

# Prisutnost Legionella pneumophila u bazenskoj vodi na području Primorsko-goranske županije

---

Šimeg, Snježana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:184:372323>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Snježana Šimeg

PRISUTNOST *Legionella pneumophila* U BAZENSKOJ VODI NA PODRUČJU  
PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2017.godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Snježana Šimeg

PRISUTNOST *Legionella pneumophila* U BAZENSKOJ VODI NA PODRUČJU  
PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2017. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Darija Vukić Lušić, dipl. sanit. ing.

Diplomski rad obranjen je dana 29. rujna 2017. u/na Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije,  
pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Željko Linšak, dipl. sanit. ing.
2. doc. dr. sc. Dražen Lušić, dipl. sanit. ing.
3. doc. dr. sc. Darija Vukić Lušić, dipl. sanit. ing.

Rad ima 65 stranica, 48 slika, 3 tablica, 38 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Dariji Vukić Lušić, dipl. sanit. ing. na posvećenom vremenu, usmjeravanju i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada, te ponajviše na prenesenom znanju prilikom pisanja diplomskog rada ali i ranije kroz nastavu na studiju sanitarnog inženjerstva. Veliko Vam hvala.

Zahvaljujem se svim djelatnicima i stažistima Odsjeka za mikrobiologiju okoliša Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije na srdačnosti, savjetima, druženju i što su mi ustupili mjesto na odsjeku tijekom provođenja istraživanja za diplomski rad. Posebno se zahvaljujem dr. sc. Arijani Cenov na stručnim savjetima, vođenju kroz radne bilješke i demonstraciji metoda analiziranja. Također se posebno zahvaljujem Erini Frlan i Alanu Božović na demonstraciji provedbe analize bazenske vode.

Veliko hvala mojoj obitelji, dečku, prijateljima i kolegama na podršci tijekom studija.

## SAŽETAK

Bakterija *L. pneumophila* iz roda *Legionella*, ubikvitaran je mikroorganizam prirodno prisutan u vodi i vlažnom tlu. Opasnost za čovjeka predstavljaju legionele prisutne u umjetnim vodenim sustavima, gdje u nepovoljnim uvjetima može perzistirati i do godine dana. U toplim i vlažnim uvjetima, poput različitih vrsta bazena (posebice onih s temperaturom vode u rasponu 20 °C – 45 °C) ova bakterija može nesmetano preživljavati i razmnožavati se više mjeseci. Put zaraze predstavlja inhalacija aerosola ili mikroaspiracija kontaminirane vode. Povećani rizik za razvoj epidemije javlja se nakon dužeg nekorištenja objekta, a jedan od primjera takve prakse rada su bazenska kupališta sa sezonskim režimom rada.

Cilj ovog rada bio je prikazati mikrobiološku kakvoću bazena na području Primorsko-goranske županije s aspekta prisutnosti bakterije *L. pneumophila*. Analizirani su podaci prisutnosti bakterije, te povezanost s dodatnim fizikalno-kemijskim i mikrobiološkim pokazateljima kakvoće bazenske vode, u četverogodišnjem razdoblju ispitivanja (2013. – 2016.). Rezultati ukazuju na generalno nizak udio (2 %) pozitivnih rezultata na pokazatelj *L. pneumophila*, međutim s trendom porasta, što odgovara porastu udjela spa bazena u ukupnom broju analiziranih uzoraka. Općenito, broj svih ispitanih uzoraka raste, a najveći je u glavnim turističkim centrima (Opatija, Krk, Rab). Veći udio pozitivnih uzoraka javlja se kod slatke vode. U pozitivnim je uzorcima, u odnosu na uzorke u kojima *L. pneumophila* nije dokazana, zabilježena niža koncentracija rezidualnog klora i povišeni broj UBB, međutim razlika se nije pokazala statistički značajnom. T-test je između pozitivnih i negativnih uzoraka pokazao statistički značajnu razliku jedino u pokazatelju temperaturi vode, s značajno višim vrijednostima kod pozitivnih uzoraka. Obzirom da razlika u razinama klora između pozitivnih i negativnih uzoraka nije statistički značajna, upitna je efikasnost djelovanja klora na legionele unutar vodenog sustava. Naime, prema rezultatima legionele se mogu dokazati i pri višim koncentracijama klora.

Nakon detaljnije analize rezultata ispitivanja u četverogodišnjem razdoblju zaključujemo da za praćenje pojavnosti *L. pneumophila* u vodi presudnu ulogu može imati izbor adekvatne metode ispitivanja, čemu je potrebno posvetiti posebnu pažnju. Također, u budućnosti je potrebno definirati ispitivanje prisutnosti *L. pneumophila* u vodi za piće iz vodoopskrbnih sustava, što se trenutno provodi u slučajevima epidemiološke indikacije.

**KLJUČNE RIJEČI:** *L. pneumophila*, bazeni, spa, metoda ispitivanja, membranska filtracija

## SUMMARY

*L. pneumophila* is bacteria from *Legionella* genus. This ubiquitous microorganism is naturally present in water and wet soil. Dangers to man represent legionnaires present in artificial water systems, where bacteria can persist in unfavorable conditions for up to a year. In warm and humid conditions, such as one present in various pool types (especially those with water temperature ranging from 20 °C to 45 °C), this bacterium can undisturbed survive and multiply for several months. The infection is result of contact with contaminated water by aerosol inhalation or micro-aspiration. An increased risk of developing an epidemic occurs after a long not used period of the facility, and one of the examples of such practice is swimming pool with seasonal work regimen.

The aim of this study was to show the microbiological quality of the pool in the area of the Primorje-Gorski Kotar County from the aspect of the presence of *L. pneumophila*. Data on the presence of this bacteria, as well as correlation with additional physico-chemical and microbiological basin water quality indicators, were analyzed in the four-year study period (2013 - 2016). The results indicate a generally low part (2%) of positive results of the *L. pneumophila* indicator, however, with the growth trend, that corresponding to the increase in spa pool part in the total number of analyzed samples. Generally, the number of all tested samples is growing, and is the largest in major tourist centers (Opatija, Krk, Rab). A higher part of positive samples occurs in fresh water. In positive samples, in regards to samples in which *L. pneumophila* was not shown, lower residual chlorine concentration and elevated UBB levels were observed, however the difference was not statistically significant. The T-test between positive and negative samples showed statistically significant difference only in the water temperature indicator, with significantly higher values in positive samples. Since the difference in the chlorine levels between the positive and negative samples is not statistically significant, the efficiency of the chlorine action on the legionnaires within the aquatic system is questionable. Namely, legionnaires can be proved at higher chlorine concentrations.

After a more detailed analysis of the results of the four-year study, we conclude that in order to monitor the occurrence of *L. pneumophila* in water, the choice of the appropriate test method can be a crucial part of the study, and special attention should be paid to this. Also, in the future it is necessary to define the presence of *L. pneumophila* in drinking water from water supply systems, which is currently being carried out only in the case of epidemiological indications.

**KEY WORDS:** *L. pneumophila*, pools, spa, test method, membrane filtration

## SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>1</b>
1.1	Mikrobiologija voda .....	1
1.2	<i>Legionella pneumophila</i> .....	1
1.2.1	Građa i biološke osobine .....	2
1.2.2	Epidemiologija .....	3
1.2.3	Laboratorijska dijagnostika .....	5
1.3	Bazenska voda .....	6
1.3.1	Vrste bazena .....	6
1.4	Preventivne mjere .....	8
1.4.1	Identifikacija i procjena rizika .....	8
1.4.2	Upravljanje rizicima .....	10
1.4.3	Bakteriološka analiza bazenske vode .....	14
1.4.4	Preventivne mjere za smanjenje rizika i mjere suzbijanja .....	17
<b>2</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>20</b>
3.1	Područje istraživanja .....	20
3.2	Terenski rad (uzorkovanje).....	20
3.2.1	Materijali .....	20
3.2.2	Metoda.....	20
3.3	Laboratorijska analiza .....	21
3.3.1	Materijali .....	21
3.3.2	Metode.....	21
3.4	Statistička analiza .....	34
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
4.1	Geografska distribucija uzoraka .....	40
4.2	Broj uzoraka – ukupni/pozitivni.....	41
4.3	Vrste bazena .....	42
4.4	Odnos pojavnosti <i>L. pneumophila</i> i ostalih ispitanih pokazatelja .....	44
<b>5</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>54</b>



# 1 UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1 Mikrobiologija voda

Riječ mikrobiologija dolazi od grčkih riječi *mikrós* što znači malen, sitan; *biós* – život; *lógos* – riječ, u prenesenom značenju označava znanost. Mikrobiologija se u svojim proučavanjima služi s dostignućima iz drugih znanosti poput kemije, fizike i ekologije. To je znanost koja proučava mikroorganizme. Mikroorganizmi su sitna, oku nevidljiva bića rasprostranjena i prisutna u svim sferama našeg okoliša, te također i ljudskog organizma. "Na čovjeku, na koži i sluznicama, živi oko deset puta više mikroorganizama nego što ima čovjekovih vlastitih stanica." (1). Većina mikroorganizama iz naše okoline je korisna ili barem neškodljiva za ljudski organizam, dok su od više milijuna mikroorganizama njih nekoliko stotina uzročnici bolesti kod čovjeka. Mikroorganizmi su karakterizirani velikom varijabilnošću, što im omogućava preživljavanje u okolišu.

U površinskim vodama često se nalazi veliki broj mikroorganizama koji u vodu dospijevaju iz okoliša, zraka, kiše, otpadnih produkata različitih industrija ili postrojenja za obradu otpadnih voda. Mikroorganizmi u vodi se dijele na one prisutne na površini i unutar sedimenta (bentički); te na mikroorganizme prisutne u stupcu vode (pelagički) koji se dijele na mikroorganizme koji plivaju (nekton) i mikroorganizme koji plutaju (plankton). Podjela na te dvije skupine temelji se na mjestu obitavanja pojedine skupine mikroorganizama u vodi za vrijeme razvojnih faza. Prisustvo mikroorganizama u pojedinoj zoni u vodi zavisi o okolišnim ekološkim faktorima, to su primjerice temperatura, svjetlost, otopljeni plinovi, koncentracija soli, karakteristike sedimenta i sl. Stanje okoline koje je pogodno za razvoj i funkcioniranje mikroorganizma zove se područje tolerancije (2). Promjena područja tolerancije posljedica je promjene nekog od ekoloških faktora, koji može biti biotički ili abiotički. U tom slučaju on na funkcioniranje mikroorganizma djeluje kao ograničavajući čimbenik, te značajno djeluje na prisutnost. Lokacija obitavanja u vodi i biološka aktivnosti mikroorganizama uvjetovane su pored ekoloških faktora i veličinom samog mikroorganizma. Primjerice, u obalnom području koje je karakterizirano bujnom vegetacijom i prisutnošću svjetla vrsta bakterija ovisi o dubini vode gdje prevladava dvadesetak različitih bakterijskih rodova, od kojih se najčešće javljaju *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, te *Caulobacter*. U površinskoj vodi udaljenoj od obale obitavaju fotosintetičke alge, tu kisik slabo difundira, te obitavaju bakterije iz roda *Pseudomonas* i vrste *Cytophaga*, *Caulobacter* i *Hyphomicrobium*. U dubljoj vodi gdje je mala količina kisika i slabiji prodor svjetlosti obitavaju anoksiogene fototrofne bakterije koje sadrže pigment bakterioklorofil prema kojem dobiju ime, grimizne i zelene sumporne bakterije. U sedimentu se nalazi anaerobna populacija bakterija *Desulfovibrio*, metanobakterije, te bakterije iz roda *Clostridium*. (2).

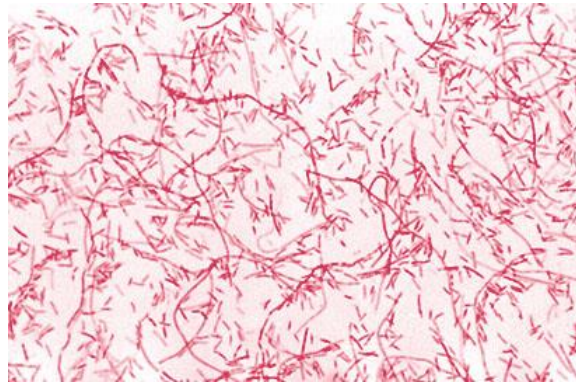
## 1.2 *Legionella pneumophila*

Obitelj *Legionellaceae* objedinjuje mikroorganizme sa zajedničkim fenotipskim i genetskim osobitostima u rod, *Legionella*. Rezultati istraživanja direktne amplifikacije 16S ribosomske RNA potvrđuju zajedničke značajke mikroorganizama iz ovog roda s velikim postotkom podudarnosti genetskog materijala, više od 95 % (3). Ova grupa mikroorganizama izdvojena je i opisana nakon slučaja epidemije akutne pneumonije u lipnju 1976. godine u Philadelphiji (USA). Epidemija je zahvatila 200-tinjak gostiju u ugostiteljskom objektu (hotelu), njih 21 je preminuo (4). Bolest je simptomima podsjećala na upalu pluća ali je bio nepoznat razlog oboljevanja većeg broja ljudi i uzrok odnosno izvor infekcije. Kako je do tada neopisana bolest nastala za vrijeme trajanja konferencije Američke legije, rod je po njima dobio ime "*Legionella*". Bolesti koje uzrokuju bakterije iz ovog roda

jednim se imenom nazivaju legioneloze. Unutar roda *Legionella* razlikujemo za sada poznatih pedesetak vrsta od kojih je najpoznatija, najčešći uzročnik bolesti i prva opisana *Legionella pneumophila*. Unutar pojedinih vrsti poznate su seroskupine, kojih trenutno u ovom rodu brojimo više od sedamdeset. Infekciju kod ljudi uzrokuje svega dvadesetak vrsta bakterija iz ovog roda. Gotovo 90 % slučajeva infekcije uzrokuje *L. pneumophila*, zatim 6 % uzrokuje *L. micdadei*, 3 % *L. bozemanii*, dok ostale infektivne vrste zajedno uzrokuju 1 % legioneloza (1). Izvojena bakterija *Legionella pneumophila* na temelju svoje antigene građe podjeljena je u 14 seroskupina. Najčešća seroskupina *L. pneumophila* serogrupa 01 uzrokuje najteži oblik oboljenja, legionarsku bolest. Blaži oblik oboljenja sa simptomima sličnim simptomima gripe naziva se pontijačna groznica.

### 1.2.1 Građa i biološke osobine

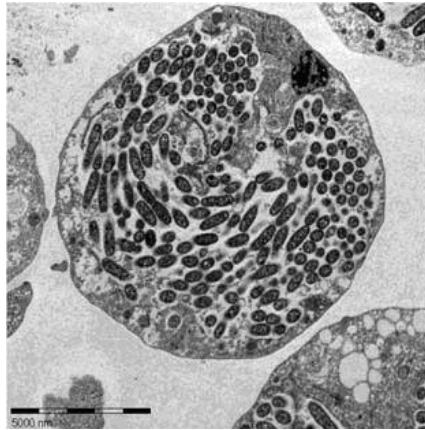
Građom bakterije iz ovog roda, ovisno o uvjetima u sredini, mogu biti u obliku bacila ili kokobacila, širine 0,3-0,9  $\mu\text{m}$ , te dužine 2-3  $\mu\text{m}$  koja može doseći i do 20  $\mu\text{m}$  u filamentoznom obliku kada se bakterije jave u formi dugih niti. Legionela je nesporogen, aeroban gram-negativni mikroorganizam mikroskopski prikazan na Slici 1.



Slika 1. Mikroskopski izgled legionela iz kulture, bojenje po Gramu (Izvor: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/rep/lepn.htm> )

Legionela posjeduje flagele koje joj omogućuju pokretljivost i pile uz pomoć kojih se adherira na površinu. U vodenim sustavima legionela se veže i kolonizira površine od raznih materijala poput plastike, propilena, polistirena, stakla i drva (4). Vežući se s drugim mikroorganizmima legionele tvore biofilm kolonizirajući površinu nekog vodenog sustava. Ubikvitaran je mikroorganizam, vrlo otporan na vanjske uvjete. Legionele, u odnosu na većinu bakterija koje obitavaju u vodi, pokazuju veću otpornost na niže vrijednosti pH i kratko izlaganje visokim temperaturama (5). Mogu živjeti u rasponu temperature od 5,7-63 °C, no osjetljive su na temperature više od 60 °C. Također su osjetljive na dezinficijense, a posebice klorne preparate i povećanu koncentraciju klora u vodi. Postupcima dezinfekcije opisanim u podpoglavlju "Upravljanje rizicima" suzbijaju se legionele prisutne u vodi. Pored dezinficijensa osjetljive su i na neke antibiotike. To su: eritromicin, azitromicin, rifampicin i doksiciklin. No posjeduju otpornost na betalaktamske antibiotike, vankomicin i aminoglikozide. Za rast su im neophodni L-cistein hidroklorid i soli željeza. Bakterije iz ovog roda su aerobi, posjeduju aerobni kemoorganotrofni organizam, no neke vrste bolje rastu u prisutnosti CO<sub>2</sub> u atmosferi. Legionele su biokemijski inertne. Sve vrste su asaharolitične, ne oksidiraju niti ne fermentiraju ugljikohidrate. Kao izvor ugljikohidrata služe im aminokiseline. Posjedovanje enzima i sadržaj masnih kiselina se razlikuje među vrstama. Različite vrste posjeduju neke od enzima oksidaze, katalaze, želatinaze i hipurikaze. Testovi redukcije nitrata i ureaza daju negativan rezultat. Antigenska građa na površini stanica bakterija legionela temelji se na proteinskim antigenima. Njezini antigeni proteini su:

protein odgovoran za stvaranje zaštitnih protutijela (Mcm, engl. major cytoplasmic membrane), proteini koji sudjeluju u stvaranju tip specifičnih monoklonskih protutijela (Msp, engl. major secretory protein i Mab, engl. major antibody) i protein koji uzrokuje unutarstaničnu infekciju stanice domaćina (Mip, engl. macrophage infectivity potentiator). Legionele također posjeduje antigen stanične stijenke lipopolisaharid (engl. Lipopolysaccharide, LPS), te citotoksine i antigen Hsp60 (engl. Heat Shock Protein) koji pospješuju virulenciju bakterije (1). Legionele imaju sposobnost parazitiranja u druge mikroorganizme. Primjerice *Legionella pneumophila* može inficirati i razmnožavati se unutar amebe prisutne u vrućoj vodi. Tako zaštićena legionela preživljava okolišne uvijete, koji su za nju inače nepovoljni. Slika 2 prikazuje inficiranu stanicu. Kada takva inficirana stanica domaćina eruptira, iz nje se oslobađa velik broj pokretnih legionela (4).



Slika 2. Mikroskopski prikaz stanice domaćina inficirane legionelama (Izvor: Mikrut (4))

### 1.2.2 Epidemiologija

Legionele su ubikvitarni mikroorganizmi, što označava njihovu sveprisutnost u okolišu. Zbog okoliša koji predstavlja rezervoar ovih bakterija nazivamo ih ekonozama. Nalaze se svuda u prirodi, najviše obitavaju u vodi i vlažnom tlu. Količine u prirodi ne predstavljaju opasnost za čovjeka obzirom da okolišni uvjeti ne podupiru ekstenzivni rast ovih bakterija. Opasnost za čovjeka predstavljaju legionele prisutne u umjetnim vodenim sustavima koje je stvorio čovjek, zbog čega se svrstavaju u skupinu "Man Made Disease". U takvim se sustavima legionele razmnožavaju, čemu pogoduju faktori u samom sustavu, poput temperature koja je viša od sobne temperature, stagnacije vode, stvaranja biofilma i sl. Koloniziranju i zadržavanju bakterija u sustavu pogoduje prisustvo organskih i anorganskih sedimenata, naslage nastale na stjenkama, a posebice biofilm koji ih štiti od vanjskog utjecaja, pa i djelovanja biocidnih sredstava (1, 2, 3, 6). Legionele koloniziraju sustave i uređaje poput vodovodnih cijevi, vodosprema, uređaja za kondicioniranje zraka, rashladnih tornjeva, kondenzatora za evaporaciju, ovlaživača, fontana, razne vrste bazena, prirodne, spa bazene, a posebice one sa temperaturom vode u rasponu 20 °C – 45 °C. Epidemije legioneloza najčešće su povezane s ustanovama koje posjeduju jedan ili više od navedenih vodovodnih sustava ili uređaja, primjerice hoteli, apartmani, kampovi, toplice, wellness centri, rekreacijski ili sportski centri, trgovački centri, putnički brodovi, bolnice, starački domovi, rashladni tornjevi i sl. Izvor infekcije često su bolnički sustavi za opskrbu vodom i uređaji za klimatizaciju kolonizirani bakterijama. Uz navedene izvore infekcije zabilježeni su i sporadični slučajevi. To su primjerice infekcije destiliranom vodom, infekcije kirurških rana, pri intubaciji i kod upotrebe opreme za respiratornu terapiju i dr. Ovisno o području u kojem je infekcija stečena razlikujemo nekoliko grupa. To su infekcije stečene u zajednicama, stečene u domovima (iz vodoopskrbne mreže), stečene u zdravstvenim ustanovama (tzv. nosokomijalne), te

infekcije stečene tijekom putovanja. Povećani rizik za razvoj epidemije javlja se nakon dugotrajnijeg nekorištenja objekta, primjer takve prakse rada su hoteli sa sezonskim režimom rada. U slučaju prekida rada pri stagnaciji vode u sustavu dolazi do uvjeta pogodnih za rast i razmnožavanje bakterija. Put zaraze predstavlja inhalacija aerosola ili mikroaspiracija kontaminirane vode. Manifestacija kliničkih znakova bolesti ovisi o infektivnoj dozi i imunološkom stanju domaćina. Bolest se može pojaviti kod ljudi svih dobnih skupina, no najčešće oboljevaju stariji, imunokompromitirani, ljudi sa kroničnim bolestima. Rizični čimbenici za oboljevanje su alkoholizam i pušenje. Infekcije bolesnika na hemodijalizi ili s transplattiranim bubrezima nerijetko imaju smrtni ishod (1). Prema podacima o legionarskoj bolesti nema zabilježenih slučajeva prijenosa zaraze sa čovjeka na čovjeka. Legionele se ubrajaju među najčešće bakterijske uzročnike pneumonija u općoj populaciji (1). Legionarska bolest epidemijski se pojavljuje s distribucijom u proljeće i ljeto. Epidemije blažeg oblika legioneloze, pontijačne groznice, pojavljuju se bez sezonski uočljive distribucije. Legionele također uzrokuju nozokomijalne respiratorne infekcije. Temeljem navedenih podataka pojavnost ove bolesti prevenira se eliminiranjem bakterija *Legionella spp.* iz vode koja je za ljudsku upotrebu, te iz sustava u kojima nastaje aerosol. Brza i pravovaljana detekcija bakterija u vodi predviđa opasnost i omogućuje pravovremeno uklanjanje izvora zaraze.

#### 1.2.2.1 Prijava oboljenja

Prijava i dojavljivanje slučajeva zaraze i epidemija odvija se preko nacionalnih epidemioloških službi i međunarodnih mreža. Epidemiološke službe u Republici Hrvatskoj (u daljnjem tekstu RH) djeluju u sklopu Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (u daljnjem tekstu HZJZ). Na području Europe od značaja za mikrobiološka istraživanja je grupa osnovana 1983. godine pod nazivom European Society of Clinical Microbiology and Infectious disease (kratica ESCMID). Ova grupa znanstvenika bavi se istraživanjima u području kliničke mikrobiologije i zaraznih bolesti. Od 1986. godine u Europi djeluje i skupina znanstvenika s ciljem poboljšanja epidemioloških i mikrobioloških znanja i informacija o pojavnosti legioneloza pod nazivom The European Working Group of Legionella infections (kratica EWGLI) i The European Study Group of Legionella infections (kratica ESGLI). EWGLI grupa bavi se razvitkom i unapređenjem tehnika rukovanja, obrađivanja i dijagnostike, izradom vodiča za upravljanje rizicima, preventivnim i kurativnim postupcima, te sastavlja tim za kontrolu i suzbijanje epidemije. Uspostavili su internacionalni nadzor i prijavljivanje slučajeva oboljevanja putem mreže EWGLINet, kasnije preimenovane u ELDSNet (engl. European Legionnaires` Disease Surveillance Network) koja predstavlja bazu podataka Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (engl. European Centre for Disease Prevention and Control, kratica ECDC), osnovanog 2002. godine (7). Na globalnoj su razini praćenje, prevencija, suzbijanje bolesti, propisivanje zdravstvenih i sigurnosnih smjernica i drugi postupci vezani za ovu i slične teme u nadležnosti Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, kratica WHO). Još jedno udruženje od globalnog značaja na ovom području istraživanja je i američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. Center for Disease Control and Prevention, kratica CDC).

