

# UTJECAJ OKOLIŠNIH FAKTORA NA STVARANJE BIOFILMA LEGIONELA U MORSKOJ VODI

---

Gašaj, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:210857>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ**

**SANITARNOG INŽENJERSTVA**

**Andrea Gašaj**

**UTJECAJ OKOLIŠNIH FAKTORA NA STVARANJE BIOFILMA LEGIONELA U  
MORSKOJ VODI**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U RIJECI**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ**

**SANITARNOG INŽENJERSTVA**

**Andrea Gašaj**

**UTJECAJ OKOLIŠNIH FAKTORA NA STVARANJE BIOFILMA LEGIONELA U**

**MORSKOJ VODI**

**Diplomski rad**

**Rijeka, 2020.**

Mentor rada: izv. prof. dr.sc. Ivana Gobin. dipl.sanit.ing.

Diplomski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 55 stranica, 13 slika, 7 tablica, 31 literaturni navod.

## **ZAHVALE**

*Najveće zahvale idu dragoj mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Gobin, velikim znanjem, neupitnim strpljenjem, potporom i entuzijazmom uvelike je pomogla izradi ovog rada, praktičnog i teorijskog dijela. Velike zahvale izv.prof.dr.sc. Daliboru Brozniću na savjetovanju i pomoći kao i na vođenju pri obradi rezultata.*

*Zahvale cijelom Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na pomoći i savjetima, a posebne zahvale laborantici Gabrijeli Begić.*

*Na kraju, veliko hvala dragim osobama na potpori i pomoći u izradi diplomskog rada.*

## SAŽETAK

Ubikvitarni stanovnik vodenih sustava, bakterija *Legionella pneumophila*, iz porodice *Legionellaceae* uzročnik je atipične pneumonije nazvane legionarska bolest. Legionele su aerobne bakterije koje se po Gramu boje plavo. Normalno se nalaze u prirodnim vodenim sredinama kao što su rijeke, jezera i slično, a obitavaju u klimatizacijskim sustavima, bazenima, rashladnim tornjevima i ostalim umjetno stvorenim sredinama gdje primarno stvaraju probleme. Jednom nastanjene u navedenim sredinama, mogu stvarati biofilm na različitim površinama.

U ovom se radu istraživao utjecaj okolišnih faktora kao što su temperatura i razrjeđenje morske vode na sposobnost stvaranja biofilma različitih sojeva *L. pneumophila* u morskoj vodi. Korišteno je trinaest sojeva bakterije *L. pneumophila*, među kojima je i soj *L. pneumophila* Allentown ST82 izoliran iz morske vode. Sojevi su podijeljeni na one koji su izolirani iz okoliša i na legionele koje su klinički izolati.

Rezultati su pokazali razlike u sposobnosti stvaranja biofilma za kliničke i okolišne izolate u različitim izvorima. Pa tako, klinički izolati su pokazali bolju sposobnost stvaranja biofilma u vodovodnoj vodi i razrijeđenoj morskoj vodi. Na kraju, vidljivo je da su svi ispitani sojevi legionela sposobni stvoriti biofilm u ispitivanim uzorcima voda. Navedeno povećava potrebu za redovnim i ispravnim održavanjem sustava i provođenjem dezinfekcijskih mjera kako bi se onemogućilo stvaranje biofilma ili isti uklonio.

**Ključne riječi:** *Legionella pneumophila*, biofilm, morska voda

## **ABSTRACT**

Ubiquitous inhabitant of aquatic systems, bacteria *Legionella pneumophila* from the family *Legionellaceae* is the cause of atypical pneumonia called legionnaires' disease. *Legionellae* are aerobic, Gram negative bacteria. They are normally found in natural aquatic environments such as rivers and lake, but also inhabit air conditioning systems, swimming pools, cooling towers and other man-made environments where they primarily create problems. Once inhabited in these environments, they can form a biofilm on various surfaces.

This research investigated the influence of environmental factors such as temperature and dilution of seawater on the ability to form a biofilm of different strains of *Legionella* in seawater. Thirteen strains of *L. pneumophila* were used, including *L. pneumophila* Allentown ST82 isolated from seawater. Strains were divided into those isolated from the environment and clinical isolates.

The results showed differences in biofilm formation ability for clinical and environmental isolates in different sources. Thus, clinical isolates have shown a better ability to form a biofilm in tap water and dilute seawater. Finally, it can be seen that all tested legionella strains are capable of creating a biofilm in the tested water samples. This increases the need for regular and proper maintenance of the system and the implementation of disinfection measures to prevent the creation of biofilm or remove it.

**Key words:** *Legionella pneumophila*, biofilm, seawater

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Legionella spp. ....	2
1.1.1. Legionella pneumophila.....	3
1.1.2. Legionella longbeacheae.....	5
1.2. Patogeneza .....	7
1.3. Bolesti uzrokovane legionelama.....	9
1.3.1. Pontijačka groznica .....	9
1.3.2. Legionarska bolest.....	10
1.3.3. Infekcije uzrokovane non-pneumophila vrstama legionela .....	12
1.4. Dijagnostika i liječenje legioneloza.....	14
1.5. Kultivacija.....	16
1.6. Faktori koji pogoduju rastu legionela .....	17
1.7. Biofilm.....	20
1.7.1. Legionella pneumophila i biofilm.....	20
1.7.2. Biofilm i morska voda .....	24
1.8. Mjere za suzbijanje.....	25
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	27
3. METODE I MATERIJALI.....	28
3.1. Materijali.....	28
3.1.1. Hranjive podloge .....	29
3.1.2. Bakterijski sojevi.....	29
3.1.3. Uzorci vode .....	30
3.2. Metode .....	31
3.2.1. Priprema bakterijskog inokuluma .....	31
3.2.2. Razvijanje biofilma .....	31
3.2.3. Određivanje broja bakterija i statistička obrada rezultata .....	31
4. REZULTATI .....	32
4.1. Sposobnost stvaranja biofilma legionela.....	32
4.1.1. Biofilm Legionella pneumophila u morskoj vodi .....	32
4.1.2. Biofilm Legionella pneumophila u destiliranoj vodi.....	34
4.1.3. Biofilm Legionella pneumophila u jednakom omjeru morske i destilirane vode 1:1....	36
4.1.4. Biofilm Legionella pneumophila u vodovodnoj vodi .....	38
4.2. Statistička obrada rezultata .....	40



4.2.1.	<i>Usporedba izolata kliničkih i okolišnih ovisno o temperaturi .....</i>	40
4.2.2.	<i>Usporedba kliničkih i okolišnih izolata ovisno o temperaturi i u određenom izvoru ....</i>	41
4.2.3.	<i>Usporedba različitih izvora.....</i>	42
5.	RASPRAVA.....	45
6.	ZAKLJUČAK.....	50
7.	LITERATURA .....	51
8.	ŽIVOTOPIS.....	55

## 1. UVOD

*Legionella* jest ubikvitarna bakterija prirodnih vodenih sustava i uzročnik legioneloza. Osim u prirodnim vodenim sustavima, prisutna je i u antropogenim, odnosno umjetnim vodenim sustavima. Razlog zbog kojeg ona može preživjeti u umjetnim vodenim sustavima jest prilagodba na razne uvjete kao i odgovarajuća temperatura te što su joj omogućene hranjive tvari potrebne za rast. Pripada Gram negativnim bakterijama, značajna je i u dijagnosticiranju bolničkih infekcija, odnosno nespecifičnih pneumonija što je važno za osobe oslabljenog imuniteta (1). Prisutnost legionela u vodi iz slavina postaje sve veći problem globalno, kako za komunalna društva koja ispostavljaju vodu, tako i za konzumere, odnosno populaciju. Pojava bolesti, legioneloze, datira iz druge polovice 20. stoljeća. Legioneloza se može podijeliti na dvije vrste, ovisno o težini bolesti i simptomima. Tako se lakši oblik bolesti naziva pontijačka groznica, a teži oblik, koji potencijalno može biti letalan jest legionarska bolest. Bolest se u oba slučaja prenosi kapljično, odnosno putem aerosola, ali nisu zabilježeni slučajevi prijenosa bolesti s čovjeka na čovjeka.

S epidemiološkog stajališta, najugroženije skupine jesu mala djeca i imunokompromitirane osobe zbog nerazvijenog i slabog imuniteta. Povećan rizik javlja se tijekom putovanja i boravka u hotelima, osobito onima koji posluju sezonski.

Najpoznatiji uzročnik legioneloza jest *Legionella pneumophila* iz porodica *Legionellaceae*. U današnje vrijeme kolonizacija ovih bakterija događa se u vodovodnim cijevima, bojlerima i slično, otkuda dolaze iz okoliša. Osim kolonizacije, razvile su i sposobnost stvaranja biofilma, što ih čini rezistentnijima u okolišu, unatoč metodama dezinfekcije. Biofilm bakterijama omogućava preživljavanje u uvjetima koji im ne odgovaraju, kao i stanje u kojima su bakterije žive no ne mogu se replicirati. Koloniziranju i stvaranju biofilma svakako pogoduje voda koja stagnira u cijevima kao i nepročišćena voda.

## **1.1. Legionella spp.**

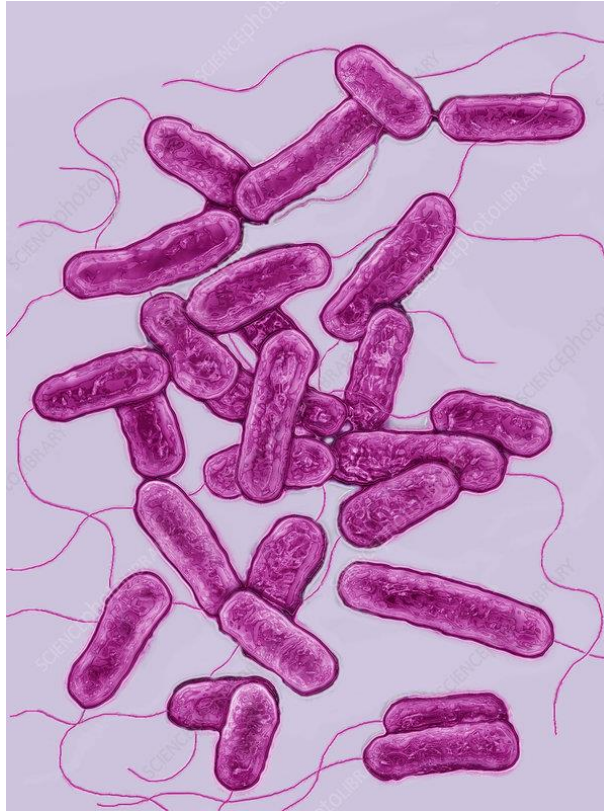
U porodici *Legionellaceae* najznačajniji predstavnik svakako jest *Legionella pneumophila* koja se smatra najčešćim uzročnikom pontijačke groznice i legionarske bolesti. Sve legionele klasificiraju se kao Gram negativni štapići koji preživljavaju u aerobnim uvjetima. U ovu porodicu pripada minimalno 62 vrste bakterija s preko 70 različitih serogrupa. Genomski, bakterije su slične u više od 90%, što nije slučaj sa drugim vrstama, gdje je ista značajnije manja. Bakterije ove porodice izolirane su iz različitih okoliša i različitih geografskih položaja (2).

Oko 90% slučajeva legionarske bolesti koji su klinički zabilježeni i dijagnosticirani izolirani uzročnik jest bila bakterija *L. pneumophila*. Ostatak infekcija uzrokuju druge bakterije iz porodice kao što su *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleii* i drugi (3).

Prvi sojevi legionela izolirani su u zamorcima, četrdesetih godina prošlog stoljeća. S obzirom na nepoznavanje metoda za izoliranje ove bakterije, kako bi ona bila izolirana korištene su metode za *Rickettsiu*. Desetak godina nakon, u Poljskoj je legionela izolirana iz tla. Rod *Legionella* dobio je ime i prvi put je upotrebljen 1979. nakon velike incidencije pneumonija kod američkih legionara tri godine prije toga (4).

Legionele pripadaju intracelularnim parazitima protozoa koje su prirodno u vodama. Pri napadanju stanica sisavaca, koriste mehanizam sličan onome kojim se multipliciraju u stanicama protozoa. Prirodno one se mogu naći u okolišnim rezervoarima kao što su površinske vode, jezera, rijeke gdje su povezane s protozoama. U umjetno stvorenim rezervoarima voda, one mogu nastaniti glave tuša, rashladne tornjeve i sl (4).

Serogrupa *L. pneumophila* koja najčešće uzrokuje bolest jest O1, koja je najčešće i izolirana iz slučajeva intrahospitalnih infekcija. Osim te serogrupe, u bolnicama su izolirane legioneloze serogrupa 2-14 kao i legioneloze koje nisu izazvane *L. pneumophila* vrstom (5).



