

# SKÚSENOSTI S APLIKÁCIOU ALTERNATÍVNYCH METÓD DETEKcie VYBRANÝCH PATOGÉNOV V PITNÝCH VODÁCH

**RNDr. Marianna Cíchová, RNDr. Miloslava Prokšová, CSc.**

Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábřežie armádneho generála L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava, cichova@vuvh.sk

## Súhrn

Metódy detekcie a analýzy nukleových kyselín sa v posledných rokoch začali uplatňovať aj v oblasti vodárenskej mikrobiologickej praxe. Vzhľadom na špecifické a nestále zloženie vodnej matrice je zavádzanie a štandardizácia týchto metód do rutínnej analytickej praxe zatiaľ len na výskumnej úrovni. Cieľom našej práce bolo otestovať použitie real-time PCR metódy s použitím farbičky SYBRGreen na kvantitatívne stanovenie *Legionella* spp. a *Salmonella* spp. vo vzorkách pitných a podzemných vôd. Detekčný limit metódy bol stanovený na  $10^2$  až  $10^3$  KTJ/ml. V rámci optimalizácie metódy boli otestované rôzne spôsoby prekoncentrácie vzoriek vody ako aj metódy izolácie DNA.

## Úvod

Voda určená na ľudskú spotrebu t. j. pitná voda podlieha prísnyim kritériám kvality, ktoré sú ustanovené legislatívou. Napriek tomu, že v európskych krajinách je zabezpečený vysoký štandard kvality pitnej vody a celkovo vody používanej pre ľudskú potrebu, nebezpečenstvo výskytu ochorenia spôsobeného mikrobiologicky znečistenou vodou je stále aktuálne. Mikrobiologická kvalita pitnej vody je kontrolovaná najmä prostredníctvom end-point monitorovania výskytu indikátorových mikroorganizmov a niektorých patogénnych mikroorganizmov ako *Salmonella* spp., *Legionella* spp. a *Pseudomonas aeruginosa*. Súčasné štandardné postupy používané na detekciu mikroorganizmov z vodného prostredia sú založené na kultivačných metódach. Hoci tieto metódy predstavujú nezastupiteľnú detekciu pri mikrobiologických analýzach vôd, nie sú schopné pokryť rozmanité podmienky vodného prostredia a preto neumožňujú detekciu mnohých prítomných baktérií vo vodnom prostredí [1]. Použitie týchto metód komplikuje aj skutočnosť, že niektoré baktérie sú schopné v stresových podmienkach (hladovanie, neoptimálna teplota rastu, zvýšený osmotický tlak, nevhodné svetelné podmienky a pod.) obmedzovať svoju metabolickú aktivitu a stávajú sa nekultivovateľnými (viable but nonculturable, VBNC). Navyše, pre mnohé významné patogény s možným výskytom vo vodnom prostredí ako napr. *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas* spp. neexistujú dodnes v slovenskej ako aj európskej legislatíve normované postupy na ich detekciu priamo z vodného prostredia.

V rámci zlepšovania mikrobiologickej kontroly kvality vôd sa začínajú v európskych krajinách aplikovať do vodohospodárskej praxe najmä nové kontrolné prístupy na rôznych úrovniach ako napr. stratégie monitorovania mikrobiologickej kvality vôd na základe princípov HACCP, aplikácia postupov Water Safety Plans, použitie nových indikátorových mikroorganizmov ako aj zavádzanie nových detekčných metód s využitím techník molekulárnej biológie [2]. Diagnostické metódy, využívajúce princípy z oblasti molekulárnej biológie, otvárajú pre vodárenské laboratóriá nové možnosti rutínnej analýzy. Tieto metódy poskytujú najmä menšiu časovú náročnosť (nie je nutná

kultivácia a konfirmácia), vyššiu citlivosť (detekcia aj jednej molekuly DNA) ako aj špecificitu, založenú na detekcii skupinovo-, rodovo-, druhovo-, poddruhovo-špecifických sekvencií DNA alebo RNA molekúl [3].