#### 1.2.2.2 Klinička slika

Infekcija legionelom se manifestira u nekoliko oblika bolesti. Legionarska bolest, najčešći i najinvazivniji oblik oboljenja je pneumonija. Inkubacijski period bakterije *Legionella pneumophila*, koja kod ljudi uzrokuje ovu bolest traje 2 do 10 dana, ponekad i više. Naveden širok raspon perioda inkubacije otežava pravovremenu reakciju i početak terapije. Također, iz istog razloga otežana je detekcija izvora infekcije, pogotovo kod inficiranja tijekom putovanja. Bolest može trajati tjednima, sa visokom stopom smrtnosti. Legionarska bolest praćena je nespecifičnim simptomima poput slabosti, bolovima u mišićima, bolovima u prsima, poremećajima u disanju, neproduktivnog suhog kašlja,

povišene temperature, glavobolje, dijareje, povraćanja, stanja konfuzije ili delirija, hiponatrijemije, zatajanje bubrega itd. Zbog ovih se simptoma legioneloza u početku često zamjenjuje drugim bolestima okarakteriziranim istim simptomima. Kod svih pacijenata javlja se povišena temperatura već u prvih nekoliko dana, ako ne i u prvom danu infekcije. Kod polovice pacijenata razvije se gnojni iskašljaj, u trećine se javlja krvavi iskašljaj i bol u prsima. Od gastrointestinalnih simptoma istaknuta je pojava dijareje kod polovice pacijenata, dok se kod trećine pacijenata javlja mučnina, povraćanje i abdominalna bol. Pravovremeno liječenje rezultira potpunim oporavkom. Ukoliko se legionarska bolest ne dijagnosticira i ne liječi na vrijeme, stanje se značajno pogoršava i može biti smrtonosno. Najčešće komplikacije koje se javljaju kod oboljelih su prekid disanja uzrokovan zatajenjem pluća, zatim akutno zatajenje bubrega i drugih organa. Ponekada se pri oboljenju javljaju sekundarni simptomi poput slabosti, zamora i poremećaja u pamćenju, od kojih se najčešće javlja retrogradna anamnezijska.

Pontijačna groznica je akutno, samo limitirajuće nepneumonijsko oboljenje nalik na prehladu. Ovaj oblik bolesti razvija se u puno većem postotku izloženih, čak do 95%. Vrijeme inkubacije je nekoliko sati do nekoliko dana, oboljenje traje svega 2 do 5 dana. Simptomi su nalik na simptome prehlade, javlja se slabost, umor, bol u mišićima, bol u zglobovima, glavobolja, dijareja, mučnine, povraćanje, otežano disanje i suhi kašalj. Komplikacije se rijetko pojavljuju. Liječenje je simptomatsko, oporavak od bolesti je uobičajen unutar tjedan dana. Premda su legioneloze primarno respiratorna oboljenja postoje zabilježeni slučajevi širenja infekcije i u ostale sustave. Legionele su autopsijom detektirane u slezeni, jetri, bubrezima, miokardiju, kostima, koštanoj srži, zglobovima, limfnim čvorovima i probavnom traktu. Oboljenje nastalo širenjem infekcije iz pluća u druge dijelove tijela naziva se izvanplućni sindrom. Manifestacija simptoma pri ovom oboljenju često je vrlo dramatična s brojnim komplikacijama. Infekciju legionelama treba uzeti u obzir kao mogućnost izvora zaraze kod pacijenata koji su razvili kombinaciju neuroloških, srčanih i gastrointestinalnih simptoma s prisutnošću pneumonije.

### 1.2.3 Laboratorijska dijagnostika

Laboratorijska dijagnostika može biti izravna, detekcijom i izolacijom kliničkog materijala ili neizravna dijagnostika dokazom protutijela u serumu bolesnika. Klinički materijal uzima se iz područja zahvaćenog infekcijom. Kod legioneloza klinički materijal predstavlja iskašljaj, larvat, aspirat ili uzorak dobiven biopsijom bronhoskopom. Za detekciju i određivanje skupina i serogrupa koriste se: test direktna fluorescencija za detekciju antigena (imunofluorescentni test, engl. direct fluorescent antibody; DFA), enzimski imunoesej (engl. enzyme immunoassay; EIA), radioimuno test (engl. radioimmuno assay; RIA), test lateks aglutinacije (eng. latex agglutination test; LA) i analiza nukleinskih kiselina primjenom lančane reakcije polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR). Kod pretraga seruma oboljelog prati se dinamika titar protutijela laboratorijskom analizom humanog uzorka svaka dva do četiri sata. Kod izolacije klinički se materijal nasadije na hranjivu podlogu pogodnu za rast legionela. To su BCYE (engl. Buffered Charcoal Yeast Extract Agar) i krvni agar (kratica: KA). *L. pneumophila* je nutritivno zahtjevna kao što je već opisano u podpoglavljju "Građa i biološke osobine" i ne raste na standardnim bakteriološkim hranjivim podlogama. Izostanak rasta na krvnom agaru upućuje na legionelu (6). Na BCYE agaru, hranjivoj podlozi s kvaščevim ekstraktom i aktivnim ugljenom koja je puferirana na pH 6,9 (1), legionele rastu kao pravilne, sjajne, okrugle, konveksne, sive kolonije. Opisana kultivacija i identifikacija se provode prema normi HRN ISO 11731:2000. Kolonije izložene ultraljubičastom zračenju fluoresciraju žutozeleno. Izolacija legionela se potvrđuje serološkim testovima, (DFA) ili LA (6).

### 1.3 Bazenska voda

Pravilnikom o sanitarno-tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 107/12; 88/14) bazenska voda definirana je kao "voda u bazenima za plivanje, kupanje i medicinsku rehabilitaciju" (9). Nadalje, "voda za punjenje jest voda u bazenima koja se upotrebljava za prvo punjenje i dopunjavanje bazena" (9). Za punjenje bazena najčešće se upotrebljava voda iz javnog vodoopskrbnog sustava. U upotrebi mogu biti i drugi izvori poput akumulacije kišnice, vode iz bunara ili morska voda. Morskom vodom naziva se voda iz mora i oceana koja sadrži znatne količine otopljenih soli. Koncentracija soli iznosi više od  $35\text{g l}^{-1}$ . Morska voda sadrži kalcijeve i magnezijeve kloride i sulfate, koji je čine vrlo tvrdom i izrazito slana okusa. Ista se može koristiti za piće nakon provedbe postupka desalinizacije. Voda za punjenje prije punjenja bazena prolazi odgovarajuće tehnološke pripreme. To su minimalna dezinfekcija s rezidualnim učinkom i korekcija pH vrijednosti (10).

#### 1.3.1 Vrste bazena

Bazen je objekt koji može biti izgrađen od različitih materijala, najčešće korišteni su metal, plastika, stakloplastika ili beton. Oblik i dimenzije bazena mogu biti različite, bazeni mogu biti smješteni u otvorenom ili zatvorenom prostoru, ukopani ili postavljeni iznad površine, fiksni ili mobilni, za privatnu ili javnu upotrebu, bazeni s grijanom vodom i bazeni sa podvodnim vodenim mlazom. Bazen služi za umjetno zadržavanje vode, za bavljenje vodenim sportovima, rekreaciju, u terapijske svrhe, te za relaksaciju u spa centrima, na putničkim brodovima i sličnim mjestima (10). Vrsta bazena ovisi o obliku i dimenzijama, te o namjeni. Prema namjeni bazene možemo podijeliti u slijedeće skupine: privatni, dječji, javni, sportski, za vježbu i plivanje, „hot tubs“, spa, morski, prirodni i mnogi drugi. Najjednostavnija podjela bazena je na male, čija tlocrtna površina vode iznosi do  $200\text{ m}^2$  i velike, sa tlocrtnom površinom većom od  $200\text{ m}^2$ . Od značaja za ovo istraživanje nekoliko je različitih vrsta bazena. Prema izvedbi grupirani su u nekoliko grupa, to su bazeni, masažne kade, vodena igrališta, spa zona uključujući jacuzzi i whirlpool bazene. Prema namjeni to su većinom javni bazeni u hotelima, zdravstvenim ustanovama ili školama i privatni. Javni bazeni najčešće se nalaze u sklopu rekreacijskih centara u čijem rukovodstvu se nalazi nekoliko različitih vrsta bazena. Najčešći oblik takvih bazena je pravokutan sa različitim dimenzijama ovisno o namjeni istoga. U sklopu većih rekreacijskih centara nalaze se Olimpijski bazen(i) za plivanje dimenzija  $50\times 25\text{ m}$ , bazeni za skokove, bazeni za vježbu, dječji bazeni i drugi. Na Slici 3 prikazan je Olimpijski bazen koji se nalazi u sklopu Bazena Kantrida (Rijeka).



Slika 3. Olimpijski bazen (Izvor: <http://www.bloglasnik.net/veliki-gradovi/rijeka/besplatan-ulaz-na-bazene-kantrida-za-sve-gradane-tijekom-listopada/> )

Mogu biti vanjski ili unutarnji, sa sustavom za grijanje ili bez, te sa popratnim sadržajima npr. tobogan, skakaonice i sl. Ovi bazeni dostupni su na korištenje ljudima svih dobnih skupina i različite fizičke spreme. U sklopu ovakvih centara o zdravlju i sigurnosti kupača uz osoblje bazena tijekom radnog vremena brinu i spasioci. Bazeni u sklopu hotela, škola, zdravstvenih i sličnih ustanova mogu se definirati i kao polu-javni. Pristup takvim bazenima imaju najčešće samo gosti ili članovi pojedine ustanove. Oblik bazena određen je potrebama i mogućnostima pojedine ustanove.



Slika 4. Primjer izvedbe whirlpool bazena (Izvor: <https://www.logic4training.co.uk/course/legionella-treatment-managers-course/> )

Privatni bazeni manjih su dimenzija od javnih, najčešće 3,7x7,3 m. Ukopani pored kuće ili u zatvorenom prostoru, montažni koji se najčešće uklanjaju nakon perioda korištenja. Vruće kupelji (engl. hot tubs) punjene s grijanom vodom koriste se za relaksaciju ili u terapijske svrhe. Nazivaju se različitim nazivima među kojima su spa bazeni (engl. spa pools), whirlpool bazeni (engl. whirlpool tubs), whirlpool spa ili jacuzzi, hidromasažne kade i sl. Voda se u vrućim kupeljima zagrijava na temperaturu iznad 30°C (11). Mlaznicama pumpe hladni zrak se pumpa u grijanu vodu pri čemu se u kadi stvaraju mjehurići zraka. Navedeni uvjeti u vrućim kupeljima uzrokuju stvaranje aerosola raspršenog iznad površine vode što povećava rizik za razvoj infekcije legionelom. Whirlpool bazeni su izvedba vrućih kupelji namijenjena za jednokratnu, individualnu upotrebu. Najčešće se nalaze u kupaonicama hotela ili u privatnom vlasništvu. Naziv "jacuzzi" podrazumijeva prethodno opisane whirlpool spa bazene, naziv potječe od istoimenog američkog proizvođača vodovodnih dijelova. Sadržaj bazena se ne mijenja nakon svakog korisnika, već voda cirkulira uz postupak pročišćavanja. Premda je većina izvedbi ove vrste bazena dizajnirana za sjedenje, neke od izvedbi mogu uključivati i plivanje tijekom boravka u bazenu. Plivanje u vrućim kupeljima prakticira se u zdravstvenim ustanovama kod fizikalnih terapija koje se provode u hidroterapeutskim kupeljima ili bazenima, čiji se sadržaj prazni iza svakog pacijenta. Izvedbe vrućih kupelji u koje se uvodi topla voda iz prirodnog geotermalnog izvora nazivamo "prirodni-spa" (engl. "natural-spa"). Takvim vodama pripisuje se terapijski učinak, zbog čega se voda obrađuje minimalnim tretmanom ili se ne obrađuje kako se nebi umanjio njezin učinak. U literaturi se također spominju i bazeni za uranjanje (engl. plunge pools), koji se koriste u spa zonama sa saunama za hlađenje korisnika uranjanjem u negrijanu vodu nakon boravka u grijanim bazenima ili sobama. U svrhu definiranja održavanja i ispitivanja navedeni se bazeni poistovjećuju sa bazenima za plivanje (3, 12).

Pored već navedenih mogućih izvedbi bazena važno je navesti i moguće izvedbe filtracijskih sustava za pročišćavanje i tretiranje vode. Tip izvedbe ovisi o količini vode, namjeni bazena i kapacitetu kupača. Prema podacima projektanta bazena i proizvođača bazenske opreme "bazeni

eurostil", razlikujemo *skimmerski* i preljevni tip bazena. *Skimmerski* tip koristi se za bazene do 200 m<sup>2</sup> sa manjim kapacitetom. "Način obrade vode je sličan efektu rijeke s ciljem čišćenja površine vode, tj. voda iz mlaznica ispire površinu vode koja utječe u otvor na jednoj bočnoj strani školjke (tzv. *skimmer*), najčešće u smjeru duže osi bazena." Izvedba sustava je vrlo jednostavna. Funkcionalni sustav uključuje najosnovniju opremu, održavanje je jednostavno i ne zahtjeva stručno osposobljeno osoblje. Proljevni tip upotrebljava se kod javnih bazena s većim kapacitetima zapremnine vode i većim brojem korisnika. Površina bazenske vode je u razini s okolnom bazenskom površinom. "Mlaznice su smještene na dnu bazena i voda struji od dna bazena prema površini i predstavlja najpravičniji i najefikasniji način prostrujavanja vode kroz bazen. Voda se proljeva preko ruba bazena i utječe u proljevni kanal, po čemu je takav način pročišćenja i dobio ime." Složenija konstrukcija i održavanje zahtijevaju stručno osposobljeni kadar (13). Pojedine vrste bazena imaju karakteristike temeljem kojih se razlikuju od drugih navedenih vrsta. Te karakteristike također određuju specifičnosti upotrebe kao i razlike u održavanju. Svaka od tih karakteristika odnosno različitosti može predstavljati i potencijalni rizik za zdravlje korisnika, koji treba uzeti u obzir.

## 1.4 Preventivne mjere

Prije određivanja preventivnih mjera potrebno je izvršiti analizu stanja. Podaci bitni za analizu stanja su identifikacija rizika ili opasnosti, analiza učestalosti pojave opasnosti, posljedice nastale opasnosti. Analizom i propisivanjem preventivnih mjera, razvoja infekcije bakterijama iz roda *Legionella*, uz mnoge druge zadaće od epidemiološkog značaja, bave se već spomenute organizacije i agencije na nacionalnoj, međunarodnoj i globalnoj razini. To su: HZJZ sa pripadnim epidemiološkim službama županijskih Zavoda za javno zdravstvo (kratica ZZJZ) na području RH, na prostoru Europske Unije ESCMID, EWGLI, ESGLI, ECDC s mrežom ELDSNet, te na globalnoj razini WHO i CDC. Pojavnost legioneloza može se značajno smanjiti mjerama efektivne kontrole te se iz tog razloga ulažu značajni napori za otkrivanje i uklanjanje izvora moguće zaraze.

### 1.4.1 Identifikacija i procjena rizika

Kod procjene rizika važno je identificirati opasnost, "Što bi moglo poći po zlu?". Nakon što se izvor opasnosti definira, određuje se mogućnost za nastajanje odnosno učestalost pojave, "Kolika je mogućnost za taj događaj?". I na posljeticu analiza posljedica, "Koje posljedice taj rizik uzrokuje?". Cilj procjene rizika je smanjiti mogućnost nastajanja predmetne pojave na najmanju moguću razinu. Pri procjeni rizika određuje se i prioritet reagiranja, na temelju kojeg se određenoj opasnosti pristupa sa većim značajem, zbog ozbiljnosti posljedica koje uzrokuje. Pri procjeni rizika potrebno je sastaviti multidisciplinarni tim stručnjaka iz relevantnih područja, koja na neki način utječu na kontrolu istoga. Primjerice pri procjeni rizika za nastajanje infekcije uzrokovane bakterijom *Legionella pneumophila* u bazenu za javnu upotrebu u tim stručnjaka mogu se uključiti; epidemiolog, mikrobiolog, doktor medicine, inženjer građevine, sanitarni inženjer, kemičar i voditelj bazena. EWGLI u svom tehničkom vodiču preporučuje smjernice i popis zadaća za lakše provođenje procjene. Za procjenu rizika i provođenje preventivnih mjera zadužene su odgovorne i osposobljene osobe. Prilikom procjene rizika potrebno je voditi evidenciju, kako pri samom donošenju odluke o postupcima upravljanja rizicima, tako i pri provedbi istih. Odgovorna osoba mora odrediti i osigurati postupke upravljanja rizicima, koji će pri implementaciji biti učinkoviti i sigurni, odnosno bez ugrožavanja zdravlja osoblja koje ih provodi. Osoblje koje provodi zadane postupke mora biti odgovarajuće educirano, osposobljeno, iskusno i informirano. Primijenjeni postupci moraju biti neškodljivi za sustav u kojem se primjenjuju, kao i za korisnike tog sustava. Također, potrebno je predvidjeti nedostatke u provedbi navedenih postupaka, te osmisliti i osigurati način postupanja kod pojave nedostataka (11). U bazenskim vodama



razlikujemo nekoliko karakterističnih uvjeta koji mogu utjecati na nastajanje opasnosti u sustavu. Pri kontroli i rukovanju vodom razlikuju se uvjeti čuvanja hladne i tople vode. Hladna i topla voda dopremaju se odvojenim sustavima, iz odvojenih spremnika. Temeljem temperaturnih zahtjeva hladna voda pohranjuje se na temperaturi nižoj od 20 °C, uz osiguravanje da se temperatura vode održi ispod navedene vrijednosti i tijekom prolaska kroz sustav do krajnjeg cilja ili korisnika. U spremnicima hladna voda može povremeno biti kontaminirana legionelom prispjelom iz izvora vode za ljudsku potrošnju. Kontaminacija je u većini slučajeva zanemariva, jer se radi o malom broju bakterija koje nemaju pogodne uvjete za rast i razmnožavanje. Prisutne legionele razmnožavati će se u uvjetima stagnacije vode u sustavu, povišene temperature i prisutnosti odgovarajućih nutrijenata. Stoga, zbog povišene temperature u spremnicima i sustavu za toplu vodu postoje pogodniji uvjeti i veći rizik od razvoja legionela. Iz tog se razloga temperatura vode u sustavu tople vode održava najmanje na 50-55 °C, optimalno na 60 °C. Uz navedene temperaturne uvjete pri planiranju i izvođenju navedenih sustava teži se izgraditi ih u veličinama koji će odgovarati dnevnim potrebama kako nebi dolazilo do stagnacije vode u spremnicima. Preduvjet za zdravstveno ispravnu vodu je siguran i zdravstveno ispravan sustav, koji omogućava postizanje optimalnih radnih uvjeta (14). U pravilniku (NN 107/12; 88/14) navedene su higijenske mjere uklopljene u kupališni red, koje predstavljaju obavezne postupke prije ulaska u bazensko kupalište. Ponašanje korisnika, odnosno kupača, ima veliki utjecaj na mikrobiološke uvjete u bazenskoj vodi. Kupači na sastav vode utječu svojim ulaskom i boravkom u vodi, pri čemu unose određene tvari u vodu, kao i vrstom aktivnosti koju provode tijekom kupanja. Većina tvari dospijeva u vodu otapanjem s kože. Tu se najčešće radi o nečistoćama s kože, kozmetičkim preparatima, znoju i urinu. Iz navedenih izlučevina, znoja i urina oslobađaju se značajne količine dušičnih spojeva. Analizom bazenske vode očitava se niska koncentracija uree i amonijaka koji predstavljaju najveće izvode dušika u urinu. Međutim, očitavaju se značajne koncentracije derivata amonijaka nastalih u reakcijama s klorom i dušikom. Iz navedenog se zaključuje da u vodi dezinficiranoj klorom dolazi do degradacije uree u reakciji sa klorom (15). Legionele za svoj rast i razmnožavanje od anorganskih tvari zahtijevaju prisustvo željeza. Željezo u vodu dolazi nizom reakcija, primjerice redukcijom spojeva sa željezom pod utjecajem organske tvari u raspadu, iz izvora mineralnih tvari, iz organske tvari, iz željeznih cijevi i željeznih građevina korozivnim djelovanjem kiselina u vodi. Stvaranju biofilмова pogoduju hranjivi nutrijenti (organski i anorganski materijali) koji potiču rast i razmnožavanje legionela, kemijski elementi u tragovima, metalnioksidi i hidroksioksidni spojevi, tvrdoća vode, vodeni kamenac i slične tvari prisutne u vodi. Biofilm je strukturna zajednica stanica mikroorganizama (sastavljena od protozoa, ameba, bakterija i algi) koje se pričvršćuju na površinu, međufazu ili nešto drugo. Mikroorganizmi u biofilmu pokazuju drugačije osobine u odnosu na slobodne mikroorganizme iste vrste. Pod utjecajem zajednice javljaju se drugačije fenotipske i genske karakteristike, promjene u transkripciji gena (16) koje bakterijama omogućuju bolju zaštitnu funkciju od antibiotika i kemijskih dezinfekcijskih sredstava. Bakterije stvaraju biofilmove pričvršćujući se na površinu u vodenom okolišu pomoću velike količine biološke mase (supstrata). Mikroorganizmi su u zajednici biofilma i mehanički zaštićeni, kao posljedica međusobne povezanosti mikroorganizama i ireverzibilne povezanosti sa supstratom. Njihovom nastanku, razvoju i stabilnosti pogoduju hrapave površine, pa se biofilmovi mogu naći na područjima u sustavu gdje je korozija zahvatila materijal. Svojim nastankom i uvjetima koje stvara, biofilm uzrokuje promjene u okolišu pogodne za njegov opstanak i širenje. Primjerice, uzrokuje daljnju koroziju materijala. Biofilmovi u sustavu mogu nastati na različitim mjestima i na različitim materijalima. Najčešće nastaju na mjestima poput stjenki vodosprema i cjevovoda, rubnim i slijepim završecima cijevi, T-profilima, armaturi, filterima, mrežicama na slavini, rozetama na glavi tuša i sl. (14). Iako nutritivno zahtjevna, legionela na ovaj način, unutar biofilma može obitavati i u inače nepovoljnim uvjetima. Stoga je za eliminaciju izvora zaraze potrebno obratiti pažnju i na one sustave koje ne smatramo nutritivno pogodnima za njezino obitavanje. Stoga, bazen i bazenski prostor moraju

biti izvedeni od materijala koji ne utječu na fizikalna, kemijska i mikrobiološka svojstva vode i ne smiju biti korozivni. Uz rizike izvora bakterija i karakteristika okoliša u kojima one obitavaju važno je spomenuti i moguće načine inficiranja. Najčešći način infekcije legionelama je inhalacija aerosola, no do infekcije može doći i aspiracijom prilikom ingestije infektivnog sadržaja. Što dovodi do zaključka da do infekcije može doći prilikom rekreacije (plivanje), kupanja, no i samog zadržavanja u bazenu, vreloj kupelji, prirodnim bazenima i sličnim izvedbama bazena. Iako predstavlja samo jedan od mogućih načina inficiranja legionelozom, ovaj način potrebno je posebno istaknuti zbog provođenja kvalitetnih i učestalih preventivnih mjera. Većina prijavljenih slučajeva infekcije nastala je prilikom boravka u vrelim kupeljima ili prirodnim termama.

#### 1.4.2 Upravljanje rizicima

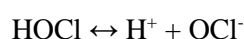
Upravljanje rizicima obuhvaća prethodno opisanu identifikaciju i procjenu rizika, na temelju koje se određuju postupci djelovanja za kontrolu istih, te primjenu, unapređenje i monitoring. O svim navedenim postupcima potrebno je voditi evidenciju. Za upravljanje i kontrolu rizika zadužena je odgovorna osoba. Procjena rizika predviđa način, učestalost i materijale za provedbu potrebnih postupaka. Osnovni postupci koji se provode u svrhu prevencije su razni postupci čišćenja, dezinficiranja, te mikrobiološki monitoring. Pravilnikom (NN 107/12; 88/14) su propisane obavezne mjere i način postupanja za vlasnike i odgovorne osobe na bazenima i bazenskim kupalištima koji su obuhvaćeni tim Pravilnikom. Mjere se odnose na odabir odgovarajućih građevnih materijala, opremanje bazenskog kupališta potrebnom sanitarnom i tehničkom opremom, imenovanje odgovorne osobe za pojedinu zadaću i definiranje njezinih obaveza, vrsta dokumentacije koju vlasnik mora posjedovati, evidencije i analize koje se moraju voditi, pravila i ponašanje u izvanrednim situacijama i sl.