Slika 1. *L. pneumophila* pod transmisijom elektronskim mikroskopom

(<https://www.sciencephoto.com/media/601655/view/legionella-pneumophila> )

### ***1.1.1. Legionella pneumophila***

Primarni uzročnik legionarske bolesti, kao i pontijačke groznice jest *L. pneumohila* koja ima mnoštvo podvrsta i serotipova. Pripada oportunističkim intracelularnim humanim patogenima. Ubikvitarna je bakterija i sposobna je preživjeti u uvjetima koji nisu prilagođeni za njeno umnažanje. U tim uvjetima, bakterije su izložene stresu i limitacijama kao i promjenama u temperaturama, salinitetu, kisiku i pH. Upravo zbog toga razvile su stanje koje

se naziva vijabilnim, ali ne kultivabilnim stanjem u kojem se nalaze dok uvjeti ne postanu povoljni za njihovo umnažanje. Ono što je poznato za legionele jest da one ne mogu preživjeti bez vode, odnosno za njihovo preživljavanje svakako je najbitniji vodeni okoliš. Morfološki, bakterija je veličine 2 do 20 mikrometara, Gram negativna i nesporogena. Može se objasniti da unatoč tankom staničnom zidu, legionela se boji Gram negativno zbog sastava tog staničnog zida u kojem su ubikinoni i masne kiseline. Ima mogućnost adheriranja na različite površine zbog strukture koju posjeduje, pili, te je pokretna zbog flagela. Ukoliko uđe u ljudski organizam ima sposobnost izbjegavanja fagocitoze prilikom umnažanja u humanim makrofazima. U nekoliko istraživanja dokazana je povezanost patogeneze i ekologije legionela, upravo zbog sličnosti životnog ciklusa u amebama i multipliciranja u makrofazima (6).

Faktori virulencije kod legionele su kompleksni i nisu u potpunosti objašnjeni, ali su bitni za sposobnost umnažanja. Legionela ulazi u interakciju sa fagocitnim stanicama i to u nekoliko koraka: vezanje mikroorganizma na receptore eukariotske stanice, penetracija u fagocite, "bijeg" od baktericidnog napada, formacija vakuole gdje se događa bakterijska replikacija, intracelularna replikacija i ubijanje stanice domaćina.

U okolišu, prirodnim vodenim sustavima, *L. pneumophila* se najčešće nalazi u protozoama, kao što su amebe. Amebe nisu direktno uzrok širenja legionela u okolišu, no smatraju se jednim od štitova, odnosno zaštita legionela od nepovoljnih uvjeta i biocidnih tretmana. Uz amebe, bakterije lakše prodiru i u umjetno stvorene vodene sustave u kojima se mogu zadržavati. Mjesta koja predstavljaju rizik jesu svakako ona u kojima voda stagnira, bojleri, vodeni tornjevi, cisterne, jacuzzi bazeni, slijepi završeci cijevi koji su svakako najpovoljnije mjesto za njihov opstanak.

**Tablica 1. Karakteristike *Legionella pneumophila***

Karakteristike	<i>Legionella pneumophila</i>
Metabolizam	Aerobno
Oblik	Bacil
Bojenje po gramu	gram-negativna (crvena)
Stanište	Vodena staništa (unutar višestaničnih organizma, biofilm)
pH	5 - 8,3
Temperatura preživljavanja	5,7 – 63 °C
Temperatura razmnožavanja	25 - 45 °C
Hranjive tvari	L-cistein, aminokiseline, željezo
Osjetljivost	Klor, isušivanje, UV-zračenje

### 1.1.2. *Legionella longbeacheae*

*Legionella longbeachae* klasificirana je kao bakterija porodice *Legionellaceae* 1981. godine. Prvotno je izolirana u Kaliforniji, 1980. godine kod pacijenta s pneumonijom. Ova bakterije posjeduje dva serotipa i serotip 1 je najčešće poveziv sa bolestima kod ljudi. Uzročnik je infekcija donjeg respiratornog sustava kako kod imunokompromitiranih, tako i kod zdravih osoba. U Europi i Sjedinjenim Američkim Državama rijetki su slučajevi u kojima legioneloze izaziva ova vrsta legionele, dok je u Australiji i na Tajlandu ona zaslužna za više od pola slučajeva legioneloza. Najvećim i najznačajnijim rezervoarom smatra se tlo, odnosno zemlja za sađenje biljaka (7). Osim toga, ona se može pronaći u raznim mješavinama za

sađenje biljaka, piljevini pa i kori. Ona u organizam može ući inhalacijom aerosola koji je nastao od navedene zemlje. Znanstvenici su dokazali kako *L. longbeacae* i *L. pneumophila* imaju različit način preživljavanja intracelularno. Genom ove legionele sadrži široki spektar proteina koji joj pomažu u invaziranju i degradaciji biljnog materijala. Navedene enzime posjeduje samo *L. longbeachae* (8). *L. longbeachae* ne posjeduje flagele što su znanstvenici naveli kao moguće objašnjenje za razliku u inficiranju miševa između dvije vrste legionela. Nadalje, istraživanja su pokazala kako *L. longbeachae* ima manje izražen bifazni životni ciklus nego *L. pneumophila*, te je ona inkapsulirana (9).

## 1.2. Patogeneza

Ova bakterija nije dio fiziološke mikrobiote ljudskog organizma te ona u njega ulazi putem udisanja aerosola koji sadrži bakteriju. Ona se ne može prenijeti sa čovjeka na čovjeka, već isključivo putem kontaminirane vode ili tla. Nekoliko studija pokazalo je da su ekologija i patogeneza legionela povezane. Znanstvenici su demonstrirali način na koji *L. pneumophila* inficira amebe, te je kasnije dokazano kako na sličan način bakterija napada makrofage u ljudskom organizmu, koji također predstavljaju prvu liniju obrane. Primarna razlika je u tome što nisu sve vrste legionela sposobne inficirati humane makrofage, najčešće istraživana *L. pneumophila* posjeduje faktore virulencije kojima ulazi u protozoe tla i vode, te je upravo to čini virulentnijim od drugih vrsta.

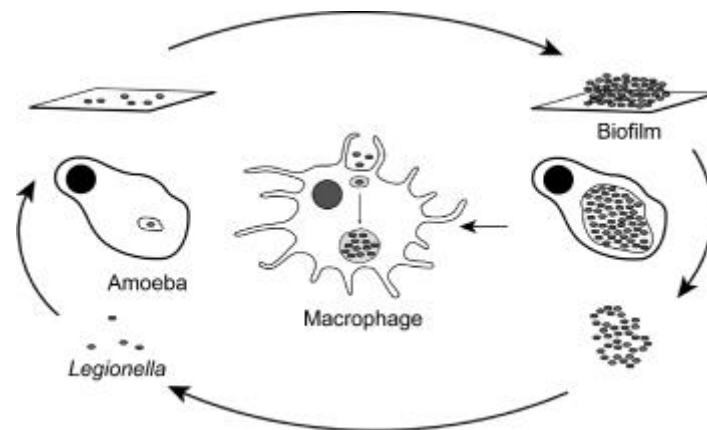
Jednom kada bakterija uđe u organizam, točnije pluća inficirane osobe, alveolarni makrofazi fagocitiraju i virulentne i nevirulentne sojeve bakterije te su oni intaktni u fagocitima, nalaze se u fagosomalnoj vakuoli. Jedino virulentni sojevi imaju mogućnost umnažanja u fagocitima i inhibiranja fuzije fagosoma s lizosomima. Navedeno rezultira odumiranjem makrofaga i oslobađanjem velikog broja bakterijskih stanica. Na taj način, bakterija inficira druge makrofage čime se bakterijska koncentracija u plućima bolesnika povećava. Prilikom odumiranja makrofaga, odlaže se fibrin i nakuplja serum u alveolama što dovodi do razvitka jake upale pluća koja uništa respiratorne funkcije. Razumijevanje patogeneze legionele postalo je jasnije nakon identifikacije gena koji joj pomažu da zaobiđe endocite u stanicama protozoa i humanim stanicama.

Tijekom fagocitoze legionele aktiviraju kompleks aktivnosti koje uključuju i inhibiciju oksidativnog praska, redukciju zakiseljavanja fagosoma, blokiranje sazrijevanja fagosoma te promjene u organelima. Upravo to im omogućava da fagosome pretvore u svoju nišu za razmnožavanje, čime je njihova baktericidna aktivnost reducirana. Uz samu aktivnost



bakterija, struktura površine je važan faktor u patogenezi legionela, adheriranje bakterije na površinu stanice krucijalan je korak u infektivnom ciklusu. Uz flagele i pile, izdanke koji legionelama pomažu u adheriranju, važnu ulogu imaju i proteini među kojima su: glavni protein vanjske membrane (MOMP – *the major outer membrane protein*), protein toplinskog šoka (Hsp60 - *the heat shock protein*), glavni protein za infektivnost (*the major infectivity potentiator protein*).

Analiza procesa razvitka infekcije u protozoama i humanim stanicama dovela je do identifikacije faktora koji utječu na virulenciju legionela i to su ekspresija proteina tijekom inficiranja makrofaga, ekspresija određenih proteza i plazmida koji joj omogućavaju da preživi (10).



Slika 2. Ciklus legionele u amebama (<http://www.imls.uzh.ch/en/research/fgrimls/Hilbi.html>)

### **1.3. Bolesti uzrokovane legionelama**

Do tada nepoznati uzročnik nekarakteristične pneumonije, prvi put se javlja 1976. godine među američkim legionarima na Konvenciji u Philadelphiji. Nekoliko učesnika navedene konvencije oboljelo je od od upale pluća te je isto potaknulo znanstvenike na istraživanje uzročnika. Iako legionela može uzrokovati lakši i teži oblik bolesti, one se zajedničkim imenom nazivaju legioneloze. Lakši oblik bolesti, sličniji gripu, naziva se pontijačka groznica, a onaj teži oblik dobio je ime upravo prema pojavljivanju među legionarima, te se on naziva legionarska bolest. Transmisija bakterije u humani organizam može biti kroz razne okolišne izvore kao što su whirlpool bazeni, glave tuša i razni uređaji koji imaju mogućnost stvaranja aerosola (15).

Danas, sve veća pojavnost legioneloza posljedica je ljudskog utjecaja i mijenjanja okoliša, upravo zbog toga što se bakterije mogu naći u prirodnim vodenim sustavima te putem njega prijeći u umjetne vodene sustave stvorene od strane čovjeka.

#### ***1.3.1. Pontijačka groznica***

Pontijačka groznica definira se kao akutna respiratorna bolest kod koje nisu zabilježeni smrtni slučajevi. Može se opisati kao blaga infekcija gornjih dišnih puteva koja simptomima nalikuje na gripu. Zbog svojih simptoma koji se mogu pripisati gripu ili prehladi dijagnosticiranje pontijačke groznice može se zamijeniti sa dijagnozom gore spomenutih. Također, poteškoće koje ona uzrokuje najčešće se liječe spontano i ne uključuju potrebu za liječničkom intervencijom i hospitalizacijom. Iako imaju istog uzročnika, pontijačka groznica se od legionarske bolesti razlikuje u tome što se kod nje ne javlja pneumonija. Najvažnija značajka ove bolesti jest da je ona samolimitirajuća, njena inkubacija traje od nekoliko sati do

3 dana, a simptomi uključuju malaksalost, probavne smetnje kao proljev i povraćanje, mučninu i glavobolju.

Prvi slučaj pontijačke groznice zabilježen je u mjestu Pontiac u Michiganu, po čemu je i dobila ime. Otkrivena je kada je nekolicina radnika u mjesnoj ambulanti osjetila simptome slične gripi i imala povišenu temperaturu, no bez upale pluća. Tek nakon što je otkriven uzročnik legionarske bolesti, dokazano je da je poteškoće kod navedenih izazvala ista bakterija kao i kod američkih legionara (10).

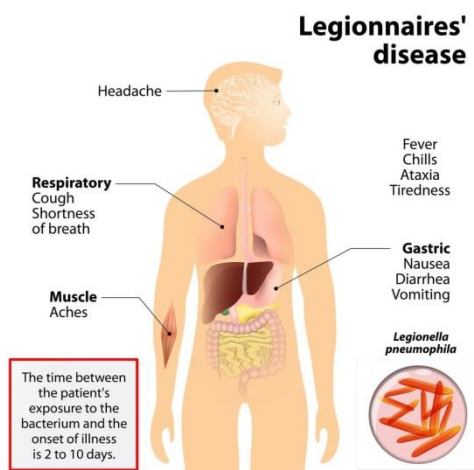
### ***1.3.2. Legionarska bolest***

Kod same izloženosti ovoj bakteriji, važno je znati da neće svaki pojedinac koji je izložen razviti simptome. Uz to, kod legionarske bolesti izostaje karakterističan simptom po kojem je moguće bez drugih dijagnostičkih postupaka odrediti da li se radi o infekciji legionelom ili o nekoj drugoj pneumoniji. No, postoje neki simptomi koji su specifičniji za legionarsku bolest nego za upale pluća drugih uzročnika. Za razliku od pontijačke groznice, legionarska bolest može završiti letalno, a uzrok tome leži u neprepoznavanju simptoma na vrijeme. Smrtnost od navedene bolesti može biti i do 12% (11). Ovaj teži oblik upale pluća najčešće uzrokuje već spomenuta *L. pneumophila*, seroskupine O1, dok uz nju mogu biti uzročnici i seroskupine 4 i 6 (12). Uvelike, pojavnosti legionarske bolesti pogoduju vodeni sustavi, pogotovo oni neodržavani te oni koji stagniraju, no prikladna temperatura vodenog okoliša poticat će razmnožavanje legionela (4).

Jednom kada bakterija uđe u organizam potrebno je 2-10 dana inkubacije do pojave prvih simptoma. Specifično je da se u većem broju slučajeva simptomi javljaju oko petog dana inkubacije. Jedan od prvih simptoma jest zimica koja je prisutna već prvog dana bolesti, koju prati visoka temperatura. Temperatura je prisutna svih dana bolesti koja može trajati i

tjednima (13). Od ostalih simptoma osoba može osjećati malaksalost, glavobolju, bol u mišićima, a kašalj koji se javlja je suh i bez iskašljaja. Kao i kod ostalih upala pluća prisutna je bol u prsima i otežano disanje. Simptomi respiratornog sustava karakteristični su za pneumonije, no neki pacijenti mogu razviti i gastrointestinalne simptome te poremećaje u radu bubrega. Oko 25-50 % slučajeva biti će praćeno mučninom, povraćanje i boli u abdomenu. Neurološki, mogu se zabilježiti delirij, zbunjenost pa čak i halucinacije. Ovi poremećaji mogu se dijagnosticirati u prvom tjednu bolesti. Karakteristično za legionarsku bolest jest svakako rendgenski snimak, odnosno radiološke promjene. Radiološke promjene na plućima javljaju se trećeg dana bolesti zbog akumulacije tekućine u plućima. Nakon postavljene dijagnoze, potrebno je izvjesno vrijeme da bi bolesnik imao normalan rendgenski snimak pluća, a to može potrajati i do 12 tjedana (10).

