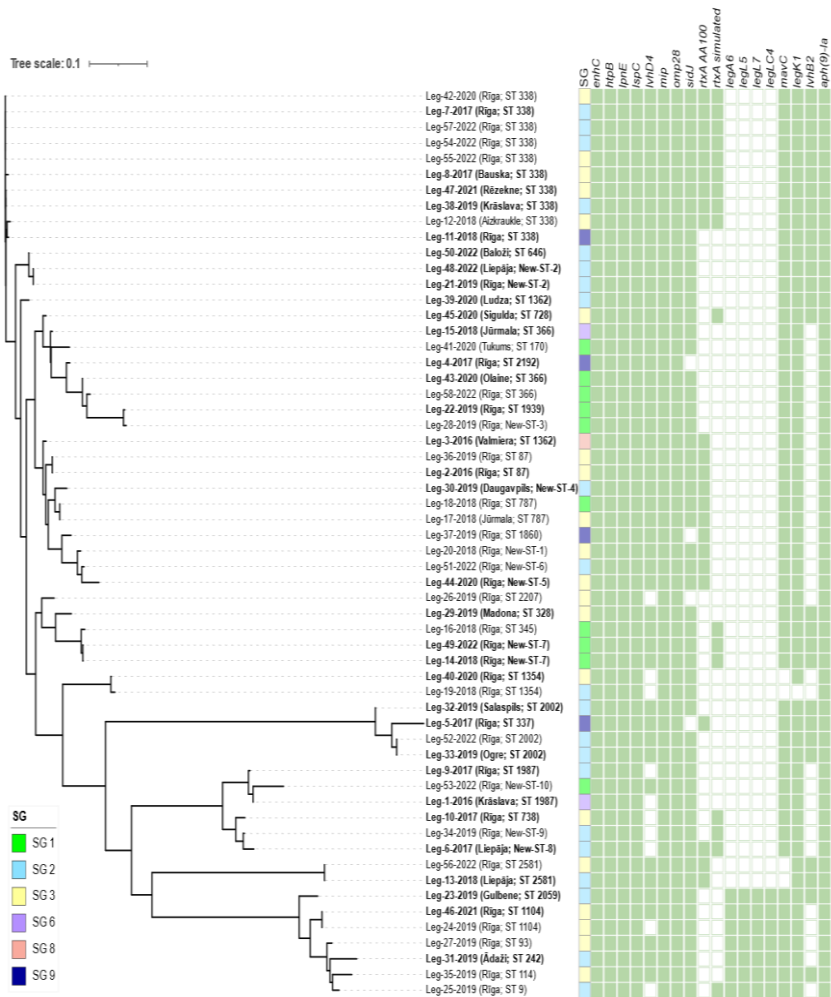
Gēni *enhC*, *htpB*, *omp28*, *mip*, *lpnE* un 11 gēni no *lsp* gēnu saimes atrasti visiem *L. pneumophila* 58 izolātiem.

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 PQR 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* (2.4. attēls) un 11 *lsp* saimes gēni. Core Genome SNP dendrogramma parāda tās pašas grupas kā cgMLST minimālais savienotais

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.



2.4. 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.

3. Diskusija

3.1. *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 (Borellla 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 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 mājāsaimniecības 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 imūnģenētiskiem faktoriem (Hawn et al., 2005).

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 pieauga smēķētāju vidū. Pētījuma autori uzskata, ka TLR6 polimorfisms 359T > C var būt arī kā 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, 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. Iepriekš 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 nediagnosticētiem 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 analizē. Šie atklājumi saskan ar iepriekšējo vides pētījumu rezultātiem, kur leģionellas izplatība bija augstāka ēkās ar centralizētām karstā ūdens apgādes sistēmām (Kruse et al., 2016). 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 izstrādi un rūpīga laboratoriskās diagnostikas metožu izvēle vides un klīnisko gadījumu izmeklēšanā.

3.2. *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. 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 *Legionella* infekcijas avotiem.

Pētījumā ir izvērtēta leģionellu izplatība un daudzveidība 210 dzīvojamos 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), kā arī divos ziņojumos no Itālijas, kur leģionellu prevalence variēja no 19,8 % (Felice et al., 2019) līdz 26 % karstā ūdens sistēmās (Totaro et al., 2017). ASV vismaz viens *Legionella* pozitīvs paraugs tika konstatēts 15 % vienģimenes 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).

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 % paņemto 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 (Bešić et al., 2021). Viszemākā *Legionella* izplatība tika novērota Kanāriju salās – tikai 8,5 % paraugu no karstā ūdens sadales sistēmām bija piesārņoti (Domenech-Sanchez, Laso et Alberti, 2022). Kopumā, izņemot Domeneka-Sančesa pētījumu (Domenech-Sanchez, Laso et Alberti, 2022), ir konstatēta diezgan līdzīga *Legionella* izplatība. Leģionellu prevalences 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.