##### 1.4.2.1 Postupci čišćenja

Uz provođenje postupaka čišćenja bazena vrlo je važno provoditi čišćenje i pranje okolnog bazenskog prostora. Postupak čišćenja određuje vlasnik bazena. Na dnevnoj bazi bazen se mehanički čisti tijekom rada uz pomoć podvodnih čistača, pri čemu se iz bazenske vode uklanjaju nečistoće. Jednom tjedno provodi se čišćenje svih površina bazena. Čišćenje se obavlja na kraju radnog dana, a po potrebi i tijekom radnog vremena. Preporuča se kompletno pranje svih bazenskih površina nakon ispusta bazenske vode najmanje jednom godišnje, a po potrebi i više puta.

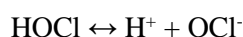
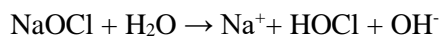
##### 1.4.2.2 Postupci dezinfekcije

Dezinfekcija bazena provodi se u svrhu prevencije nastajanja bolesti koje uzrokuju bakterije, virusi i drugi mikroorganizmi prisutni u vodenom mediju. Iako karakteriziran intenzivnim kemijskim mirisom najčešći dezinficijens u uporabi je klor, odnosno sredstva na bazi klora. U tu svrhu najčešće se koriste natrijevhipoklorit u tekućem stanju, kalcijevhipoklorit i tzv. organski klor u obliku tableta ili granula. Klor je žuto-zeleni plin reskog mirisa. Otrovan je, upotrebljavao se kao bojni otrov, plin zagušljivac. On je jaki oksidans, u vodi se hidrolizira do hipoklorne kiseline (HOCl). Nastala hipoklorna kiselina (HOCl) je slaba kiselina koja može disocirati na vodikov ion (H<sup>+</sup>) i hipokloritni ion (OCl<sup>-</sup>).



Relativni odnosi hipoklorne kiseline (HOCl) i hipokloritnog ion (OCl<sup>-</sup>) ovise o pH, a vrlo su bitni za efikasnost postupka, obzirom da je poznato da je dezinfekcijski učinak hipoklorne kiseline (HOCl) značajno veći u odnosu na hipokloritni ion (OCl<sup>-</sup>).

U vodenoj otopini natrijeva hipoklorita odvija se reakcija u kojoj također nastaje hipoklorna kiselina. Pri pH vrijednosti vode u rasponu od 6,5-8,5 ova reakcija je nepotpuna stvarajući u vodi istovremeno prisutne ione hipoklorida (OCl<sup>-</sup>) i hipoklornu kiselinu (HOCl) značajne za dezinfekciju.



Klor i klorini preparati djeluju na stanicu mikroorganizma na način da oštećuju staničnu stjenku uzrokujući smrt stanice ili ulaskom u staničnu stjenku djeluju na enzime na staničnoj stjenki uzrokujući disfunkciju njezine zaštitne uloge. Ispravno doziranje određuje se temeljem ukupnog volumena vode u bazenu, potrebe vode za klorom i rezidualnim klorom. Potreba vode za klorom je količina klora izražena u mg l<sup>-1</sup> kojeg je potrebno dodati vodi do pojave rezidualnog klora. Rezidualni klor je koncentracija klora izražena u mg l<sup>-1</sup> koja je zaostala u vodi kao višak nakon reakcije klora s tvarima koje se mogu oksidirati u vodi (17).

Kod dezinfekcije je važno pratiti razinu slobodnog klora koja određuje rezidualni učinak dezinficijensa. Prisustvo rezidualnog klora ostvaruje se dodavanjem klora u vodu do pojave orijentacijske doze rezidualnog klora od 0,5-1,0 mg l<sup>-1</sup> vode. Koncentracija rezidualnog klora niža od 0,5 mg l<sup>-1</sup> vode dostatna je i adekvatna kod kombinirane dezinfekcije klorom preparata s ozonom ili UV dezinfekcije. Pravilnikom o sanitarno-tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 107/12, 88/14) propisana je maksimalna razina koncentracije slobodnog klora u bazenskoj vodi koja ne smije biti viša od 1,02 mg po litri vode. Prema WHO, za provedbu dezinfekcije u vrućim kupeljima zbog specifičnih uvjeta povremeno je potrebna primjena viših koncentracija rezidualnog klora u odnosu na koncentracije propisane Pravilnikom, odnosno 2-3 mg l<sup>-1</sup>. Kontaktno vrijeme potrebno za djelovanje klora i klorinih preparata minimalno je 30 minuta. Uz kontinuirano kloriranje bazenske vode, potrebno je provoditi i postupke čišćenja bazena, zamjenu vode u bazenu, a efikasnost ovih mjera kontrolirati povremenim ispitivanjem kakvoće bazenske vode i sl. Učestalost provedbe ovih postupaka zavisi o učestalosti upotrebe i kapacitetu bazena. Bazenska voda temperature od 25 °C idealno je stanište za razvoj mikroorganizama, no s porastom temperature pospješuje se i djelovanje dezinficijensa. U nekim bazenima temperatura je i viša od 25 °C. Viša temperatura vode, povišena temperatura zraka, kao i prisutnost velikog broja kupaca utječu na povišenje broja mikroorganizama u vodi koji se u takvim uvjetima eksponencijalno razmnožavaju. Dezinfekcija vode predstavlja značajan postupak povećanja sigurnosti kupaca. Osnovni preduvjet za uspješnu dezinfekciju je odgovarajuća pH vrijednost vode. Najbolja učinkovitost dezinfekcije postiže se u rasponu vrijednosti pH vode od 7,0 – 7,6, kada se u vodi nalazi učinkovita količina reaktivnog oblika dezinficijensa. Vrijednost pH ispod 7,0 ima kiselu reakciju, uzrokuje strukturne promjene metalnih materijala u kontaktu s takvom vodom. Porast pH vrijednosti iznad 7,6 ima lužnatu reakciju, koja uz promjene u vodi i materijalima u doticaju kod kupaca uzrokuje svrbež kože i pečenje očiju, a ukoliko se popije može uzrokovati gastrointestinalne tegobe. pH vode je najčešće u porastu pod djelovanjem nečistoća iz okoline i od kupaca, te tvrdoće vode. Pri višim vrijednostima pH smanjuje se učinkovitost dezinficijensa, te je kao bitan preduvjet za učinkovitu dezinfekciju a time i čistu bazensku vodu potrebno pratiti vrijednost pH vode, te je po potrebi korigirati (18). Kod dezinfekcije hidromasažnih kada zbog visoke temperature vode dolazi do raspršivanja klora u obliku aerosola pri čemu se oslobađa intenzivan neugodan kemijski miris. Zbog

navedenog, preporuka je upotrebu klora zamijeniti preparatima na bazi broma ili dezinfekciju provoditi ozonom. Karakteristike oba navedena postupka opisane su u podpoglavlju "Ostala sredstva za dezinfekciju". U slučajevima kada su koncentracije rezidualnog klora veće od propisanih, pri čemu također nastaje neugodan miris po kloru, uobičajava se provesti dekloriranje. Dekloriranje se može provesti upotrebom aktivnog ugljena, natrijevog sulfita, ili alternativnih metoda primjerice provjetravanjem, vitaminom C i vinobranom. Uz nastajanje neugodnog mirisa, upotrebu klora u svrhu dezinfekcije vode karakterizira i nastajanje kancerogenih trihalometana (kratica THM). THM su kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), diklor metan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), dibromklor metan ( $\text{CHClBr}_2$ ) i bromoform ( $\text{CHBr}_3$ ). Nastaju u reakciji klora s organskim tvarima u vodi, točnije huminskim kiselinama prirodno prisutnim u sirovoj vodi. WHO nije propisala maksimalno dopuštenu koncentraciju THM, već preporuča granicu odrediti temeljem procjene rizika. U Republici Hrvatskoj je u vodi za piće dozvoljeno  $100\mu\text{g l}^{-1}$ , a preporuka Ministarstva zdravstva za bazensku vodu također je  $100\mu\text{g l}^{-1}$ (19). Pored organskih tvari klor u vodi reagira i s amonijakom, fenolima, bromom i drugim tvarima, uzrokujući nastanak štetnih spojeva i veću potrošnju klora. Veću potrošnju također uzrokuje neodgovarajuća vrijednost pH koja smanjuje učinkovitost klora. Pored navedenih negativnih posljedica primjene klora, kao prednost za istaknuti je jednostavnost rukovanja ovim dezinfekcijskim sredstvom. Ostale prednosti su jednostavna nabava, skladištenje rezervnih količina, mogućnost transporta, doziranje i mjerenje koncentracije, a uz primarno uništenje mikroorganizama prednost su i oksidacija organskih i anorganskih tvari, te suzbijanje stranih okusa i mirisa vode.

#### 1.4.2.3 Hiperkloriranje

Hiperkloriranje ili šok tretman vode kloriranjem primjenjuje se kod provedbe čišćenja bazena, te u slučaju mikrobiološkog onečišćenja bazenske vode. Hiperkloriranje se postiže deseterostrukom količinom dezinficijensa, u odnosu na onu koja se upotrebljava kod kontinuirane dezinfekcije. Potrebna doza za kloriranje vode za piće je 2 g po kubnom metru ( $\text{m}^3$ ) vode ili  $2\text{ mg l}^{-1}$ , dok se kod postupka hiperkloriranja primjenjuje doza od 20 g po kubnom metru ( $\text{m}^3$ ) vode. Hiperklorirana voda treba odstajati u bazenu, najmanje 24 sata, kako bi se postigao željeni učinak dezinfekcije (17). Takva voda ne smije se koristiti za kupanje, zbog čega se nakon njezinog ispuštanja bazen ponovno puni, čistom vodom. Hiperklorirana voda se prije ispuštanja u odvod po potrebi neutralizira.

U procesu hiperkloriranja bazena u cilju provedbe detaljnije godišnje dezinfekcije, ono se provodi koncentracijom slobodnog rezidualnog klora (kratica SRK) od  $50\text{ mg l}^{-1}$  u trajanju od 2-4 sata kroz cijeli protočni sustav bazenskog kupališta. Tijekom hiperkloriranja potrebno je održavati koncentraciju SRK iznad  $30\text{ mg l}^{-1}$  tijekom cijelog postupka. Po isteku kontaktnog vremena, iz sustava se hiperklorirana voda ispušta te se sustav ispire. Smatra se da je učinkovito ispiranje provedeno kada se koncentracija SRK smanji na vrijednost nižu od  $0,5\text{ mg l}^{-1}$  (20). Kontinuiranom dezinfekcijom osigurava se održavanje mikrobiološki ispravne vode za kupanje. Kao što se može zaključiti iz gore opisana dva primjera, postupak hiperkloriranja može se provoditi primjenom više različitih koncentracija SRK. Postupak hiperkloriranja ovisi o proizvođaču dezinfekcijskog sredstva, te je iznimno važno pridržavati se postupka propisanih od proizvođača. Također je važno pridržavati se mjera zaštite zbog toksičnog utjecaja dezinfekcijskih sredstava. Iz tog se razloga za provođenje postupka hiperkloriranja angažiraju ustanove ovlaštene za preventivnu dezinfekciju uz adekvatan nadzor (20).

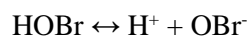
#### 1.4.2.4 Ostala sredstva za dezinfekciju

Osim sredstvima na bazi klora dezinfekcija se može uspješno provoditi i uz pomoć uređaja za dezinfekciju, poput generatora ozona, UV lampi, ionizatora i sl. No uz njihovu je primjenu također

potrebno koristiti kemijske dezinficijense, obzirom da navedeni uređaji ne osiguravaju rezidualno djelovanje (21). Uz najčešće primjenjivano kemijsko sredstvo klor, kemijski postupak dezinfekcije vode može se provoditi i ozonom.

Ozon ( $O_3$ ) je alotropna modifikacija kisika, vrlo toksičan plin. Ozon je snažan oksidans, zbog čega predstavlja jedno od najboljih kemijskih sredstava za dezinfekciju. Upotrebom ozona dolazi do potpune dezinfekcije vode, pa i inaktiviranja virusa. Djelovanje ozona se zasniva na njegovoj nestabilnosti pri čemu se raspada na dvoatomni kisik ( $O_2$ ) i atom kisika. Oslobođeni atom kisika ima jako oksidacijsko svojstvo, koje se očituje kao antimikrobno pri djelovanju na protoplazmu organizama u vodi uništavajući ih. Baktericidan učinak postiže se sa koncentracijom od 2-4 mg l<sup>-1</sup>, kroz kontaktno vrijeme od 4-10 minuta. Uzrokuje oksidaciju i razgradnju organskih i anorganskih tvari, primjerice oksidaciju mangana (Mg) i željeza (Fe). No za razliku od klora, pri njegovoj se primjeni ne stvaraju trihalometani, nema neugodnog mirisa niti toksičnog djelovanja. Poboljšava okus i miris vode ne mijenjajući njezin mineralni sastav, te uklanja boju vode. Ozon za dezinfekciju se proizvodi industrijski iz kisika podvrgnutog električnom pražnjenju. Propuštanjem struje suhog kisika ili suhog i čistog zraka između dvije elektrode pod visokim naponom nastaje triatomski oblik. Nedostaci dezinfekcije ozonom su veliki investicijski i pogonski troškovi, koji su i do tri puta skuplji od onih kod dezinfekcije klorom. Rukovanje ozonom je opasno, ima veliku korozivnu moć. Također, značajan nedostatak je nepostojanje rezidualnog ozona, zbog čega postoji mogućnost naknadne kontaminacije vode u sustavu, te ga je potrebno kombinirati s upotrebom klornog preparata

Brom je kemijska tvar čiji se preparati koriste za provedbu dezinfekcije. Preparati na bazi broma upotrebljavaju se kao supstitucijsko sredstvo za preparate na bazi klora, zbog neugodnog mirisa koji se širi isparavanjem iz tople vode tretirane klornim dezinficijensom. Brom je sličan kloru, ali nešto manje reaktivan. Brom je pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju, na temperaturi oko 60 °C prelazi u otrovne pare koje izazivaju iritacije. Reakcija broma sa vodom odvija se sukladno prikazanoj jednadžbi:



Iz prikazane formule disocijacije broma u vodi vidimo da je princip reakcije isti kao kod primjene klornog preparata. Brom u reakciji sa vodikom iz vode stvara bromovodičnu kiselinu i hipobromidnu kiselinu. Učinkovitost ovih preparata opada pri pH vrijednosti 8,5. Idealna vrijednost pH kreće se od 7,2-8,0. Koncentracija rezidualnog broma u bazenskoj vodi nebi trebala biti viša od 4 mg l<sup>-1</sup>, a u vrućim kupeljima od 5 mg l<sup>-1</sup> (14). Iako pogodni zbog učinkovitosti preparati na bazi broma nisu prvi izbor kod odabira dezinficijensa. Brom je rjeđi element u prirodi što uzrokuje višu cijenu sirovine, no granice upotrebe su uže i zbog veće fiziološke aktivnosti. Nadražljivac je organoleptičkih organa, te može uzrokovati posljedice na središnji živčani sustav i oštećenja na dišnim organima (22).

Fizikalni postupak dezinfekcije vode je UV dezinfekcija. Princip provedbe je tretiranje tankog sloja čiste vode UV zračenjem valne duljine 200-295 nm, kroz vrijeme kontakta od 0,5 do 5 sekundi. Maksimalna djelotvornost se postiže na valnoj duljini od 260 nm. Princip baktericidnog djelovanja zasniva se na razaranju protoplazme bakterijskih stanica, što uzrokuje njihovu smrt. Prednosti dezinfekcije UV lampama su jednostavno rukovanje, mala potrošnja energije, bez maksimalno dopuštenih koncentracija, bez utjecaja na kemijski sastav vode. Nedostaci su mogućnost naknadne kontaminacije vode, manjak pouzdanih mjera kontrole pokazatelja učinkovitosti dezinfekcije, brzo trošenje UV lampi. Zbog navedenih nedostataka ova metoda je u upotrebi za dezinfekciju malih količina vode s izravnom upotrebom.

### 1.4.3 Bakteriološka analiza bazenske vode

Za punjenje bazena kao što je već opisano u podpoglavlju "Bazenska voda" u većini slučajeva se koristi voda za ljudsku potrošnju dostupna iz javnog vodoopskrbnog sustava. Voda iz vodoopskrbnog sustava podliježe analizi pokazatelja temeljem "Pravilnika o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju" pod oznakom NN 125/2013, 141/2013, 128/2015. Iako je voda prethodno analizirana temeljem navedenog Pravilnika, nakon punjenja u bazen, zbog karakterističnih uvjeta u bazenskom okolišu javlja se potreba za ispitivanjem prema kriterijima Pravilnika koji definira kriterije bazenske vode (NN 107/2012, 88/2014). Ispitivanje kakvoće bazenske vode posebice je važno zbog moguće prisutnosti, te rasta i razmnožavanja bakterija iz roda *Legionella*, čija ispitivanje nije propisano temeljem Pravilnika NN 125/2013, 141/2013, 128/2015. Pravilnikom (NN 107/2012, 88/2014) se utvrđuju: sanitarno tehnički uvjeti kojima moraju udovoljavati bazenska kupališta, zdravstvena ispravnost bazenske vode, vrsta i obim analiza uzoraka bazenske vode, analitičke metode te vođenje evidencije rada bazenskog kupališta (9). Odredbe Pravilnika (NN 107/2012, 88/2014) ne odnose se na vodu bazena za kupanje koja je u vlasništvu građana, a nije za javnu uporabu; bazene koji koriste vode specifičnog sastava, a koje imaju medicinsku indicaciju (npr. termalne vode, sumporne vode i druge vode s dokaznim terapijskim svojstvima), te na saune, hidromasažne kade, lagune, protočne bazene i vodene tobogane s morskom vodom. Vrijednosti pokazatelja ispitivane bazenske vode moraju odgovarati vrijednostima fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških pokazatelja bazenske vode propisanim u Prilogu 1. ovog Pravilnika prikazanim u Tablici 1. Najveća dopuštena vrijednost koncentracije *Legionella pneumophila* u bazenskoj vodi je < 1 cfu/100 ml sa napomenom: "U bazenima s miješanjem vode i/ili u bazenima kod kojih se može stvarati aerosol, ako je temperatura vode u bazenu  $\geq 23$  °C." (9).

Tablica 1 Uvjeti za bazensku vodu propisani Pravilnikom o sanitarno-tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 107/12; 88/14) (9)

Broj	Pokazatelj	Jedinica	Vrijednost	
			min.	max.
			Bazenska voda	
			min.	max.
1	Mikrobiološki			
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	cfu/100 ml	-	< 1
1.2	<i>Escherichia coli</i>	cfu/100 ml	-	< 1
1.3	<i>Legionella pneumophila</i>	cfu/100 ml	-	< 1 *
1.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	cfu/100 ml	-	100 **
1.5	Ukupan br. aer. bakterija pri 37 °C/48 h	cfu/ml	-	200
2	Fizikalno - kemijski			
2.1	Boja – metoda SM2120C	mg/l Pt/Co skale	-	20
2.2	Mutnoća	NTU	-	4,0
2.3	pH vrijednost			
	a) slatka voda	-	6,5	9,0
	b) morska voda	-	6,5	9,0
	c) prirodna mineralna voda	-	6,5	9,0
2.4	Električna vodljivost	$\mu$ S/cm	-	-
2.5	Oksidativnost kao O <sub>2</sub>	mg/l	-	5,0
2.6	Slobodni klor <sub>3</sub>	mg/l	-	1,02
2.7	Trihalometani (ukupni)	$\mu$ g/l	-	100
2.8	Klor dioksid <sub>4</sub>	mg/l	0,2	0,3

\* U bazenima s miješanjem vode i/ili u bazenima kod kojih se može stvarati aerosol, ako je temperatura vode u bazenu  $\geq 23$  °C.

\*\* U bazenima s morskom vodom. Pokazatelj se ne određuje u bazenima sa slatkom vodom.

Nastavak opisa oznaka sa prethodne stranice koje opisuju značenja vrijednosti iz Tablice 1:

- 1: Preporuča se odgovornoj osobi ručno mjerenje vezanog klora
- 2: Iznimno su za ograničeno vrijeme radi ispunjavanja sukladnosti s propisanim mikrobiološkim pokazateljima zdravstveni zahtjevi za bazenske vode dozvoljene više koncentracije, ali koncentracija slobodnog klora ne smije biti iznad 1,2 mg/l.
- 3: Samo kod odgovarajuće tehnološke pripreme vode.

Uzorak bazenske vode čiji parametri udovoljavaju propisanim vrijednostima smatra se zdravstveno ispravnim.

Prilogom 2. ovog Pravilnika propisuju se metode za ispitivanje vode za kupanje. Od mikrobioloških pokazatelja za ovo istraživanje su značajni parametri ukupan broj bakterija (kratice: UBB) i *Legionella pneumophila*.

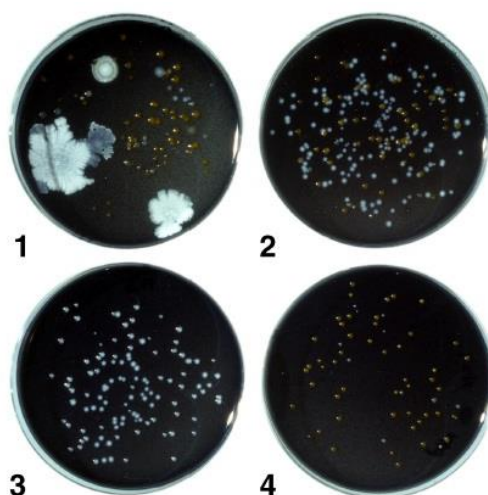
Za parametar ukupan broj aerobnih bakterija na 37 °C kroz 48h za bazenske vode najviša dopuštena granica iznosi 200 cfu ml<sup>-1</sup>. Ukupni broj bakterija je pokazatelj efikasnosti dezinfekcije vode i općih higijenskih uvjeta u sustavu.

Za detekciju mikrobiološkog pokazatelja – *Legionella pneumophila* predložena je metoda koncentriranja uzorka membranskom filtracijom ili centrifugiranjem, nakon čega se pripremljeni uzorak nasaduje na odgovarajuću selektivnu podlogu, te se vrši identifikacija sumnjivih kolonija. Pravilnikom je također dozvoljeno predložene analitičke metode zamijeniti primjenom akreditiranih metoda koje su validirane internim i međulaboratorijskim ispitivanjima. Metoda korištena u ispitivanju uzoraka obrađenih u ovom diplomskom radu je standardizirana metoda HRN EN ISO 11731:2000, membranska filtracija i inokulacija selektivne hranjive podloge čiji su postupci detaljno opisani u poglavlju "Materijali i metode", podpoglavlju "Laboratorijska analiza".

Legionela je kao ubikvitaran mikroorganizam stalno prisutna u vodi iz prirode, no njezina koncentracija u uzorku vode ponekad je preniska da bi se bakterija detektirala standardnim metodama. Pri obradi takvih uzoraka potrebno je ukoncentrirati vodu postupcima ukoncentriravanja ili filtracije. Također je vrlo bitno smanjiti popratnu mikrofloru, koja ometa detekciju legionela iz uzorka. Inhibicija popratne kompetitivne mikroflore vrši se toplinskim tretmanom ili upotrebom kiseline. Toplinski tretman provodi se u termostatu na temperaturama u rasponu od 50 – 60 °C kroz period od 20 do 30 minuta. Tretman kiselinom provodi se pri pH=2,2 kroz 5 minuta. Uzorci se prenose na hranjive podloge. Hranjiva podloga je prirodni ili umjetni medij za uzgoj mikroorganizama, u kojem oni rastu hraneći se tvarima potrebnim za sintezu staničnih sastojaka i proizvodnju energije. Sastav hranjive podloge bitno se razlikuje, ovisno o nutritivnim zahtjevima bakterije koju želimo uzgojiti. Izborom sastava podloge možemo selektivno olakšati ili otežati, pa i spriječiti rast određenih mikrobnih skupina. Pravilnim izborom sastava hranjive podloge olakšava se selekcija, identifikacija, klasifikacija, ocjenjivanje patogenosti, neškodljivosti određene vrste mikroorganizma. Kao što je već prethodno istaknuto, legionela ima specifične nutritivne zahtjeve, ne pokazuje porast na uobičajenim hranjivim podlogama (4). Krvni agar (KA) u slučaju analize uzorka vode na legionelu koristi se u svrhu određivanja ukupnog broja bakterija. KA je prirodna, kruta diferencijalna hranjiva podloga koja sadrži krv određene životinje. Ova se podloga još koristi za izolaciju bakterija koje za svoj rast zahtjevaju hemoglobin, te se koristi za detekciju hemolitičke aktivnosti (23).