Ono što je bitno napomenuti jest da neće kod svakog pojedinca simptomi biti jednako izraženi, dok se neki ni ne moraju javiti. Sve ovisi o imunološkom sustavu pojedinca, kao i infektivnoj dozi koja uđe u ljudski organizam (13).



Slika 3. Simptomi legionarske bolesti (<https://theconversation.com/why-are-people-still-dying-from-legionnaires-disease-121862>)

### 1.3.3. *Infekcije uzrokovane non-pneumophila vrstama legionela*

Kao što je već poznato najveći broj legioneloza uzrokovano je i najpoznatijim predstavnikom te bakterijske vrste, *L. pneumophila*. Kad govorimo o drugim legionelama najčešće se tu spominje *L. longbeachae* i *L. micdadei* te je jako mali broj slučajeva u kojima su drugi pripadnici ove vrste uzročnici. Bolesti koje uzrokuju druge vrste iz roda *Legionellaceae* ne moraju imati simptome kakve tipično možemo pronaći u legionelozama, a uz to i infekcije sa dvije ili više vrste mogu biti prisutne. Upravo radi razvijenih testova koji su specifični samo za *L. pneumophila* kod bolesti uzrokovane drugim legionelama one najčešće neće biti dijagnosticirane. Malo je poznato o mehanizmima patogenosti i unutarstaničnom životu legionela koje nisu *L. pneumophila*. No, one ne smiju biti zanemarene upravo iz razloga jer predstavljaju veći javnozdravstveni rizik, poglavito za imunokompromitirane osobe. Poznata je mogućnost da navedene budu teže za ukloniti iz vodenih sustava gdje *L. pneumophila* i stvara najveće probleme, pa ih se iz tog razloga ne smije podcjenjivati kao humane i okolišne patogene.

Znanstvenici su prilikom pojave legioneloza proveli istraživanje u kojem je dokazano da postotak od 53% bolesti izaziva *L. longbeachae*, a 46% *L. pneumophila*, ono što je također zabilježeno jest veća smrtnost u slučaju nonpneumophila legionela. Na određenim geografskim područjima prisutne su određene vrste legionela, no to još znanstveno nije objašnjeno. Primjer navedenog jest Tajland gdje je incidencija pneumonija uzrokovanih *L. longbeachae* veća, dok pneumonija uzrokovana *L. pneumophila* nije zabilježena. Pneumonija ima težu kliničku sliku, kao i povećan rizik od razvoja perikarditisa, endokarditisa i akutnog pankreatitisa.

*Legionella micdadei* zajedno sa nekim drugim legionelama kao što su *L. dumoffii*, *L. feeleii* i *L. anisa* čini otprilike 2,2% ukupnih legioneloza. Navedena vrsta uzrokuje bolest

najčešće kod pacijenata koji su HIV pozitivni i pacijenata sa transplantiranim bubregom (28). Infekcija se pojavljuje većinom intrahospitalno i simptomi mogu biti slični onima u legionarskoj bolesti ili pontijačkoj groznici, no mogu se javiti i komplikacije u vidu teškog proljeva, upala poplućnice i sl. Znanstvenici su dokazali kako je ova vrsta bakterija manje agresivna za humane makrofage (29).

Ostale vrste legionela su rijetko izolirane iz ljudskog organizma, a i onda kada su oni izolirani to je kod onih pacijenata koji već pate od težih akutnih ili kroničnih oboljenja. Pacijenti kod kojih je dokazana bolest uzrokovana nonpneumophila vrstama legionele u većini su slučajevi bolesnici koji imaju oslabljen imunitet i primaju imunosuportivnu terapiju, što nije slučaj kod bolesti uzrokovane *L. pneumophila*. Od javnozdravstvenog značaja je napomenuti kako nije zabilježen slučaj pojave upale pluća koje su uzrokovane nonpneumophila vrstama legionela, a da su povezane sa aerosolom stvorenih od velikih rasladnih sustava i sl. Ono gdje jesu zabilježene druge vrste legionela jest u pojavi pontijačke groznice čija je posljedica izloženost aerosolu (29).

#### 1.4. Dijagnostika i liječenje legioneloza

Iako znanstvenici pokušavaju pronaći dijagnostički postupak koji bi olakšao i skratio vrijeme potrebno da se legioneloze dokažu, do sada nije zabilježen veći uspjeh. Upravo kako bi se izbjegle letalne ili teže posljedice, potrebno je razviti metodu koja bi omogućila brzo dijagnosticiranje. Testovi za dijagnosticiranje trebali bi se primjenjivati na svim pacijentima sa sumnjivom pneumonijom, onima starijima od 40 godina, imunokompromitiranim pacijentima, pacijentima koji ne reagiraju na beta laktamske antibiotike te naravno onima koji su potencijalno bili izloženi legioneli na nekom mjestu gdje se dogodila epidemija. U postavljanju dijagnoze potrebno je uzorke uzeti prije antibiotske terapije kako bi rezultati analize bili što ispravniji (13).

Danas postoji širok spektar genetskih i imunoloških metoda za dijagnosticiranje, no unatoč tome testovi za legionelu baziraju se na najpoznatijoj *L. pneumophila* O1. Laboratorijske metode koje se sada koriste u dijagnozi jesu izolacija bakterije na hranjivom mediju, serološka identifikacija, detekcija antigena u urinu, detekcija bakterije u tkivu ili tjelesnim tekućinama koristeći imunofluorescentnu mikroskopiju, detekcija bakterijskog DNA pomoću PCR-a (eng. *Polymerase Chain Reaction*). Od navedenih metoda najmanje se koristi imunofluorescentna mikroskopija, dok se za većinu slučajeva koristi detekcija antigena u urinu (4). Detekcija antigena osjetljiva je metoda za legioneloze koje se javljaju među populacijom i prilikom putovanja, a za legioneloze koje se javljaju intrahospitalno ova metoda nije u potpunosti odgovarajuća. Ova metoda je najbrža od svih navedenih te je upravo zato i najčešće korištena, već u prva tri dana bolesti antigeni se mogu detektirati, dok nakon ozdravljenja u urinu oni mogu zaostati i nekoliko tjedana.

Imunofluorescentna mikroskopija može biti direktna ili indirektna metoda za detekciju, pri čemu se kao uzorci uzimaju sekret iz respiratornog trakta, tekućina iz pluća ili pleuralna

tekućina. PCR metoda koristi se češće za dijagnosticiranje legionela iz okoliša, iako se može primjeniti i na kliničke uzorke. Ona potencijalno može otkriti većinu serogrupa te je zato korisna u ranoj detekciji infekcije, osobito u intrahospitalnim slučajevima. Osim brzine u postavljanju dijagnoze, PCR metoda ima i ekonomskih benefita, brzom dijagnozom sprječavaju se veći gubitci, čemu uvelike doprinosi i korištenje real-time PCR metode. Uz kultivaciju na hranjivoj podlozi, koristi se ELISA, najčešće korištena serološka metoda. Ona služi kao potvrda dokazane legionele na hranjivoj podlozi te se kao takva ne može koristiti zasebno. Jedna od prednosti metoda je dostupnost velikog broja antiseruma kojima se može dokazati veliki broj serogrupa bakterije, no mana je dugotrajnost analize koja u postavljanju dijagnoze nije poželjna (1).

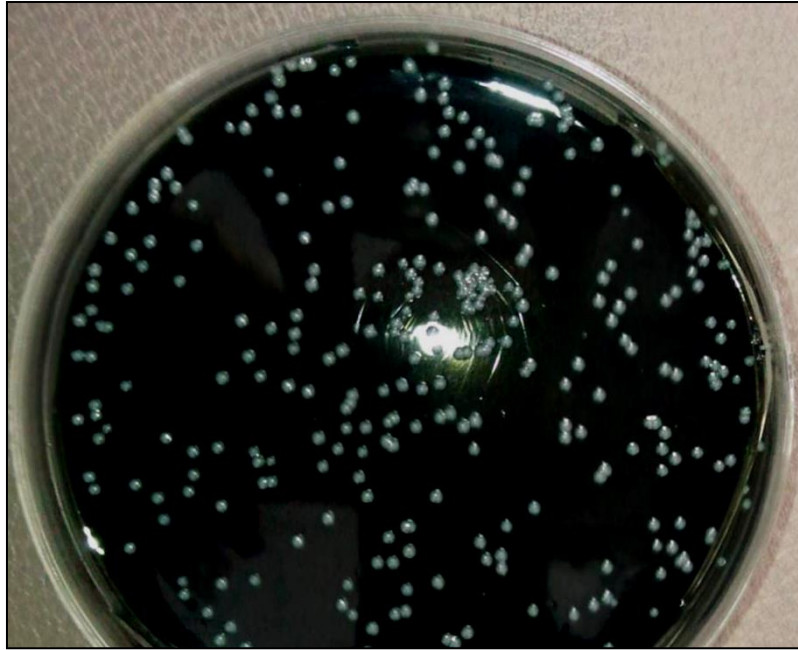
Terapija legioneloza sastoji se od uzimanja prikladnih antibiotika koji mogu suzbiti uzročnika. Najučinkovitijima do sada pokazuju se makrolidi u koje ubrajamo azitromicin i klaritromicin koji uspješno penetriraju u tkiva i na taj način djeluju na uzročnika. Eritromicin pokazuje djelotvornost ali znatno slabiju nego prethodno navedeni, dok bakterija pokazuje potpunu otpornost na beta laktamske antibiotike. Ukoliko se sumnja na polimikrobnu pneumoniju, pacijentu se uz makrolide daju i beta laktamski antibiotici. Liječenje legioneloza jest dugotrajno, od 10 do 21 dana, dok sami simptomi nisu prisutni predugo (1).

Veliki problem današnjice predstavlja činjenica da profilaksa za legionelu ne postoji te je potrebno podignuti svijest o potrebi kontroliranja prisutnosti ove bakterije.



## 1.5. Kultivacija

Još uvijek, preferirana metoda za dijagnostičke postupke jest kultivacija bakterija na hranjivoj podlozi. Kultivacija se smatra zlatnim standardom upravo zbog toga što je njena specifičnost blizu 100%, a osjetljivost metode iznosi oko 60%. U prošlosti, legionela se mogla izolirati jedino u zamorcima i kokošjim jajima, sve dok nije razvijen *in vitro* medij na kojem se može rasti. Primarno, legionela se uzgaja na agaru koji sadrži L-cistein koji je bakteriji neophodan za rast. Prije otkrića idealnog agara za uzgoj legionela, ona se kultivirala na Mueller-Hinton agaru, koji je sadržavao hemoglobin i L-cistein. Znanstvenici su utvrđivali sastav podloge koji idealno pogoduje rastu bakterije, te se sam sastav iste mijenjao kroz godine. Tako je podloga sadržavala kazein hidrolizat, ekstrakt govedine i škrob koji je zamijenjen aktivnim ugljenom, dodavane su određene supstance kako bi se zadržao optimalan pH potreban za rast, a to je 6,9. Novi razvijen medij za uzgoj bakterija nazvan je BCYE (eng. *Buffered Charcoal Yeast Extract*). Nekoliko godina kasnije, u hranjivu podlogu dodane su i kalijeve soli, kao i određeni antibiotici koji podlogu čine još selektivnijom za rast legionela (14). Danas, podloga sadrži l-cistein, soli željeza, ekstrakt kvaca koji je izvor proteina i aktivni ugljen koji pomaže uklanjanju vodikovog peroksida toksičnog za bakteriju (10).



Slika 4. Porast legionele na BCYE agaru

#### **1.6. Faktori koji pogoduju rastu legionela**

Već ranije spomenuto, legionela je sveprisutna bakterija koja ima sposobnost rasta i razmnožavanja u različitim uvjetima. Ti uvjeti uključuju različite temperature, pH vrijednosti kao i vodene sredine u kojima se može naći. Od navedenih, najvažniji faktor jest temperatura koja će legionelama omogućiti preživljavanje, kako u prirodnim vodenim resursima tako i u umjetnim. Legionele jesu mezofilne bakterije sa širokim temperaturnim rasponom u kojem mogu rasti, pa se tako mogu pronaći na temperaturama od 12°C do 42°C dok im je optimum za rast od 25°C do 40°C (14). Unatoč navedenom, zabilježeni su slučajevi u kojima je bakterija bila prisutna u sistemima vruće vode i do 66°C, a iznad 70°C bivaju uništene gotovo instantno. Znanstvenici su dokazali da broj bakterija opada iznad 44-45°C, a temperatura pri kojoj im je razmnožavanje limitirano iznosi između 48,4°C i 50,0°C (10). O preživljavanju bakterije u raznim uvjetima govori činjenica da je bakterija izolirana i iz smrznutog jezera i u termalnim vodama. Pri niskim temperaturama nema mogućnost razmnožavanja, ali može

preživjeti dugo vremena. Jednom kada se temperatura podigne na optimum potreban za njen rast ona se može dalje razmnožavati, a pri temperaturama od 50°C može preživjeti i do nekoliko sati. U sustavima hladne vode zbog izbjegavanja infekcija legionelom temperature je potrebno održavati između 20°C i 25°C (16). Sve navedeno legionelu čini termotolerantnom bakterijom, osobito u vodenim sredinama koje svakako predstavljaju krucijalan faktor u razmnožavanju bakterije i širenju infekcije (10).