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* prevalences 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 ēkā, 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 ēkā, kurās iepriekš bijuši leģionāru slimības gadījumi, apsaimniekotāji, iespējams, ir apzinīgāki, un pastiprinātās piesardzības dēļ šajās ēkā 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 ēkā 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.

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.

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 identificēta 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. 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 (Declerck et al., 2007; Hsu et al., 2011), rūpnieciskajos ūdeņos (Scheickl et al., 2014) un dzesēšanas torņos (Scheickl 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 dzīvojošas amēbas spēj uzturēt dzīvotspējīgus, bet nekultivējamus celmus (Dietersdorfer et al., 2018) un nodrošināt ilgstošu *Legionella* persistenci un transmisiju (Denoncurt et al., 2018).

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.

3.3. *L. pneumophila* ģenētiskā daudzveidība

Mūsu pētījumā, veicot pilna genoma sekvenču analīzi 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 sekvenču tips. Sekvenču 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 sekvenču 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 pārnese 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.

Pasaulē plaši pārstāvēts sekvenču tips gan starp klīniskajiem, gan starp vides izolātiem 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 uzsējumu veikšanai (Garner et al., 2019; ECDC, 2022), un tas ir arī viens no iemesliem, kāpēc SG 1 tiek uzskatīta 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. Vienlaikus tiek attīstītas NGS metodes, kas dod iespēju veikt augstas izšķirtspējas tipēšanu, izvairoties no baktēriju ūrkultūras 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).

3.4. *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 faktorus 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. SdeE, 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* SG 2–14 celmiem (Katsiaflaka et al., 2016), līdzīgā pētījumā Austrālijā *lvh* saimes gēni SG 1 *L. pneumophila* izolātiem konstatēti 57 % vides izolātu un 78 % klīnisko izolātu (Huang et al., 2006). Gēnam *lvhB2* ir liela nozīme baktērijas spējā inficēt, ja baktērija pirms tam dzīvojuši zemākā temperatūrā (Ridenour et al., 2003).

Sākotnējās analīzes laikā tika novērota ievērojama atšķirība *rtxA* pozitīvo izolātu izplatībā, salīdzinot ar citiem pētījumiem. Pārbaudot genomus pret VFDB 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 *rtxA1/rtxA-rtxA2/rtxA* un *rtxA3/rtxA-rtxA4/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 sekvences 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 VFDB 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. Var secināt, ka metode precīzai *rtxA* klātbūtnes noteikšanai ir rūpīgi jāizvērtē un jāņem vērā acīmredzamie gan PĶR metožu, gan uz izlīdzināšanu bāzēto skaitļošanas metožu un references datu bāzu ierobežojumi.

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, plaša 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 pārnese 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

vienšūņiem un makrofāģiem un līdzevolūcija ir radījusi molekulāru mijiedarbību starp patogēnu un saimnieku, piemēram, horizontālo gēnu pārnēsī. 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 horizontālā gēnu pārnese 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 makrofāģu 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 ūdens apgādes sistēmās 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 zemu 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.
- Pilsnveidojot 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 recenzējamās zinātniskajās izdevumos:

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

Mutiski ziņojumi konferencēs:

1. **Valciņa, O.,** Pūle, D., Makarova, S. K., Bērziņš, A., Krūmiņa, A. *Legionella pneumophila* izplatība dzeramā ūdens apgādes sistēmā daudzdzīvokļu mājāsniecībās Rīgā. 2013. RSU 2013. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija.
2. **Valciņa, O.,** Pūle, D., Malisevs, A., Trofimova, J., Staskevica, A., Makarova, S., Grantina-Ievina, L., Berzins, A.; Krumina, A. Diversity and factors associated with occurrence of *Legionella pneumophila* in drinking water supply systems. 2019. 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. Paraugu ņemšanas plāna nozīmīgums *Legionella pneumophila* kontrolei. 2014. // RSU 2014. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija.
2. **Valciņa, O.,** Krastiņa, D., Pūle, D., Bērziņš, A., Krūmiņa, A. Seroprevalence of *Legionella* in blood donors and occurrence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in Riga. **2015.** // RSU 2015. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija.

3. **Valciņa, O.**, Krastiņa, D., Pūle, D., Bērziņš, A., Krūmiņa, A. *Legionella pneumophila* seropositivity associated factors in Latvian blood donors. 2015. // 8th International Conference on Biodiversity Research, Daugavpils, Latvija.
4. Pūle, D., Mališevs, A., **Valciņa, O.** Development of Water Supply System Model for Artificial Contamination with *Legionella*: Preliminary Results. 2016. // 58th International Scientific Conference of Daugavpils University, Daugavpils, Latvija.
5. **Valciņa, O.**, Pule, D., Malisevs, A., Trofimova, J., Makarova, S., Grantina-Ievina, L., Berzins, A.; Krumina, A. Co-occurrence of *Legionella* spp. and free living protozoja in frinking water supply systems in Latvia. 2017. // The 9th International Conference on Legionella, Rome, Italy.
6. **Valciņa, O.**, Staškeviča, A., Pūle, D., Bērziņš, A. Diversity of Legionella in hot water distribution systems in Latvian hotels. 2018. // ESCMID Study group for *Legionella* infections (ESGLI) Conference 2018, Lyon, France.
7. Pūle, D., **Valciņa, O.** Formation of *Legionella* Containing Biofilm in Small-Scale Water Supply System Model. 2019. // ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI) Conference 2019, Athens, Greece.