Za svoj rast i razmnožavanje legionela iz okoline, u ovom slučaju medija troši dostupne količine željeza i aminokiselina. Legionela raste na hranjivim podlogama koje su obogaćene željezom i L-cisteinom. Nekoliko varijacija dodanih agaru pokazalo se adekvatnima za uzgoj bakterija

*Legionella spp.* U upotrebi su hranjive podloge sa različitim udjelom pojedine komponente. Udio sastava određuje proizvođač hranjive podloge. Za detekciju legionele najčešće se koriste sljedeće podloge: PCV (sadrži: polymixyn B, cycloheximid, vancomycin), PCV (-) ne sadrži L-cystein, GVPC (sadrži: glicin, polymixyn B, cycloheximid, vancomycin) i BCYE (engl. buffered charcoal yeast extract agar). BCYE agar je selektivni agar koji se koristi za detekciju, izolaciju i kvantifikaciju legionela iz uzoraka vode. BCYE agar sastoji se od aktivnog ugljena, kvašćevog ekstrakta, pufera/kalijev hidroksid (ACES), L-cisteina, željezo (III) pirofosfat,  $\alpha$ -ketoglutarata i agara (24).  $\alpha$ -ketoglutarata kiselina legionelama služi kao izvor aminokiselina što omogućava njihov oporavak i rast na BCYE agaru (5). Legionele na BCYE agaru rastu kao bijelo-sive, plave ili ljubičaste kolonije sa punim glatkim rubom i karakterističnim mliječnim sjajem. U upotrebi je također i BCYE agar bez L-cisteina. PCV agar je neselektivni agar koji se koristi za detekciju legionela. Sastoji se od agara, aktivnog ugljena i kvašćevog ekstrakta sa dodatkom antibiotika (25). PCV (-) sastavom je sličan PCV agaru, no ne sadrži L-cystein zbog čega se može koristiti kao negativna kontrola. GVPC agar služi za selektivnu izolaciju legionela uz pomoć dodanih antibiotika i amino kiseline glicin. Za razliku od PCV agara on sadrži glicin. Sastav GVPC agara identičan je sastavu BCYE agara uz dodatak glicina i antibiotika (vankomicin hidroklorid, polimiksin B sulfat, cikloheksimid) (25). Opisane hranjive podloge u najvećoj mjeri se koriste za detekciju *Legionella pneumophila*, dok je za detekciju nekih drugih vrsta iz roda *Legionella* potrebno primijeniti izmijenjeni sastav hranjive podloge. Primjerice *L. micdadei* za povećani rast zahtjeva albumin, (engl. Albumin buffered charcoal yeast extract agar, ABCYE) (5).



Slika 5. Uzgoj legionela iz uzorka vode na četiri različita medija (5)

Na Slici 5. prikazane su četiri različite podloge za uzgoj legionela. Prikazani rast ili izostanak rasta direktni je pokazatelj ponašanja legionela u odnosu na sastav podloge. Prikazani rezultati porasta bakterija su očekivani i u drugim slučajevima upotrebe ovih hranjivih podloga za detekciju bakterija legionela. Podloga pod brojem 1 je BCYE agar na kojem rastu brojne ne-legionela bakterije i samo manji broj legionela. Podloga broj 2 je PVC agar sa porastom brojnih kolonija legionela i drugih bakterija. Podloga broj 3 je GVPC agar na kojem rastu legionela bakterije i samo nekoliko ne-legionela. Podloga broj 4 je PVC agar bez cisteina na kojem rastu ne-legionela bakterije, bez porasta legionela. Bakterija legionela zavisno o sastavu podloge može imati varijacije u boji i izgledu porasle kolonije, no njezine varijacije ne odstupaju značajno od sljedećih opisa. Legionele rastu na hranjivoj podlozi kao pravilne, sjajne, okrugle, konveksne, sivo-bijele, ljubičaste, plave, a ponekad i zelenkaste kolonije sa mliječnim prozirnim sjajem. Kolonije izložene ultraljubičastom zračenju fluoresciraju žuto-zeleno.



#### 1.4.4 Preventivne mjere za smanjenje rizika i mjere suzbijanja

Pod pojmom preventivne mjere podrazumijeva se kontinuirana provedba mjera definiranih dokumentom koji određuje postupke upravljanja rizicima. Preventivne mjere mogu se provoditi i diskontinuirano, odnosno po potrebi. Takav primjer prakse su hoteli koji rade sezonski, te se preventivne mjere provode nakon perioda mirovanja svih aktivnosti u objektu, a neposredno prije otvaranja istog za goste. Preventivne mjere provode se s ciljem smanjenja rizika.

Najjednostavnija preventivna mjera u takvim slučajevima je ispiranje vodovodnog sustava i slavina. Ispiranju sustava prethode postupci ispiranja taloga iz spremnika, te čišćenje taloga iz mrežica na slavinama, tuševima i filterima. Postupak ispiranja sustava provodi se dok na svim slavinama ne teče bistra voda najmanje pet minuta. Ovaj postupak se koristi i u periodima rada kod neredovito korištenih slavina kako bi se izbjegla stagnacija vode u sustavu. Nakon ispiranja zaostalog taloga i vode iz sustava provodi se toplinski tretman odnosno pasterizacija sustava. Pasterizacija sustava provodi se ispiranjem sustava vodom visoke temperature, najniže temperature od 65 °C, optimalno raspona 70-90 °C. Tako povišenu temperaturu potrebno je održavati u sustavu kroz četiri sata. Vruću vodu treba pustiti da teče slavinama najmanje jednu minutu. Nakon toplinskog tretmana temperatura vode se snižuje. Za toplu vodu u sustavu temperatura ne smije biti ispod 50 °C, dok temperatura hladne vode ne smije biti iznad 20 °C na slavini. Moguće je provesti i postupak hiperkloriranja u navedenim sustavima. Tada on prethodi postupku pasterizacije sustava. Princip provedbe navedenog postupka sličan je onome opisanom kod dezinfekcije bazena, nakon kojeg se provodi ispiranje sustava. Hiperkloriranje se provodi u slučajevima kada je onemogućeno provođenje postupka pasterizacije ili nakon izvedbe građevinskih i inženjerskih radova na sustavu potrošne/sanitarne vode (20).

Slične preventivne mjere provode se kod puštanja sezonskih bazenskih kupališta na korištenje, najmanje jednom godišnje kod bazenskih kupališta koji rade cijelu godinu (9), te posebice kod pojave infektivnih bakterija u bazenskoj vodi. Prije otvaranja bazena koji su bili zatvoreni van sezone kupanja provode se postupci čišćenja, ispiranja i dezinfekcije. Bazen je potrebno isprazniti ispuštanjem vode iz njega. Zatim se provodi mehaničko čišćenje stjenki bazena, filtera, slavina, pumpi i pripadnog protočnog sustava. Hiperkloriranje se provodi postupkom opisanim u podpoglavlju "Postupci dezinfekcije", pri čemu tretirana voda određen broj sati odstoji u bazenu. Bazen je nakon postupka potrebno isprati, odnosno hiperkloriranu bazensku vodu je nakon provedenog tretmana potrebno ispustiti iz bazena. Kod bazena se održavanje provodi redovitom filtracijom i izmjenom vode, neizostavnim ispravnim kontinuiranim tretmanom preparatima na bazi klora(4) i praćenjem značajnih karakteristika bazenske vode. Značajni parametri za kontinuiranu dezinfekciju su koncentracija rezidualnog klora i pH vrijednost. Navedeni pokazatelji redovito se prate, automatskim sustavima, koji su najčešće u kombinaciji sa automatskom regulacijom istih. Također je potrebno redovito provoditi čišćenje svih površina i sastavnih dijelova bazenskog kupališta. Neki od postupaka koji se primjenjuju u bazenu i na kupališnim područjima su: konstantna cirkulacija vode u bazenu, periodi ne korištenja bazena kada se reguliraju poželjne razine dezinficijensa i pripadnih parametara, zamjena najmanje polovice bazenske vode čistom tijekom dana, redovito očitavanje parametara, redovita inspekcija i čišćenje površina, čišćenje filtera za vodu i filtera za nečistoće u bazenu, održavanje i čišćenje kupališnog područja, te sustava za grijanje, ventilaciju i klimatizacijskih sustava, čišćenje bazena manjih zapremnina ispuštanjem ukupne količine vode, osiguravanje kvalifikacije i kompetencije osoblja za provedbu zaduženih postupaka rada (9), informiranje i edukacija korisnika javnih bazena pravilima ponašanja čije bi nepridržavanje doprinijelo povećanju rizika od infekcije u bazenu. Bazeni sa potencijalno većim rizikom za nastajanje infekcije su vrele kupelji ili hot tubs, tipovi bazena sa mjhurićima, te je održavanju ovog tipa bazena potrebno posvetiti veću pažnju. Neki se od postupaka

opisanih u vodiču EWGLI iz 2011. godine češće provode. Obavezno je provođenje kontinuiranog tretmana preparatima na bazi klora ili broma uz korekciju pH, monitoring rezidua dezinficijensa i pH vrijednosti najmanje tri puta u danu, dnevno ispiranje filtera za nečistoće. Preporuča se barem polovicu ukupne količine vode izmijeniti novom u jednom danu, preporuča se praćenje neprekidnog rada pumpi i automatskog dezinfekcijskog sustava (rad tijekom 24 sata u danu), jednom tjedno potrebno je očistiti i dezinficirati cijeli sustav, mjesečno ispitati mikrobiološku kakvoću vode, te svaka četiri mjeseca ispitati vode na prisutnost legionela. Također, potrebno je voditi evidenciju provedenih postupaka, koju kontrolira odgovorna osoba (11).

Specifični slučajevi provedbe opisanih postupaka su provedba mjera za suzbijanje uzročnika infekcije (*Legionella spp.*) prikazani u Tablici 2, posebice ako je u nekom objektu (bazenskom kupalištu) nastala potreba za protuepidemijskim mjerama. Posebne protuepidemijske mjere propisuje i odobrava odgovorna osoba, specijalist epidemiologije, a nalaže ih sanitarni inspektor (20). U slučaju analize vode na legionelu čiji rezultati iznose 100-1000 cfu *Legionella spp.* na litru uzorka, provode se u nastavku opisane mjere. Prije provedbe preventivnih mjera potrebno je izvršiti ponoviti ispitivanje bazenske vode. Temeljem donesenih mjera kontrole i procjene rizika, nastoji se identificirati uzrok povećanog broja legionela. Preporuka je bazen isprazniti, očistiti i dezinficirati. Ponovno uzorkovanje provodi se jedan dan nakon provedbe preporučenih postupaka, te nakon 1-4 tjedna. U slučaju kada je rezultat ispitivanja bazenske vode na prisustvo legionela više od 1000 cfu na litru uzorka vode, potrebno je evakuirati ljude i zatvoriti područje. Od postupaka najprije se provodi hiperklorinacija bazenske vode s koncentracijom 50 ml g<sup>-1</sup>klora kroz jedan sat. Nakon toga slijedi pražnjenje, čišćenje i dezinfekcija bazena. Jedan dan nakon punjenja bazena provodi se ispitivanje vode, što se ponavlja nakon 1-4 tjedana. Bazeni nije u upotrebi do rezultata analize koji zadovoljavaju zahtjeve iz pripadnog važećeg Pravilnika (NN 107/2012, 88/2014) (11).

Tablica 2 Procjena potrebe za provedbom preventivnih mjera na temelju kvantifikacije pozitivnih rezultata (11)

Broj legionela u mililitru vode (cfu/ml)	Procjena rezultata
1-10	Nalaz koji upozorava i podsjeća na potrebu stalne primjene općih preventivnih mjera, ali općenito ne predstavlja neposredan rizik. Neki ga proglašavaju i negativnim rezultatom.
(11-100)	Prema nekim navodima i ova se kategorija smatra neopasnom. Ova se kategorija nalazi unutar donje, šire kategorije. Potencijalno je rizična jer izostankom preventivnih mjera u kratkom vremenu može doći do značajnog pogoršanja uvjeta i povećanja rizika.
11-1000	Postoji potencijalni rizik i treba odrediti ciljane mjere.
>1000	Neposredan visok rizik. Nužne su hitne mjere uključivši i moguće zatvaranje objekta.
Broj ukupnih bakterija u mililitru vode (cfu/ml)	Procjena rezultata
>100000 (10 %)	Potencijalno visok rizik. Treba odrediti ciljane mjere.

## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Stupanjem na snagu Pravilnika o sanitarno-tehničkim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 107/2012, 88/2014) u listopadu 2012. godine u Republici Hrvatskoj je donesena nacionalna zakonska regulativa koja definira ispitivanje fizikalno-kemijskih i mikrobioloških pokazatelja. Osim rutinskih pokazatelja mikrobiološke kakvoće vode, postavljen je zahtjev i kriterij za ispitivanjem vrste *L. pneumophila*.

Cilj diplomskog rada bio je prikazati i analizirati podatke o prisutnosti *L. pneumophila* u bazenskoj vodi na području Primorsko-goranske županije u razdoblju od 2013. do 2016. godine. Također, cilj je bio istražiti povezanost prisutnosti *L. pneumophila* s ostalim ispitanim fizikalno-kemijskim i mikrobiološkim parametrima (temperatura vode i zraka, pH vrijednost, koncentracija slobodnog klora, UBB). Dan je prikaz zdravstvenih rizika koji se javljaju uslijed neadekvatnog tretiranja bazenske vode.

## 3 MATERIJALI I METODE

### 3.1 Područje istraživanja

Istraživanjem je obuhvaćeno područje Primorsko-goranske županije, točnije uzorci bazenske vode sa navedenog područja. Ispitivanje na pokazatelj *Legionella pneumophila* provedeno je na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije (u daljnjem tekstu NZZJZ PGŽ). Obzirom da je ispitivanje uzoraka bazenske vode na *L. pneumophila* obavezno od 2013. godine, obrađeni podaci uzoraka analizirani su tijekom četverogodišnjeg razdoblja od 2013. do 2016. godine.

U navedenom razdoblju je na području Primorsko-goranske županije (u daljnjem tekstu: PGŽ) analizirano ukupno 324 uzoraka bazenske vode na pokazatelj *L. pneumophila*. Najveći broj uzoraka uzorkovan je na područja grada Opatije, zatim slijede silaznim redom grad Krk, područje otoka Raba, općina Baška, područje Crikvenice, Malinska, grad Rijeka, Novi Vinodolski, Dramalj, Klenovica, Selce, Delnice, Lovran, područje Malog Lošinja, otok Paga, Senj, Viškovo, Gospić, Karlobag, Otočac, Solin.

### 3.2 Terenski rad (uzorkovanje)

#### 3.2.1 Materijali

U terenskom radu od materijala su korišteni:

1. Boca zapremnine od 1 L
2. Sredstvo za deaktivaciju dezinficijensa (natrij tiosulfat)
3. Jednokratne rukavice
4. Zaštitna maska
5. Radna bilježnica

#### 3.2.2 Metoda

Bazenska voda za analizu uzima se u sterilne staklene, polipropilenske boce ili boce drugih odgovarajućih materijala, zapremnine 1 l sa čepom na navoj. Pri uzorkovanju vode za analizu na prisustvo legionela potrebno je nositi zaštitne rukavice, te u slučajevima sumnje na izvor zaraze obavezno je nositi i zaštitnu masku za dišne organe. Uzorak se prikuplja tako da se iz bazena zagradi količina od 1 l vode. U boci se ostavi prostor od 2-3 cm zraka što omogućava miješanje uzorka. U slučaju uzorka koji sadrži dezinficijens, naprimjer klorni preparat, isti je potrebno deaktivirati. Ukoliko se radi o kloru, dodatkom kalij tiosulfata ili natrij tiosulfata. Čep na navoj treba dobro zatvoriti kako bi se spriječio gubitak pri transportu. Uzorak je potrebno odgovarajuće označiti kako bi se omogućila sljedivost. Uz informacije o mjestu uzorkovanja i vrsti uzorka također je vrlo bitno zabilježiti okolišne uvjete prilikom uzorkovanja. To su: vrijeme uzorkovanja, temperatura vode i zraka, te koncentracija i vrsta preparata za dezinfekciju vode. Prikupljeni uzorci šalju se u laboratorij na analizu pohranjeni na sobnoj temperaturi ( $20 \pm 5$  °C) na tamnom. Uzorke je potrebno dostaviti u laboratorij u što kraćem roku, posebice uzorke koji sadrže dezinficijens. Poželjno vrijeme dostave je jedan dan, a ne smije biti duže od dva dana. Za uzorke koji se transportiraju iz udaljenih lokacija poželjno vrijeme dostave je dva dana ali ne duže od pet, maksimalno dozvoljeno vrijeme je četrnaest dana (26). U slučaju duljeg transporta od poželjnog uzorci se pohranjuju na temperaturi ( $5 \pm 3$ ) °C radi očuvanja izvornih karakteristika i mikroflore (27).

### 3.3 Laboratorijska analiza

#### 3.3.1 Materijali

Od materijala su u laboratorijskom radu korišteni:

1. Membranski filter
2. Filter papir promjera 0,22  $\mu\text{m}$
3. Vakuum pumpa
4. Spremnik za vodu (otpad)
5. Plamenik
6. Pinceta
7. Jednokratne rukavice
8. Škare
9. Epruveta
10. Destilirana voda
11. Alkohol
12. Ultrazvučna kupelj
13. Petrijeva zdjelica
14. Pipeta
15. Eza za razmaz uzorka
16. Eza za presađivanje
17. Inkubator
18. Mikroskop
19. Ultravioletna lampa
20. DrySpot Legionella Latex Test
21. Marker
22. Radna bilježnica
23. Fotoapar

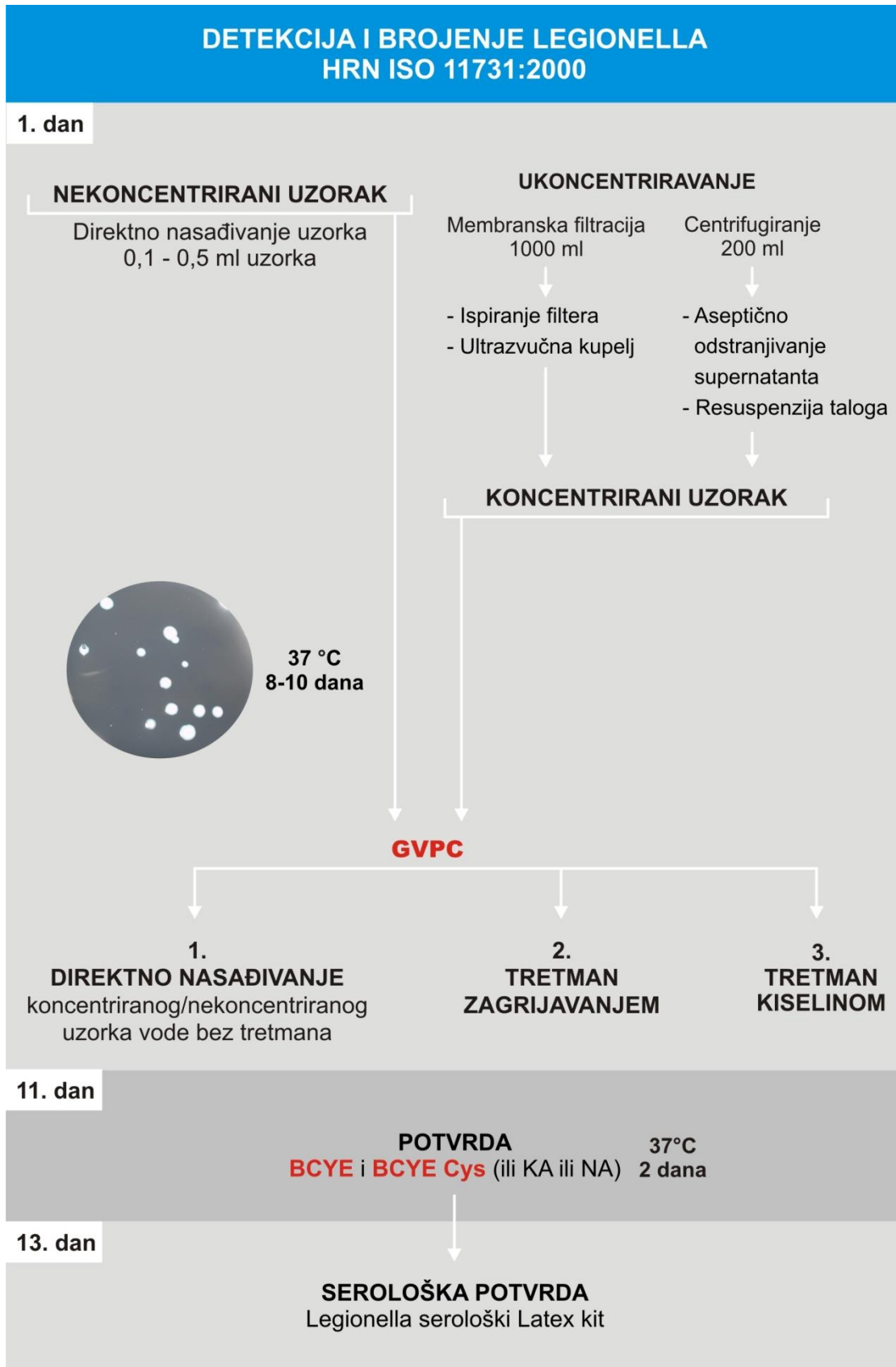
#### 3.3.2 Metode

Analizu uzoraka dostavljenih u laboratorij potrebno je provesti u što kraćem roku od uzorkovanja. U idealnim uvjetima provodi se unutar 24 h. Na NZZJZ PGŽ prisutnosti i broj *L. pneumophila* u uzorcima bazenske vode provodi se temeljem metode opisane u normi HRN EN ISO 11731:2000 u skladu sa zahtjevima Pravilnika o sanitarno tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda Republike Hrvatske (NN 107/2012, 88/2014)

Uzorci vode dopremaju se na Odsjek za mikrobiologiju okoliša NZZJZ PGŽ za analizu *L. pneumophila*. Dospjeli uzorci upisuju se u radnu bilježnicu Odsjeka te im se dodjeljuje odgovarajući analitički broj pod kojim se raspoznaju u daljnjoj analizi. Iz ukupne količine 0,5 ml uzorka inokulira se na krvni agar za određivanje broja izraslih kolonija. Zatim se preostala količina uzorka ukoncentrira postupkom membranske filtracije, te se uzorak kultivira na selektivnoj hranjivoj podlozi. Prije početka postupka membranske filtracije potrebno je sterilizirati membrane i lijevke. Sterilizacija se provodi pomoću visoke temperature plamena. Na membranu se postavi filter papir promjera 0,22  $\mu\text{m}$ , te lijevak u koji se ulijeva uzorak. Uzorak se filtrira iz lijevka pomoću vakuumpumpe u spremnik za profiltriranu vodu. Prilikom filtracije potrebno je konstantno dolijevanje vode, kako bi se spriječilo da filter presuši dok se ne profiltrira ukupna količina uzorka. Filter papir se nakon završetka membranske filtracije sterilnom pincetom prenosi u epruvetu za daljnju obradu uzorka. U epruvetu se doda količina

od 5-25ml destilirane vode za resuspenziju uzorka sa filtera. Uzorak je potrebno energično mućkati najmanje 2 minute. Također, filter se može isjeckati sterilnim škarama na sitne komadiće što pospješuje ispiranje uzorka. Tako pripremljeni uzorak smješta se u ultrazvučnu kupelj na 35 Hz kroz 2 minute. Nakon ultrazvučne kupelji uzorak se termostatira na 55 °C kroz 20 minuta kako bi se u što većoj mjeri onemogućio rast ne-ciljanih mikroorganizama koji bi mogli ometati detekciju *L. pneumophila*.