Osim temperature, pH vrijednost važan je faktor koji može limitirati ili potencirati bakterijski rast. Ova bakterija raste u slabo lužnatom i slabo kiselom mediju, u pH 6,0-8,0, a pri pH vrijednostima 5,0 i 10,0 kultivacijska sposobnost nije toliko izražena (16). Uz navedeno, mali je broj istraživanja koji su uz vodovodnu vodu kao pogodan medij za rast spomenuli i slanu morsku vodu koja također može imati benefite za legionelino razmnožavanje. Znanstvenici su dokazali kako bakterija ima mogućnost preživljavanja u vodama gdje je koncentracija NaCl do 3%, a temperature nisu niže od 4°C odnosno nisu više od 20°C. Naravno, sama koncentracija NaCl i temperatura nisu dovoljni već je potrebna i kombinacija sa drugim nutrijentima koji se nalaze u morskoj vodi i iz čega legionele crpe ono što im je potrebno kako bi opstale (19).

Sama voda ne može biti dovoljan medij u kojem se bakterije razmnožavaju već su potrebni drugi nutrijenti i faktori koji će omogućiti isto. U studijama je dokazana bakterijska sposobnost dugog preživljavanja u sterilnoj vodi iz slavine i sterilnoj destiliranoj vodi, no one se ondje ne razmnožavaju. Upravo prisutnost drugih mikroorganizama legionelama omogućava da prežive i da se razmnožavaju. Prisutnost drugih mikroorganizama će bakterijama omogućiti sve potrebne nutrijente za rast kao što su naprimjer aminokiseline. Ti mikroorganizmi mogu biti druge bakterije ali i protozoe (10). Znanstvenici su svojim istraživanjima dokazali mogućnost legionela da se razmnožavaju u 14 vrsta protozoa što uključuje *Acanthamoebu* i *Naegleriu* i neki od trepetljikaša. Protozoe predstavljaju važan

vektor za rast i preživljavanje u prirodnim i umjetnim okruženjima, te su pronađene na onim mjestima gdje su zabilježeni slučajevi legioneloza. U prirodnim okruženjima legionele proliferiraju u protozoe pomoću intracelularnih fagosoma uz produkciju proteaza sa citotoksičnom aktivnošću što uzrokuje lokalnu destrukciju na protozoama (10). Zbog njene mogućnosti razmnožavanja intracelularno legionele se smatraju parazitima ameba, s obzirom da se ne mogu razmnožavati ekstracelularno. Ovakav način života bakterije nije uobičajen upravo zbog toga jer su protozoe te koje za svoj rast i razmnožavanje koriste bakterije od kojih dobivaju sve potrebne nutrijente. Inicijalna interakcija između patogena i stanice domaćina, u ovom slučaju protozoe, posredovane su vezanjem bakterijskog liganda, kao što su pili, na receptor koji se nalazi na površini stanice domaćina. Genetska istraživanja pokazala su da bakterijska stanica posjeduje minimalno dva pili. Jedan od njih je CAP pili, eng. *Competence-and-adherence pili* (15). Kada bakterija uđe u protozou ona se nalazi u vakuoli i izbjegava degradaciju lizosomima. Mitohondriji i endoplazmatski retikulum regrutiraju se sa vakuolom i nastaje izvedeni odjeljak u kojem se nalaze legionele. Bakterija se umnaža ekstenzivno, uništava fagosomalnu membranu, invadira citosol stanice domaćina, lizira i izlazi iz stanica, kako bi mogla započeti novi infektivni ciklus i dalje se razmnožavati (17). Kako bi njen životni ciklus bio uspješan, jednom ingestirana bakterija od strane ameba mora imati određene uvjete u kojima ona može opstati. Temperatura je ponovno jedan od glavnih faktora koji bakteriju može ograničiti (18). Na temperaturi od 22°C bakterija biva probavljena, a na 35°C ona može proliferirati. Osim na preživljavanje, bitna je temperatura zbog ekspresije flagela koje ona posjeduje, pa su tako pri 30°C flagele više izražene, nego na temperaturama od 37°C. Bičevi su bitni kod legionela jer njihova prisutnost će omogućiti bakterijama da inficiraju protozoe i makrofage, dok one koje ih ne posjeduju imaju smanjenu ili nikakvu sposobnost adheriranja i inficiranja. Životni ciklus u protozoama legionele štiti i

od utjecaja biocida i termalne dezinfekcije što im pruža daleko veću rezistenciju u okolišu (10).

## **1.7. Biofilm**

U svom prirodnom okruženju bakterije žive u organiziranim zajednicama koje se nazivaju biofilm. Biofilm se može naći na prirodnim površinama kao i na površinama umjetno stvorenih sustava. Ovakav način života bakterijama osigurava povoljniji okoliš uz stvaranje sluzavih i tankih slojeva uz pomoć kojih izbjegavaju njima nepovoljna stanja kao što su temperaturni ekstremi i stanje limitiranih nutrijenata (10). Formiranje biofilma ide kroz nekoliko koraka, odnosno faza. Inicirano je pričvršćivanjem na supstrat, nakon čega slijedi sazrijevanje biofilma i formiranje ekstracelularnog matriksa što završava disperzijom bakterija. Mikrobne populacije adheriraju na određeni supstrat i ugrade se u matriks gdje tvore polimernu supstancu koja im pruža zaštitu od nepovoljnih uvjeta. Adheriranje stanica bakterija na površinu događa se najčešće pomoću ekstracelularne polisaharidne supstance koju izluči stanica. (10). Vezanje bakterija i stvaranje biofilma uvjetovano je raznim čimbenicima među kojima su kombinacije kemijskih, bioloških i vremenskih uvjeta. Bakterijske zajednice koje tvore biofilmove stvaraju posljedice u umjetno stvorenim sredinama gdje se mogu naći (20). Biofilmovi se smatraju izuzetno kompleksnim mirobnim ekosistemima koji se mogu sastojati od bakterija, algi i protozoa. No, čak i u takvim zajednicama bakterije su kompetitivne i "natječu" se za nutrijente kako bi se mogle integrirati (2).

### **1.7.1. *Legionella pneumophila* i biofilm**

U vodama u prirodi legionele se mogu naći kao sesilne stanice u biofilmovima koji im omogućava pričvršćivanje na površine ili zajednicu sa drugim bakterijama. Navedeno se

postiže formiranjem ekstracelularnog matriksa koji se sastoji većinski od vode, polisaharida, proteina, DNA i RNA i anorganskih spojeva. Preživljavanje legionela u oligotrofnim uvjetima indicira da je bakterija sposobna pridobiti nutrijente iz bakterijske zajednice u biofilmu. Ono što legionelama dodatno pomaže jest adheriranje na već postojeći biofilm formiran od drugih bakterija te je tada njihovo preživljavanje značajnije nego u slučaju kada legionele primarno koloniziraju i stvaraju biofilm (21).

Legionela je u manjem postotku zastupljena u biofilmovima koji su pronađeni u prirodnim vodama kao i u okolišnim biofilmovima, te to može biti objašnjeno utjecajem drugih mikroorganizama u biofilmu. Neke bakterijske vrste uspješno će promovirati prisutnost legionela dok će drugi inhibirati njen rast. Primjeri bakterija koji promoviraju njen rast jesu *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens*. Znanstvenici navode kako navedene bakterije sintetiziraju tvari koje pomažu u adherenciji bakterije. Suprotno, bakterije koje inhibiraju legionelu u biofilmu jesu *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*. U biofilmu promovirajuće *Klebsiella pneumoniae* i inhibirajuće *Pseudomonas aeruginosa* legionela ima mogućnost perzistirati što govori smanjenom utjecaju inhibirajuće bakterije u prisutnosti *Klebsiella pneumoniae*. Razlog tome može biti u faktorima rasta koje producira *Klebsiella*, dok oni inhibiraju rast *Pseudomonasa* (2).

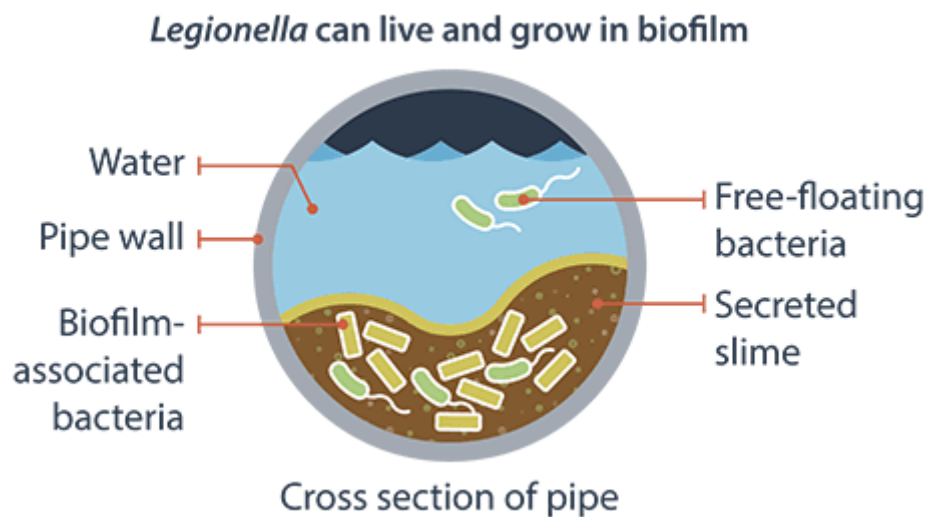
U laboratorijskim uvjetima, *Legionella* će tvoriti biofilm u strožim uvjetima na ranije spomenutom BCYE agaru, koji je bogat nutrijentima, i pri različitim temperaturama. Kvantiteta, stupanj adherencije i stupanj tvorbe biofilma u korelaciji je sa različitim temperaturama. Na 25°C legionela tvori biofilm nalik na gljivu koji sadrži vodene dijelove, a suprotno, pri 37°C biofilm je deblji i ne sadrži vodu. Treća temperatura na kojoj je zabilježena pojavnost biofilma jest 42°C i tada je on nitaste strukture bez sjaja (2).

Iako je preživljavanje legionela u biofilmu s više vrsta mikroorganizama zabilježeno, malo je poznato o faktorima koji joj omogućavaju pričvršćivanje i perzistiranje u biofilmovima (2). Ono što legionelu još izdvaja jest činjenica da je ona sposobna tvori i nutrijente za rast dobivati direktno od algi kao i rasti na ekstracelularnim produktima cijanobakterija u laboratorijskim uvjetima (2).

Postoje određeni faktori koji određuju formiranje biofilma legionela, jedan od najvažnijih je svakako ciklički di-GMP (eng. *Cyclic di-GMP*). C-di-GMP jest sekundarni glasnik bakterija koji regulira određene procese kao što su patogeneza i formiranje biofilma. Pretjerano formiranje biofilma pokazuje povezanost sa smanjenjem razine c-di-GMP-a, dok bi njegova degradirajuća sposobnost mogla poboljšati formaciju biofilma. Svakako jest značajna i prisutnost željeza koji je esencijalan nutrijent potreban za rast i replikaciju. Iako je esencijalan, njegova koncentracija trebala bi biti strogo kontrolirana upravo zbog toksičnosti koju može izazvati. Visoke koncentracije željeza izazvati će snažnu inhibiciju formiranja biofilma (2). Bakterijska stanica sadrži i gen Lcl (eng. *Legionella collagen-like*) koji je adhezin i veže se za sulfatni glikozaminoglikan na ekstracelularnom matriksu domaćina (1). Ovaj gen je prisutan u raznim okolišnim i kliničkim izolatima *L. pneumophila* dok kod drugih, manje poznatih vrsta on izostaje te one nisu ni zabilježene kod pacijenata kao ni u biofilmovima (2). Prisutnost kationa ima utjecaja na biofilm, pa tako naprimjer kalcij i magnezij olakšavaju pričvršćivanje stanica na abiotičke površine. Povišene koncentracije cinka, mangana i magnezija povećavaju sposobnost legionela da se poveže sa stanicama domaćina kao što su naprimjer humane epitelne stanice pluća.

Važno je spomenuti i Quorum sensing (QS) koji regulira ekspresiju gena u raznim bakterijskim procesima uključujući virulenciju, sporulaciju, bioluminiscenciju, kompetenciju i formaciju biofilma. Za *L. pneumophila* QS je važan u disperziji bakterijskih stanica u kasnijim fazama razvoja biofilma (2).

Upravo zbog mogućnosti stvaranja biofilma, potrebno je prevenirati njegovo stvaranje jer jednom stvoreni biofilm teško je ukloniti. Kada bakterija uđe u vode, to su najčešće biofilmovi i to na stijenkama slavine, ventilacije ili u klimatizacijskom sustavu. Nekoliko je faktora koji će pogodovati stvaranju biofilma, oni su: prisutnost nutrijenata, kako u vodi tako i na samom materijalu, kamenac i korozija, više temperature vode, stagnacija ili slabi protok vode u slavinama. Kamenac i korozija olakšavaju formiranje biofilma zbog stvaranja mikroniša do kojih ne može doprijeti dezinficijens i na taj način se povećava površina dostupna mikroorganizmima za stvaranje biofilma. Korozija povećava dostupnost željeza legionelama što rezultira povećanim rizikom za rast legionela kao i mjestima u vodoopskrbnim sustavima gdje je protok manji, a osobito gdje voda stagnira (12). Odabir materijala za vodovodni sustav predstavlja jedan od rizika za nastan biofilma jer neki od materijala, osobito prirodnih, mogu omogućiti supstrat bogat nutrijentima za rast, ali jednaki takav rizik predstavljaju i plastične površine (22).