Literatūras saraksts

1. 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>
2. 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>
3. 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>
4. Best, A., Abu Kwaiq, Y., 2018. Evolution of the Arsenal of *Legionella pneumophila* Effectors To Modulate Protist Hosts. *mBio*. 9. <https://doi.org/10.1128/mbio.01313-18>
5. 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>
6. 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>
7. 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>
8. 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>
9. 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>

10. 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>
11. SPKC, Centre of Disease Prevention and Control of Latvia, 2023. Epidemiological Reports | SPKC Epidemioloģijas biļeteni. <https://www.spkc.gov.lv/lv/epidemiologijas-bileteni> (accessed 04.02.2023).
12. 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>
13. 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>
14. CSB, Oficiālās statistikas portāls, n.d. Iedzīvotāju skaits un raksturojošie rādītāji | Oficiālās statistikas portāls [WWW Document]. stat.gov.lv. URL <https://stat.gov.lv/lv/statistikas-temas/iedzivotaji/iedzivotaju-skaits> (accessed 06.02.23).
15. 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>
16. 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>
17. 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>
18. 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>
19. 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>

20. 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>
21. 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>
22. 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>
23. 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>
24. 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>
25. 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>
26. 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>
27. 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>
28. 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>
29. 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>

30. 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>
31. 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>
32. 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).
33. 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).
34. 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>
35. 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>
36. 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>
37. 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>
38. 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>
39. 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>

40. 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>
41. 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>
42. 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>
43. 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>
44. 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>
45. 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>
46. 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>
47. 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>
48. 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>
49. 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>

50. 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>
51. 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>
52. 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>
53. 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>
54. Herwaldt, L.A., Marra, A.R., 2018. *Legionella*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 31, 325–333. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000468>
55. 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>
56. 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>
57. 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).
58. 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).
59. Javanmard, E., Niyiyati, 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>

60. 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>
61. 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>
62. 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>
63. 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>
64. 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>
65. 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>
66. 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>
67. 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>
68. 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>
69. Kuroki, T., Watanabe, Y., Teranishi, H., Izumiyama, 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>

70. 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>
71. 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>
72. 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.
73. 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>
74. 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>
75. 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>
76. 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-acetylneuraminase cytidyltransferase gene. *Clinical Microbiology and Infection*. 20, O435–O441. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12459>
77. 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>
78. 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>
79. 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).

80. 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>
81. 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>
82. 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>
83. 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>
84. 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>
85. 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>
86. 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.
87. 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>
88. 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>
89. 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)
90. 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>

91. 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>
92. 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>.
93. 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>
94. 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>
95. 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>
96. 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>
97. 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>
98. 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>
99. 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>
100. 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>

101. Scheickl, 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>
102. 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>
103. 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 subgenomic 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>
104. 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>
105. 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>
106. 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>
107. 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>
108. Smirnov, A., Brown, S., 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*. 3, 148–190.
109. 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>
110. Solgi, R., Niyiyati, M., Haghghi, 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.
111. 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>

112. 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>
113. 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>
114. Svetlicic, E., Jaén-Luchoro, D., Klobucar, R.S., Jers, C., Kazacic, 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>
115. 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>
116. 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>
117. 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>
118. 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>
119. 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>
120. 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>

121. 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>
122. 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>
123. 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>
124. 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>
125. 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>
126. 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 Seņkovai** 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

Pieteikuma iesniedzējs: **Olga Valciņa, doktorante**
Medicīnas fakultāte

Pētījuma nosaukums: „Legionella pneumophila molekulārā epidemioloģija”

Iesniegšanas datums: 30.10.2013.

Pētījuma protokols: 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.

Izskaidrošanas formulārs: ir

Piekrišana piedalīties pētījumā: ir

Komitejas lēmums: **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 sadalas mērķis ir novērtēt seropozitivitātes asociētos faktorus, t.sk. tiks ņemti ūdens paraugi dzīvojamās ēkās, kuros tiks noteikta *Legionella* klātbūtne un skaits.

Paldies, ka veltījat 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 sieviete

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 nē7. 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 nē10. Vai pēdējā gada laikā Jūs esiet bijis dušā ārpus mājām nē jā viesnīcā jā ciemos jā darbā jā slīmnīcā

Paldies par Jūsu veltīto laiku! Mēs to ļoti novērtējam!