Termostatirani uzorak inokulira se u količini od 0,1-0,5 mL na selektivnu ploču Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide medij (GVPC). Inokulum se razmaže sterilnim štapićem i pusti odstajati kako bi se inokulum upio u agar. Preostala količina pripremljenog uzorka čuva se u hladnjaku do kraja trajanja analize kao radni materijal u slučaju potrebe za ponavljanjem analize. Nakon što se uzorak upije u podlogu slijedi inkubacija nasadne podloge se preokrenute strane. U termostatu se podešavaju uvjeti temperature od (36±2) °C i atmosfera zraka sa volumnim udjelom ugljičnog dioksida (CO<sub>2</sub>) od 2,5 % u trajanju od najmanje 10 dana. Inkubacija u uvjetima sa navedenim udjelom CO<sub>2</sub> može pogodovati rastu nekih vrsta legionela, ali ne nužno (27). Pregledavanje inokuliranih ploča obavlja se u intervalima od 2-3 dana tijekom inkubacije. Svaka informacija o promjeni na ploči zapisuje se u radnu bilježnicu laboratorija. Nakon inkubacije sve karakteristične kolonije koje rastu na selektivnom agaru se smatraju suspektima. Svaka suspektna kolonija presađuje se na Buffered Charcoal Yeast Extract agar (BCYE) i Buffered Charcoal Yeast Extract whit L-cystein agar (BCYE-Cys). BCYE agar bez cisteina preduvjet je rasta *L. pneumophilla*. BCYE-Cys agar može se zamijeniti Nutrijent agarom (NA) ili Krvnim agarom (KA). Ukoliko je prisutno više od jedne suspektne kolonije, presađuju se barem dvije kolonije od svake vrste. Subkultivirane ploče (ploče sa presađenim suspektim kolonijama) inkubiraju se u istim uvjetima kao i GVPC ploče sa uzorkom, na temperaturi od (36±2) °C i volumnim udjelom ugljičnog dioksida (CO<sub>2</sub>) od 2,5 % u trajanju od najmanje 2 dana. Legionela kolonijama smatraju se one čiji je rast vidljiv na BCYE agaru, a izostao na BCYE-Cys ili zamjenskom agaru (NA ili KA). U slučaju prisutnosti jake pozadinske flore ponavlja se postupak ispitivanja, koristeći veće razrjeđenje ili manji volumen uzorka. Cjelokupni postupak metode HRN ISO 11731:2000 prikazan je u osnovnim crtama na Slici 6 koja slijedi u nastavku rada.

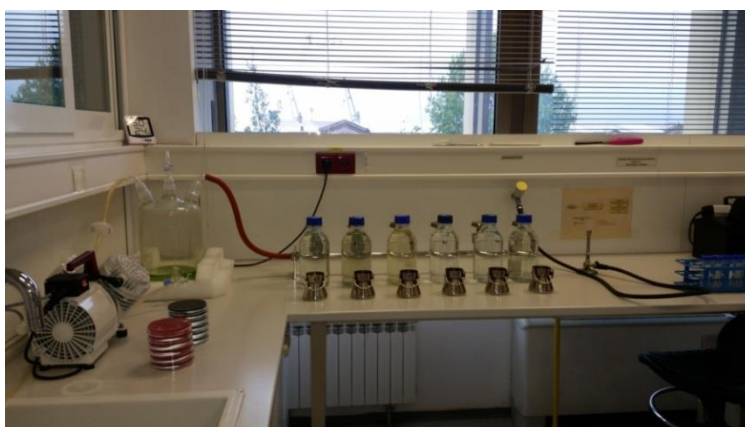


Slika 6. Shematski prikaz metode za detekciju i brojenje bakterija *Legionella* HRN ISO 11731:2000 (2)

Prikazane fotografije koje slijede označene Slika 7. – Slika 28. prikazuju provedbu analize uzoraka bazenske vode temeljem metode opisane u normi HRN EN ISO 11731:2000 u skladu sa zahtjevima Pravilnika (NN 107/12, 88/14) na NZZJZ PGŽ. Pored svake Slike (fotografije) stoji kratak opis prikazanog.



Slika 7. Razmaz 1 mL uzorka bazenske vode na krvni agar (KA)  
(Fotografirala: Snježana Šimeg, 27.04.2017.)



Slika 8. Membranska filtracija (Fotografirala: Snježana Šimeg, 27.04.2017.)





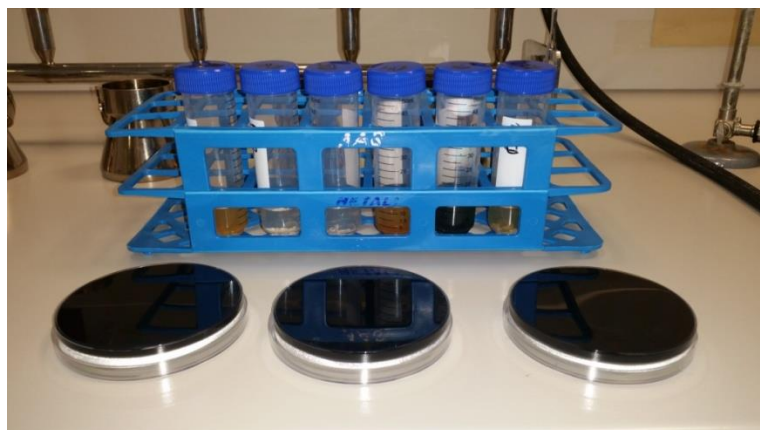
Slika 9. Uklanjanje filter papira nakon membranske filtracije  
(Fotografirala: Snježana Šimeg, 27.04.2017.)



Slika 10. Resuspenzija uzorka sa filter papira (Fotografirala: Snježana Šimeg, 27.04.2017.)



Slika 11. Ultrazvučna kupelj (Fotografirala: Snježana Šimeg, 27.04.2017.)



Slika 12. Uzorci nakon termostatiranja spremni za inokulaciju na agar  
(Fotografirala: Snježana Šimeg, 27.04.2017.)



Slika 13. Inokulacija GVPC agara sa pripremljenim uzorkom bazenske vode  
(Fotografirala: Snježana Šimeg, 27.04.2017.)



Slika 14. Nasađene hranjive podloge (lijevo GVPC, desno KA)  
(Fotografirala: Snježana Šimeg 27.04.2017.)



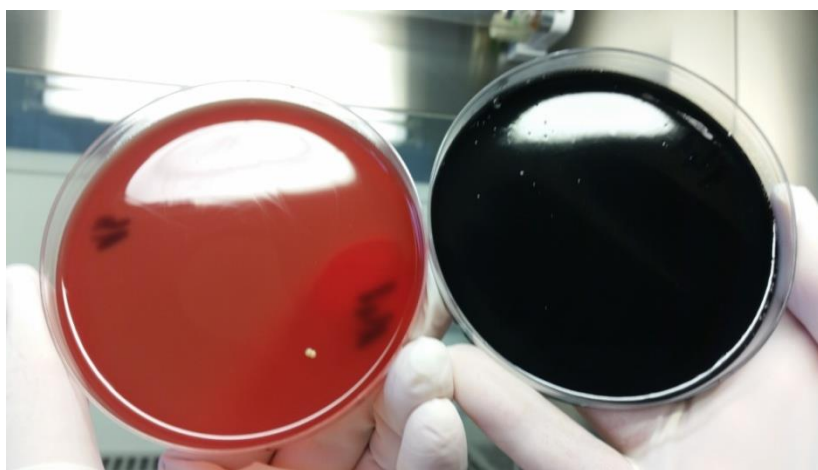
Slika 15. Prvo očitavanje podloga nakon inkubacije od 2 dana, u digestoru  
(Fotografirala: Snježana Šimeg, 18.05.2017.)



Slika 16. Očitavanje nasađenih podloga, 2. dana inkubacije  
(Fotografirala: Snježana Šimeg, 18.05.2017.)



Slika 17. Porast UBB na KA, 2. dana nakon nasađivanja podloge  
(Fotografirala: Snježana Šimeg, 18.05.2017.)



Slika 18. Usporedba stanja na KA i GVPC podlogama istog uzorka, 2. dana nakon nasađivanja  
podloge (Fotografirala: Snježana Šimeg, 18.05.2017.)



Slika 19. Porast kolonija na GVPC agaru, 4. dan (Fotografirala: Snježana Šimeg, 20.05.2017.)



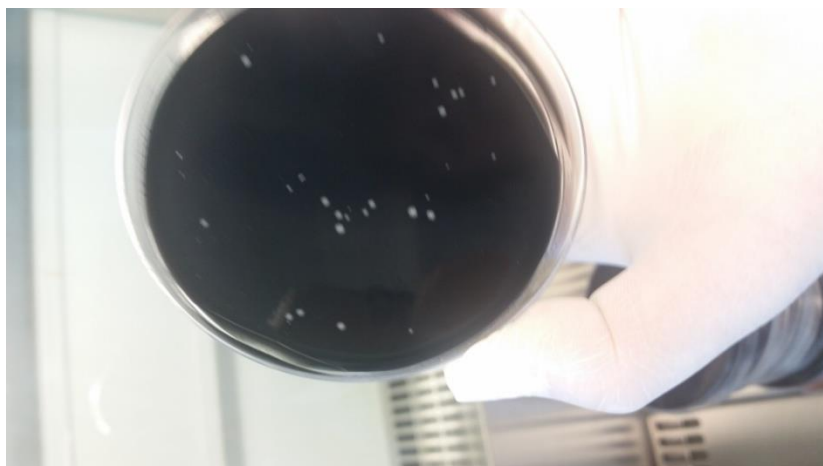
Slika 20. Presađivanje suspektnih kolonija sa GVPC na BCYE agar, 4. Dan  
(Fotografirala: Snježana Šimeg, 20.05.2017.)



Slika 21. Porast presađenih suspektnih kolonija, 6. dan (Fotografirala: Snježana Šimeg, 22.05.2017.)



Slika 22. Interpretiranje poraslih kolonija, 6. dan (Fotografirala: Snježana Šimeg, 22.05.2017.)



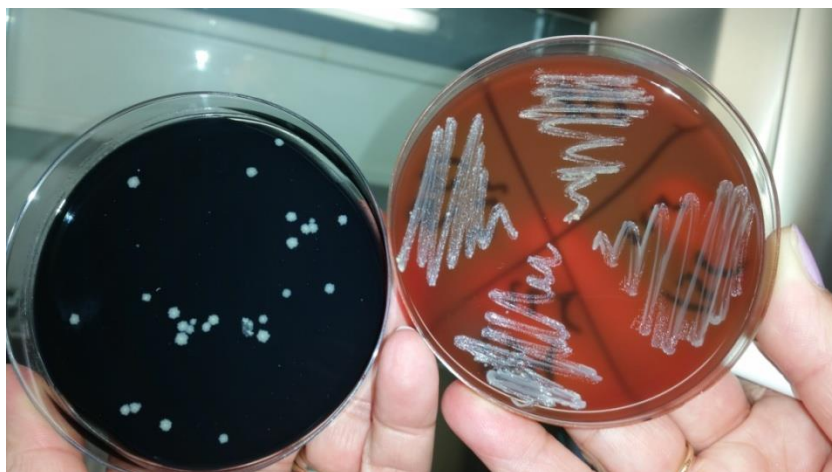
Slika 23. Porast kolonija na GVPC agaru, 6. dan (Fotografirala: Snježana Šimeg, 22.05.2017.)



Slika24. Presađivanje suspektne kolonije sa GVPC agara na BCYE agar i KA agar (Fotografirala: Snježana Šimeg, 22.05.2017.)



Slika 25. Porast kolonija na GVPC agaru (lijevo) i presađenih suspektnih kolonija na BCYE (desno), 8. dan (Fotografirala: Snježana Šimeg, 24.05.2017.)



Slika 26. Porast kolonija na GVPC agaru (8. dan) sa usporednim prikazom porasta presađenih kolonija na KA agaru (Fotografirala: Snježana Šimeg, 24.05.2017.)



Slika 27. Porast kolonija na GVPC agaru, 10. dan (Fotografirala: Snježana Šimeg, 26.05.2017.)



Slika 28. Prikaz rasta presađenih suspektnih kolonija na enrichment aharu 10. dan (Fotografirala: Snježana Šimeg, 26.05.2017.)

U cilju određivanja serogrupe *Legionella pneumophila* koristi se test lateks aglutinacije. Za provedbu lateks aglutinacije koristi se OXOID-ov DrySpot Legionella Latex Test. Test se sastoji od plavih čestica sintetiziranih antitijela koja su isušena na papiru. Aglutinacija se odvija u prisustvu mikroorganizama iz roda *Legionella*. Antigeni stanične membrane stvaraju vidljive mrlje plave boje na testu. Ovaj test predstavlja brzi i jednostavan način provjere patogenosti *Legionella spp.*, te određivanje vrste i serogrupe. Detekcija *Legionella pneumophila* serogrupe 1 i serogrupe 2-14 provodi se odvojeno. Test se sastoji od područja za aglutinaciju uzorka i kontrole. Na područje označeno nazivom "TEST" nanosi se pufer za aglutinaciju i uzorak, dok se na područje "CONTROL" nanosi samo pufer za aglutinaciju. Postupak provedbe testa je slijedeći. Na predviđena mjesta na testu kapne se po jedna kap DrySpot pufera (oznaka: DR230M). Potrebno je pripaziti da pufer ne dotiče lateks reagens na testu kako se nebi pomiješali prije vremena. Suspektna kolonija se pomoću eze prenese na test te pomiješa sa puferom. Nastala suspenzija se zatim pomiješasa lateks reagensom, preko predviđene površine. Postupak miješanja pufera i lateks reagensa sa novom ezom se ponovi na području za kontrolu testa. Nastale homogene smjese na testu potrebno je miješati laganim kružnim pokretima (rotacijom testa) do pojave aglutinacije ali najduže kroz 60 sekundi. Aglutinacija nastala unutar 60 sekundi daje pozitivan rezultat testa, dok izostanak aglutinacije na testu ili naknadna aglutinacija (aglutinacija nakon 60 sekundi) predstavljaju negativan rezultat. Na kontrolnoj površini ne dolazi do aglutinacije ukoliko se ona pojavi postupak je potrebno ponoviti zbog sumnje na kontaminaciju površine ili isteka valjanosti samog testa. Test se provodi u digestoru sa potrebnom zaštitnom opremom pod normalnim osvjetljenjem. Nakon odrađenog testa korišteni materijal je potrebno sigurno i neškodljivo zbrinuti.(28)

Na fotografijama označenim od Slika 29. do Slika 33. koje slijede prikazani su postupci provedbe lateks aglutinacije DrySpot Legionella Latex Test-om:

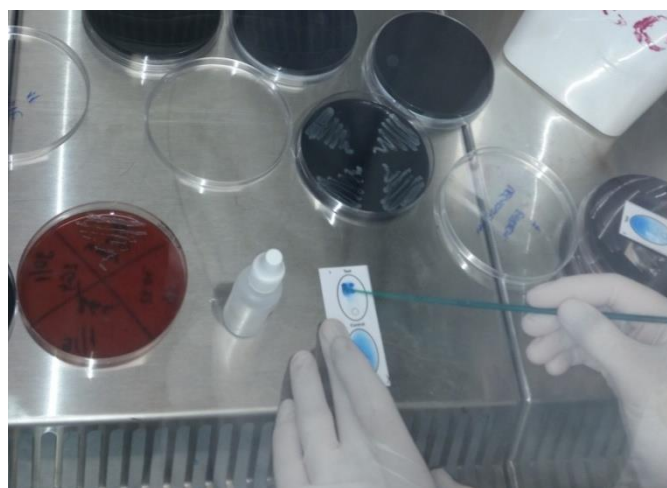


Slika 29. Nanošenje DrySpot pufera na označena mjesta na testu (Fotografirala: Snježana Šimeg, 28.04.2017.)





Slika 30. Razmaz DrySpot pufera ezom na označena mjesta na testu (Fotografirala: Snježana Šimeg, 28.04.2017.)



Slika 31. Razmar uzorka na test (Fotografirala: Snježana Šimeg, 28.04.2017.)



Slika 32. Rotacija DrySpot testa do 60 sekundi (Fotografirala: Snježana Šimeg, 28.04.2017.)



Slika 33. Prikaz pozitivnog DrySpot testa (Fotografirala: Snježana Šimeg, 28.04.2017.)

### 3.4 Statistička analiza

Statistička analiza provodi se grupiranjem podataka i određivanjem njihove vrste, određivanjem njihove važnosti za donošenje zaključaka, definiranjem mjere utjecaja (je li utjecaj značajan ili nije). Prije same obrade podataka postavlja se hipoteza koju želimo dokazati na temelju prikupljenih podataka. Prvi korak obrade je grafički prikaz podataka. Na taj način lako možemo odrediti granice podataka, raspored, te možemo donesti trenutne zaključke. Iako nas ovaj korak možda ne dovodi do ispravnih odgovora na našu hipotezu, može nas usmjeriti na primjenu odgovarajućih metoda obrade podataka. Statističkom analizom podataka provjeravamo točnost postavljene hipoteze, pri čemu određujemo kritično područje i razinu značajnosti. Kritično područje u skupu podataka su oni podaci koji značajno odstupaju od postavljene hipoteze. Razina značajnosti označava rizik za odbacivanjem hipoteze kada je ona trebala biti prihvaćena, označava se u postocima i težimo što manjoj vrijednosti. Odabir najpogodnijeg testa temelji se na određivanju kritičnog područja na zadovoljavajućoj razini značajnosti uz minimalnu vjerojatnost prihvatanja neistinite hipoteze (29).

Podaci dobiveni ispitivanjem mogu biti kvantitativni ili kvalitativni. Svaku grupu podataka možemo podijeliti u nekoliko podskupina. Kvantitativni (numerički) podaci mogu biti diskretni (diskontinuirani) ili kontinuirani. Podaci iz ove skupine mogu se mjeriti intervanim mjernim ljestvicama i omjernim. Oba tipa podataka se mogu koristiti u parametrijskim testovima. Kvalitativni (kategorijski) podaci mogu biti binarni (logički), nominalni i ordinalni (uredbeni). Dobivene numeričke podatke potrebno je organizirati. U slučaju obrade sirovih kvalitativnih podataka raspoređujemo ih u tablicu kontingencije ili sadržajnosti.

Deskriptivni statistički testovi koriste se za opisivanje glavnih svojstava skupine podataka u kvantitativnom smislu, sažimanjem skupa podataka. Podatke se prikazuje opisno ili pomoću tablica i slika odnosno grafova. Svojstva skupine podataka opisuju se mjerama centralne tendencije i mjerama raspršenosti. Mjera centralne tendencije ili središnja mjera je brojčana vrijednost koja reprezentira skupinu rezultata u slučaju kada rezultati imaju tendenciju grupiranja oko neke vrijednosti. U ovu skupinu mjera ubrajamo: srednju vrijednost, centralnu vrijednost, dominantnu vrijednost, geometrijsku i harmonijsku sredinu. Opisani su termini značajniji za analizu podataka u ovom diplomskom radu. Srednja vrijednost ili aritmetička sredina (engl. mean;  $M$ ) je zbroj svih vrijednosti  $n$  u skupu rezultata podijeljen s ukupnim brojem rezultata  $N$ .  $M = \sum x / N$ . Srednja vrijednost je kao težište rezultata osjetljiva na vrijednost i broj rezultata. Zbog toga se srednja vrijednost velikog broja rezultata prije izračuna grupira u manje skupine, a prilikom računanja srednje vrijednosti višekratno ponovljenog mjerenja uvodi se korekcija. Harmonijska sredina ( $H$ ) definira se kao recipročna vrijednost aritmetičke sredine recipročnih vrijednosti numeričke varijable. Koristi se za prikaz prosjeka nekih odnosa. Mjere raspršenosti ili disperzije daju informaciju o rasporedu elemenata numeričkog statističkog skupa. Dijelimo ih na apsolutne i relativne pokazatelje, te će također biti definirani samo pokazatelji značajni za razumijevanje termina u diplomskom radu. Apsolutni pokazatelji su: raspon varijabilnosti, kvartil (interkvartil), varijanca i standardna devijacija. Relativni pokazatelji su: koeficijent kvartilne devijacije i koeficijent varijacije. Raspon varijabilnosti je najjednostavnija, ali najmanje precizna mjera, predstavlja razliku između najveće i najmanje vrijednosti numeričkog niza. Varijanca ili mjera varijabiliteta je prosječno kvadratno odstupanje vrijednosti numeričkog obilježja od aritmetičke sredine. Prikazuje se kao odmak od pripadajuće skale vrijednosti. Standardna devijacija je mjera definirana kao prosječno odstupanje vrijednosti numeričkog obilježja od aritmetičke sredine jer prikazuje kako se gusto rezultati nekog mjerenja grupiraju oko aritmetičke sredine. Standardna devijacija je pozitivan korijen iz varijacije. Koeficijent varijacije je postotak standardne devijacije od aritmetičke sredine. Koristi se kada se želi utvrditi veličina variranja nekog svojstva u više različitih grupa ili u kojem svojstvu grupa više varira. (30, 31)

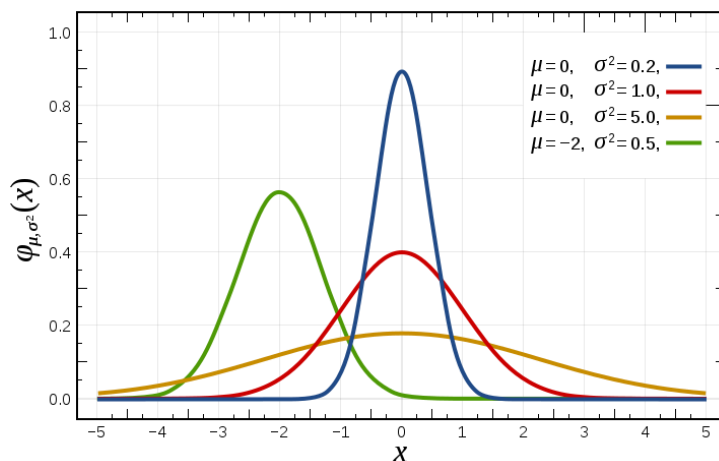
Sirovi ili izvorni podaci dobiveni iz analiza sažimaju se i grupiraju u tablične i slikovne prikaze. Takav način grupiranja omogućuje nam jednostavnije snalaženje prilikom obrade, te izradu grafičkih prikaza. Tablični prikaz podataka mora biti logički dobro organiziran, a snalaženje i čitanje podataka mora biti jednostavno. Tablica je naslovljena kratkim i sadržajnim naslovom. Ima dvodimenzijsku strukturu, broj redaka i stupaca određen je brojem podataka. Ustroj podataka je jasan i svaka grupa podataka je odgovarajuće označena omogućujući pregledan prikaz ogromnih količina podataka. Sadržaj tablice su čisti podaci, izvorna mjerenja ili izvorni podaci. Primjerice tablice sa statističkim podacima minimalno sadrže podatke o vrsti statističkog testa, broj opažanja, odgovarajući statistički pokazatelj i dobivenu vrijednost. Po potrebi se ispod tablice ispisuje kratki opis kratica i simbola. Svrha slikovnog prikaza podataka je jasno tumačenje rezultata kroz prikaz međusobnog odnosa podataka. Prikazuje se kratkim opisom i po potrebi dodatnim informacijama poput legende za grafički prikaz. Slikovni prikaz podataka podrazumijeva: grafičke prikaze, crteže, ilustracije, karte i fotografije. Grafički prikaz rezultata je slikovni prikaz skupova podataka, nizova mjerenja, količine učestalosti, trenda ili međusobnog odnosa podataka. Izvorne vrijednosti mjerenja upisane u tablicama na ovaj se način prikazuju kada je značajnije prikazati skupnu organiziranost podataka od samih vrijednosti pojedinog podatka. U koordinatnom sustavu prikazuje se odnos nezavisnih i zavisnih podataka (varijabli). Iz grafičkih prikaza mogu se očitavati zakonitosti u podacima koji nisu vidljivi iz suhoparnog numeričkog zapisa podataka. Primjerice lakše se uočavaju veća odstupanja od mjerenja odnosno grube pogreške. Prema mjernoj ljestvici razlikujemo: linerne, polilogaritamske i logaritamske prikaze.