Slika 5. Prikaz biofilma legionela u presjeku vodovodne cijevi

(<https://www.cdc.gov/legionella/wmp/overview/growth-and-spread.html>)



### *1.7.2. Biofilm i morska voda*

Bakterije predstavljaju važnu ulogu u morskom okolišu, uključujući vođenje biogeokemijskih ciklusa i opskrbljivanje materijala i energije na višim trofičkim razinama. Fenotipska plastičnost bakterija jest sposobnost njihovog genotipa da pod raznim utjecajem okoliša proizvede različite fenotipe što svakako omogućava preživljavanje u uvjetima koji nisu potpuno pogodni te je upravo jedan od takvih uvjeta morski okoliš (23).

Biofilmovi morskog okoliša lako koloniziraju umjetne površine pri čemu ubrzavaju procese korozije i obraštaja, ali mogu i utjecati na polietilensku plastiku. Zajedno sa drugim mikroorganizmima, bakterije su zaslužne za obraštanje, pri čemu dozvoljavaju adheziju većih organizama kao što su alge, dagnje i kozice. Navedeno stvara velike ekonomske izdatke, ali i ekološki značaj je bitan. Organizmi prisutni u obraštaju reduciraju protok vode i povećavaju biološki talog u farmama akvakulture.

U morskom okolišu pristup nutrijentima je više ograničen i varira. Na otvorenom moru, more sadrži manje nutrijenata i oni su slabije dostupni bakterijama, dok je obaln more bogato nutrijentima. Organska materija u morskoj vodi sadrži veće količine prozirnog gela u formi koloida i snopova koji su produkt mikroorganizama i fitoplanktona. Bakterijske stanice imaju lak pristup nutrijentima uz pričvršćivanje na gelove i hidrolizirajući ih koristeći hidrolaze (23).

Nekoliko je važnih bakterijskih procesa i mehanizama koji su ključni u formiranju biofilma u morskoj vodi, oni uključuju mikrobnu populaciju već pristunu na površini koja daje signale drugim mikroorganizmima, komunikacija među istim vrstama i različitim vrstama bakterija i regulatorni balans između kooperacije i kompetitivnosti. Dijelovi morskog

okoliša bakterijama predstavljaju jak izvor nutrijenata kao što su anorganski makronutrijenti, organski ugljik, energija koja im je potrebna, mikronutrijenti i elektroni (24).

U moru pronalazimo dva načina života mikroorganizama, jedan je onaj gdje su organizmi raspršeni u vodenom okolišu, a u drugome su mikroorganizmi vezani na čvrstu površinu. Iako je uobičajeno da oni preferiraju jedan način života, neki imaju sposobnost prilagodbe na oba ovisno o fazi životnog ciklusa u kojoj se nalaze. Primjeri bakterija koje žive vezane za površinu su *Rhodobacteraceae*, *Alphaproteobacteria*, *Alteromonadaceae*, *Vibrionaceae* i *Flavobacteria*. Smatra se kako je afinitet prema načinu života usađen u mikrobnu genetiku i rezultat je dugotrajne evolucije (24).

## **1.8. Mjere za suzbijanje**

Ranije spomenuto, legionela je bakterija koja može biti pronađena u prirodnim vodenim sustavima. Ukoliko ona nastani prirodne vode, broj kolonija neće biti dovoljno velik da bi predstavio rizik za ljudsko zdravlje. S obzirom na njenu toleranciju na klorid, prilikom obrade voda ona može prijeći u vodovodne sustave. Uz toleranciju na klorid, u vodovodnim sustavima bakteriji pogoduje i visoka temperatura (25).

U vodovodnim sustavima primarno je potrebno obratiti pažnju na materijale koji se koriste u izgradnji vodoopskrbnih objekata kao i na slijepe završetke cijevi koji predstavljaju daleko najveći rizik za razmnožavanje legionela kao i za stvaranje biofilma. Poznavajući put prijenosa kontrola se također mora bazirati na glavama tuševa i klimatizacijskim sustavima (26). Nakon toga pažnja se mora fokusirati na održavanju temperature sustava kako ona ne bi bila poticajna za rast i razvoj bakterija. U kupaonicama temperatura mora biti do 45°C, a u

kuhinjama ona mora ići od 55°C do 60°C. U velikim vodovodnim sustavima kao što su hoteli, bolnice i slično temperatura vode ne smije ići ispod 60°C i to mora biti pod strogo kontroliranim uvjetima. Ovdje se javlja problem kod starijih i manje održavanih sustava gdje nije moguće konstatno održavati jednaku temperaturu zbog određenih gubitaka (12). Najvažniji korak za objekte koji posluju sezonski jest dezinfekcija na kraju sezone, te hiperdezinfekcija koja slijedi prije samog početka sezone.

Tehničke mjere nisu dovoljne kako bi se rizik smanjio na minimum pa je potrebno i simultano provođenje kemijsko-fizikalnih mjera. Tretman natrijevim hipokloritom efikasna je metoda, relativno jeftina, no otegotna okolnost jest miris klora koji se javlja u tretiranoj vodi te njegova nestabilnost ako je temperatura vode malo viša. Klor dioksid je učinkoviti kemijski dezinficijens koji uništava i biofilm te sprječava da on ponovno nastane (10).

Uz klorne preparate voda se može tretirati hidrogen peroksidom koji nije dovoljno učinkovit te stoga nije u prečestoj upotrebi. Ionizacija bakrom i srebrom jest zahtjevna metoda gdje voda prije mora proći kroz predtretman (27).

U sustavima gdje postoji mogućnost pojave biofilma nije poželjno koristiti tretman UV zračenjem. UV zračenje uništava vegetativne oblike no, biofilm i spore perzistiraju pa voda nije sterilna. Također, nije dugotrajno rješenje jer nema rezidualnog djelovanja (23).

Dezinfekcija ozonom jest dobra dezinfekcijska metoda jer on prodire u vegetativne oblike, ali uz njih vodu ostavlja sterilnom jer utječe na spore i biofilm. Osim uništenja biofilma, svojim djelovanjem ozon osigurava da se isti više ne pojavi. Nedostatak ove metode jesu veliki financijski izdaci koje dodatno povećava potreba za uklanjanjem ozona prije nego voda ide u upotrebu (10).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj okolišnih faktora (temperatura i razrjeđenje morske vode) na stvaranje biofilma različitih sojeva *L. pneumophila* u morskoj vodi.

### 3. METODE I MATERIJALI

#### 3.1. Materijali

- Automatske pipete
  - 2-20 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L i 100-1000 $\mu$ L "GilsonPipetman" (Gilson, USA)
  - nastavci za pipete (Gilson, USA)
- Epruvete
- Petrijeve zdjelice
- Sterilna destilirana voda
- Fiziološka otopina
- Plamenik
- Pincete
- Sterilne igle
- Termostat (35 $\pm$ 2  $^{\circ}$ C, 32 $\pm$ 2  $^{\circ}$ C)
- Mikrotitar pločice
- Ultrazvučna kupelj "Bandelin"
- Spektrofotometer Biofotometer, "Eppendorf", Njemačka

### **3.1.1. Hranjive podloge**

Prilikom izrade ovog istraživanja korištena je hranjiva podloga BCYE koji služi kao medij za rast legionelama. Hranjiva kruta podloga BCYE agar je sastava (pH 6,9): 10 g/l N-[2-acetamido]-2-aminoetansulfonske kiseline (ACES; Sigma, UK), 10 g/l kvašćevog ekstrakta (Oxoid, UK), 2 g/l aktivnog ugljena (Sigma, UK), 20 g/l agara (Oxoid, UK) te 1g/l alfa-ketoglutarat (Sigma, UK) uz dodatak 10 ml/l 0,1 M željezovog (III) nitrata (Sigma, UK) te 10 ml/l 0,33 M L-cisteina (Sigma, UK) i tekuća podloga AYE sastava (pH 6,9): 10 g/l kvašćev ekstrakt (Oxoid, UK), 10 g/l ACES (Sigma,UK), 1 g/l alfa-ketoglutarat (Sigma,UK) uz dodatak 3,3 mL/l 1M L-cisteina (Sigma, UK) i 3,3 mL/l 1M željezovog pirofosfata (Sigma,UK).

### **3.1.2. Bakterijski sojevi**

U istraživanju je korišteno 16 različitih sojeva legionela. Glavna razlika među sojevima bila je što su neki bili okolišni izolati, a drugi su bili izolirani u kliničkim slučajevima.

Okolišni izolati koji su korišteni jesu:

- *L. pneumophila* sg1 Oxford 1 ST1
- *L. pneumophila* sg1 Oxford 2 ST1
- *L. pneumophila* sg1 Benidorm ST1299
- *L. pneumophila* sg1 Bellingham ST728
- *L. pneumophila* sg1 Allentown ST82

Korišteni klinički izolati u istraživanju:

- *L. pneumophila* sg1 Oxford ST1
- *L. pneumophila* sg1 Philadelphia ST1
- *L. pneumophila* sg1 Philadelphia ST37
- *L. pneumophila* sg6 Chicago ST421
- *L. pneumophila* sg8 Concord 3 ST1324
- *L. pneumophila* sg1 Benidorm ST1299
- *L. pneumophila* sg1 Bellingham ST334
- *L. pneumophila* sg1 Bellingham ST728

### **3.1.3. Uzorci vode**

Uzorci vode koji su korišteni u istraživanju dopremljeni su u sterilnim staklenim bocama koje su bile označene. Uzorke su predstavljali sirova morska voda dopremljena s otoka Lošinja, destilirana vodovodna voda i vodovodna voda iz slavine. Voda je filtrirana pomoću filtera za šprice promjera 0,22  $\mu\text{m}$ .

## **3.2. Metode**

### ***3.2.1. Priprema bakterijskog inokuluma***

Broj bakterija u inokulumu određen je spektrofotometrijskom metodom nakon pripreme bakterijske suspenzije u sterilnoj vodovodnoj vodi. Apsorbancija se mjerila pri 600 nm i namještena je na OD1 (eng. Optical Density). Ta apsorbancija označava koncentraciju bakterija od  $1 \times 10^9$  cfu/mL. Nakon toga bakterije su dodane u pripremljene uzorke vode i početna koncentracija bakterija je iznosila  $\sim 10^6$  cfu/mL.

### ***3.2.2. Razvijanje biofilma***

Nakon što je početna suspenzija bakterija dodana u uzorke, pripremljena su razrjeđenja u mikrotitarskim pločicama i ista stavljena na inkubaciju na dvije temperature, 25°C i 37°C kroz 5 dana kako bi se biofilm počeo stvarati na površini mikrotitarskih pločica. Sljedeći korak bio je isprati mikrotitarske pločice i podvrgnuti ih tretmanu u ultrazvučnoj kupelji kroz 60 sekundi kako bi se bakterije odvojile od površine na kojoj jesu, u ovom slučaju s površine mikrotitarske pločice.

### ***3.2.3. Određivanje broja bakterija i statistička obrada rezultata***

Iz razrjeđenja u mikrotitarskim pločicama, bakterije su nasađene na neselektivni BCYE agar i inkubirane na 37°C. Nakon 72h izvršeno je očitavanje porasta na podlozi te se tako pratio broj vijabilnih bakterija iz uzoraka morske vode, destilirane vode, vodovodne vode kao i iz određenog omjera morske i destilirane vode (1:1). Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije. U svrhu daljnje obrade korišten je program *Statistica* uz korištenje neparametrijskog Mann-Whitney U testa.



## 4. REZULTATI

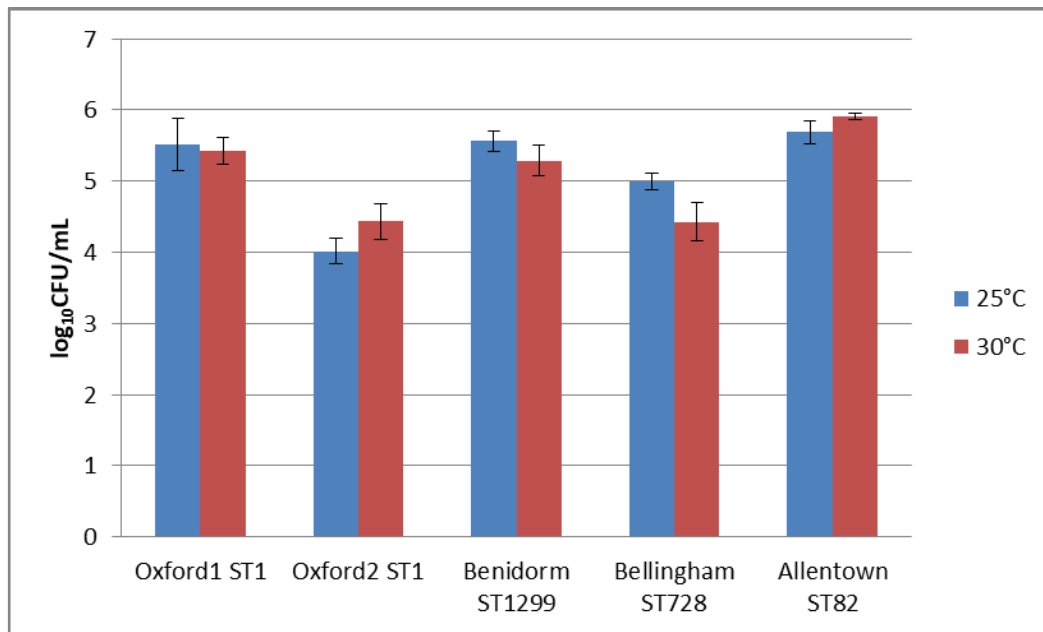
Prirodno, legionele nastanjuju vodena područja i to pretežito slatke odnosno vodovodne vode, njeno prirodno stanište nisu morske vode. U tim vodama, legionele pokazuju sposobnost stvaranja biofilma. Istraživanje se baziralo na utjecaju okolišnih faktora koji potencijalno imaju mogućnost potenciranja boljeg stvaranja biofilma legionela.