Základom pre rozvoj molekulárno-biologických metód bolo vyvinutie metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) v 80. rokoch 20. storočia [4]. Počas krátkeho obdobia sa metóda PCR stala najpoužívanejšou amplifikačnou metódou, pričom jej aplikácie sú v posledných rokoch využívané aj v oblasti environmentálnej mikrobiológie. PCR je v podstate jednoduchý metodický postup, ktorý umožňuje *in vitro* amplifikáciu (zmnoženie) špecifického úseku dvojvláknovej DNA v priebehu 60 minút na  $10^9$  molekúl [5]. V súčasnosti je popísaných množstvo ďalších modifikácií klasickej PCR reakcie ako duplex PCR, multiplex PCR, nested PCR ako aj metóda reverzne transkripčnej (RT) PCR. Výhodami týchto metód sú exaktnosť, vysoká citlivosť, reprodukovateľnosť a pomerne jednoduchá praktická realizovateľnosť. Nevýhodou však môže byť potenciálne riziko kontaminácie reakcií a detekcia iba na kvalitatívnej úrovni. Ďalším posunom vo vývoji metód bolo použitie kvantitatívnej PCR, umožňujúcej detekciu produktov PCR v priebehu reakcie tzv. real-time PCR s následnou kvantifikáciou prítomnej DNA vo vzorke. Výhodami real-time PCR metódy je redukcia odchýlok, zvýšenie citlivosti, redukcia času analýzy, eliminácia spracovávania produktov po PCR a zníženie kontaminácie produktom použitím uzatvorených skúmaviek [2, 6]. Aplikácie PCR detekčných metód vo vodárenskej mikrobiológii sú v súčasnosti iba na experimentálnej úrovni za absencie normovaných postupov. Pre využitie týchto metód v rutinných analýzach je preto potrebné vypracovať konkrétne metodické prístupy zohľadňujúce významné špecifiká detekcie z vodnej matrice.

Cieľom našej práce bolo overiť použitie kvantitatívnej real-time PCR metódy na detekciu dvoch hygienicky významných patogénov *Salmonella* spp. a *Legionella* spp. priamo z vody.

### ***Salmonella* spp.**

Salmonely sú v prírode veľmi rozšírené, vyskytujú sa v črevách človeka a zvierat (primárne patogény), ale aj u bezstavovcov (hmyz, kliešte). Vyskytujú sa bežne v prostredí odpadových, povrchových, závlahových a podzemných vôd a za vhodných podmienok sú schopné prežívať vo vode mesiace až roky [7]. Salmonely sú schopné perzistovať vo vodnom prostredí vo VBNC štádiu, ale názory rôznych autorov na zdravotné riziko týchto štádií sú rôzne [8]. I keď salmonely prítomné vo vodnom prostredí nepredstavujú významný podiel v šírení salmonelózy, vo vode sa bežne vyskytujú a znižujú jej využiteľnosť. Výskyt salmonel v pitných vodách znamená závažné bezprostredné ohrozenie ľudského zdravia, v povrchových vodách poukazuje na značné fekálne znečistenie a v domových splaškoch môže naznačovať prítomnosť neznámeho bacilonosiča.

Pre stanovenie salmonel vo vodnom prostredí platí norma STN ISO 6340 Kultivačné stanovenie *Salmonella* spp. [9]. Predpísaná metóda kultivačného stanovenia pozostáva zo štyroch postupných inkubačných krokov s použitím selektívnych a neselektívnych pôd a s biochemickým potvrdzovaním typických kolónií vyrastených na príslušných médiách. Stanovenie *Salmonella* spp. pomocou kultivačných metód je časovo náročné, s nedostatočnou konfirmáciou pozitivity a s výstupnou informáciou iba o prítomnosti a neprítomnosti tejto baktérie vo vzorkách vody.

V posledných rokoch boli pre stanovenie salmonel otestované rôzne kvalitatívne ako aj kvantitatívne PCR detekčné metódy, a to najmä pre potraviny a klinické vzorky [10, 11]. V našej práci sme sa rozhodli otestovať metódu kvantitatívnej real-time PCR s použitím nešpecifickej DNA viažúcej farbičky SYBRGreen, ktorá by umožnila

kvantifikovať salmonely priamo vo vodách. Výhodou real-time PCR metódy s použitím nešpecifických farbičiek je možnosť nadväznosti na protokol klasickej PCR metódy s malými modifikáciami. Na detekciu salmonel pomocou real-time PCR metódy sme teda vybrali pár primerov *S212f* a *S500r* na detekciu génu *fimC*, ktorý u salmonel kóduje syntézu fimbrií. Použitie tohto génu na identifikáciu salmonel pomocou klasickej PCR metódy bolo jasne zdokumentované v práci Drahovská a kol. [12], kde ho autori práce odskúšali na 53 serotypoch salmonel a 25 iných rodov baktérií. Veľkosť amplifikovaného produktu 289 bp zodpovedá požiadavkám na optimálnu veľkosť produktu pre použitie nešpecifickej farbičky SYBRGreen .