Linearne grafove (xy grafove) dijelimo na raspršene i linijske, u upotrebi također može biti i kombinacija tih dviju vrsta. Grafički prikaz niza mjerenja označenih pojedinačnim znakovima nazivamo raspršeni grafikon (engl. scatter plot). Raspršeni grafikon najčešće se koristi za prikaz i usporedbu numeričkih vrijednosti poput znanstvenih, statističkih i tehničkih podataka dok je linijski grafikon kod kojeg se vrijednosti ravnomjerno raspoređuju duž vodoravne osi prikladan za prikaz podataka koji sadrže nenumeričke vrijednosti. Opisani graf se koristi za prikaz neprekinutih podataka tijekom vremena. Oni su idealni za prikazivanje trendova u podacima u jednakim vremenskim razdobljima ili tijekom vremena. Kombinacija ova dva grafa može se koristiti primjerice za prikaz dvije zavisne varijable u odnosu na jednu nezavisanu. Kod grafova čije vrijednosti ne daju linearni prikaz i nije poznata funkcijska ovisnost  $y(x)$  upotrebom metoda linearizacije može ih se prevesti u linearan oblik. Linearizacija je postupak prevođenja kvadratne ovisnosti u linearnu i nelinearnih vrijednosti bez poznate funkcije ovisnosti u linearne vrijednosti logaritmiranjem. Stupčasti grafikoni prikazuju brojnost ili učestalost pojavnosti unutar kategorija nominalnih i ordinalnih podataka. Mogu biti položeni (engl. bar) ili okomiti (engl. column) stupci, a posebna vrsta je histogram frekvencija. Frekvencija " $f_i$ " neke određene vrijednosti  $x_i$  varijable  $X$  prikazuje broj ponavljanja te vrijednosti u promatranom skupu podataka. Relativna frekvencija je omjer vrijednosti frekvencije i ukupnog broja podataka. Histogram frekvencija prikazuje raspodjelu frekvencije diskretne ili kontinuirane varijable. Diskretne varijable označavaju prebrojivi skup vrijednosti. Kontinuirane varijable prikazuju kontinuirani skup vrijednosti. Za njihov se prikaz podatke grupira u razrede i odredi relativna frekvencija. Kružni grafikoni (engl. pie chart) koriste se za prikaz skupnih podataka koji predstavljaju određene dijelove ukupne količine podataka. Odnosno za prikaz relativnih učestalosti, to su udio i postotak. Grafikon okvira s ručicama (engl. stock) koristi se za brojčani prikaz podataka sa prikazom mjera prosjeka i odstupanja.

Model koji prikazuje normalnu distribuciju podataka je Gaussova krivulja, naziva se još i normalna raspodjela, a prikazana je na Slici 34. Graf normalne raspodjele zvonolika je oblika i simetrična. Određena je jednadžbom:

$$y = e^{-x^2}$$

Gaussova funkcije zove se još i funkcija gustoće normalne slučajne varijable. Pripadna se krivulja naziva i krivulja vjerojatnosti zbog njezine primjene u računu vjerojatnosti. Parametri njezine funkcije su aritmetička sredina i standardna devijacija. U standardnoj normalnoj distribuciji aritmetička sredina je  $\mu=0$ , a standardna devijacija  $\sigma=1$  (32).



Slika 34. Normalna raspodjela, crvena krivulja predstavlja standardiziranu normalnu raspodjelu (31)

Trend je linija koja označava tendenciju kretanja pojave u promatranom razdoblju s pretpostavkom da promatrano razdoblje ne sadrži periodične komponente. Trendove koji imaju oblik pravca nazivamo linearni ili linijski. Polazna pretpostavka je da je trend linija koja se prilagođava zadanim frekvencijama vremenskog niza. Izbor oblika trenda ovisi o stupnju reprezentativnosti trenda na temelju najpovoljnijeg odnosa varijanci. Reprezentativnost trenda ispituje se metodom analize varijance. Na temelju ocijenjenog modela mogu se vršiti i predviđanja vrijednosti pojave za neka buduća razdoblja. Koeficijent determinacije pokazatelj je reprezentativnosti trend modela koji se temelji na analizi varijance. Vrijednost koeficijenta determinacije kreće se u intervalu od 0 do 1. Što je koeficijent bliži vrijednosti 1, trend model je reprezentativniji (31). Ostali trendovi imaju oblik krive linije te ih nazivamo krivolinijski. Neke od izvedbi takvih su parabolični (parabola II . stupnja) i eksponencijalni trend.

Analiza varijance (engl. Analysis of Variance; ANOVA) je zbir statističkih modela koji se koriste za analizu i donošenje zaključaka o postojanju razlika između skupine sredstava i njihovih povezanih postupaka. Analiza modela temelji se na određivanju korelacije i pripadnih vrijednosti u numerički kontinuiranom smjeru. Korelacija predstavlja suodnos ili međusobnu povezanost između različitih pojava predstavljenih vrijednostima dviju varijabli (33).

Za razliku od korelacijske analize zadaća regresijske analize je pronaći analitičko matematički oblik veze između jedne ovisne ili regresand i jedne ili više neovisnih ili regresorskih varijabli. Odnose navedenih varijabli opisuje regresijski model. Grafički prikaz dvije varijable (ovisne i neovisne) u korelaciji je jednostavan ili jednodimenzionalni regresijski model. Slučaj kada se uz jednu ovisnu varijablu analiziraju dvije ili više neovisnih varijabli naziva se složeni ili višedimenzionalni model. Regresijska analiza može se postaviti na neki od slijedećih načina:

- potpunim, preciznim i konciznim definiranjem predmeta i ciljeva istraživanja uz postavljanje osnovnih pretpostavki (hipoteze)
- crtanjem dijagrama rasipanja, izborom modela i definiranjem varijabli
- odabirom konkretnog regresijskog modela, njegovih specifikacija i postavljanje pretpostavki
- statističkom analizom modela (ocjena parametara i pokazatelja reprezentativnosti modela)
- testiranjem hipoteza o modelu i statističko teorijskih pretpostavki (31).

Jednostavna linearna regresija u svojim postupcima provodi metodu najmanjih kvadrata i metodu minimiziranja sume kvadrata.

Korelacija podataka ukazuje nam na mogućnost predviđanja vrijednosti jedne varijable na temelju vrijednosti i saznanja o drugoj varijabli. Ovisno o odnosu među njima može dati linearni ili nelinearni prikaz korelacije. Kod linearne korelacije dobivamo prikaz na grafu gdje su točke presjeka vrijednosti varijabli poredane oko određenog pravca, on se naziva linija regresije. Što su točke bliže liniji regresije to je korelacija među njima veća i obrnuto, što su udaljenije korelacija je manja. Korelacija je međuzavisnost ili povezanost slučajnih varijabli (31). Korelacija između dviju varijabli može imati različite odnose. Razlikujemo pozitivnu, negativnu, nemonotonu, cikličku korelaciju i slučaj kada korelacija ne postoji (29). Pozitivna korelacija prikazana je rastom zavisne varijable koji prati rast vrijednosti nezavisne varijable. Negativna korelacija prikazuje pad vrijednosti zavisne varijable dok vrijednosti nezavisne varijable rastu ili obrnuto, vrijednosti zavisne varijable se povećavaju smanjenjem vrijednosti nezavisne varijable. Na temelju podataka iz grafa izračunava se koeficijent korelacije. On izražava mjeru povezanosti između dvije varijable neovisno o jedinicama mjere pojedine varijable. Posebno je značajan kod skupova sa puno podataka kod kojih se ne može točno definirati postoji li značajna povezanost između uspoređivanih varijabli. Za više različitih slučajeva korelacije postoji više koeficijenata korelacije. Najčešće je u upotrebi Pearsonov koeficijent korelacije za linearne modele. Dok se za rad s nelinearnim modelima najčešće koristi Spearmanov

koeficijent korelacije. Pearsonov koeficijent korelacije ( $r$ ) primjenjuje se u linearnim korelacijama sa neprekidnom normalnom distribucijom (31). Određivanje koeficijenta bazira se na usporedbi stvarnog utjecaja među varijablama u odnosu na maksimalan mogući utjecaj tih dviju varijabli. Koeficijent se izražava vrijednostima u rasponu od (+1) do (-1), pri čemu predznak označava smjer korelacije. Nedostatak koeficijenta korelacije je što njime ne možemo odrediti snagu korelacije. T-test najjednostavniji je oblik statističkog testa kojim se provodi analiza dviju varijabli i korelacije međunjima.

ANOVA test nam daje mogućnost određivanja i višestrukih korelacija ( $R$ ). Ovom analitičkom procedurom utvrđujemo na koji način više neovisnih varijabli utječe na jednu ovisnu varijablu. Za izračun višestruke korelacije najprije je potrebno izračunati koeficijente korelacije svakog pojedinog promatranog para varijabli. Koeficijent višestruke korelacije izražava se vrijednostima u rasponu od 0 do (+1). Za njegovu interpretaciju vrijede ista pravila kao i kod interpretacije Pearsonovog koeficijenta korelacije. Pri analizi skupine podataka s više vrijednosti varijabli izračun višestruke korelacije daje preciznija rješenja. Za pravilno donošenje zaključaka potrebno je na ispravan način odabrati statistički značajne varijable za analizu. Donošenje zaključaka na temelju korelacije između dvije varijable nesigurno je zbog ne potvrđene uzročno-posljedične veze, iako su varijable u korelaciji visokog stupnja. Iz tog razloga za ispravnu interpretaciju podataka potrebno je pronaći dodatnu varijablu koja potvrđuje uzročno-posljedičnu vezu. Ili u slučaju da dodatna varijabla ne potvrdi korelaciju, ona se odbacuje kao slučajna. Nakon određivanja razlike varijabli u korelaciji za određivanje njezine značajnosti provode se *post hoc* testovi. Dostupni su brojni testovi različite statističke snage i manje ili veće točnosti. Kao jedan od *post hoc* testova provodi se standardni t-test u svrhu utvrđivanja najmanje značajnih razlika. U tom testu se provodi usporedba svih mogućih parova aritmetičkih sredina grupa.

Odabir testa za analizu može se temeljiti na uparenosti ili neuparenosti uzoraka. T-test za neuparene (nezavisne) uzorke još je jedan od testova koji se primjenjuju za uzorke koji slijede Gaussovu raspodjelu. Može se primijeniti jednosmjerni test (engl. *one-tailed test*) kojim određujemo postoji li povećanje ili smanjenje u vrijednostima parametara. Dok dvosmjerni test (engl. *two-tailed test*) traži bilo kakvu promjenu u vrijednostima parametara. Jednosmjerni test koristi se kada smo sigurni da će do promjene parametara doći samo u jednom smjeru. Za sve ostale slučajeve preporuča se koristiti dvosmjerni test.

Dovoljan broj podataka i njihova homogenost određuju raspodjelu podataka, odnosno određuju da li uzorkovani podaci slijede Gaussovu raspodjelu. Ovisno o vrsti raspodjele odabiremo statistički test. Razlikujemo parametrijske i neparametrijske testove, te istoimene grane statistike koje ih istražuju. Parametrijska statistika podrazumijeva da uzorkovani podaci slijede Gaussovu raspodjelu. Prikladni testovi poput ANOVA testa, t-testa i drugih varijanti koriste se za velike grupe podataka, koji slijede jedan tip normalne raspodjele vjerojatnosti. Neparametrijska statistika s druge strane temelji se na metodama i testovima nezavisnim o raspodjeli podataka i pogodnim i za analizu malih grupa podataka. Za odabir pogodnijeg testa između ova dva potrebno je definirati robusnost i snagu statističkog testa. Robusnost (engl. *robustness*) je osjetljivost metode analize na promjene uvjeta ispitivanja. Robusni test primjenjiv je usprkos nezadovoljavanju svih pretpostavki za njegovo izvođenje. Svaki parametrijski test ima odgovarajuću inačicu neparametrijskog. Neparametrijski testovi su robusniji od parametrijskih inačica, no imaju manju snagu testa. Snaga statističkog testa je vjerojatnost da će test odbaciti nultu hipotezu ako je alternativna hipoteza istinita, što se naziva pogreška tipa II ili lažno negativna odluka. Parametrijski testovi imaju jaču snagu testa, što je povoljno svojstvo posebice pri analizi velikih uzoraka. S povećanjem snage statističkog testa opada vjerojatnost pogreške prihvatanja nulte hipoteze kada je ona u stvari netočna. Kada numerički podaci ne slijede

Gaussovu raspodjelu primjenjuje se postupak transformacije ili normalizacija. Najčešće korištena su tri postupka normalizacije. To su: kvadriranje, logaritmiranje i inverzija podataka.

Dovoljan broj podataka i njihova homogenost također značajno utječu na rezultat statističke analize i zaključke koje donosimo na temelju rezultata. Primjerice kada u grupi podataka imamo vrijednosti koje u velikoj mjeri odskaku od ostalih, oni značajno utječu na izračune koeficijenata i rezultat. Kada se u velikoj grupi podataka nalazi nekoliko vrijednosti koje odskaku od linije regresije, možemo ih sa velikom sigurnošću isključiti iz izračuna, označivši ih kao greške u mjerenju, ali ih ne isključujemo u potpunosti iz analize podataka. No u slučaju male grupe podataka sa više uzoraka koji značajno odstupaju od linije regresije teško je odrediti da li se radi o odstupanjima ili su one dio skupa podataka. Za pronalaženje rješenja u ovakvim slučajevima upotrebljavaju se kvantitativne metode poput standardne devijacije.

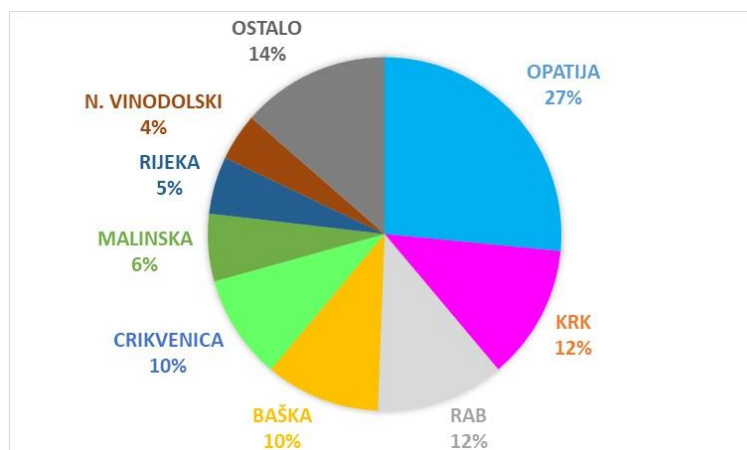
## 4 REZULTATI

Analiza uzoraka bazenske vode na prisutnost *Legionella pneumophila* za uzorke sa područja Primorsko-goranske županije provodi se na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo PGŽ temeljem Pravilnika (NN 107/12, 88/14) standardiziranom metodom HRN ISO 11731:2000.

Od podataka zabilježeni su podaci o lokaciji uzorkovanja te okolišni uvjeti u trenutku uzorkovanja, zatim vrijeme uzorkovanja, vrijeme dostave uzorka, početak, trajanje i završetak analize. Podaci zabilježeni tijekom uzorkovanja značajni za analizu su: vrsta bazena, vrsta analizirane vode (slatka ili morska), temperatura vode, temperatura zraka, vrijednost pH i koncentracija dezinficijensa. Informacije koje se bilježe nazivaju se sirovi ili izvorni podaci, upisuju se u radne knjige laboratorija. Informacije tijekom analize uzoraka upisuju se u radni list nazvan "TIJEK ANALIZE". Primjer jednog takvog radnog lista priložen je kao Prilog 1 ovog rada. Od podataka koje bilježimo razlikujemo kvantitativne i kvalitativne podatke. U grupu kvantitativnih podataka spadaju intervalni podaci – vrijednosti temperatura, te omjerni kontinuirani podaci – koncentracija klora. U grupi kvalitativnih podataka razlikujemo nominalne podatke i binarne (logičke) podatke. Nominalni podaci su kompleksni kategorički podaci koji se razlikuju prema nazivu. U ovom istraživanju nominalni podaci od značaja su lokacija, naziv vrste bazena i vrsta bazenske vode. Binarni podaci su osnovni tip kategoričkih podataka, tu podrazumijevamo prikaz rezultata u formatu – pozitivno/negativno. Izvorni podaci o uzorcima i rezultati dobiveni iz provedenih analiza su objedinjeni u skupine podataka. Interpretacija rezultata provedena je na temelju podataka iz terenskog izvida i izvješća laboratorijskih analiza. Dio grafički prikazanih podataka u ovom poglavlju izveden je iz sirovih podataka. Drugi dio grafičkih prikaza je prikaz rezultata statističkog t-testa iz ANOVA statističkih modela. Podaci su statistički obrađivani u programima "Microsoft Office Excel 2007" i "Statistica 7".

### 4.1 Geografska distribucija uzoraka

Sa područja Primorsko-goranske županije (u daljnjem tekstu: PGŽ) u navedenom razdoblju analizirano je 324 uzoraka. Najveći broj uzoraka u iznosu od 86 (27%) uzorkovan je na područja grada Opatije, zatim slijede silaznim redom grad Krk sa 40 (12%) uzoraka, područje Raba sa 38 (12%), općina Baška sa 34 (10%), područje Crikvenice sa 31 (10%), Malinska sa 20 uzoraka, grad Rijeka sa 17 uzoraka, Novi Vinodolski sa 14 uzoraka, te Dramalj, Klenovica i Selce svaki sa po 7 uzorka, Delnice sa 5 uzorka, 4 iz Lovrana, 3 uzorka sa Velog Lošinja, po 2 uzorka sa otoka Paga, iz Senja i Viškova, 1 iz Gospića, Karlobaga, Otočca, Solina, te 1 uzorak iz privatne kuće.



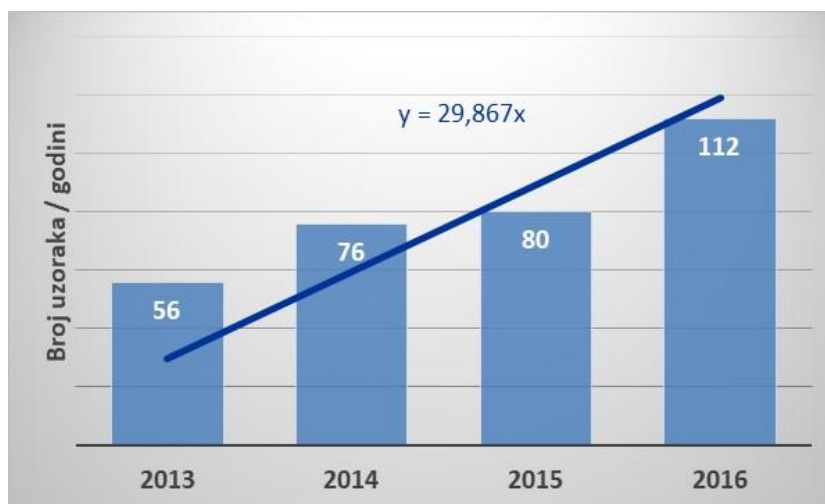
Slika 35. Grafički prikaz podjele ukupnog broja uzoraka s obzirom na mjesto uzorkovanja



Iz podataka prikazanih kružnim grafom vidljivo je da su gradovi i općine sa većim brojem uzoraka, posljedično i većim udjelom, turistička središta u kojima se nalaze javna i/ili polu-javna bazenska kupališta.

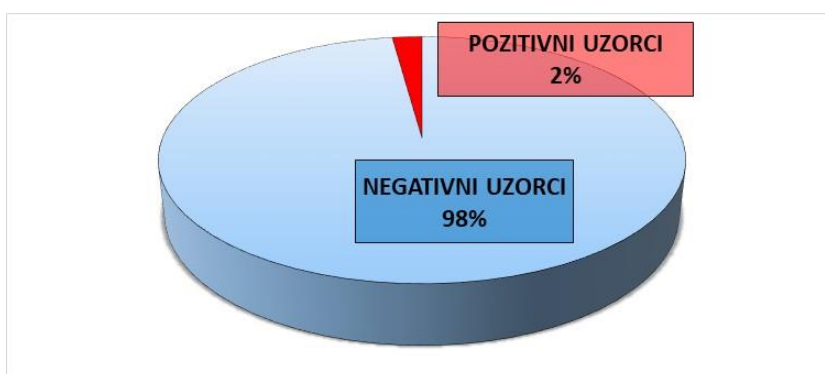
#### 4.2 Broj uzoraka – ukupni/pozitivni

U analiziranom razdoblju zamijećen je pozitivan trend broja uzoraka po godinama, što je vidljivo iz sljedećeg stupčastog grafičkog prikaza (Slika36). Porast broja uzoraka potvrđen je i prikazanim pozitivnim trendom rasta.



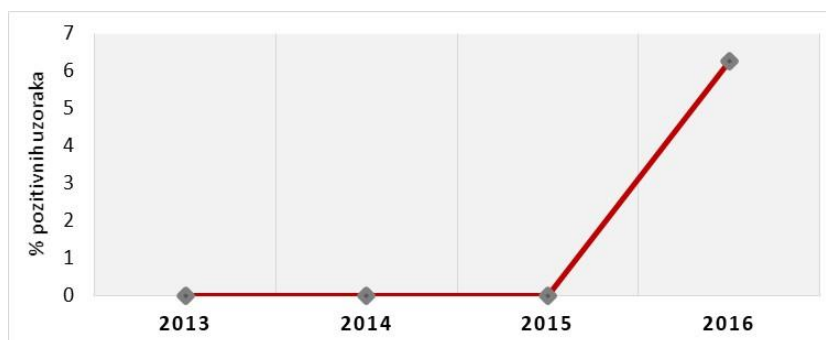
Slika 36. Grafički prikaz ukupnog broja uzoraka bazenske vode po pojedinoj godini tijekom perioda istraživanja 2013.-2016. godine

Udio pozitivnih uzoraka u odnosu na ukupan broj od 324 uzorka bazenske vode prikazan je kružnim grafom na Slici 39.



Slika 39. Grafički prikaz udjela pozitivnih uzoraka u ukupnom broju uzoraka bazenske vode

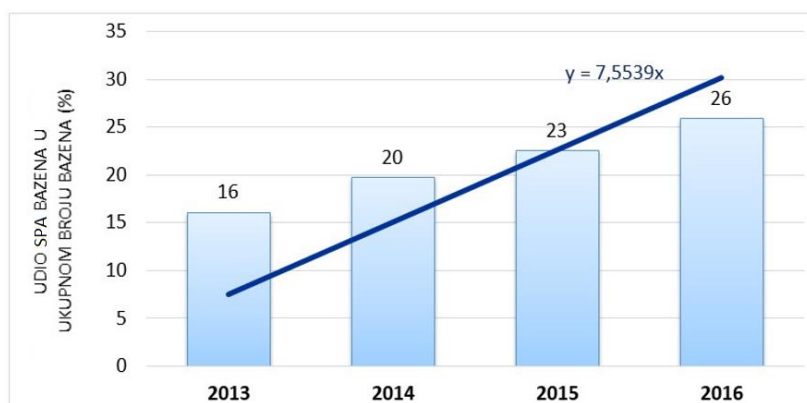
Svi pozitivni uzorci analizirani tijekom perioda od četiri godine (2013. – 2016.) zabilježeni su tijekom 2016. godine, što je zorno prikazano linijskim grafom na Slici 42.



Slika 42. Prikaz pozitivnih uzoraka po analiziranim godinama

### 4.3 Vrste bazena

Iako su svi uzorci naznačeni kao bazenska voda, uz 249 uzoraka iz raznih izvedbi bazena, u analizu je uključeno i 35 uzoraka iz whirlpool bazena, zatim 29 uzoraka iz jacuzzi-a, 5 uzoraka spa zona, 3 uzorka masažnih kada, 2 uzorka vode za punjenje bazena, te 1 uzorak vodenog igrališta. Bazeni sa toplom vodom imaju procijenjen veći rizik rasta i razmnožavanja bakterija *L. pneumophila* od standardnih bazena zbog karakterističnih uvjeta pogodnih za rast bakterija koji se u njima stvaraju. Stoga im je u ovoj analizi posvećena posebna pažnja. Skupine whirlpool bazeni, jacuzzi, masažne kade, spa zona i wellness bazeni srodne su vrste bazena, stoga su za potrebe analize podataka objedinjene pod nazivom spa bazeni za jednostavniji opisni i grafički prikaz podataka.



Slika 37. Udio uzoraka vode spa bazena u ukupnom broju uzoraka po analiziranim godinama

Na prikazanom stupčastom grafu (Slika 37) vidljiv je udio uzoraka iz izdvojene vrste bazena po pojedinim godinama iz perioda istraživanja. Stupčasti graf je prikazan sa linijom regresije koja označava pozitivan trend uzorkovanja takvih bazena. Pozitivan trend uzorkovanja spa bazena prati prethodno prikazan porast trenda uzorkovanja svih vrsta bazena.