### 4.1. Sposobnost stvaranja biofilma legionela

Zbog okoliša u kojem legionele prirodno obitavaju bilo je potrebno istražiti mogućnost stvaranja biofilma u tri različita vodena izvora kao i na dvije različite temperature. Bakterije čiji porast je praćen jesu sve različiti sojevi *L. pneumophila* koji su podijeljeni na okolišne i na kliničke izolate.

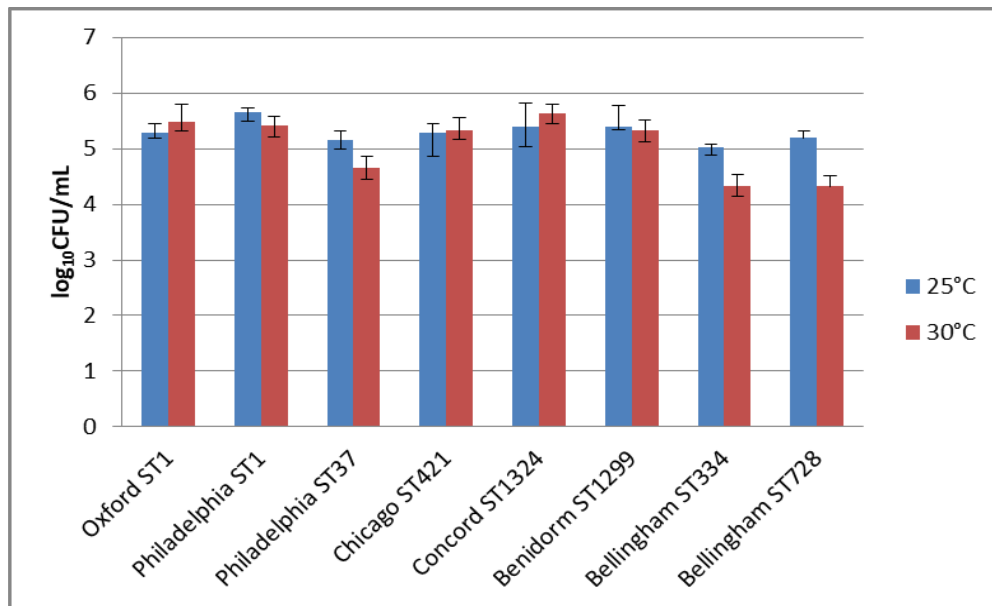
#### 4.1.1. *Biofilm Legionella pneumophila u morskoj vodi*

Sposobnost stvaranja biofilma različitih sojeva *L. pneumophila* ispitan je na način da su bakterije inokulirane u morsku vodu i praćen njihov porast nakon 5 dana na dvije različite temperature, 25°C i 30°C. Na slici 6. vidljiv je porast okolišnih izolata legionela na različitim temperaturama, u uzorku morske vode.



Slika 6. Porast okolišnih sojeva *L. pneumophila* u morskoj vodi na dvije različite temperature. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL±SD.

Iz dobivenog grafa vidljivo je da okolišni izolati legionela pokazuju sposobnost stvaranja biofilma u morskoj vodi pri obje temperature. Vidljivo je da neki sojevi bolje preživljavaju na temperaturi od 30°C, kao što je *L. pneumophila* Allentown ST82, soj izoliran iz morske vode što nije prirodno stanište legionela.



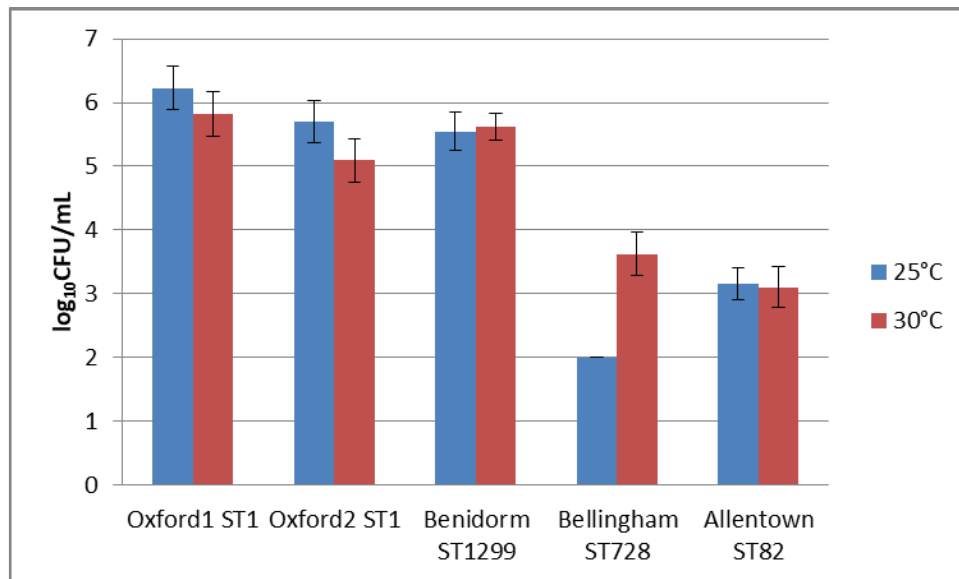
Slika 7. Porast kliničkih sojeva *L. pneumophila* u morskoj vodi na dvije različite temperature.

Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL±SD.

Na prikazanom grafu može se vidjeti preživljavanje kliničkih izolata legionela u morskoj vodi na dvije različite temperature. Većina bakterijskih sojeva koji su klinički izolati pokazuju veći afinitet prema stvaranju biofilma na temperaturi od 25°C.

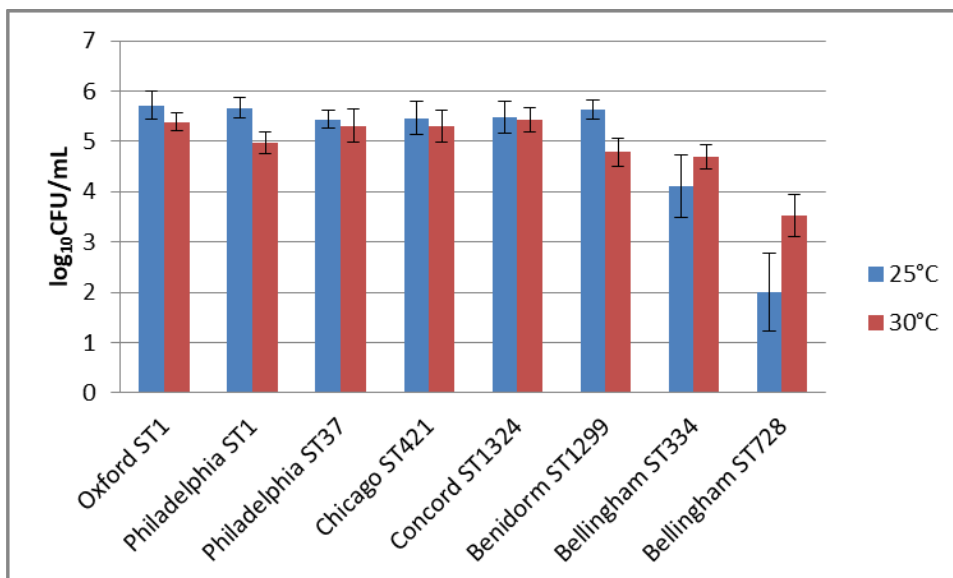
#### 4.1.2. Biofilm *Legionella pneumophila* u destiliranoj vodi

Sljedeći izvor u kojem je praćeno stvaranje biofilma legionela jest destilirana voda sa inokuliranim bakterijskim sojevima. Rast je praćen također kroz 5 dana, na temperaturama od 25°C i 30°C.



Slika 8. Porast okolišnih sojeva *L. pneumophila* u destiliranoj vodi na dvije različite temperature. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL $\pm$ SD.

Iz prikazanog može se vidjeti kako svi okolišni sojevi legionela stvaraju biofilm i u destiliranoj vodi, na obje temperature. Soj bakterije *Legionella pneumophila* Bellingham ST728 pokazuje nešto veću sposobnost stvaranja biofilma na 30°C u destiliranoj vodi, u odnosu na rast pri 25°C, dok se ostali sojevi podjednako ponašaju na obje temperature, uz blago veći porast pri 25°C.



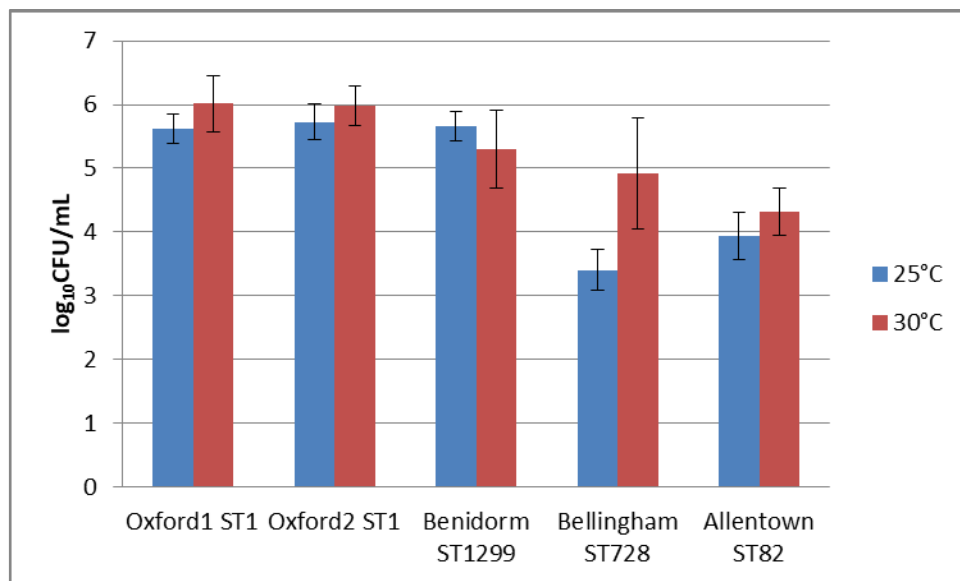
Slika 9. Porast kliničkih sojeva *L. pneumophila* u destiliranoj vodi na dvije različite temperature. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL±SD.

Klinički izolati *L. pneumophila* pokazuju veći afinitet prema stvaranju biofilma na temperaturi od 25°C, osim sojeva *Legionella pneumophila* Bellingham ST334 i ST728 koji biofilm bolje stvaraju pri 30°C.

#### 4.1.3. *Biofilm Legionella pneumophila* u jednakom omjeru morske i destilirane vode

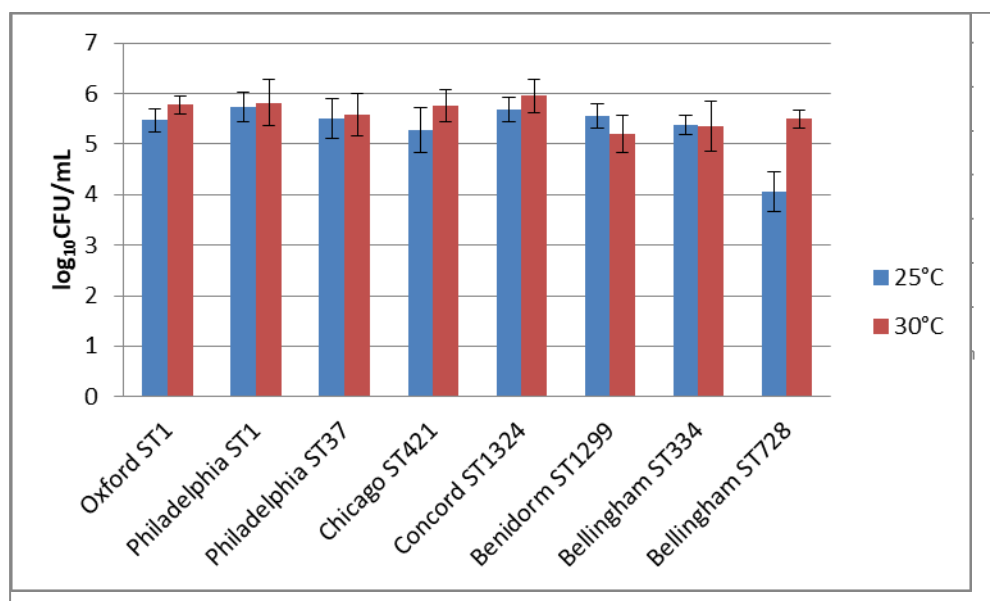
##### 1:1

Kako bi se istražilo u kojem mediju i pri kojoj temperaturi legionele najbolje stvaraju biofilm, one su inokulirane i u uzorak koji predstavlja jednak omjer destilirane i morske vode te je praćen porast na obje temperature.



Slika 10. Porast okolišnih sojeva *L. pneumophila* u omjeru destilirane i morske vode na dvije različite temperature. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL±SD.

Iz prikazanog grafa može se vidjeti da skoro svi okolišni sojevi legionela u ovom mediju bolje preživljavaju i stvaraju biofilm pri temperaturi od 30°C nego na nižoj temperaturi.

