

WYSTĘPOWANIE BAKTERII *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* W OBIEKTACH WOJSKOWYCH

Agnieszka Sikora¹, Maria Koziół-Montewka^{1,2}, Iwona Gładysz²,
Małgorzata Wójtowicz-Bobin¹, Paulina Dobosz¹, Anna Sikora³

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²Państwowa Szkoła Wyższa im. Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

³Oddział Ginekologiczno-Położniczy i Patologii Ciąży,
Samodzielny Publiczny Szpital Wojewódzki im. Papieża Jana Pawła II w Zamościu

Sikora A., Koziół-Montewka M., Gładysz I., Wójtowicz-Bobin M., Dobosz P., Sikora A. (2013), *Występowanie bakterii Legionella pneumophila w obiektach wojskowych*. Człowiek i Zdrowie, 2 (VII), s. 33-38

Streszczenie:

Cel pracy: Rejestrowane zakażenia bakteriami z rodzaju *Legionella* oraz ogniska epidemiczne skłaniają do monitorowania potencjalnych rezerwuarów *Legionella*, które stanowią źródło zakażenia nie tylko dla osób z obniżoną odpornością, ale i osób zdrowych bez czynników ryzyka. Materiał i metody: Materiałem do przeprowadzonych badań były próbki wody pobrane z instalacji sieci wodociągowej 4 budynków koszarowych oraz 1 szpitala wojskowego. Oznaczenie liczby bakterii *Legionella* w próbkach wody wykonano zgodnie z obowiązującymi normami. Wyniki: Na podstawie przeprowadzonych badań pobranych próbek wody sieci wodociągowej wszystkich przebadanych obiektów wojskowych wykazano obecność *L. pneumophila* SG 2-14, ale nie stwierdzono obecności najbardziej zjadliwej *L. pneumophila* SG 1. Zaobserwowano, że tylko w jednym budynku koszarowym liczba bakterii *L. pneumophila* przekraczała dopuszczalny poziom $>10^2$ CFU/100 ml. W przebadanym szpitalu wojskowym w 77,77% próbek wody, liczba pałeczek *L. pneumophila* była $>10^2$ CFU/100 ml. Wnioski: W celu zmniejszenia ryzyka zakażenia *Legionella* należy stale monitorować sieć wodociągową, a w przypadku zwiększonej ponad normę liczby bakterii zastosować odpowiednią metodę eradykacji.

Słowa kluczowe: *Legionella pneumophila*, choroba legionistów, systemy dystrybucji wody

Wstęp

Bakterie z rodzaju *Legionella* są czynnikiem etiologicznym legionelozy, która klinicznie może przebiegać jako choroba legionistów (legionelozowe zapalenie płuc, postać płucna), gorączka Pontiac oraz jako ciężka postać popłucna z zespołem septycznym (Diederer 2008).

Zdaniem niektórych badaczy postać płucna stanowi od 1 do 5% wszystkich zachorowań wywołanych przez pałeczki *Legionella*. Śmiertelność pacjentów z tą postacią jest wysoka i wynosi od 15 do 20%, a u osób hospitalizowanych z obniżoną odpornością przekracza nawet 30% (Matuszewska, Krogulska 2009). Postać łagodna o objawach grypopodobnych – gorączka Pontiac występuje u ponad 90% narażonej populacji (Fields i in., 2002). W tej postaci legionelozy nie stwierdza się objawów zapalenia płuc, co związane jest z brakiem namnażania się tych bakterii w makrofagach płucnych (Palusińska-Szych, Cendrowska-Pinkosz 2008).

Według piśmiennictwa stwierdza się, że gatunek *Legionella pneumophila* jest odpowiedzialny za większość rozpoznanych przypadków legionelozy (80-90%), a za 50-75% zachorowań odpowiada *L. pneumophila* należąca do serogrupy 1 (SG 1). Pozostałe gatunki *Legionella* izolowane są bardzo rzadko (O'Neill, Humphreys 2005; Matuszewska, Krogulska 2009).

Pierwsze doniesienia o chorobie legionistów (ang. *legionnaires'disease*, LD) pochodzą z 1976 roku, kiedy wśród uczestników corocznego zjazdu weteranów wojennych Legionu Amerykańskiego stanu Pensylwania w Filadelfii stwierdzono epidemię zapalenia płuc. Spośród 3683 członków konwentu zakwaterowanych w luksusowym hotelu *Bellevue Stratford* zachorowało 182, z czego 146 (80%) wymagało bezwzględnej hospitalizacji z powodu ciężkiego przebiegu choroby. W tym czasie odnotowano również 39 zachorowań wśród pracowników obsługi hotelowej. W wyniku zakażenia zmarły wtedy 34 osoby (Marrie 2008). Dzięki intensywnym badaniom wykazano, że przyczyną ówczesnych zachorowań był nowy, nieznany do tej pory czynnik infekcyjny, który badacze nazwali *Legionella pneumophila*: *Legionella* – po legionistach, którzy zostali zakażeni podczas konwentu; *pneumophila* – „kochający płuca”, ze względu powinowactwo bakterii do makrofagów alveolarnych i komórek nabłonkowych pęcherzyków płucnych. Stwierdzono również, że źródłem zakażenia były bakterie *Legionella* znajdujące się w systemie wentylacyjnym hotelu (Marrie 2008).

Adres do korespondencji: Agnieszka Sikora, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: agnieszka.sikora24@wp.pl

Według O'Neill do zakażenia dochodzi przez inhalację aerozolu wodno-powietrznego o średnicy kropelek od 2,0-5,0 µm lub aspirację wody zanieczyszczonej bakteriami *Legionella*. Nie stwierdzono do tej pory przypadków szerzenia się choroby z człowieka na człowieka (O'Neill, Humphreys 2005).

Zdaniem wielu badaczy *Legionella* spp. powszechnie występują w naturalnych i sztucznych zbiornikach wodnych. Głównym źródłem zakażenia i rezerwuarem bakterii są instalacje wody w budynkach mieszkalnych i budynkach użyteczności publicznej. *Legionella* kolonizuje również systemy klimatyzacji. Najbardziej niebezpieczna jest jednak obecność pałeczek *Legionella* w systemach dystrybucji wody użytkowej w szpitalach, w aparaturze medycznej (np. dializatory, respiratory, inhalatory, nawilżacze powietrza) oraz w turbinach dentystycznych używanych w gabinetach stomatologicznych. Stan ten stwarza ryzyko zakażenia ludzi tymi bakteriami, a w szczególności pacjentów z obniżoną odpornością przebywających w zamkniętych ośrodkach służby zdrowia (Matuszewska, Krogulska 2009; Breiman, Butler 1998).