V rámci optimalizácie metódy bolo otestovaných 25 kombinácií koncentrácií primerov s použitím 50, 100, 200, 250, 300 nM primeru na reakciu. Pre testovanie bola použitá kvantita templátovej DNA  $10^4$  kópií genómu v reakcii. Pre každý pár primerov boli určené hodnoty Ct (prahový cyklus) a dRn (fluorescencia normalizovaná referenčnou farbičkou ROX). Špecificita amplifikácie PCR produktov bola identifikovaná prostredníctvom krivky topenia a hodnôt Tm (teplota topenia). Pre ďalšie testovanie boli po optimalizácii vybrané primery s koncentráciou 200 nM *S212f* a 200nM *S500r*. Analýza krivky topenia tzv. disociačná krivka, zodpovedajúca špecificite reakcie, vykazovala pre jednotlivé koncentrácie primerov jeden homogénny produkt s konštantným Tm  $85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Špecificita primerov bola otestovaná s použitím referenčných kmeňov *Salmonella enterica* CCM 4420, izolátov *Salmonella* sp. z povrchovej vody (Dunaj, Váh), izolátov *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* sp., *Listeria monocytogenes* z povrchových vôd.

Real-time PCR reakcia prebiehala v termocykléri Mx3005P s použitím 2x Brilliant II SYBR Green QPCR master mixu (Stratagene) s teplotným programom: 10 min pri  $95^{\circ}\text{C}$ , 40x (30 s pri  $95^{\circ}\text{C}$ , 60 s pri  $60^{\circ}\text{C}$ ). Real-time PCR reakčná zmes obsahovala 12,5  $\mu\text{l}$  2x Brilliant®II SYBR® Green QPCR master mixu (Stratagene), 0,5  $\mu\text{l}$  každého z primerov s výslednou koncentráciou 200 nM, referenčnú farbičku ROX nariedenú 1:500 s objemom 0,375  $\mu\text{l}$  a 10  $\mu\text{l}$  DNA templátu. Konečný objem reakčnej zmesi bol 25  $\mu\text{l}$ . Na základe získaných hodnôt prahového cyklu (Ct) verzus logaritmus koncentrácie desaťnásobne riedenej genomickej DNA *Salmonella enterica* CCM 4420 bola vytvorená kalibračná krivka, ktorá vykazovala dobrú linearitu v rozsahu od  $10^3$  až  $10^9$  KTJ/ml s korelačným koeficientom  $R^2 = 0,976$  a s efektívnosťou amplifikácie 102,7%. Detekčný limit metódy bol stanovený na  $10^3$  KTJ/ml.

Pre izoláciu bakteriálnej DNA priamo z vody bez kultivačného medzistupňa bolo otestovaných niekoľko jednoduchých spôsobov izolácie DNA na báze hrubej lýzy buniek (lýza povarením v PCR pufri, v TE pufri, TE pufri s SDS, v deionizovanej vode, alkalická lýza, lýza s použitím proteínázy K, lýza s použitím kombinácie lyzozýmu a proteínázy K a lýza s použitím Chelex 100) ako aj použitie dvoch komerčných izolačných kitov Power Water® DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Inc.) a ForensicGEMTMSaliva isolation kit (ZyGEM). Každá použitá lyzačná metóda bola testovaná trikrát. Metóda s použitím Chelexu ako aj komerčný kit ZyGEM poskytovali štatisticky najlepšie výťažnosti templátových DNA po priamej izolácii zo vzoriek vody.