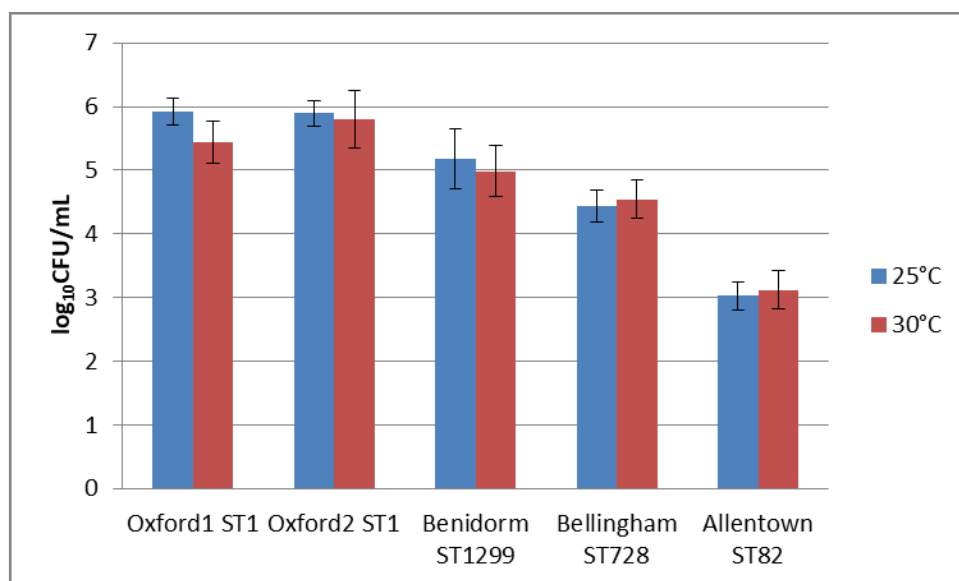


Slika 11. Porast kliničkih sojeva *L. pneumophila* u omjeru destilirane i morske vode na dvije različite temperature. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL±SD.

Kao i kod okolišnih izolata legionela, tako i većina kliničkih izolata pokazuje bolji porast i preživljavanje na temperaturi od 30°C.

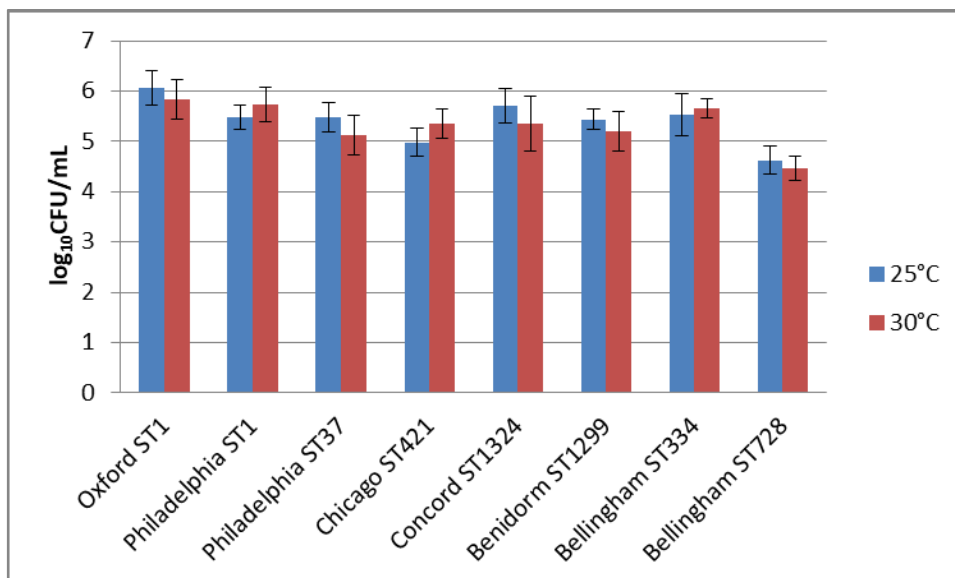
#### 4.1.4. Biofilm *Legionella pneumophila* u vodovodnoj vodi

Medij u kojem legionele mogu stvarati biofilm jest svakako njihovo prirodno stanište, a to je vodovodna voda. U vodovodnu vodu inokulirani su sojevi na dvije temperature te praćen njihov porast nakon 5 dana.



Slika 12. Porast okolišnih sojeva *L. pneumophila* u vodovodnoj vodi na dvije različite temperature. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL±SD.

Na grafu vidimo porast okolišnih sojeva nakon 5 dana na dvije temperature. Može se iščitati kako svi sojevi stvaraju biofilm na obje temperature, dok se među sojevima porast ne razlikuje značajno ovisno o temperaturi.



Slika 13. Porast kliničkih sojeva *L. pneumophila* u vodovodnoj vodi na dvije različite temperature. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL $\pm$ SD.

Kao i u prethodnom grafu, klinički izolati također na obje temperature pokazuju sposobnost stvaranja biofilma na obje temperature, no ovdje neki sojevi nešto veći afinitet prema stvaranju biofilma pokazuju pri temperaturi od 25°C.



## 4.2. Statistička obrada rezultata

Nakon što su rezultati porasta bakterija prikazani grafički, bilo je potrebno statistički obraditi rezultate kako bi se prikazalo da li ima značajnije razlike među određenim izvorima i pri određenim temperaturama. U svrhu daljnje obrade dobivenih rezultata korišten je program *Statistica* uz korištenje neparametrijskog Mann-Whitney U testa.

### 4.2.1. Usporedba izolata kliničkih i okolišnih ovisno o temperaturi

**Tablica 2. Rezultati Mann-Whitney U test-a za okolišne i kliničke izolate legionele u destiliranoj vodi**

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-value
OKOLIŠNI IZOLATI	1115,500	964,5000	334,5000	2,326430	0,019996
KLINIČKI IZOLATI	3358,500	2101,500	616,5000	4,768898	0,000002

**Tablica 3. Rezultati Mann-Whitney U test-a za kliničke izolate legionele u omjeru destilirane i morske vode (1:1)**

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-value
KLINIČKI IZOLATI	2821,500	3506,500	1225,500	-1,99017	0,046573

Prilikom izrade statističke analize u kojoj je praćena razlika u izolatima ovisno o temperaturi, uviđeno je kako bakterije koje su okolišni i klinički izolati rastu različito na temperaturama od 25°C i 30°C. Statistički značajna razlika očituje se u p-vrijednosti koja je manja od 0,05. Razlika je pronađena u slučaju kada su uzorci bakterija inokulirani u

destiliranu vodu, dok u morskoj vodi, vodovodnoj nije pronađena statistički značajna razlika. Dobiveno govori o stvaranju biofilma za kliničke izolate legionele koji su u destiliranoj vodi i omjeru destilirane i vodovodne vode pokazali bolju sposobnost stvaranja biofilma na temperaturi od 25°C, dok je kod okolišnih izolata to slučaj u destiliranoj vodi gdje legionele preživljavaju brojnije na 30°C. Dobiveni rezultati statističkom analizom podudaraju se sa grafičkim prikazom porasta bakterija u destiliranoj vodi gdje je obilježen veći broj bakterija okolišnih i kliničkih izolata poraslih na 25°C, odnosno kliničkih izolata legionela u omjeru destilirane i vodovodne vode na 30°C.

#### 4.2.2. *Usporedba kliničkih i okolišnih izolata ovisno o temperaturi i u određenom izvoru*

**Tablica 4. Rezultati Mann-Whitney U test-a za izolate legionele u vodovodnoj vodi pri temperaturi kultivacije od 30°C**

	Rank Sum okolišni	Rank Sum klinički	U	Z	p-value
<b>VODOVODNA VODA, 30°C</b>	1280,000	2906,000	650,0000	<b>-2,68797</b>	<b>0,007189</b>

U sljedećem statističkom testu, obratila se pozornost na to postoji li razlika između izolata kliničkih i okolišnih, ali pri točno određenoj temperaturi rasta bakterija. Tablica prikazuje zabilježenu statistički značajnu razliku u rastu bakterija različitih izolata u izvoru vodovodne vode i pri temperaturi od 30°C, dok kod drugih nije zabilježena razlika među izolatima. Zabilježena statistički značajna razlika govori o tome da su klinički izolati *L. pneumophila* sposobniji stvarati biofilm u vodovodnoj vodi u odnosu na okolišne izolate. Navedeno je također uočljivo i u grafičkom prikazu rasta bakterija ukoliko se uspoređi prikaz logaritamskih vrijednosti za okolišne i kliničke izolate legionela u vodovodnoj vodi,

logaritamske vrijednosti su veće kod kliničkih izolata što upućuje na bolje preživljavanje i stvaranje biofilma u odnosu na okolišne izolate.

#### 4.2.3. Usporedba različitih izvora

Nadalje, već spomenutim Mann-Whitney U testom međusobno su uspoređeni različiti izvori koji su primarno selektirani na osnovi temperature i izolata.

**Tablica 5. Rezultati Mann-Whitney U test-a za kliničke izolate legionela pri 25°C**

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-value
DESTILIRANA VODA- MORSKA VODA	2990,500	1860,500	684,5000	3,659946	0,000252
1:1-MORSKA VODA	3321,000	2139,000	963,0000	2,481053	0,013100
MORSKA VODA- VODOVODNA VODA	2160,000	3300,000	984,0000	-2,34412	0,019073

Tablica prikazuje statistički značajnu razliku u sposobnosti rasta kliničkih izolata legionela između destilirane i morske vode na temperaturi od 25°C. Ona se također očituje i kod usporedbe izvora morske vode sa vodovodnom vodom kao i sa omjerom 1:1 destilirane i morske vode. Klinički izolati *L. pneumophila* nešto manji afinitet stvaranja biofilma imaju u morskoj vodi u odnosu na druge izvore ovdje spomenute.

**Tablica 6. Rezultati Mann-Whitney U test-a za okolišne izolate legionela pri 30°C**

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-value
DESTILIRANA VODA-1:1	1036,500	1448,500	406,5000	-2,41382	0,015787
1:1- VODOVODNA VODA	1426,500	1058,500	428,5000	2,155408	0,031131

Pri temperaturi kultivacije od 30°C okolišni izolati legionela pokazuju statistički značajnu razliku u stvaranju biofilma u uzorcima destilirane vode i omjera destilirane i morske vode. Uz to razlika je i kod usporedbe uzoraka omjera destilirane i morske vode sa vodovodnom vodom, dok u usporedbi sa morskom razlika nije statistički značajna za okolišne izolate pri temperaturi od 30°C. Iz tablice je vidljivo da će okolišni izolati legionele nešto bolje stvarati biofilm u omjeru destilirane i vodovodne vode nego u drugim prikazanim izvorima.

**Tablica 7. Rezultati Mann-Whitney U test-a za kliničke izolate legionela pri 30°C**

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-value
DESTILIRANA VODA-1:1	1999,500	4105,500	514,5000	-5,96120	0,000000
DESTILIRANA VODA- VODOVODNA VODA	2448,500	3656,500	963,5000	-3,27657	0,001051
1:1-MORSKA VODA	3696,500	1763,500	587,5000	4,929503	0,000001
1:1-VODOVODNA VODA	3646,000	2682,000	1086,000	2,801945	0,005080
MORSKA VODA- VODOVODNA VODA	2145,500	3314,500	969,5000	-2,43867	0,014742

Najviše statistički značajnih rezultata pronalazimo pri međusobnom uspoređivanju različitih izvora za kliničke izolate ukoliko je temperatura kultivacije bila 30°C. Ovi rezultati govore o različitoj dinamici rasta i sposobnosti stvaranja biofilma za legionele koje su klinički izolati ovisno o izvoru u kojem se nalaze. S obzirom na p-vrijednost za uočiti je da će legionela više preživljavati i stvarati biofilm u omjeru destilirane i morske vode kao i u vodovodnoj vodi, dok je u destiliranoj vodi i morskoj vodi ta sposobnost nešto manja.

## 5. RASPRAVA

Najpoznatiji predstavnik ove bakterijske porodice, *Legionella pneumophila*, ubikvitarna je bakterija, aerobnog načina života i sveprisutna je u vodama. Prirodno stanište njoj su prirodno nastali vodeni sustavi, no njen javnozdravstveni značaj raste kada se ona nastani u umjetnim vodenim sustavima koje je stvorio čovjek. Tako se ona može pronaći u velikim hotelskim sustavima, klimatizacijskim sustavima, rashladnim tornjevima i sličnim sredinama koji joj pružaju uvjete idealne za rast. Legionele razvijaju toleranciju na tretmane klorom zbog čega ih je teže eliminirati iz sustava te je potrebno pribjeći skupljim metodama dezinfekcije. Osim financijske strane, prilikom nemogućnosti eliminiranja legionela povećava se rizik za infekcije ne samo u hotelskim i drugim sustavima, već i u bolnicama koje također mogu biti izvor zaraze te na taj način dolazi do intrahospitalnih infekcija (30).

Bolest uzrokovanu legionelama legionarska bolest, prenosi se kapljičnim putem, odnosno aerosolom koji sadrži bakterijske stanice potrebne da bi u plućima zaražene osobe izazvale infekciju razmnožavajući se. Osim legionarske bolesti, nešto blaži oblik jest pontijačka groznica, no put prijenosa je isti. Nisu zabilježeni slučajevi direktne transmisije sa čovjeka na čovjeka, već samo spomenutim aerosolom koji se stvara u rashladnim tornjevima, klimatizacijskim sustavima, no osim toga moguća je zaraza i česticama prilikom obrade tla (31).