Zgodnie z dostępnym piśmiennictwem stwierdza się, że na zakażenie szczególnie narażone są osoby starsze – powyżej 60 roku życia, nadużywające alkoholu i nikotyny, z rozpoznanymi chorobami współistniejącymi (np. cukrzycą, przewlekłymi chorobami układu oddechowego, niewydolnością nerek, chorobami nowotworowymi). Według niektórych doniesień stwierdza się, że grupę ryzyka stanowią również pracownicy szpitali, gabinetów stomatologicznych, zakładów przemysłowych, myjni samochodowych oraz osoby często podróżujące, które korzystają z hoteli i klimatyzacji (Mazurkiewicz i in., 2011; Poupard i in., 2007; Sikora i in., 2013).

Według *European Working Group for Legionella Infections*, EWGLI ze względu na miejsce zakażenia wyróżnia się trzy typy legionelozy. Typ pierwszy określany jest, jako CAP-LD - *community acquired pneumonia-legionnaire's disease*. Postać ta jest nabyta w środowisku zamieszkania, pracy, rekreacji. Typ drugi to TAP-LD - *travel associated pneumonia-legionnaire's disease*. Jest on związany z podróżowaniem (za granicę lub w kraju). Typ trzeci legionelozy określany jest przez badaczy, jako HAP-LD - *hospital acquired pneumonia-legionnaire's disease* i nabywany jest w czasie hospitalizacji lub leczenia w sanatorium (wodolecznictwo) (Pancer, Stypułkowska-Misiurewicz 2009).

Według ostatniego raportu *European Legionnaires' Disease Surveillance Network* (ELDSNet) opublikowanego w roku 2011 stwierdza się, że w Europie odnotowano 4.897 zachorowań, z czego większość została nabyta w środowisku zamieszkania (67%). Pozostałe 24% przypadków stanowiły zakażenia nabyte podczas podróży, a tylko 7% zachorowań było związanych z leczeniem lub pobytem w sanatorium. Z danych opublikowanych przez ELDSNet wynika, że aż 77% wszystkich przypadków zachorowań odnotowano u osób powyżej 50 roku życia (www.ecdc.europa.eu).

Według oficjalnych danych zamieszczanych w biuletynie „Choroby Zakaźne i Zatrucia w Polsce” opracowywanym przez Zakład Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie, od 1 stycznia 2003 roku do 15 kwietnia 2013 roku zgłoszono w Polsce 241 przypadków zachorowań (www.pzh.gov.pl). Należy jednak podkreślić, że w opinii specjalistów liczba przypadków jest niedoszacowana ze względu na większość nierozpoznawalnych pod względem czynnika etiologicznego przypadków zapalenia płuc.

Szczególne zainteresowanie budzą aktualne doniesienia McDonough i współautorów z 2007 roku o zakażeniach legionellozą wśród młodych amerykańskich rekrutów wojskowych. W badaniach McDonough gatunek *L. pneumophila* zidentyfikowano metodą multiplex PCR w wymazach z jamy nosowo-gardłowej u pięciu badanych w wieku od 18 do 28, u których wcześniej rozpoznano na podstawie objawów klinicznych oraz obrazu RTG klatki piersiowej zapalenie płuc. Na podstawie tych wyników badań stwierdzono, że przypuszczalnym rezerwuarem pałeczek *Legionella* były systemy wody ciepłej w koszarach, ośrodkach sportowych oraz system klimatyzacji (McDonough i in., 2007).

Rejestrowane stale nowe zachorowania oraz ogniska epidemiczne skłaniają do badaczy do monitorowania potencjalnych rezerwuarów *Legionella*, które stanowią źródło zakażenia nie tylko dla osób z obniżoną odpornością, ale i osób zdrowych bez czynników ryzyka. Zgodnie z Ustawą Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 roku „W sprawie wymagań dotyczących jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi” istnieje obowiązek kontroli sieci wody użytkowej na obecność bakterii z rodzaju *Legionella*, a w przypadku wykrycia *L. pneumophila* serogrupy 1 (SG 1) lub zwiększonej ponad normę liczby bakterii ($>10^2$ CFU/100 ml wody) pozostałych grup serologicznych istnieje konieczność eradykacji tych bakterii z systemu.

Doniesienia o zakażeniach *L. pneumophila* wśród personelu wojskowego oraz brak informacji na temat występowania pałeczek *L. pneumophila* w systemach sieci wody użytkowej obiektów wojskowych w Polsce skłonił autorów pracy do przeprowadzenia badań mikrobiologicznych próbek środowiskowych (McDonough i in., 2007; Velasco i in., 2011).

Materiał i metody

Materiałem do przeprowadzonych badań były próbki wody ciepłej i zimnej pobrane z instalacji sieci wodociągowej 4 budynków koszarowych znajdujących się na terenie jednostki wojskowej oraz 1 szpitala wojskowego. Do badań pobrano 32 próbki (każda o objętości 1000 ml), w tym 30 próbek pobrano z instalacji wody ciepłej i 2 próbki z instalacji wody zimnej. Probki wody do badań pobrano, transportowano i przechowywano zgodnie z zasadami zawartymi w normach: PN-EN ISO 19458: 2007, PN-ISO 11731: 2002 oraz PN EN ISO 11731-2: 2008, a punkty poboru próbek

były zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. i były one następujące: wpływ ze zbiornika wody ciepłej lub najbliższy punkt czerpalny, punkt czerpalny najdalej położony od zbiornika wody ciepłej, woda powracająca do podgrzewacza (recyrkulacyjna), wybrane punkty pośrednie, liczba zależna od wielkości systemu.

Oznaczenie liczby bakterii z rodzaju *Legionella* w próbkach wody wykonano metodą filtracji membranowej (FM) i/lub metodą posiewu powierzchniowego zgodnie z następującymi normami: PN-ISO 11731:2002 „Jakość wody. Wykrywanie i oznaczanie bakterii z rodzaju *Legionella*” oraz PN-EN ISO 11731-2:2008 „Jakość wody – Wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakterii z rodzaju *Legionella* – Część 2: Metodyka filtracji membranowej dla wód o małej liczbie bakterii”.

Uzyskane wyniki przedstawiono, jako CFU (*colony forming units*) *Legionella* w przeliczeniu na określoną objętość wody, ich nieobecność potwierdzono, jako „nie wykryto” w badanej objętości próbki.

Wyniki badań

W sieci wodociągowej wszystkich przebadanych budynków koszarowych znajdujących się na terenie jednostki wojskowej oraz szpitala wojskowego wykazano obecność *L. pneumophila* SG 2-14 (Tabela 1, Tabela 2). Nie stwierdzono jednak obecności najbardziej zjadliwej *L. pneumophila* SG 1 oraz nie wykryto pałeczek w próbkach wody zimnej.