Zvýšenie koncentrácie stanovovaných mikroorganizmov vo vodách je možné dosiahnuť prostredníctvom koncentrácie vzorky metódou membránovej filtrácie. Pre možnosť uplatnenia tejto metodiky pre zvýšenie kvantifikácie baktérií metódou real-time PCR bolo potrebné overiť použiteľnosť rôznych typov membránových filtrov. V našich experimentoch sme si do testovania vybrali 3 typy membránových filtrov s veľkosťou pórov 0,2 $\mu\text{m}$  – nitrátcelulóзовý (Millipore) a dva rôzne polykarbonátové filtre NUCLEPore (Whatman) a ISOPore (Millipore). V sérii testov s modelovými

vzorkami a s použitím počtu 200 buniek *Salmonella enterica* CCM 4420 sme odskúšavali výťažnosť patogénov po filtrácii a následnej elúcii. Spôsob elúcie zahŕňali sonifikáciu, premiešavanie na Vortexe so sklenenými guľičkami, bez guľičiek, z nastrihaným filtrom, s filtrom vcelku. Najvyššie dosiahnuté percento výťažnosti nepresiahlo 60 až 80 %, pričom najlepšie výťažnosti boli dosiahnuté s použitím polykarbonátového filtra.

Po optimalizácii prípravných metodických medzikrokov (filtračná metóda, izolačná metóda DNA) a základných reakčných podmienok real-time PCR boli pripravené modelové vzorky pitných a podzemných vôd, obohatené bunkami *S. enteritis* CCM 4420 s koncentračným rozsahom  $10^3$  až  $10^9$  KTJ/ml. Pre obe vodné matrice bolo možné aplikovať uvedený typ kvantitatívnej real-time PCR bez náznaku inhibície amplifikácie. Z predbežných výsledkov sa nám zatiaľ podarilo úspešne kvantifikovať testovaný mikroorganizmus iba na úrovni detekčného limitu  $10^4$  KTJ/ml.

### **Legionella spp.**

Prirodzeným výskytom legionel sú sladkovodné systémy prírodných vôd [13], vlhká pôda, kompost ako aj drevné substráty. Nachádzame ich v rozvodoch teplej vody, najmä na miestach tzv. mŕtvych bodov potrubia [14], v kúpeľoch, v bazénoch, v chladiacich vežiach ako aj v chladiacej vode klimatizačných zariadení [15]. Aquatické biofilmy najmä na korodujúcich materiáloch vodovodných systémov sú považované za významné ekologické miesta, ktoré umožňujú prežívanie a množenie legionel. Biofilmy v distribučných sieťach pitných vôd umožňujú legionelám vytvorenie nepriamej rezistencie voči chlorácii, prípadne iným použitým dezinfekciám a stávajú sa preto veľkým problémom pri zabezpečovaní zdravotne nezávadnej vody pre obyvateľstvo. V prípade legionel je tiež popisované VBNC štádium, ktoré môže byť potenciálnym zdrojom infekcie [16].

I keď dodnes neexistuje všeobecne prijatý bezpečný limit pre počty legionel v distribučnej sieti pitnej vody, sú známe mnohé prístupy k tejto skutočnosti na úrovni doporučení [17] alebo jednotlivých národných legislatív rôznych štátov. Doporučené limity v národných legislatívach krajín EU začínajú okolo hodnoty 50-100 KTJ/ml. Veľká pozornosť pri detekcii *Legionella* spp. je sústredená na kontroly zariadení ako sú chladiace veže a systémy pre teplú vodu vo veľkých budovách. Stanovenie prítomnosti *Legionella* spp. v pitnej vode nie je zatiaľ zaradené v rámci kontroly pitnej vody (Smernice Rady 98/83/ES, 1998 a Nariadenia vlády SR č. 354, 2006).

Stanovenie legionel je štandardizované v normách STN ISO 11731 a STN ISO 11731-2, [18, 19] ktoré popisujú kultivačné metódy izolácie *Legionella* spp. pre všetky druhy environmentálnych vzoriek vrátane vzoriek pitnej vody, vody používanej v priemysle, prírodných vôd ako aj pre sedimenty a kaly. Stanovenie *Legionella* je založené na kultivácii opracovanej vzorky na tlmivých selektívnych médiách s aktívnym uhlím a kvasničným extraktom, ktoré sú navyše obohatené  $\alpha$ -ketoglutarátom a antibiotikami [13]. Veľkou nevýhodou kultivačného stanovenia legionel je až 10-dňová kultivácia.