Jedna od karakteristika bazena kojoj treba posvetiti pažnju, obzirom na stvaranje različitih uvjeta u bazenu, je vrsta vode za punjenje bazena. Za analizu podataka značajne kategorije bile su slatka i morska bazenske vode. Većina bazena čija je voda analizirana punjeni su slatkim vodom, točnije njih 249, što iznosi približno 78%. 22% uzoraka, odnosno 72 su bila uzorka morske bazenske vode. Za preostale uzorke, manje od 1%, nije bila dostupna informacija o kojoj vrsti bazenske vode je riječ.



Slika 38. Podjela uzoraka na uzorke slatke i morske vode sa prikazom udjela pozitivnih uzoraka

Uz podatak o podjeli ukupnih uzoraka u kategorije slatka i morska voda na grafu (Slika 38) je prikazan i udio pozitivnih uzoraka iz pojedine kategorije. Od ukupnog broja uzoraka u analiziranom periodu zabilježeno je 7 pozitivnih uzoraka. Od 7 pozitivnih uzoraka, samo jedan uzorak je bazenska slatka voda iz bazena, dok su preostalih 6 uzorci iz spa bazena, od kojih je jedan uzorak morske bazenske vode. Od 6 pozitivnih uzoraka iz spa bazena, njih 5 uzorkovano je iz jacuzzi-a, a 1 je uzorak whirlpool bazena. Od ukupnog broja pozitivnih uzoraka, njih 3 uzorkovana su iz istog objekta – Objekt A (jacuzzi), od čega je jedan uzorak ponovljeno uzorkovanje nakon pozitivne analize. Treći pozitivan uzorak iz istog objekta ponovljena je pozitivna detekcija iz istog bazena. U dva jacuzzi-ja Objekta B analiziran je po 1 uzorak sa pozitivnim rezultatom. Iz Objekta C analiziran je 1 pozitivan uzorak iz bazenske vode. U whirlpool bazenu Objekta D analiziran je jedan uzorak morske vode. Prikaz opisanih podataka nalazi se u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz podataka pozitivnih uzoraka analize bazenske vode na prisutnost *L. pneumophila*

	Objekt A			Objekt B		Objekt C	Objekt D
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7
VRSTA BAZENA	Jacuzzi bazen	Jacuzzi bazen	Jacuzzi bazen	Jacuzzi bazen	Jacuzzi bazen	Bazen	Whirlpool bazen
VRSTA VODE	BSV*	BSV*	BSV*	BSV*	BSV*	BSV*	BMV**
MJESEC UZORKOVANJA (GODIŠNJE DOBA)	Ožujak (proljeće)	Ožujak (proljeće)	Kolovoz (ljetno)	Ožujak (proljeće)	Ožujak (proljeće)	Ožujak (proljeće)	Rujan (ljetno)
VRIJEME UZORKOVANJA	10:40	/***	11:40	10:45	10:48	10:50	08:50
TEMP. VODE (°C)	31	42	35	30	30	29	34,7
TEMP. ZRAKA (°C)	27	28	/***	26	27	26	/***
KONC. KLORA (mg l <sup>-1</sup> )	0,16	0,05	0,07	0,74	0,3	0,5	0,9
REZULTAT UBB	100	2	640	100	10	0	5
REZULTAT <i>L. pneumophila</i> (cfu/1000 ml)	304	100	4000	10	150	10	600
SEROGRUPA	1	1	1	1	1	2-14	1

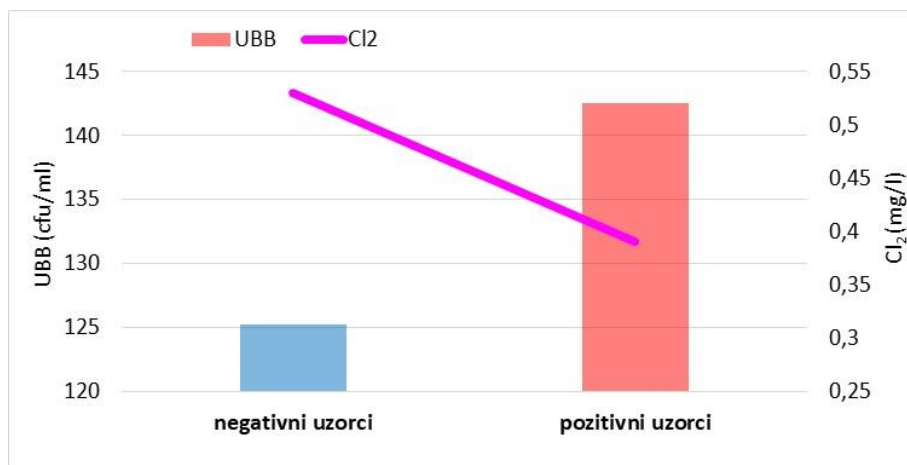
\*BSV = bazenska slatka voda

\*\*BMV = bazenska morska voda

\*\*\* oznaka "/" označava da nedostaje podatak

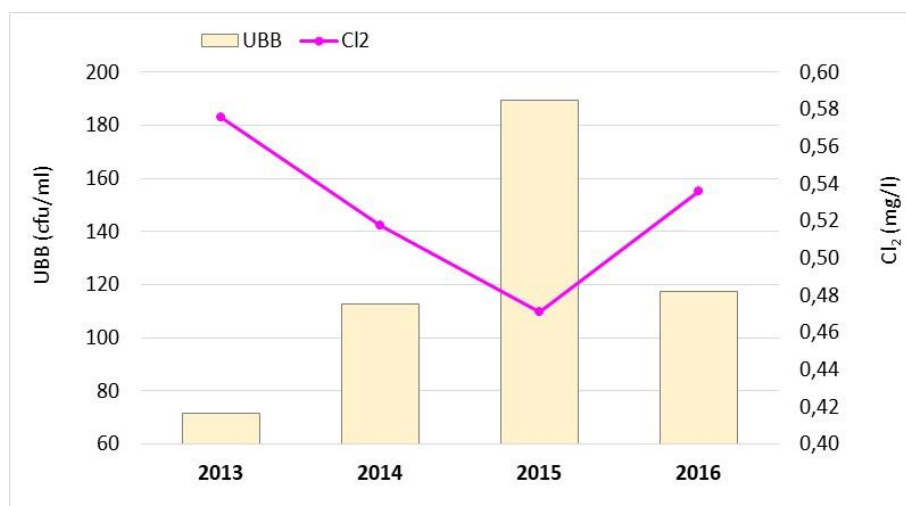
#### 4.4 Odnos pojavnosti *L. pneumophila* i ostalih ispitanih pokazatelja

Praćenjem odnosa dva parametara, koncentracija slobodnog klora i ukupnog broja bakterija, u odnosu na pozitivne i negativne uzorke sa priloženog grafa na Slici 40 uočava se obrnuto proporcionalan odnos, što odgovara očekivanom ponašanju. Kod manje koncentracije slobodnog klora (dezinficijensa) u bazenskoj vodi nastaju pogodniji uvjeti za rast bakterija. To se očitava povećanim rastom UBB. Pri zadovoljavanju specifičnih uvjeta za rast legionela, detektira se i njihova prisutnost upotrebom odgovarajućih testova.



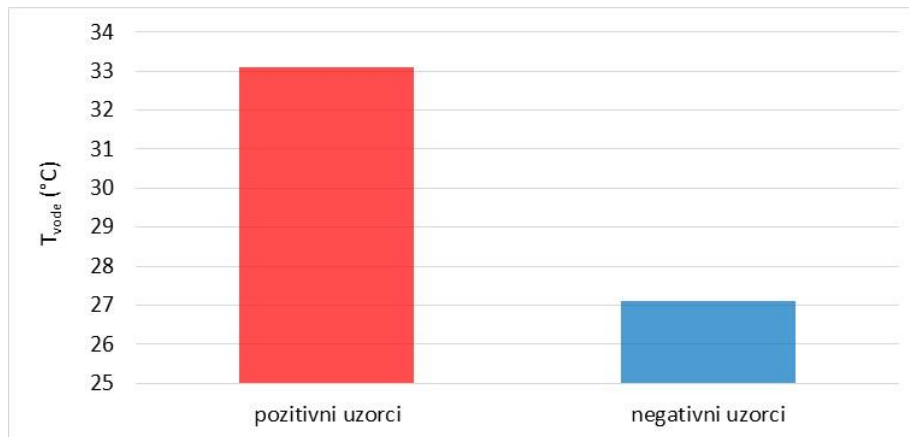
Slika 40. Grafički prikaz negativnog trenda koncentracija rezidualnog slobodnog klora (RSK) u odnosu na porast ukupnog broja bakterija (UBB) kod pozitivnih uzoraka

Na Slici 41 prikazana je korelacija srednjih godišnjih vrijednosti parametara koncentracije slobodnog klora i ukupnog broja bakterija. Na grafičkom prikazu može se uočiti negativna korelacija tih dvaju parametara. Korelacijskom analizom utvrđena je statistički značajna negativna korelacija ( $r = -0,18$ ,  $p < 0,005$ )

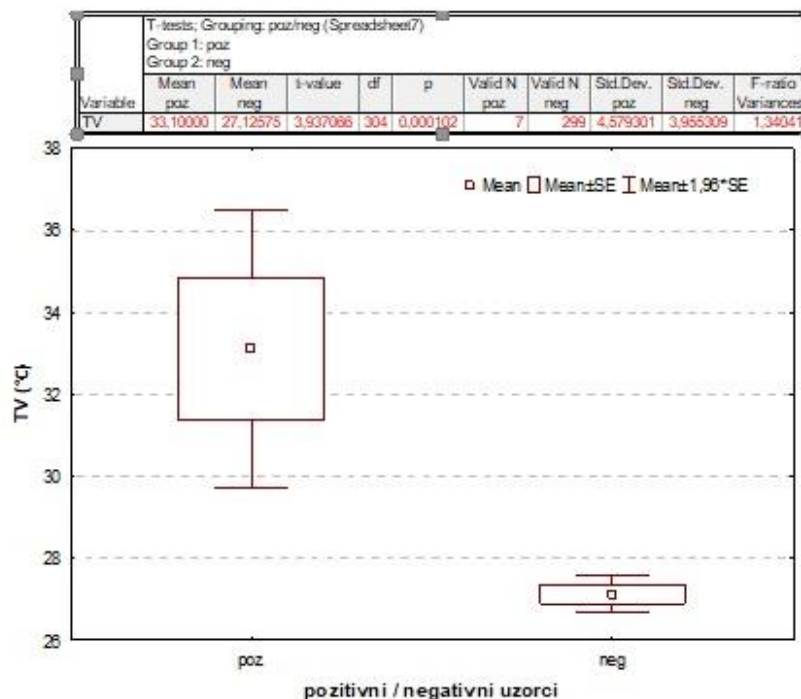


Slika 41. Grafički prikaz odnosa srednjih vrijednosti koncentracija rezidualnog klora (RSK) na ukupni broj bakterija (UBB) za pojedinu godinu iz analiziranog perioda

Rezultati statističke obrade u programu "Statistica" prikazani su u nastavku. Analiza varijance provedena je ANOVA t-testom. Iako logična i prikazana u prethodnim grafovima korelacija parametara RSK ( $p = 0,3562$ ) i parametra UBB ( $p = 0,918$ ) sa pojavnosti *L. pneumophila* u uzorcima analizom varijance nije se pokazala statistički značajnom. Parametar temperatura zraka ( $p = 0,898$ ) također ne pokazuje statistički značajnu razliku između uzoraka provedbom analize varijance. Provedbom parametrijskog t-testa izlučena je statistički značajna razlika u temperaturi vode ( $p < 0,001$ ) između pozitivnih i negativnih uzoraka prikazana na Slici 44. Raspon vrijednosti temperature vode svih analiziranih uzoraka u rasponu je od 17 – 42 °C, medijan raspona je 29,5 °C, srednja vrijednost iznosi 26 °C. Srednja vrijednost temperature vode prikazana je na Slici 43, a za pozitivne uzorke srednja vrijednost iznosi 33,1 °C.

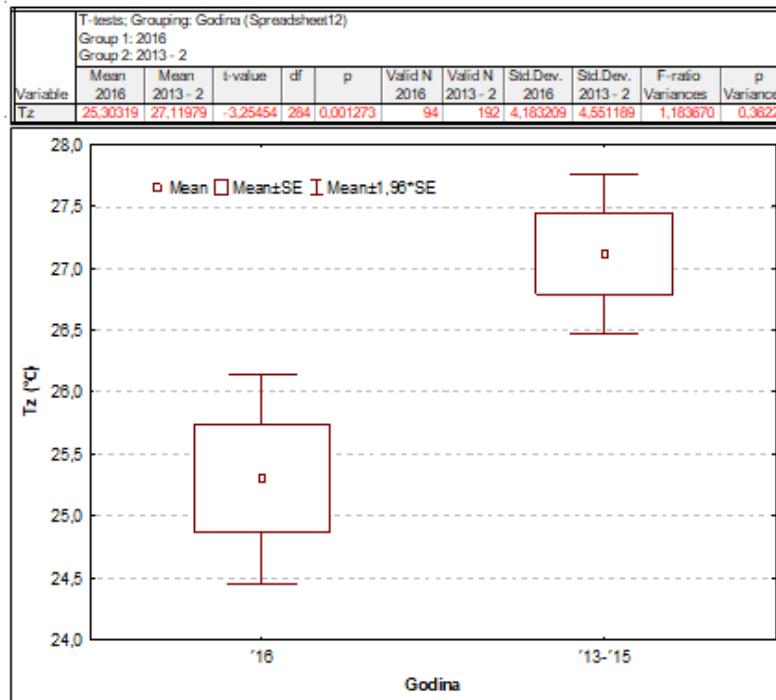


Slika 43. Grafički prikaz srednje vrijednosti temperature vode pozitivnih i negativnih uzoraka



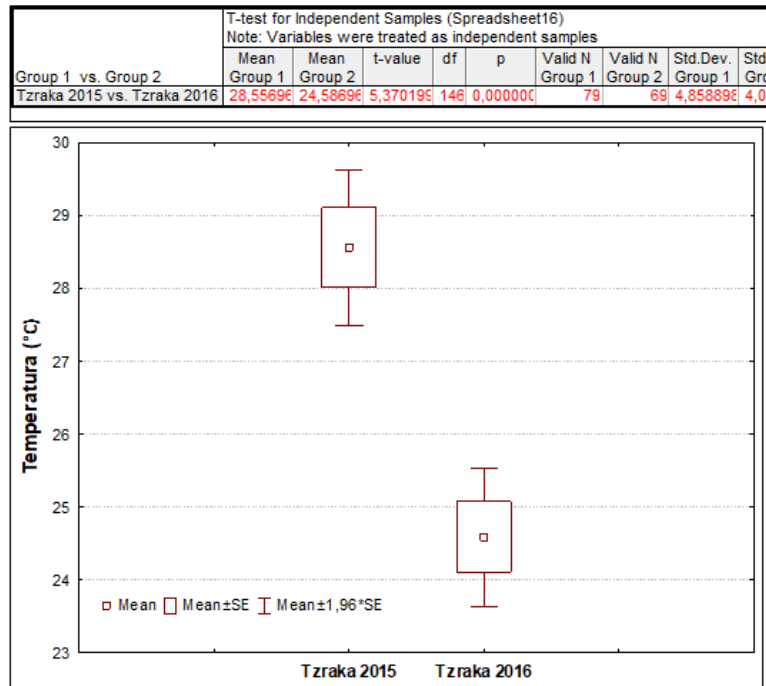
Slika 44. Prikaz rezultata ANOVA t-testa za varijablu temperatura vode

Obzirom da su pozitivni uzorci u promatranom razdoblju detektirani samo u 2016. godini, t-testom se analizirala varijanca odnosa srednjih vrijednosti varijabli između 2016. godine kao jedne grupe, u odnosu na razdoblje 2013. do 2015., kao druge grupe, u kojoj nije uočen niti jedan pozitivan uzorak. Statistički značajnim se pokazao parametar temperature zraka ( $p = 0,001$ ), rezultat analize prikazan je na Slici 45. Raspon vrijednosti temperature zraka svih analiziranih uzoraka u rasponu je od 14 – 39 °C, medijan raspona je 26,5 °C, srednja vrijednost iznosi 23 °C. Podaci za 2016. godinu: srednja vrijednost iznosi 25,3 °C; standardna devijacija 4,2; minimum 15,0 °C; maksimum 33,0°C. Podaci za period 2013.-2015. godine: srednja vrijednost iznosi 27,1 °C; standardna devijacija 4,6; minimum 14,0 °C; maksimum 39,0 °C.



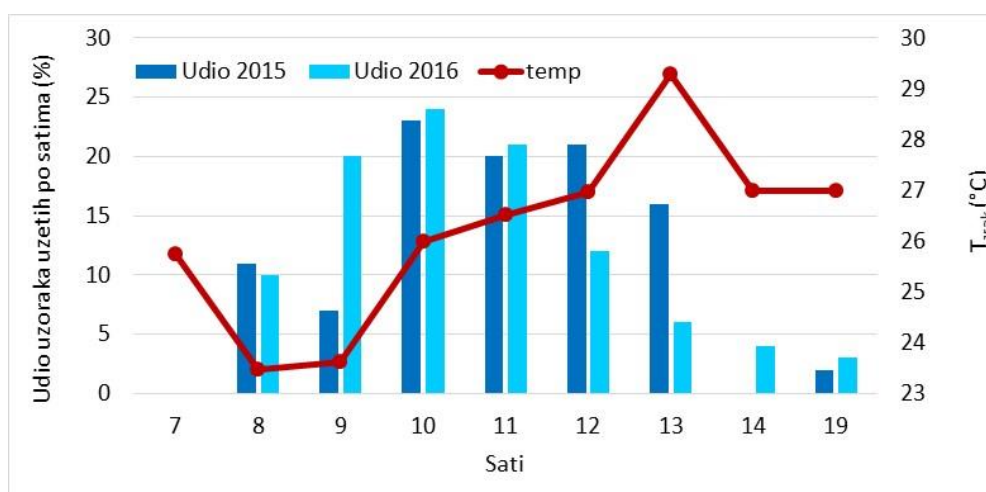
Slika 45. Prikaz rezultata ANOVA t-testa za varijablu temperatura zraka

Analizom varijance t-testom između 2016. godine pojedinačno sa ostalim godinama iz perioda istraživanja zabilježena je statistički značajna razlika u temperaturi zraka ( $p < 0,001$ ) između uzoraka iz 2015. godine i uzoraka iz 2016. Godine, prikazana na Slici 46. Srednja vrijednost temperature zraka za 2015. godinu iznosi 28,56 °C sa standardnom devijacijom od 4,86. Srednja vrijednost istog parametra za 2016. godinu iznosi 24,59 °C sa standardnom devijacijom od 4,02.



Slika 46. Prikaz rezultata ANOVA t-testa za varijablu temperatura zraka

Detaljnijom analizom uzoraka zamijećeno je da do značajne razlike u temperaturi zraka dolazi zbog razlike u vremenu uzorkovanja. Primjerice, u 2015. godini je većina uzorkovanja, dakle mjerenja temperature izvršena u periodima dana s većom temperaturom zraka u odnosu na vremena uzorkovanja u 2016. godini. U razdoblju s mjerenom najnižom temperaturom zraka (8 – 9 h). u 2016. godini uzorkovan je znatno veći udio uzoraka, u odnosu na udio tijekom 2015. godine. Približno sličan udio uzoraka uzorkovan je u satima kada se srednja vrijednost izmjerene temperature zraka kreće od 26 – 27 °C. U 13 sati, kada je zabilježena najveća srednja temperatura zraka, u 2015. godini uzorkovan je dva puta veći udio uzorak, u odnosu na udio uzoraka uzorkovan u promatranom periodu dana 2016. godine. Opisano je prikazano na slici 47 gdje je kombinacijom stupčastog i linijskog grafa prikazan udio uzoraka iz uspoređivanih godina po satima kada je izvršeno uzorkovanje. Crvena linija prikazuje srednju vrijednost temperature zraka po satima.



Slika 47. Grafički prikaz promjene temperature zraka po satima s obzirom na udio uzetih uzoraka u tom vremenu

*Post hoc* Tukey HSD testom provedenim na vrijednostima iz pojedinih godina proučavanog razdoblja, potvrđena je statistički značajna razlika u temperaturi zraka ( $p < 0,001$ ) između uzoraka iz 2015. godine i uzoraka iz 2016. godine.



## 5 RASPRAVA

Bakterije iz roda *Legionella* su ubikvitarni mikroorganizmi, prirodno prisutni u vodi. Iz okolišnih uzoraka se uglavnom detektiraju u malim koncentracijama, kao posljedica njenih specifičnih nutritivnih zahtjeva. Za rast zahtijevaju aminokiselinu cistein i soli željeza. Iako nutritivno zahtjevna vrsta, vrlo je otporna na vanjske uvjete, te u vodovodnom sustavu mogu preživjeti više od godine dana. U odnosu na većinu bakterija iz vode otpornije su na niže vrijednosti pH i kratkotrajno izlaganje visokim temperaturama (40 – 60 °C). Navedene karakteristike legionela iskorištene su prilikom dokazivanja prisutnosti legionela u uzorcima vode. Tijekom provedbe metode HRN ISO 11731:2000 uzorak se izlaže temperaturi od 55 °C, što onemogućuje rast ne-ciljanih mikroorganizama koji ne podnose visoke temperature, a svojim bi rastom mogli ometati detekciju legionela. U bazensku vodu legionele dospijevaju iz vodovodnog sustava, u kojem se one u pogodnim uvjetima razmnožavaju i predstavljaju opasnost od legioneloza. U slučaju pozitivnih rezultata, za pravilnu interpretaciju nalaza i poduzimanje daljnjih mjera važno je da je rezultat izražen kvantitativno. Bazenska voda s prekomjernom koncentracijom bakterija *Legionella spp.* predstavlja mogući izvor infekcije. Legionele inficiraju dišni sustav uzrokujući pneumoniju ili blaže oblike respiratornih oboljenja, ovisno o vrsti bakterije iz roda *Legionella* koja je uzrokovala bolest. Nije zabilježen put širenja infekcije ingestijom legionela. Dakle, osim povišenog broja legionela u bazenskoj vodi do infekcije će doći u uvjetima stvaranja aerosola koji sadrži bakterije. Vrste bazena u kojima postoje uvjeti stvaranja aerosola su spa bazeni, uključujući wellness, whirlpool bazene i vruće kupelji. Stoga navedene vrste bazena pripadaju rizičnijoj vrsti bazena te im je oko održavanja i provođenja sanitarno-higijenskih postupaka potrebno posvetiti više pažnje. Prema izvještaju WHO iz 2006. godine, do tada nije bio zabilježen niti jedan slučaj izbijanja infekcije ili epidemije legioneloze povezan s kupanjem u bazenu (34). Većina slučajeva epidemija legionarske bolesti u svijetu izbile su udisanjem inficiranog aerosola koji se širi okolnim zrakom iz rashladnog tornja. Od 2002. godine uspostavom Europskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (ECDC), internacionalni nadzor i prijavljivanje slučajeva obolijevanja u Europskoj uniji odvija se putem mreže ELDSNet. Prema podacima iz izvješća ECDC-a "Legionnaires' disease in Europe" iz 2014. godine, većina infekcija je nastala iz izvora povezanih sa zajednicom, putovanjem i zdravstvenim ustanovama. U 2014. godini u zemljama Europske Unije od 5984 prijavljena slučaja, 74 % (4406) infekcija stečeno je u zajednici, 18 % oboljenja povezano je s putovanjem, 7 % sa boravkom u zdravstvenim ustanovama, dok za preostalih 2 % nije definiran izvor infekcije (35). Prema izvoru zaraze, od ukupnog broja slučajeva za 58 % izvor zaraze su bili rashladni uređaji, 40 % je stečeno infekcijom iz vodovodnih sustava, 1 % oboljenja uzrokovano je infekcijom iz bazenske vode, a preostalih 1 % obuhvaća sve druge izvore (35). Iz ljetopisa Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZZJZ) podaci su o izbijanju epidemija legioneloza za istraživano razdoblje 2013. – 2016. godine na području Republike Hrvatske slijedeći: u 2013. godini zabilježena je jedna epidemija sa dvoje oboljelih; od tada, do 2016. g. nije bilo zabilježenih epidemija, kada je zabilježena jedna epidemija sa sedam oboljelih.