Tabela 1. Wyniki badania w kierunku obecności bakterii *L. pneumophila* w próbkach wody pobranych z budynków koszarowych na terenie jednostki wojskowej

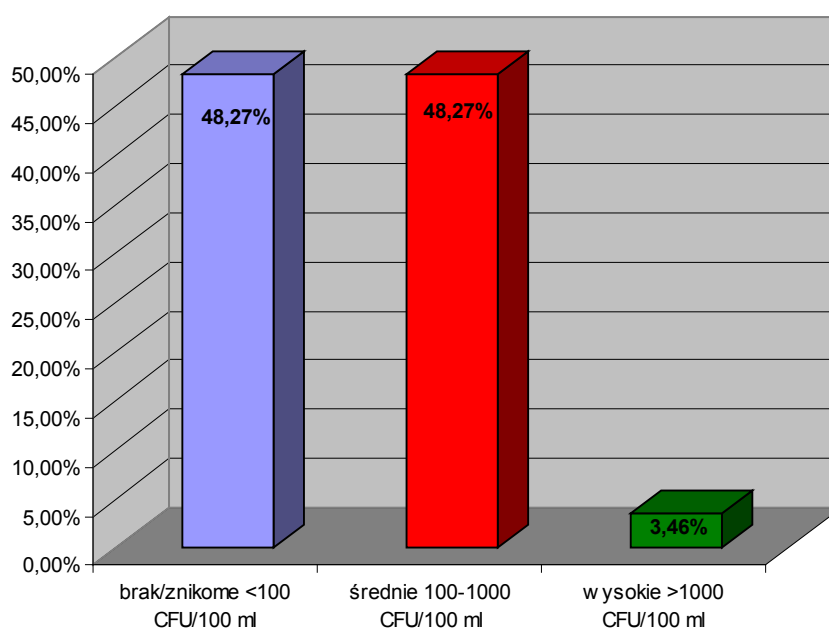
Miejsca pobrania próbek	Wykrywana liczba <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 (CFU/100 ml)
Budynek nr 1	0,8
	1
	1,8
	0,02
Budynek nr 2	2,8
	1,2
	42,2
Budynek nr 3	42
	38
Budynek nr 4	178
	54,9

Tabela 2. Wyniki badania w kierunku obecności bakterii *L. pneumophila* w próbkach wody pobranych z instalacji sieci wodociągowej w szpitalu wojskowym

Miejsca pobrania próbek	Wykrywana liczba <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 (CFU/100 ml)
Najbliższy punkt czerpalny	197,8
	161
	900
	147
	141

<u>Punkty pośrednie</u>	
Oddział I	174
	175
Oddział II	141,8
	66,5
	281
Oddział III	61,6
	44,2
	245
Oddział IV	136
	588
	209
Oddział V	15,24
	2225

Zgodnie z obowiązującym rozporządzeniem Ministra Zdrowia (Dz. U. Nr. 61 poz. 417) wyróżnia się trzy poziomy skażenia wody bakteriami z rodzaju *Legionella*: brak/niski <100 CFU/100 ml, średni 100-1000 CFU/100 ml, wysoki >1000 CFU/100 ml, bardzo wysoki >10 000 CFU/100 ml. Na Rycinie 1 przedstawiono odsetek przebadanych próbek wody ciepłej z uwzględnieniem stopnia skażenia *L. pneumophila* SG 2-14.



Rycina 1. Odsetek przebadanych próbek wody z uwzględnieniem stopnia skażenia bakteriami *L. pneumophila* SG 2-14

Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano, że w jednym budynku koszarowym liczba bakterii *L. pneumophila* przekraczała dopuszczalny poziom >10² CFU/100 ml – 178 CFU/100 ml. Zaobserwowano, że w pozostałych budynkach koszarowych liczba *L. pneumophila* była <10² CFU/100 ml (zakres 0,02–54,9 CFU/100 ml). Stwierdzono, że w przebadanym szpitalu wojskowym w 77,77% pobranych próbkach wody, liczba pałeczek *L. pneumophila* była >10² CFU/100 ml (zakres 136–2225 CFU/100 ml). Wykazano, że tylko na jednym oddziale szpitalnym stwierdzono wysoki poziom skażenia >10³ CFU/100 ml.

Dyskusja

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania pozwoliły określić zagrożenie związane z mikrobiologicznym skażeniem wewnętrznych instalacji wody użytkowej przez bakterie *L. pneumophila* w obiektach wojskowych. Podjęcie badań na ten temat było związane z ostatnimi doniesieniami McDonough i wsp. oraz Velasco i wsp. o zarejestrowanych nowych zachorowaniach wśród zdrowych, młodych osób nie zaliczanych do grup ryzyka zakażenia *Legionella*. Ponadto, podjęcie takiego tematu badawczego wynikało z braku badań sieci wodociągowej obiektów wojskowych na obecność bakterii *Legionella* w Polsce (McDonough i in., 2007, Velasco i in., 2011).

Z dostępnej literatury wynika, że głównym źródłem zakażenia bakteriami z rodzaju *Legionella* są systemy sieci wodociągowej dużych obiektów użyteczności publicznej. Dane wskazują, że 30-87% sieci wodnej różnych obiektów jest skolonizowana przez pałeczki *Legionella* (Leoni i in., 2005). Badania przeprowadzone przez Blatt i wsp. w wojskowym centrum medycznym potwierdzają znaczenie systemów dystrybucji wody użytkowej, jako źródła zakażenia pałeczkami *Legionella*. Badacze wykazali w swoich badaniach obecność *L. pneumophila* SG 1, które zostały również zidentyfikowane u zakażonych pacjentów podczas epidemii choroby legionistów (Blatt i in., 1993).

W Polsce od 1 stycznia 2008 roku, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 roku, w budynkach zamieszkania zbiorowego, w tym również w zakładach opieki zdrowotnej zamkniętej należy wykonywać badania w kierunku bakterii *Legionella*. Zgodnie z powyższym rozporządzeniem w przypadku stwierdzenia znacznego skażenia systemu wodnego przez *Legionella* należy wprowadzić odpowiednie procedury czyszczenia, dezynfekcji systemu oraz monitorowania parametrów fizycznych i chemicznych wody.

Systemy dystrybucji wody ciepłej obiektów wojskowych poddane badaniom w prezentowanej pracy były skolonizowane przez pałeczki *L. pneumophila*. Wykazano, że w 51,72% próbkach wody, liczba *L. pneumophila* przekraczała dopuszczalny poziom (>100 CFU/100 ml). Zaobserwowano także, że tylko w 3,46% pobranych próbkach wody stwierdzono wysoki poziom skażenia (>1000 CFU/100 ml).