Vývoj molekulárnych metód pre identifikáciu a detailnú typizáciu legionel prešiel v posledných rokoch rýchlym vývojom. Pre široké spektrum vôd vrátane odpadových bolo popísané použitie viacerých PCR metód na detekciu *L. pneumophila* a *Legionella* spp. [20, 21]. Aplikácia real-time PCR metódy s použitím farbičky SYBRGreen na detekciu *L. pneumophila* vo vzorkách vody bola nedávno detailne popísaná aj v práci autorov [22]. Na základe úspešných výsledkov tejto práce sme sa rozhodli otestovať uvedenú metódu na stanovenia *Legionella pneumophila* sg.1.

Metodické postupy real-time PCR s použitím nešpecifickej farbičky SYBRGreen otestované na stanovenie *Salmonella* spp. boli použité aj pre optimalizáciu tejto metódy pri stanovení *Legionella pneumophila* sg.1. Z našich predchádzajúcich skúseností s použitím klasickej PCR metódy boli pre použitie kvantitatívnej real-time PCR vybrané primery mip2f, mip2r, ktoré boli navrhnuté pre úseky DNA v oblasti génu mip kódujúceho 24 kDa proteín, zohrávajúci úlohu pri zosilnení infekčnosti makrofágov [23]. Produkt amplifikácie o veľkosti 131 bp zodpovedá základnej požiadavke na optimálnu veľkosť produktu pre použitie nešpecifickej farbičky SYBRGreen.

V rámci optimalizácie metódy bolo otestovaných opäť 25 kombinácií koncentrácií primerov, ale s použitím vyšších koncentrácií od 200, 300, 400, 500, 600 nM primeru na reakciu. Pre ďalšie testovanie boli po optimalizácii vybrané primery s koncentráciou 500 nM mip2f a 500nM mip2r. Analýza krivky topenia tzv. disociačná krivka, zodpovedajúca špecificite reakcie, vykazovala jeden homogénny produkt s konštantným  $T_m$   $78^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Špecificita primerov bola otestovaná s použitím referenčných kmeňov *Legionella pneumophila* sg.1., *Legionella anisa*, *Legionella* spp., izolátov a referenčných kmeňov baktérií z čelade *Enterobacteriaceae*. Kalibračná krivka vykazovala dobrú linearitu v rozsahu od  $10^2$  až  $10^6$  KTJ/ml s korelačným koeficientom  $R^2 = 0,996$  a s efektívnosťou amplifikácie 113,7%. Detekčný limit metódy bol stanovený na  $10^2$  KTJ/ml. Optimalizovaná metóda lýzy s použitím Chelexu ako aj prekoncentračná metóda membránovej filtrácie s použitím polykarbonátového filtra boli rovnako zapracovaná do celkovej metodiky stanovenia *Legionella pneumophila* sg. 1.

Optimalizovaná metóda real-time PCR s použitím SYBRGreen farbičky bola v našich testoch porovnávaná s kvantitatívnym stanovením pomocou štandardnej kultivačnej metódy. Pri použití čistých kultúr bola pozorovaná silná korelácia medzi oboma metódami. Pri porovnaní oboch metód pre rôzne typy reálnych vôd ako pitné vody z DS, voda z chladiarenských veží a podzemná voda boli detekované 1 až 2 log vyššie počty metódou kvantitatívnej real-time PCR. Zistené rozdiely sú uvádzané aj v iných literárnych zdrojoch [22], pričom predpoklad vyššej výťažnosti real-time PCR metódy je v detekcii živých, VBNC a aj mŕtvych buniek. Navýšenie detekovaných počtov buniek PCR metódou môže byť spôsobené aj izoláciou DNA z buniek legionel, ktoré prežívajú v amébach, ktoré ale nie je možné stanoviť kultivačne.

## Záver

V súčasnej dobe sa pripravujú prvé technické návrhy európskych noriem na detekciu patogénov vo vodách pomocou kvantitatívnej metódy real-time PCR. Jednotlivé metodické postupy navrhovaných noriem sú ale uvádzané veľmi všeobecne, bez konkrétnych informácií na úrovni objemov a chemikálií. Pre potreby reprodukovateľnosti a optimálnej citlivosti metódy bude potrebné rozpracovať metodiku do najmenších detailov. Prvé testovanie v našom laboratóriu bolo zamerané na optimalizáciu kvantitatívnej real-time PCR s použitím nešpecifickej farbičky SYBRGreen. Metóda nevyžaduje prítomnosť a optimalizáciu ďalších špecifických sond, nie je limitovaná možnými zmenami v templátovej sekvencii a patrí medzi finančne dostupnejšie metódy molekulárnej biológie.