Ono što bakteriju čini rezistentnijom u okolišu jest njena sposobnost prilagodbe na nepovoljne životne uvjete koji joj omogućavaju da preživi. Upravo neodržavanje sustava i neredovite kontrole i dezinfekcije dovest će do povećanog i nekontroliranog razmnožavanja legionela što će posljedično izazvati veće probleme. Problemi se javljaju ako legionele nastane cijevi, osobito njene slijepe krajeve, i druge dijelove sustava koji su mračniji i nepristupačni što će joj omogućiti uvjete za razvijanje biofilma. Biofilm je bakterijska

struktura koja se smatra najotpornijom i jednom kada on nastane teško ga je ukloniti i potrebno je pribjeći kombinaciji više metoda da bi se uklonio.

Istraživanje provedeno u ovom radu bavilo se utjecajem okolišnih čimbenika koji pospješuju stvaranje biofilma legionela u morskoj vodi. Važnost ovog istraživanja leži upravo u otkrivanju uvjeta koji bakteriji pospješuju preživljavanje i stvaranje biofilma. Biofilm će legioneli omogućiti preživljavanje na nedostupnim mjestima, kao i veću otpornost na primjenjene tretmane za suzbijanje. Upravo međusobna komunikacija među bakterijskim stanicama u biofilmu stvara ih još prilagodljivijima i predstavlja veću nepoznanicu. Ta bakterijska struktura osim problema za uklanjanje predstavlja i potencijalno veći financijski trošak, osobito za hotelske sustave o kojima ovisi turizam. Turizam kao takav, jedan je od najvećih izvora prihoda za većinu država, osobito onih koje se nalaze na moru i održavanje njihovih sustava kao i nepostojanje infekcija jedni su od glavih uvjeta za uspješne ljetne sezone. Osim za turizam, infekcije legionelama ne smiju postojati niti u bolničkim sustavima, gdje mogu izazvati velike probleme osobito u imunokompromitiranih osoba među kojima su starije osobe i djeca. Epidemije legionarske bolesti danas predstavljaju sve veći javnozdravstveni značaj, te on postaje i izraženiji ukoliko legionele žive u navedenim otpornim bakterijskim strukturama.

Sojevi legionela korišteni u ovom istraživanju jest trinaest različitih sojeva *Legionella pneumophila* te se u četiri različita uzorka pratilo preživljavanje bakterije kao i sposobnost da one stvore biofilm. Sojevi su podijeljeni na okolišne i kliničke izolate i ukupan broj iznosio je trinaest različitih sojeva *L. pneumophila*, ovisno o tome kako su i gdje izolirani. Bakterije su inokulirane u uzorke morske vode, vodovodne vode, destilirane vode i razrijeđene morske vode u omjeru 1:1. Početni broj bakterija u uzorcima iznosio je  $10^6$  cfu/ml, priređena su razrjeđenja u mikrotitarskim pločicama i tako pripremljena stavljena na dvije temperature, 25°C i 30°C. Nakon pet dana, bakterije su odljepljene sa površine mikrotitarske pločice

pomoću ultrazvučne kupelji te nasađene na BCYE agar i praćen je porast bakterija nakon kultivacije.

Nadalje, dobiveni grafovi prikazali su sposobnost legionela da prežive i stvore biofilm na površini mikrotitarskih pločica na dvije različite temperature i u različitim uzorcima. Iz njih moguće je očitati neke razlike u porastu broja bakterija, no daljnja obrada rezultata provedena je u statističkom programu *Statistica* kako bi se obratila pozornost na statistički značajnije razlike među sojevima i uzorcima.

U promatranju preživljavanja legionela u određenim uzorcima, može se primjetiti kako se određeni sojevi bakterija ističu u odnosu na druge. Pa tako u uzorku morske vode vidimo kako bakterija *L. pneumophila* Allentown ST82 pokazuje bolju sposobnost stvaranja biofilma u odnosu na drugo. Navedeno bi se moglo objasniti time da je upravo taj soj izoliran iz morske vode, što bi onda predstavljalo prirodniji okoliš za taj soj koji mu omogućava sve potrebne nutrijente za rast i razmnožavanje. Također u uzorku morske vode okolišni izolati bolje stvaraju biofilm na temperaturi od 30°C, dok klinički izolati istu sposobnost bolje pokazuju na 25°C. Navedeno teško možemo objasniti budući da smo očekivali drugačiji rezultat. Za očekivati je bilo da klinički izolati bolje stvaraju biofilm na višoj temperaturi, no u svakom slučaju svi izolati su stvorili biofilm na polistirenu u morskoj vodi, u različitoj dinamici.

Kada govorimo o uzorku destilirane vode, stvaranje biofilma je jače izraženo u obje skupine izolata na 25°C, dok se među njima ističe *Legionella pneumophila* Bellingham ST728 okolišni izolat i *L. pneumophila* Bellingham ST334 i ST728 klinički izolati čija sposobnost stvaranja biofilma je više izražena na 30°C.

U razrijeđenoj morskoj vodi, omjer destilirane i morske vode 1:1 okolišni izolati legionela podjednako rastu na obje temperature, dok se tu ističu ponovno *L. pneumophila* Allentown



ST82 i *L. pneumophila* Bellingham ST728 koji izraženije stvaraju biofilm na 30°C. S obzirom da se radi o izvorima gdje su navedeni sojevi već pokazali bolju sposobnost formiranja biofilma, može se reći da morska voda i destilirana voda uz nešto višu temperaturu predstavlja idealniji okoliš za navedena dva soja legionele. Klinički izolati legionela biofilm će stvarati nešto bolje na temperaturi od 30°C.

Kada govorimo o vodovodnoj vodi, ovdje nema sojeva koji se posebno ističu već klinički i okolišni izolati stvaraju biofilm na obje temperature podjednako. Navedeno se može objasniti time da je legionelama prirodno stanište voda kao takva koja sadrži i njima omogućava sve potrebne nutrijente kako bi se nesmetano razmnožavale i preživljavale u biofilmu.

Ukoliko se rezultati uspoređuju statistički može se zaključiti kako okolišni izolati pokazuju razliku u sposobnosti stvaranja biofilma u različitim izvorima na 30°C, dok na 25°C ona nije zabilježena i podjednako su stvarali biofilm. To se ponovno može objasniti već spomenutim okolišnim sojevima legionela koji svoju sposobnost pokazuju na 30°C.

Kada se uspoređuju rezultati statistički za različite izvore i pri različitim temperaturama, najviše razlika ćemo uočiti pri temperaturi kultivacije od 30°C za kliničke izolate legionela. Na temperaturi od 25°C, klinički izolati će opet pokazati statistički značajniji rast i stvaranje biofilma u uzorcima destilirane vode, razjeđene morske vode kao i u vodovodnoj vodi što ukazuje na to da joj morska voda nije prirodno stanište, osobito za kliničke izolate legionele. Ukoliko govorimo o okolišnim izolatima pri istoj temperaturi, njihova sposobnost stvaranja biofilma se ističe u razrjeđenoj morskoj vodi, statistički značajnije nego što je to u drugim izvorima.

Stvorena bakterijska struktura u vidu biofilma, stvara veliki izvor rizika za razvoj infekcije u ljudi te je upravo radi toga potrebno održavati visoke temperature u sustavima kako bi se njeno razmnožavanje onemogućilo pa samim time i stvaranje biofilma.

## 6. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati ovog istraživanja pokazali su da svi sojevi *L. pneumophila* imaju sposobnost stvaranja biofilma u ispitivanim uvjetima no dinamika stvaranja biofilma se razlikuje ovisno o sojevima kao i o okolišnim uvjetima. Soj *Legionella pneumophila* Allentown ST82 u odnosu na druge pokazuje bolju sposobnost stvaranja biofilma u morskoj vodi i razrijeđenoj morskoj vodi. Dobiveni rezultati pokazuju da legionele imaju sposobnost stvaranja biofilma u morskoj vodi pri određenim uvjetima što ukazuje na nužnost daljnjih istraživanja kako bi se na vrijeme poduzele mjere za sprječavanje problema koje ova bakterijska struktura može izazvati.

## 7. LITERATURA

1. M. Abdel-Nour, C. Duncan, D. Low, C. Guyard. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *International journal of molecular sciences* 14(11), 21660-21675
2. A. A. Khweek, A. O. Amer. Factors mediating environmental biofilm formation by *Legionella pneumophila*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 38(8), 2018.
3. C. Cordevant, J.S. Tang, D. Cleland, M. Lange. Characterization of Members of the Legionellaceae Family by Automated Ribotyping. *Journal of clinical microbiology* 41(1), 34-43
4. Fields B., Benson F., Besser R. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* 15(3), 506-26
5. Y. E. Lin, J. E. Stout, V.L. Yu. Prevention of hospital-acquired legionellosis. *Current opinion in infectious disease* 24(4), 350-356
6. A. Gašaj. Preživljavanje legionele u morskoj vodi. Završni rad, Medicinski fakultet u Rijeci, Rijeka, 2017.
7. Gobin I. Virulencija *Legionella longbeachae* u intratrahealno inokuliranih miševa. Magistarski rad. Rijeka, Medicinski fakultet; 2005.
8. H. Whiley, R. Bentham *Legionella longbeache* and legionellosis. *Emerging infectious diseases* 17(4), 579-583
9. C. Cazalet, L. Gomez-Valero i sur. Analysis of the *Legionella longbeachae* Genome and Transcriptome Uncovers Unique Strategies to Cause Legionnaires' Disease *Plos genetics* 6(2), 2010.

10. World Health Organization. Legionella and the prevention of legionellosis. Švicarska, World Health Organization; 2007
11. V. Borges, A.Nunes, D. Sampaio, L. Vieira, J. Machado, M. Simões, P. Gonçalves, J. Gomes. *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person to person transmission of legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. Scientific report, 2016.
12. A. Rakić, D. Ljoljo, D. Ljubas. Tehničke mjere za sprječavanje razmnožavanja bakterija *Legionella* spp. u sustavima za opskrbu toplom vodom *Hrvatske vode* 96(24), 109-118
13. Allegheny county commissioners. Approaches to prevention and control of *legionella* infection in Allegheny county health care facilities. 1st edition, Allegheny health department, 1977.
14. Lesnik R., Brettar I., Hofle MG. *Legionella* species diversity and dynamics from surface reservoir to tap water: from cold adaptation to thermophily. *The ISME journal* 10(5), 1064-1080
15. Y.Abu Kwaik, L. Gao, B. Stone, C. Venkataraman, O. Harb. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and environmental microbiology* 64(9), 3127-3133
16. Ohno A., Kato N., Yamada K., Yamaguchi K.. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and environmental microbiology* 69(5), 2540-2547
17. M. Ožanić, V. Marečić, I. Gobin, M.Šantić. Intracellular life of *Francisella* and *Legionella* within amoebae cells *Medicina fluminensis* 52(1), 49-54

18. C. Buchrieser. *Legionella*: from protozoa to humans. *Frontiers in microbiology* 182(2), 2011
19. R. Heller, C. Höller, R. Süßmuth, K. O. Gundermann. Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Letters of applied microbiology* 26(1), 64-68
20. B. Grasland, J. Mitalane i sur. Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling* 19(5), 307-313
21. D. van der Kooij, G. L. Bakker, R. Italiaander, H. R. Veenendaal, B. A. Wullings. Biofilm Composition and Threshold Concentration for Growth of *Legionella pneumophila* on Surfaces Exposed to Flowing Warm Tap Water without Disinfectant. *Applied and environmental microbiology* 83(5), 2017.
22. M. Farhat, M. Moletta-Denat. Effects of Disinfection on *Legionella* spp., Eukarya, and Biofilms in a Hot Water System. *Applied and environmental microbiology* 78(19), 6850-6858
23. C. C. C. R. de Carvalho. Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. *Frontiers in marine science* 126(5), 2018.
24. H. Dang, C.R. Lovell. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and molecular biology reviews* 80(1), 90-138
25. V. Yu. *Legionella* surveillance: political and social implications – a little knowledge is a dangerous thing. *The journal of infectious disease* 185(2), 259-261
26. I.R. Cooper, G.W. Hanlon. Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *Journal of hospital infection* 74, 152-159

27. F.P. Sidari, J.E. Stout, J.M. Van Briesen i sur.. Keeping Legionella out of water systems. *JAWWA*, 96(1)111-119.
28. I. Gobin, P.R. Newton, E.L. Hartland, H.J. Newton. Infections caused by non-pneumophila species of *Legionella*. *Reviews in medical microbiology* 20(1), 1-11.
29. R.R. Muder, V.L. Yu. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clinical infectious disease* 35(8), 990-998.
30. S. Murray. *Legionella* infection. *CMAJ* 173(11), 1322
31. A. Parr, E.A. Whitney, R.L. Berkelman. Legionellosis on the Rise: A Review of Guidelines for Prevention in the United States. *Journal of Public Health Management and Practice* 21(5), 17-26.

## 8. ŽIVOTOPIS

Zovem se Andrea Gašaj, rođena sam 5.9.1994. u Rijeci. Osnovnu školu pohađala sam na Škurinju, OŠ Ivana Zajca, nakon toga upisala sam srednju Medicinsku školu u Rijeci. Nakon četverogodišnjeg obrazovanja za zdravstveno-laboratorijskog tehničara, završila sam 2013. srednju školu uz obranu završnog rada iz područja hematologije. Medicinski fakultet u Rijeci upisujem 2014. godine, smjer preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva koji završavam 2017. godine sa završnim radom *Preživljavanje legionele u morskoj vodi* pod vodstvom mentorice izv.prof.dr.sc. Ivane Gobin. Iste godine upisala sam diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu.

Nagrade:

- 1. mjesto na državnom natjecanju Schola Medica za smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar, 2013. godine
- Nagrada Faust Vrančić za osvojeno prvo mjesto na državnom natjecanju