Mazurkiewicz i wsp. z Wojskowego Ośrodka Medycyny Prewencyjnej we Wrocławiu dokonali analizy ryzyka zakażenia i kolonizacji sieci wodociągowej pałeczkami *L. pneumophila* na podstawie badań mikrobiologicznych próbek wody pochodzących z budynków szpitalnych i budynków uzdrowiskowo-rehabilitacyjnych na terenie województw: dolnośląskiego, lubuskiego, opolskiego i śląskiego. Badacze stwierdzili obecność bakterii *L. pneumophila* w 84,45% próbek wody, z czego, aż w 71,00% próbkach wykazano obecność *L. pneumophila* SG 2-15, a w 13,40% próbek potwierdzono obecność *L. pneumophila* SG 1. W badaniach prowadzonych przez Mazurkiewicza i wsp. tylko w jednym z sześciu przebadanych szpitali nie stwierdzono kolonizacji sieci wodnej bakterii z rodzaju *Legionella*. Oceniając poziom skażenia sieci wodociągowej ciepłej wody wykazano, że w 59,70% próbkach wody, liczba bakterii nie przekraczała 10^2 CFU/100 ml wody. Stwierdzono także, że w 35,70% próbek wody zawartość bakterii zawierało się w zakresie 10^2 - 10^3 CFU/100 ml; a w 4,60% próbek była powyżej 10^3 CFU/100 ml (Mazurkiewicz i in., 2011).

Badania środowiskowe prowadzone przez Legnani i wsp. w 11 prywatnych zakładach opieki zdrowotnej w Bolonii, wykazały że wszystkie systemy wodne były skażone przez *L. pneumophila* SG 1, która występowała w 86,80% badanych próbek. *Legionella* została wyizolowana z próbek wody o temperaturze powyżej 50°C. W pracy stwierdzono związek między temperaturą wody, a stopniem skażenia sieci. Zaobserwowano, że niższa liczba *Legionella* była tam, gdzie temperatura wody była w zakresie od 58 do 62°C. We Włoszech nie ma jednak wymagań i standardów dotyczących kontroli bakterii *Legionella* w prywatnych zakładach opieki zdrowotnej. Monitoring jest zalecany tylko w szpitalach, gdzie na oddziałach znajdują się pacjenci należący do grupy podwyższonego ryzyka zakażenia oraz w przypadku stwierdzonych zachorowań na legionelozę. Według Legnani i wsp. mimo dużego skażenia sieci wodociągowej przez *L. pneumophila* SG 1 nie pojawiły się przypadki legionelozy (Legnani i in., 2002).

Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych. W przebadanym szpitalu wojskowym w 77,77% próbek wody liczba pałeczek *L. pneumophila* przekraczała dopuszczalny poziom ($>10^2$ CFU/100 ml), a tylko w jednej próbce wody stwierdzono wysoki poziom skażenia $>10^3$ CFU/100 ml (2225 CFU/100 ml). Nie stwierdzono jednak występowania najbardziej niebezpiecznej pod względem epidemicznym *L. pneumophila* SG 1. We wszystkich przebadanych próbkach wody wykryto *L. pneumophila* SG 2-14. Dane z Polski dotyczące najczęściej izolowanej z wewnętrznej instalacji wody użytkowej serogrupy *L. pneumophila* są jednak zróżnicowane. Z danych z piśmiennictwa wynika, że w innych krajach europejskich najczęściej izolowaną z próbek środowiskowych serogrupą *L. pneumophila* jest SG 1 (Legnani i in., 2002, Mazurkiewicz i in., 2011).

Zdaniem badaczy, w celu zapobiegania kolonizacji oraz namnażania się pałeczek *Legionella* w systemach wodociągowych należy zwrócić szczególną uwagę na odpowiednie rozwiązania techniczne podczas projektowania instalacji oraz właściwą jej eksploatację. Należą do nich m.in.: utrzymywanie odpowiedniej temperatury wody w sieci poza zakresem optymalnym dla namnażania bakterii z rodzaju *Legionella* (poniżej 20°C dla wody zimnej lub powyżej 55°C dla wody ciepłej), izolowanie od siebie instalacji wody ciepłej i zimnej, usunięcie ślepych odcinków sieci i miejsc zastoju wody, zminimalizowanie długości przewodów służących do przesyłania wody, odpowiednia konstrukcja podgrzewaczy do wody i zbiorników na wodę, zapewniająca łatwy dostęp do nich i możliwość dezynfekcji czy mechanicznego usuwania osadów i produktów korozji oraz zapewnienie odpowiedniego stężenia środka dezynfekującego w wodzie (Pearson 2000; Wichrowska i in., 2004).

Wnioski

1. We wszystkich przebadanych obiektach wojskowych stwierdzono kolonizację sieci wody użytkowej bakteriami *L. pneumophila* SG 2-14, co wskazuje na zagrożenie zakażeniem.
2. Nie stwierdzono obecności najbardziej wirulentnej *L. pneumophila* SG 1.
3. W celu zmniejszenia ryzyka zakażenia *Legionella* należy stale monitorować sieć wody użytkowej, a w przypadku zwiększonej ponad normę liczby bakterii zastosować odpowiednią metodę eradykacji.

Literatura:

1. Blatt S.P., Parkinson M.D., Hoffman P., Dolan D., Lauderdale P., Zajac R.A., Melcher G.P. (1993), *Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition*. Am J Med. 1993, 95, 16-22.
2. Breiman R.F., Butler J.C. (1998), *Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives*. Semin Respir Infect. 13, 84-89.
3. Diederer B.M.W. (2008), *Legionella spp. and Legionnaires' disease*. J Infect.; 56: 1-12.
4. Fields BS, Benson RF, Besser RE. (2002), *Legionella and legionnaires' disease: 25 years of investigation*. Clin Microb Rev. 15, 506-526.
5. Legnani P., Leoni E., Corradini N. (2002), *Legionella contamination of hospital water supplies: monitoring of private healthcare in Bologna, Italy*. J Hosp Infect. 50, 220-223.
6. Leoni E., De Luca P.P., Legnani R., Sacchetti R., Stampi S., Zanetti F. (2005) *Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems*. J Appl Microbiol. 98, 373-379.
7. Marrie T.J. (2008) *Legionnaires' disease – clinical picture*. W: Hoffman P., Friedman H., Bendinelli M.: *Legionella pneumophila – pathogenesis and immunity*. New York, Springer 8, 133-150.
8. Matuszewska R., Krogulska B. (2009), *Problem występowania pałeczek Legionella w instalacjach i urządzeniach wytwarzających aerozol wodno-powietrzny w obiektach służby zdrowia*. Nowa Med. 1, 56-60.
9. Mazurkiewicz J., Jakubowska O., Szulc J. (2011), *Kolonizacja sieci wodnej szpitali pałeczkami Legionella pneumophila na podstawie analizy danych z badań mikrobiologicznych Wojskowego Ośrodka Medycyny Prewencyjnej we Wrocławiu – część 1*. Forum Zakażeń 2, 1-6.
10. McDonough E.A., Metzgar D., Hansen C.J., Myers C.A., Russell K. (2007), *A cluster of Legionella-associated pneumonia cases in a population of military recruits*. J Clin Microbiol. 45, 2075-2077.
11. O'Neill E., Humphreys H. (2005), *Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence?* J Hosp Infect. 59, 273-279.
12. Palusińska-Szyszk M., Cendrowska-Pinkosz M. (2008), *Występowanie i chorobotwórczość bakterii z rodziny Legionellaceae*. Postępy Hig Med Dośw. 62, 337-353.
13. Pancer K., Stypułkowska-Misiurewicz H. (2009), *Epidemiologia zachorowań wywołanych przez Legionella sp.* Nowa Med. 1, 61-65.
14. Pearson W. (2000), *Legionella – An update and statement by the association of water technologies*. AWT, 1-21.
15. Poupard M., Campese C., Bernillon P., Che D. (2007), *Factors associated with mortality Legionnaires' disease, France, 2002-2004*. Med Mal Infect. 37, 325-330.
16. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz. U. Nr. 61 poz. 417.
17. Sikora A., Koziół-Montewka M., Książek A., Wójtowicz M., Paluch-Oleś J., Magryś A., Grzebalska A., Bednarek-Skublewska A., Steć A., Rudzki S., Furmaga J., Matuszewska R., Krogulska B. (2013), *Assessment of cytokine release after in vitro stimulation of whole blood with Legionella pneumophila in immunocompromised patients*. Immunol Invest. 42, 1-17.
18. Wichrowska B., Stankiewicz A., Maziarka D. (2004), *Monitorowanie zagrożeń związanych z występowaniem bakterii z rodzaju Legionella w wodzie wodociągowej*. Instal 11, 11-16.
19. www.ecdc.europa.eu (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC Surveillance Report Legionnaires' disease in Europe 2011).
20. www.pzh.gov.pl (Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce).
21. Velasco J.M., Yoon I.K., Jarman R.G., Bodhidatta L., Klungthong C., Silapong S., Valderama M.T., Wongstitwilairoong T., Torres A.G., De Cecchis D.P., Pavlin J.A. (2011), *Applications of PCR (real-time and MassTag) and enzyme-linked immunosorbent assay in diagnosis of respiratory infections and diarrheal illness among deployed U.S. military personnel during exercise Balikatan 2009, Philippines*. Mil Med. 176, 1096-1100.

OCCURRENCE OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* BACTERIUM IN MILITARY FACILITIES

Agnieszka Sikora¹, Maria Koziół-Montewka^{1,2}, Iwona Gładysz²,
Małgorzata Wójtowicz-Bobin¹, Paulina Dobosz¹, Anna Sikora³

¹Chair and Department of Medical Microbiology, Medical University in Lublin

²Pope John Paul II State School of Higher Education in Biała Podlaska

³Gynaecology and Obstetrics and Pregnancy Pathology Ward, Pope John Paul II Independent Public
Voivodeship Hospital in Zamość

Sikora A., Koziół-Montewka M., Gładysz I., Wójtowicz-Bobin M., Dobosz P., Sikora A. (2013), *Occurrence of Legionella pneumophila bacterium in military facilities*. Human and Health, 2 (VII), p. 39-45

Summary:

Thesis' objective: Registered infections of *Legionella* bacteria and epidemic spots create the need to monitor *Legionella* reservoirs, which are the source of infection for immunodeficient people as well as for healthy people without risk factors. Materials and methods: Water samples drawn from water system installations from 4 barrack buildings and one military hospital served as a material for the research. The number of *Legionella* bacteria in water samples was denoted in accordance with the operative norms. Results: On the basis of tests of drawn water samples from water system installations in all examined military facilities, the presence of *L. pneumophila* SG 2-14 was detected, but the presence of the most virulent *L. pneumophila* SG 1 was not ascertained. It was noticed, however, that only in one barrack building the number of *L. pneumophila* bacteria was above the acceptable level $>10^2$ CFU/100 ml. In 77.77% of water samples in the examined military hospital, the number of *L. pneumophila* bacilli was $>10^2$ CFU/100 ml. Conclusions: In order to reduce the risk of *Legionella* infection water system installation should be constantly monitored. In case of the above norm number of bacteria, the appropriate method of eradication should be applied.

Key words: *Legionella pneumophila*, legionnaire's disease, water distribution system

Introduction

Legionella bacteria are the etiologic factor for legionelozis, the clinical course of which may have the form of legionnaire's disease (legionnaire's pneumonia, pneumonic form), Pontiac fever and severe extrapulmonary form with septic syndrome (Diederens 2008).

In the opinion of some researchers pulmonary form constitute from 1 to 5% of all *Legionella* caused morbidity. Mortality among patients with this form is high and oscillates between 15-20%. Immunodeficient inpatients' morbidity even exceeds 30% (Matuszewska, Krogulska 2009). Mild form with symptoms similar to influenza - Pontiac fever occurs in over 90% of subject population (Fields in., 2002). In this form of legionnaire's disease symptoms of pneumonia are not detected, which is connected with lack of bacteria proliferation in pulmonary macrophage (Palusińska-Szych, Cendrowska-Pinkosz 2008).

In accordance with literature, *Legionella pneumophila* is responsible for majority of recognized legionnaire's diseases (80-90%). It is ascertained that 50-75% of infections are caused by *L. pneumophila* which belongs to serogroup 1 (SG 1). The remaining strains of *Legionella* are rarely isolated (O'Neill, Humphreys 2005; Matuszewska, Krogulska 2009).

First information in literature about legionnaire's disease (LD) comes from 1976, when pneumonia epidemic was recognized among participants of the annual convention of war veterans of American Legion in Pennsylvania, Philadelphia. Among 3683 convent members, which were accommodated in luxurious hotel *Bellevue Stratford*, 182 persons became ill, 146 (80%) of which required immediate hospitalization due to the severe condition. During that time, 39 infections were recorded among hotel service employees. As a result of the infection, 34 persons died (Marrie 2008). Due to intensive tests, it was proven that the cause of the disease was new, unknown infection factor, which was called by the researchers *Legionella pneumophila*: *Legionella* - after legionnaires, which were infected during the convention; *pneumophila* - "lungs loving", due to the bacteria affinity to alveolar macrophages and epithelial cells of alveolus. It was also ascertained, that *Legionella* bacteria in ventilation system were the source of the infection (Marrie 2008).