Analizirani uzorci bazenske vode obuhvaćeni ovim istraživanjem uzorkovani su iz javnih bazena, izuzev jednog uzorka koji je uzet u privatnom bazenu. Za provedbu statističke analize definirana je vrsta bazena. Uzorkovani su regularni bazeni, jacuzzi, spa, whirlpool bazeni, te masažne kade, vodeno igralište, i manji broj uzoraka vode za punjenje bazena. Jacuzzi, spa i whirlpool bazeni, te masažne kade su kao što je već tijekom rada definirano, zbog srodnosti uvjeta svrstani u skupinu spa bazena. U ukupnom broju analiziranih uzoraka uočen je pozitivan trend rasta spa bazena, koji također prati pozitivan trend ukupnog broja ispitanih bazena. Od pozitivnih uzoraka, samo je jedan uzorkovan iz regularnog tipa bazena, dok su svi preostali (njih šest) iz srodnih varijacija spa bazena. Dobiveni rezultati potvrđuju činjenicu da spa bazeni, te općenito bazeni s povišenom temperaturom vode, zbog

povoljnih uvjeta pogodnih za rast bakterija, predstavljaju skupinu bazena s povećanim rizikom za rast i razmnožavanje *L. pneumophila*. Povećani rizik spa bazena naznačen je u mnogobrojnim vodičima i literaturi, primjerice u preporukama "Preventivne mjere za smanjenje rizika od legionarske bolesti u hotelu/kampu/marini", HZZJZ 2017.

Pri detekciji ukupnog broja bakterija zabilježen je širok morfološki spektar poraslih kolonija. Iz velikog broja različitih poraslih kolonija izdvojene su samo suspektne kolonije, koje su morfološki odgovarale opisu legionela. Legionele rastu na hranjivoj podlozi kao pravilne, sjajne, okrugle, konveksne, sivo-bijele, kremaste, ljubičaste, plave, a ponekad i zelenkaste (limetaste) kolonije sa mliječnim prozirnim sjajem. U pozitivnim uzorcima zabilježeni su opisi porasta sitnih, sitnih sjajnih, boje limete, sitnih plavkastih, te bijelih sjajnih kolonija. Kolonije izložene ultraljubičastom zračenju fluoresciraju žuto-zeleno.

Utvrđena je značajna razlika u temperaturi vode u uzorcima pozitivnim na legionelu u odnosu na uzorke u kojima legionele nisu detektirane (t-test,  $p < 0,001$ ). Također, značajna razlika u temperaturi zraka uočena je između 2016. godine, u kojoj su zabilježene svi pozitivni uzorci, i ostalih istraživanih godina, u kojima pozitivni uzorci nisu detektirani. Naime, u 2016. godini temperatura zraka u bazenskom prostoru bila je značajno niža (t-test,  $p < 0,001$ ), međutim daljnjom analizom podataka zaključeno je da je navedena razlika posljedica promjene u vremenu uzorkovanja, te da nema značajan utjecaj na sam rezultat ispitivanja. Iako očekivana, statistički značajna razlika između ostalih ispitivanih fizikalno-kemijskih i mikrobioloških parametara sa brojem detektiranih bakterija *L. pneumophila* po godinama ispitivanja nije utvrđena.

Provedbom parametrijskog t-testa izlučena je statistički značajna razlika u temperaturi vode ( $p < 0,001$ ) između pozitivnih i negativnih uzoraka. Raspon vrijednosti temperature vode svih analiziranih uzoraka u rasponu je od  $17^{\circ}\text{C}$  –  $42^{\circ}\text{C}$ , medijan raspona je  $29,5^{\circ}\text{C}$ , srednja vrijednost iznosi  $26^{\circ}\text{C}$ . Srednja vrijednost temperature vode za pozitivne uzorke iznosi  $33,1^{\circ}\text{C}$ . Rezultat je očekivan, obzirom da povišena temperatura pogoduje rastu i razmnožavanju većine bakterijskih vrsta, pa tako i *L. pneumophila*. Temperatura vode jedan je od značajnijih parametara na koji se u Vodičima za detekciju i prevenciju prisutnosti legionela u bazenskoj vodi preporučuje obratiti posebnu pozornost.

Grafičkim prikazom jasno se vidi da u uvjetima niže koncentracije rezidualnog klorau vodi poraste veći broj UBB. Kod uzoraka pozitivnih na legionelu mjerene su niže koncentracije rezidualnog klora uz porast većeg broja UBB.

Pri zadovoljavanju specifičnih uvjeta za rast legionela, detektira se i njihova prisutnost upotrebom odgovarajućih testova. Uvidom u sirove podatke pozitivnih uzoraka bazenske vode zapaža se slijedeće: pri približno najnižoj vrijednosti koncentracije klora ( $0,07\text{ mg/l}$ ) očitava se najviši broj bakterija *L. pneumophila* koji iznosi  $4000\text{ cfu/ml}$ . U istom je uzorku očitana i najveći UBB ( $640\text{ cfu/ml}$ ). Kod uzorka sa najvećom vrijednosti koncentracije klora ( $0,90\text{ mg/l}$ ) od pozitivnih uzorak očitana je broj bakterija *L. pneumophila* u iznosu od  $600\text{ cfu/ml}$ . No najmanji broj bakterija *L. pneumophila* u iznosu od  $10\text{ cfu/ml}$  zabilježen je u dva pozitivna uzorka, pri čemu je vrijednost koncentracije klora u jednome iznosila  $0,74\text{ mg/l}$ , a u drugome puno niža koncentracija od  $0,05\text{ mg/l}$ . Vrijednost UBB je u pojedinim uzorcima u kojima legionela nije potvrđena prelazila i više od  $2000\text{ cfu/ml}$ . Iako je utvrđena negativna korelacija između koncentracije klora i UBB, između godina nije uočena statički značajna razlika. Do sličnih rezultata došla je i skupina autora znanstvenog članka Rakić i sur. (2013), u kojem je analizirana prisutnost bakterija *L. pneumophila* u toploj vodovodnoj vodi (36). Rezultati istraživanja pokazuju da se prisutnost *L. pneumophila* dokazuje u kloriranoj kao i

u nekloriranoj vodi. Prema navedenom, ostaje upitan učinak klorana na usporavanje rasta i razmnožavanje *L. pneumophila*. (37). U preglednom članku Rakić i sur (2016) opisan je utjecaj formiranja biofilma u vodopskrbnom sustavu koji imaju afinitet prema mjestima sa sporim otjecanjem vode. Kod turbulentnog protoka ti se biofilmovi otkidaju, uzrokujući rekontaminaciju vode. U ovim slučajevima, usprkos višoj razini klora, voda može biti mikrobiološki onečišćena. U pojedinim uzorcima pozitivnim na legionelu mjerene koncentracije klora bile su ispod minimalne razine propisane Pravilnikom koji definira kriterije za bazenske vode (NN 107/12, 88/14) od 0,12 mg/l. U prijedlogu preventivnih programa Bilajac (2005), prikazano je da je mikrobiološki neispravnim uzorcima koncentracija rezidualnog klora bila manja od propisane (38).

Udio pozitivnih uzoraka iz morske bazenske vode (1,4 %) manji je od udjela pozitivnih uzoraka iz slatke bazenske vode (2,4 %). Međutim, obzirom da je riječ o samo 7 pozitivnih uzoraka na legionelu tijekom cijelog promatranog razdoblja, utjecaj vrste vode za punjenje potrebno je još istražiti.

Sezonska distribucija podataka pokazuje da su se svi legionela pozitivni uzorci javili u proljeće i ljeto. Navedena godišnja doba se smatraju rizičnim periodima za infekcije legionelama zbog slijedećih razloga: povišene temperature koje pogoduju njihovom rastu i razvoju; veće posjećenosti bazenskih kupališta (veće frekvencije kupača); otvaranje sezonskih objekata u proljeće, nakon perioda stagnacije što predstavlja povećan rizik za razvoj epidemije.

Svi uzorci u kojima je dokazana legionela tijekom razdoblja od četiri godine (2013. – 2016.) zabilježeni su u samo jednoj kalendarskoj godini, 2016. Uzevši u obzir taj podatak analizom varijance uspoređivane su vrijednosti ispitivanih parametara između 2016. godine kao jedne grupe s razdobljem od 2013.-2015. kao druge grupe podataka. Statistički značajna razlika utvrđena je samo kod jednog pokazatelja, temperature zraka ( $p = 0,001$ ). Analizom varijance t-testom između 2016. godine sa svakom pojedinom godinom iz perioda istraživanja statistički značajna razlika zabilježena je u temperaturi zraka ( $p < 0,001$ ) između uzoraka iz 2015. i 2016. godine. Detaljnijom analizom terenskih podataka zamijećeno je da do značajne razlike u temperaturi zraka u bazenskom prostoru dolazi ovisno o satu u kojem je uzorkovanje provedeno. Za razliku od 2016. godine, u 2015. godini većina uzorkovanja uz mjerenje temperature izvršena je u periodu dana kada su temperature zraka bile više. U 2016. godini u periodu dana u kojem je zabilježena najniža temperaturom zraka (srednja vrijednost 23 °C; 8 – 9 h) uzet je znatno veći udio uzoraka u odnosu na 2015.godinu. U satima kada se srednja vrijednost izmjerene temperature zraka kreće od 26 – 27 °C približno sličan udio uzoraka uzorkovan je u obje godine. U 13 sati, kada je zabilježena najviša srednja temperatura zraka (27 °C) u 2015. godini uzorkovan je dvostruko veći broj uzoraka, u odnosu na 2016. godinu. Međutim, unatoč tome što se 2016. godina jedino po temperaturi zraka razlikuje od ostalih promatranih godina, a to je ujedno i jedina godina koja bilježi pozitivne uzorke na legionelu, smatramo da navedeno nema utjecaj na pojavnost legionela u bazenima.

Zdravstvena ispravnost bazenske vode trenutno je u Republici Hrvatskoj definirana Pravilnikom o sanitarno-tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 107/12, 88/14). Navedeni Pravilnik propisuje opseg i učestalost ispitivanja uzoraka bazenske vode. Učestalost ispitivanja je jedanput mjesečno, kao i u sezonski otvorenim kupalištima, koja se međutim ispituju samo u sezoni kupanja. Voda se na biološki pokazatelj od interesa za ovaj diplomski rad, *Legionella pneumophila*, ispituje jednom godišnje, a za sezonska kupališta provjerava se prije početka sezone kupanja. Propisana granična vrijednost iznosi  $< 1$  cfu/ml sa napomenom "U bazenima s miješanjem vode i/ili kod kojih se može stvarati aerosol, ako je temperature vode u bazenu  $\geq 23$  °C."(9). Hrvatskom zakonskom regulativom (Pravilnikom NN

107/12, 88/14) za bazenske vode preporučena je upotreba metode membranske filtracije, no dozvoljeno je korištenje i drugih akreditiranih metoda koje su validirane internom validacijom i međulaboratorijskim provjerama.

Detaljnijom analizom dobivenih rezultata za pretpostaviti je da se značajna razlika u pojavnosti legionela u bazenskoj vodi Primorsko-goranske županije između 2016. godine i prethodnog perioda obuhvaćenog ovim istraživanjem (2013. – 2015.) javila uslijed promjene mikrobiološke metode ispitivanja. U periodu od 2013. – 2015. godine, analiza bazenske vode na *L. pneumophila* provodila se preporučenom standardnom metodom HRN ISO 11731:2008 Detekcija i brojenje Legionella – Izravna metoda membranske filtracije za vode s malim brojem bakterija, obzirom da je riječ o kloriranoj vodi kod koje se ne očekuje mikrobiološko opterećenje. Međutim, primjenom metode HRN ISO 11731-2:2008, u rutinskom radu su uočeni nedostaci ove metode, odnosno njena niža osjetljivost. Da je riječ o manjkavoj metodi potvrđeno je iz rezultata PT testa (eng. Proficiency Testing). Naime, referentni materijal je istovremeno ispitan s obje HRN ISO 11731 metode, pri čemu u uzorku ispitanom metodom HRN ISO 11731:2008 legionele nisu potvrđene, dok je primjenom metode HRN ISO 11731:2000 Kvaliteta vode – brojenje Legionela rezultata bio pozitivan, što je u Izvještaju „PT provider-a“ potvrđeno kao dobar rezultata, u skladu s rezultatima ostalih laboratorija koji su sudjelovali u međulaboratorijskom uspoređivanju. U tekućoj (2017.) godini donesena je izmjena metode HRN ISO 11731:2017. Akreditirani laboratoriji u definiranom vremenskom roku imaju obavezu primijeniti novu verziju norme HRN ISO 11731.

Prema navedenom, odabir adekvatne metode ispitivanja ima veliku ulogu u smanjenju rizika od pojave legioneloza, međutim za zaštitu zdravlja korisnika bazena potrebno je i pravilno održavanje sanitarno-higijenskih uvjeta u bazenu i bazenskom okolišu, uvažavanje kućnog reda na bazenskim kupalištima od strane korisnika kao i pravilna izvedba vodovodnog sustava koja onemogućuje prodor mikrobiološkog onečišćenja, uključujući i vrste *L. pneumophila* u vodu u sustavu.

## 6 ZAKLJUČCI

- Broj uzoraka bazenske vode u kojima je dokazano prisustvo *L. pneumophila* generalno je mali, međutim s trendom porasta, u skladu s porastom udjela spa bazena u ukupnom broju ispitanih bazena
- Broj ukupno ispitanih bazena također je u porastu
- Zamijećen je veći udio pozitivnih uzoraka u bazenima punjenim slatkom vodom, u odnosu na bazene punjene morskom vodom
- U pozitivnim je uzorcima u odnosu na negativne zabilježena statistički značajno viša temperatura
- U pozitivnim je uzorcima u odnosu na negativne zabilježena niža koncentracija rezidualnog klora i viši UBB, međutim razlika nije bila statistički značajna
- Značajna razlika po godinama u temperaturi zraka u bazenskom okolišu utvrđena je 2016., koju karakterizira značajno niža temperatura zraka u odnosu na ostale ispitivane godine; analizom podataka je utvrđeno da je navedeno posljedica promjene u vremenu provedbe uzorkovanja, bez utjecaja na pojavnost legionela
- Uz provođenje analiza uzoraka, potrebno je provjeravati osjetljivost korištene metode, te po potrebi primijeniti drugu metodu analiziranja.
- Sezonska distribucija legionela pozitivnih rezultata ukazuje na njihovu pojavnost u proljeće i ljeto
- Odabir adekvatne metode od presudnog je značaja za točan rezultat analitičkog postupka, pri čemu treba naglasiti potrebu za stalnim preispitivanjem i unaprjeđenjem analitičkih metoda

## 7 LITERATURA

1. S. Kalenić i sur. Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada Zagreb. 2013.
2. J. Frece i K. Markov. Uvod i mikrobiologiju i fizikalno-kemijsku analizu voda. C.VISTA d.o.o. Celje Slovenija. 2015.
3. World Health Organization. Legionella and the prevention of legionellosis. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Indija. 2007.
4. Mikrut A. Začaj nadzora nad legionelama u turizmu. Hrvatski časopis za javno zdravstvo. Vol. 3. br 10. 7. travanj 2007.
5. U. S. Department of Health and Human Service. Procedures for the Recovery of *Legionella* from the Environment. CDC. Atlanta. 2005.
6. Mlinarić Galinović G., Ramljak Šešo M. i sur. Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija. MERKUR A.B.D. Zagreb. 2003.
7. Zakon o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti (NN 43/09)
8. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-outbreak-investigation-toolbox> Pristupljeno: 17.08.2017.
9. Pravilnik o sanitarno-tehničkim i higijenskim uvjetima bazenskih kupališta te o zdravstvenoj ispravnosti bazenskih voda (NN 107/12, 88/14)
10. Bazen. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Bazen> Zadnje ažuriranje: 17.06.2015. Pristupljeno: 16.08.2017.
11. European Working Group for Legionella Infections. "EWGLI Technical Guidelines for the Investigation, Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires` Disease". verzija 1.1. EWGLI. 2011.
12. Bazeni. <https://en.wikipedia.org/wiki/Swimming/pool> Zadnje ažuriranje: 26.08.2017. Pristupljeno: 01.09.2017.
13. Vrste i tipovi bazena. <http://www.eurostil.hr/bazeni/vrste-i-tipovi-bazena/> Zadnje ažuriranje: 2015. Pristupljeno: 01.09.2017.
14. A. Rakić i sur. Utjecaj konstrukcijskog materijala cjevovoda na razvoj biofilma i prisutnosti *Legionella spp.* u vodoopskrbnom sustavu. 2014.
15. Je li klor u bazenima opasan za zdravlje? <https://lider.media/lider-trend/je-li-klor-u-bazenima-opasan-za-zdravlje/> Zadnje ažuriranje: 13.06.2017. Pristupljeno: 20.08.2017.
16. Milanov D. i dr. "Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima". Arhiv veterinarske medicine. vol 1. br 2. 2008.
17. Hiperkloriranje bazenske vode. <http://www.stampar.hr/hr/hiperkloriranje-bazenske-vode> Zadnje ažuriranje: 2016. Pristupljeno: 20.08.2017.


18. Kemijska sredstva za bazene. <http://www.bazeni.hr/kemijska-sredstva-za-bazene/odrananje-bazenske-vode-ph-i-dezinfekcija> Zadnje ažuriranje: 26.08.2017. Pristupljeno: 01.09.2017.
19. D. Brdarić, dipl. san. ing. i sur ZZJZ OBŽ. Trihalometani u zatvorenim bazenima. <http://mail.zzjosijek.hr/trihalometali01.html> Zadnje ažuriranje: 19.09.2017. Pristupljeno: 30.08.2017.
20. Hrvatski zavod za javno zdravstvo – Služba za epidemiologiju zaraznih bolesti. "Preventivne mjere za smanjenje rizika od legionarske bolesti u hotelu/kampu/marini". 29.03.2017.
21. Kemijska sredstva za bazene. <http://www.bazeni.hr/kemijska-sredstva-za-bazene/odrananje-bazenske-vode-ph-i-dezinfekcija> Zadnje ažuriranje: Pristupljeno: 30.08.2017.
22. Brom. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Brom> Zadnje ažuriranje: 18.10.2016. Pristupljeno: 05.09.2017.
23. Hranjive podloge (agar) [https://en.wikipedia.org/wiki/Agar\\_plate](https://en.wikipedia.org/wiki/Agar_plate) Zadnje ažuriranje: 29.08.2017. Pristupljeno: 10.09.2017.
24. BCYE agar. <https://www.xebios.com/items/legionella-bcye-agar> Zadnje ažuriranje: 2015. Pristupljeno: 10.09.2017.
25. BCYE agar. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/43753?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite--prodRecCold\\_xviews--prodRecCold10-2](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/43753?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite--prodRecCold_xviews--prodRecCold10-2) Zadnje ažuriranje: nepoznat podatak Pristupljeno: 10.09.2017.
26. Metoda HRN EN ISO 11731:2000 Kvaliteta vode – Brojanje Legionella
27. Aemtek Inc. [www.aemtek.com](http://www.aemtek.com) Sampling and Analysis of *Legionella pneumophila* Zadnje ažuriranje: nepoznat podatak Pristupljeno: 30.08.2017.
28. OXOID DrySpot Legionella Latex Test. [www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0220M](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0220M) Zadnje ažuriranje: nepoznat podatak Pristupljeno: 17.07.2017.
29. Hrvatski matematički elektronički časopis. [http://e.math.hr/math\\_e\\_article/br17/anusic\\_et\\_al](http://e.math.hr/math_e_article/br17/anusic_et_al) Zadnje ažuriranje: nepoznat podatak Pristupljeno: 10.09.2017.
30. Marusteri M., Bacarea V. Kako odabrati pravi test za procjenu statističke značajnosti razlike između skupina? Biochemia Medica. 2010. 20(1): 15-32
31. Biljan-August, M., Pivac, S., Štambuk, A. Uporaba statistike u ekonomiji. 2. Izdanje. Ekonomski fakultet Sveučilišta u Rijeci. Rijeka. 2009.
32. Gaussova krivulja. [https://hr.wikipedia.org/wiki/Carl\\_Friedrich\\_Gauss](https://hr.wikipedia.org/wiki/Carl_Friedrich_Gauss) Zadnje ažuriranje: 02.11.2016. 21.05.2014. Pristupljeno: 10.09.2017.
33. Korelacija <https://hr.wikipedia.org/wiki/Korelacija> Zadnje ažuriranje: 21.05.2014. Pristupljeno: 10.09.2017.
34. World Health Organization "Guidelines for safe recreational water environments Volume 2: Swimming pools and similar environments". WHO. Geneva. Switzerland. 2006.

35. European Centre for Disease Prevention and Control "Legionnaires` disease in Europe, 2014". Stockholm. ECDC. 2016.
36. Rakić A. i sur. "Prisutnost bakterija *Legionella pneumophila* u toploj vodovodnoj vodi u ovisnosti o ekološkim čimbenicima". Hrvatske vode 21(2013). 83 1-6. 2013.
37. Rakić A. i sur. "Tehničke mjere za sprečavanje razmnožavanja bakterija *Legionella spp.* usustavima za opskrbu toplom vodom". Hrvatske vode 24(2016). 96 109-118. 2016.
38. Bilajac L. "Održavanje kvalitete vode u bazenima za šport i rekreaciju". 2005. Prijedlog preventivnih programa. Vol. 1. Broj 4. 2005.  
[file:///C:/Users/Darija%20Vuki%C4%87%20Lu%C5%A1i%C4%87/Downloads/1610-6008-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Darija%20Vuki%C4%87%20Lu%C5%A1i%C4%87/Downloads/1610-6008-1-PB%20(1).pdf)



# PRILOZI

## Prilog 1. Radni list "TIJEK ANALIZE Izolacija i potvrđivanje *Legionella pneumophila*"

 <p>NASTAVNI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO <small>IZ OBLASTI OKOLIŠNE I ZDRAVSTVENE ZAŠTITE</small></p> <p>Zdravstveno-ekološki odjel</p>	<b>TIJEK ANALIZE</b> <b>Izolacija i potvrđivanje</b> <b><i>Legionellapneumophila</i></b>	AB broj prema LDV-II-260
		Laboratorijski broj:

### 1. Opći podaci

Vlasnik	Datum i vrijeme uzorkovanja	Uzorkovao/la
Objekt	Datum i vrijeme dostave uzorka	Zaprimio/la
Lokacija uzorkovanja	Datum i vrijeme početka analize	Zadnji dan inkubacije

### 2. Opis uzorka

Uzorkovana voda	Temperatura (°C):	Dezinfekcija	Važne opaske
1. obrađena voda za piće		1. klorni preparat	
2. bazenska voda: morska slatka		koncentracija _____ mg/l	
3. neobrađena voda u prirodi		2. ostala dezinfekcijska sredstva	
4. tehnološka voda		naziv koncentracija _____	

### 3. Uzgoj i identifikacija

Popratna flora na krvnom agru (KA) → volumen uzorka od 0,5 ml, inkubacija 37°C /5 dana		
Datum	Broj kolonija (cfu)	Opaska
1.		
2.		

Uzgoj i identifikacije <i>Legionellapneumophila</i> , na BCYE agru oplemenjenom za njezin rast → volumen uzorka 1000 ml, inkubacija 37°C /10 dana				
Datum	Broj kolonija (cfu)	Opis kolonija	Razrada	Paraf
1.				
2.				
3.				
4.				

**Rezultat:**

Datum i vrijeme završetka analize:	Zaključio/la:
------------------------------------	---------------

## ŽIVOTOPIS

<b>OSOBNI PODACI</b>	
Ime i prezime	SNJEŽANA ŠIMEG
Spol	Ž
Adresa	Murajska 17, 51517 Kornić
Telefon	051 / 851 – 070
Mobitel	097 / 7249 – 770
E-mail	<a href="mailto:snjezana2911@gmail.com">snjezana2911@gmail.com</a>
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum, mjesto i država rođenja	20.01.1992. Rijeka, Hrvatska
<b>ŠKOLOVANJE</b>	2015 – 2017. Medicinski Fakultet u Rijeci, Diplomski sveučilišni studij Sanitarno Inženjerstvo
	2010 – 2015. Medicinski Fakultet u Rijeci, Preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno Inženjerstvo
	2006. – 2010. Srednja škola „Obrtnička škola“, Opatija, smjer kozmetičar
	1998. – 2006. Osnovna škola „Fran Krsto Frankopan“ Krk, PŠ Punat
<b>OSOBNNE I TEHNIČKE VJEŠTINE I ZNANJA</b>	Poznavanje rada na računalu Rad u programima Microsoft Office
<b>MATERINJI JEZIK</b>	HRVATSKI JEZIK
<b>OSTALI JEZICI</b>	ENGLESKI JEZIK – aktivno NJEMAČKI JEZIK – aktivno TALIJANSKI JEZIK – pasivno
<b>VOZAČKA DOZVOLA</b>	B kategorija

VLASTORUČNI POTPIS

---