## Literatúra

- [1] Straškrabová V. (1996). Mikrobiální ekologie vody. Jihočeská univerzita. České Budějovice.
- [2] Jofre, J. and A. R. Blanch. (2010). Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. J. Appl. Microbiol. 109:1853-1867.
- [3] Cloete T. E., Rose J., Nel L. H., Ford T. (2004) Microbial waterborne pathogens. IWA Publishing, London. ISBN 1 84339 055 8.

- [4] Mullis K. B., Faloona F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335–350.
- [5] Rosypal S., Doškař J., Petržík K., Růžičková V. (2002) Úvod do molekulární biologie. Díl IV. Molekulární biologie rostlinných virů, priony, molekulární evoluce, vznik života, metody molekulární biologie, genové inženýrství. Brno.
- [6] Rompré A., Servais P., Baudart J., De-Roubin M.R., Laurent P. (2002) Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods.* 49: 31-54.
- [7] Gannon V. P. J., Graham T. A., Read S., Ziebell K., Muckle A., Mori J., Thomas J., Selinger B., Townshend I., Byrne J. (2004) Bacterial Pathogens in Rural Water Supplies in Southern Alberta, Canada. *J. Toxicol. Environ. Health.* 67: 1643 - 1653.
- [8] Baudart J., Lemarchand K., Brisabois A., Lebaron P. (2000) Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology.* 66: 1544-1552.
- [9] STN ISO 6340 (2001) Kvalita vody. Stanovenie *Salmonella* sp.
- [10] Kumar S. - Balakrishna K. – Batra H. V. (2006) Detection of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (S. Typhi) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 149-154.
- [11] Malorny B., Mäde D., Teufel P., Berghof-Jäger C. (2007). Multicenter validation study of two blockcycler- and one capillary-based real-time PCR methods for the detection of *Salmonella* in milk powder. *Int J Food Microbiol.* 117: 211-218.
- [12] Drahovská H., Turna J., Píknová E., Kuchta T., Szitasová I., Skarková A., Sasik M.. (2001). Detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. *Biologia*, 611-616.
- [13] Fields B. S. - Benson R. F.-Besser R. E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 506-526.
- [14] Wellinghausen N., Frost C., Marre R. (2001) Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time light cycler PCR. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3985–3993.
- [15] Nagai T., Sobajima H., Iwasa M., Tsuzuki T., Kura F., Amemura-Maekawa J., Watanabe H. (2003). Neonatal sudden death due to *Legionella pneumonia* associated with water birth in a domestic spa bath. *J Clin Microbiol.* 41: 2227–2229.
- [16] Steinert M., Hentschel U., Hacker J. (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:149-162.
- [17] EWGLI (2005) European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' disease. ISBN 0- 7176-1772-6. 2.
- [18] STN ISO (2001) 11731 Kvalita vody. Stanovenie *Legionella*
- [19] STN ISO 11731-2 (2008) Kvalita vody. Stanovenie *Legionella*. Časť 2: Metóda priamej membránovej filtrácie pre vody s malým počtom baktérií
- [20] Fiume L., Bucca M.A., Sabattini G., Poda D. (2005) Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays. *Letters in Applied Microbiology.* 41: 470-475.
- [21] Joly P., Falconnet P. A., André J., Weill N., Reyrolle M., Vandenesch F., Maurin M., Etienne J., Jarraud S. (2006) Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2801-2808.
- [22] Fittipaldi M., Codony F. and Morató J. (2010) Comparison of conventional culture and real-time quantitative PCR using SYBR Green for detection of *Legionella pneumophila* in water samples. *Water SA (Online)*, 36, 4, ISSN 1816-7950.
- [23] Ballard A. L., Fry N. K., Chan L., Surman S. B., Lee J. V., Harrison T. G., Toner K. (2000) Detection of *Legionella pneumophila* using real-time PCR hybridization assay. *Journal of clinical microbiology.* 38: 4215-4218.