Address for correspondence: Agnieszka Sikora, Chair and Department of Medical Microbiology, Medical University in Lublin, Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: agnieszka.sikora24@wp.pl

According to O'Neill, the infection is the result of water and air aerosol inhalation of the drop diameter 2.0-2.5 µm or aspiration of water contaminated with *Legionella*. Cases of disease spreading from one man to another have not been recorded so far (O'Neill, Humphreys 2005).

In the opinion of many researchers, *Legionella* spp. commonly occurs in natural and man-made bodies of water. The main source of the infection and the reservoir of bacteria are water installations in residential and public utility buildings. *Legionella* proliferation occurs also in air condition systems. However, the most dangerous is the presence of *Legionella* bacilli in utility water distribution systems in hospitals, in medical apparatus (for example, dialysis machine, respirators, inhalers, air humidifiers) and in dental turbines used in dental surgeries. It creates the risk of other people's infection by those bacteria, especially immunodeficient patients in closed medical care settings (Matuszewska, Krogulska 2009; Breiman, Butler 1998).

In accordance with the available literature, older people over 60, people abusing alcohol or nicotine, people with intercurrent diseases (for example, diabetes, chronic disease of respiratory system, renal failure, cancer) are more prone to infections. In accordance with some information, personnel in hospitals, dental surgeries, industrial plants, car washes, as well as travelling persons, using hotels and air-condition constitute the risk group.

According to *European Working Group for Legionella Infections*, EWGLI, there are three types of legionnaire's disease depending on the place where infection was acquired. The first type is called CAP-LD - *community acquired pneumonia-legionnaire's disease*. This type of disease is acquired in the place of residence, workplace, recreational area. The second type is TAP-LD - *travel associated pneumonia-legionnaire's disease*. It is connected with travelling (abroad or within the country). The third type of legionnaire's disease is called by the researchers HAP-LD - *hospital acquired pneumonia-legionnaire's disease* and is acquired during hospitalization or health resort treatment (hydrotherapy) (Pancer, Stypułkowska-Misiurewicz 2009).

According to the latest report *European Legionnaires' Disease Surveillance Network* (ELDSNet) published in 2011, 4,897 cases of disease were recorded in Europe, majority of which were acquired in the place of residence (67%). Infections acquired during the travel constituted the remaining 24% of cases, while only 7% of diseases were connected with treatment or stay in health resort. The data published by ELDSNet show that 77% infected people constituted those over 50 (www.ecdc.europa.eu).

According to the official data placed in the newsletter "Infectious diseases and poisonings in Poland", elaborated by Department of Epidemiology of National Institute of Public Health - National Institute of Hygiene in Warsaw, from January 1, 2003 to April 15, 2013, there were 241 cases of the disease (www.pzh.gov.pl). It should be emphasized that in the opinion of specialists the number of cases is underestimated due to the fact that majority of pneumonia are unrecognizable with regard to the etiologic factor.

Disproportionate share of interest receives current information from McDonough and co-authors from 2007 about legionnaire's disease among young American military recruits. In McDonough's research *L. pneumophila* strain was identified by multiplex PCR method in nasal and pharyngeal swabs from 5 subjects of the age 18-28, who had had pneumonia recognized on the basis of clinical symptoms and X-ray of the chest. On the basis of those results it was ascertained that the supposed reservoir of *Legionella* bacillus was hot water systems in barrack buildings, sport centres, and air-condition systems (McDonough i in., 2007).

The new permanently recorded diseases and epidemic centres prompt researchers to conduct the monitoring of the potential *Legionella* reservoirs, which are the source of the disease of immunodeficient persons as well as of healthy persons without risk factors. Pursuant to the Act of Health Minister of March 29, 2007 "On requirements with regard to quality of water destined for consumption" there is an obligation of utility water systems inspection for the presence of *Legionella* bacteria. In case of the detected *L. pneumophila* serogroup 1 (SG 1) or above norm number of bacteria ($>10^2$ CFU/100 ml. of water) in other serogroups, there is a necessity to eradicate those bacteria from the system.

Information on *L. pneumophila* diseases among military personnel and lack of information on the presence of *L. pneumophila* bacilli in utility water systems of military facilities in Poland prompted authors of the paper to conduct tests on microbiological environmental samples (McDonough i in., 2007, Velasco i in., 2011).

Materials and methods

Samples of hot and cold water from water system installation of 4 barrack buildings on the territory of military unit and one military hospital constituted the material for the research. 32 samples were taken to the analysis (1000 ml. each), including 30 samples drawn from hot water installation and 2 samples from cold water installation. Samples were drawn, transported and stored in accordance with the rules contained in the norms: PN-EN ISO 19458: 2007, PN-ISO 11731: 2002 and PN EN ISO 11731-2: 2008. Samples' uptake points were compliant with the ordinance of Health Ministry of March 29, 2007 and included the following places: outflow of hot water reservoir or the nearest uptake point, the farthest from the hot water reservoir uptake point, the water going back to the heater (recirculation), chosen indirect points, the number depending on the size of the system.

Denotation of the *Legionella* bacteria number in water samples were realized through the membrane filtration method (FM) and/or the method of surface culture compliant with the following norms: PN-ISO 11731:2002 "Quality of water. Detection and denotation of *Legionella* bacteria" and PN-EN ISO 11731-2:2008 "Quality of water - Detection and quantitative denotation of *Legionella* bacteria - Part 2: Methodology of membrane filtration for waters with small bacteria number"

The obtained results were presented as *Legionella* CFU (colony forming units), converted to certain water volume. Their absence was ascertained as "not detected" in the analysed sample volume.

Research results

The presence of *L. pneumophila* SG 2-14 was detected in water systems of all examined barrack buildings on the territory of military unit and military hospital (Tabela 1, Tabela 2). The presence of the most virulent *L. pneumophila* SG 1 was not ascertained and no bacilli was detected in cold water samples.

Table 1. Results of the test concerning the presence of *L. pneumophila* bacteria in water samples drawn from barrack buildings on the territory of military unit.

Place of sample uptake	Detected number of <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 (CFU/100 ml.)
Building no. 1	0,8
	1
	1,8
	0,02
Building no. 2	2,8
	1,2
	42,2
Building no. 3	42
	38
Building no. 4	178
	54,9

Table 2. Results of the test concerning the presence of *L. pneumophila* bacteria in water samples drawn from water system installation in military hospital.

Place of sample uptake	Detected number of <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 (CFU/100 ml.)
<u>The nearest uptake point</u>	197,8
	161
	900
	147
	141
Indirect points	174
Detachment I	175
Detachment II	141,8
	66,5
	281

Detachment III	61,6
	44,2
	245
Detachment IV	136
	588
	209
Detachment V	15,24
	2225

Pursuant to the operative ordinance of Health Ministry (Journal of Law [Dz.U] no. 61 item 417) there are three levels of *Legionella* bacteria water contamination: low/high <100 CFU/100 ml., medium 100-1000 CFU/100 ml., high >1000 CFU/100 ml., very high >10 000 CFU/100 ml. In the figure 1, the proportion of the analyzed hot water samples was presented with the level of *L. pneumophila* SG 2-14 contamination taken into account.

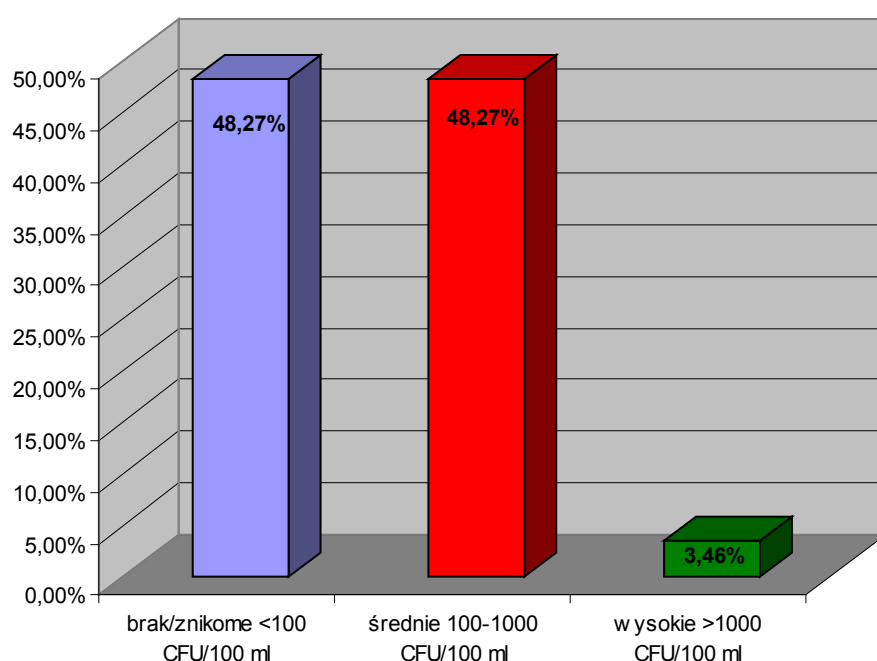


Figure 1. The proportion of the analyzed water samples with the level of *L. pneumophila* SG 2-14 contamination taken into account.

On the basis of the obtained tests results, it was proven that in one barrack building the number of *L. pneumophila* bacteria was above the acceptable level >10² CFU/100 ml – 178 CFU/100 ml. It was observed that in the remaining barrack buildings the number of *L. pneumophila* was <10² CFU/100 ml (scope 0,02–54,9 CFU/100 ml). It was ascertained that in the examined military hospital in 77,77% of water samples the number of *L. pneumophila* was >10² CFU/100 ml (scope 136-2225 CFU/100 ml). It was also shown that high level of contamination >10³ CFU/100 ml was detected in one hospital ward.

Discussion

The research conducted in this paper allowed to determine the danger connected with microbiological contamination of *L. pneumophila* bacteria inside the utility water installations in military facilities. This research was conducted because of recent information from McDonough et. al. and Velasco et. al. on new diseases recorded among young, healthy persons which does not belong to the risk groups of *Legionella* infection. Moreover, the subject undertaken resulted from lack of research for the presence of *Legionella* bacteria in water systems of polish military facilities (McDonough i in., 2007, Velasco i in., 2011).

According to the available literature, water systems of large public utility objects are the main source of *Legionella* bacteria infection. Data from literature indicate that in 30-87% of water systems in various objects *Legionella* bacilli are present (Leoni i in., 2005). Research conducted by Blatt et al. authors in military medical centre confirms the importance of utility water distribution systems as a source of *Legionella* bacilli infection. Researchers have indicated the presence of *L. pneumophila* SG 1, which was also identified in infected patients during epidemic of legionnaire's disease (Blatt i in., 1993).

Pursuant to the ordinance of Health Ministry of March 29, 2007, from January 1, 2008 in collective residence buildings in Poland, including also closed health centres, tests on *Legionella* presence should be conducted. In accordance with the above ordinance, in case of sizeable *Legionella* contamination in water systems, appropriate procedures should be applied with regard to cleaning, disinfection of the system and monitoring of physical and chemical water parameters.

Hot water distribution systems of military facilities that were subject to the examination in this thesis were contaminated by *L. pneumophila* bacilli. It was shown that in 51.72% of water samples, the number of *L. pneumophila* exceeded the acceptable level (>100 CFU/100 ml). It was also observed that only in 3.46% of water samples high level of contamination was ascertained (>1000 CFU/100 ml).

Mazurkiewicz et al. from Military Centre of Preventive Medicine in Wrocław) has conducted analysis of contamination risk and colonisation of water systems by *L. pneumophila* bacilli on the basis of microbiological water samples from hospital buildings and health resort and rehabilitation buildings on the territory of Lower Silesian, Lubusz, Opolskie, and Silesian voivodeship. The researchers discovered the presence of *L. pneumophila* bacteria in 84.45% of water samples, including 71.00% of samples with the presence of *L. pneumophila* SG 2-15 and 13.40% of samples with the presence of *L. pneumophila* SG 1. In the research conducted by Mazurkiewicz et al. only in one out of six examined hospitals colonisation of *Legionella* bacteria in water system was not found. During the assessment of hot water system level of contamination it was shown that in 59.70% of water samples the number of bacteria did not exceed 10^2 CFU/100 water ml. It was also discovered that in 35.70% of water samples the bacteria were present in the water scope 10^2 - 10^3 CFU/100 ml; and in 4.60% of samples in above 10^3 CFU/100 ml (Mazurkiewicz i in., 2011).

Environmental research conducted by Legnani et al. in 11 private health centres in Bologna, has shown that all water systems were contaminated by *L. pneumophila* SG 1, which occurred in 86.80% of examined samples. *Legionella* has been isolated from water samples in the temperature over 50°C. The relation between water temperature and the level of water system contamination was shown in the thesis. It was also observed that the lower number of *Legionella* occurred in places where water temperature was between 58-62°C. In Italy there are no requirements and standards with regard to the *Legionella* bacteria inspection in private health centres. Monitoring is recommended only in hospitals where in wards are patients belonging to the high-risk group and in case of confirmed cases of legionnaire's diseases. According to Legnani et al., in spite of large water system contamination by *L. pneumophila* SG 1, no cases of legionnaire's disease were present (Legnani i in., 2002).

Similar results were obtained in the author's research. In the examined military hospital in 77.77% of water samples the number of *L. pneumophila* bacilli exceeded the acceptable level ($>10^2$ CFU/100 ml) and only in one water sample high contamination level $>10^3$ CFU/100 ml (2225 CFU/100 ml) was discovered. However, the most dangerous regarding epidemic - *L. pneumophila* SG 1 - was not present. *L. pneumophila* SG 2-14 was discovered in all examined water samples. However, data from Poland regarding serogroup *L. pneumophila* that are the most frequently isolated from internal utility water systems are differentiated. In accordance with literature, in other European countries the most frequently isolated serogroup *L. pneumophila* is SG 1 (Legnani i in., 2002, Mazurkiewicz i in., 2011).

In the opinion of researchers, in order to prevent colonization and proliferation of *Legionella* bacilli in water systems, special attention should be paid to the appropriate technical solutions during creation of installation projects and to its proper exploitation. It includes: maintenance of appropriate water temperature in the water system in the period excluded from the time of *Legionella* bacteria proliferation (below 20°C for cold water and above 55°C for hot water), isolation of hot water installation from cold water installation, removal of blind sections and places of backwater from water systems, minimization of water tracts length, appropriate construction of water heaters and water reservoirs enabling easy access to them and possibility of disinfection or mechanical removal of sediments or corrosion products and ensuring appropriate concentration of disinfectants Pearson 2000; Wichrowska i in., 2004).

Conclusions

1. In all examined military facilities, *L. pneumophila* SG 2-14 colonisation in utility water systems was detected, which indicates the danger of infection.
2. The presence of the most virulent form - *L. pneumophila* SG 1 was not detected.
3. In order to minimize the risk of *Legionella* infection, utility water system should be constantly monitored and in case of above norm number of bacteria, appropriate eradication method should be applied.

References:

1. Blatt S.P., Parkinson M.D., Hoffman P., Dolan D., Lauderdale P., Zajac R.A., Melcher G.P. (1993), *Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition*. Am J Med. 1993, 95, 16-22.
2. Breiman R.F., Butler J.C. (1998), *Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives*. Semin Respir Infect. 13, 84-89.
3. Diederer B.M.W. (2008), *Legionella spp. and Legionnaires' disease*. J Infect.; 56: 1-12.
4. Fields BS, Benson RF, Besser RE. (2002), *Legionella and legionnaires' disease: 25 years of investigation*. Clin Microb Rev. 15, 506-526.
5. Legnani P., Leoni E., Corradini N. (2002), *Legionella contamination of hospital water supplies: monitoring of private healthcare in Bologna, Italy*. J Hosp Infect. 50, 220-223.
6. Leoni E., De Luca P.P., Legnani R., Sacchetti R., Stampi S., Zanetti F. (2005) *Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems*. J Appl Microbiol. 98, 373-379.
7. Marrie T.J. (2008) *Legionnaires' disease – clinical picture*. W: Hoffman P., Friedman H., Bendinelli M.: *Legionella pneumophila – pathogenesis and immunity*. New York, Springer 8, 133-150.
8. Matuszewska R., Krogulska B. (2009), *Problem występowania pałeczek Legionella w instalacjach i urządzeniach wytwarzających aerozol wodno-powietrzny w obiektach służby zdrowia*. Nowa Med. 1, 56-60.
9. Mazurkiewicz J., Jakubowska O., Szulc J. (2011), *Kolonizacja sieci wodnej szpitali pałeczkami Legionella pneumophila na podstawie analizy danych z badań mikrobiologicznych Wojskowego Ośrodka Medycyny Prewencyjnej we Wrocławiu – część 1*. Forum Zakażeń 2, 1-6.
10. McDonough E.A., Metzgar D., Hansen C.J., Myers C.A., Russell K. (2007), *A cluster of Legionella-associated pneumonia cases in a population of military recruits*. J Clin Microbiol. 45, 2075-2077.
11. O'Neill E., Humphreys H. (2005), *Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence?* J Hosp Infect. 59, 273-279.
12. Palusińska-Szys M., Cendrowska-Pinkosz M. (2008), *Występowanie i chorobotwórczość bakterii z rodziny Legionellaceae*. Postępy Hig Med Dośw. 62, 337-353.
13. Pancer K., Stypułkowska-Misiurewicz H. (2009), *Epidemiologia zachorowań wywołanych przez Legionella sp.* Nowa Med. 1, 61-65.
14. Pearson W. (2000), *Legionella – An update and statement by the association of water technologies*. AWT, 1-21.
15. Poupard M., Campese C., Bernillon P., Che D. (2007), *Factors associated with mortality Legionnaires' disease, France, 2002-2004*. Med Mal Infect. 37, 325-330.
16. *Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi*. Dz. U. Nr. 61 poz. 417.
17. Sikora A., Koziół-Montewka M., Książek A., Wójtowicz M., Paluch-Oleś J., Magryś A., Grzebalska A., Bednarek-Skublewska A., Steć A., Rudzki S., Furmaga J., Matuszewska R., Krogulska B. (2013), *Assessment of cytokine release after in vitro stimulation of whole blood with Legionella pneumophila in immunocompromised patients*. Immunol Invest. 42, 1-17.
18. Wichrowska B., Stankiewicz A., Maziarka D. (2004), *Monitorowanie zagrożeń związanych z występowaniem bakterii z rodzaju Legionella w wodzie wodociągowej*. Instal 11, 11-16.
19. www.ecdc.europa.eu (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC Surveillance Report Legionnaires' disease in Europe 2011).
20. www.pzh.gov.pl (Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce).
21. Velasco J.M., Yoon I.K., Jarman R.G., Bodhidatta L., Klungthong C., Silapong S., Valderama M.T., Wongstitwilai-roong T., Torres A.G., De Cecchis D.P., Pavlin J.A. (2011), *Applications of PCR (real-time and MassTag) and enzyme-linked immunosorbent assay in diagnosis of respiratory infections and diarrheal illness among deployed U.S. military personnel during exercise Balikatan 2009, Philippines*. Mil Med. 176, 1096-1100.