

MORSKA VODA KAO POTENCIJALNI IZVOR LEGIONELA

Janeš, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:184:484417>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Filip Janeš

MORSKA VODA KAO POTENCIJALNI IZVOR LEGIONELA

Završni rad

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Filip Janeš

MORSKA VODA KAO POTENCIJALNI IZVOR LEGIONELA

Završni rad

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

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima stranica, slika, tablice, literaturnih navoda.

ZAHVALE:

U prvom redu zahvaljujem se svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Gobin, koja je pokazala neupitno strpljenje, veliki entuzijazam, potporu i što je uložila svoje vrijeme tijekom izrade cjelokupnog rada, praktičnog i pisanog dijela. Hvala joj na korisnim savjetima i znanju koje mi je prenijela.

Zahvale cijelom Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na pomoći i savjetima, a posebno bi se volio zahvaliti kolegici Andrei Gašaj.

Hvala mojim roditeljima i sestri na ukazanoj podršci i povjerenju.

SAŽETAK:

Legionela je bakterija kojoj je primarno stanište u vodenim sredinama, a od njih se posebno ističu umjetno stvorena staništa kao što su bazeni, gradske fontane, klima uređaji i slično. Najveći rizik predstavljaju slijepi krajevi cijevi gdje se legionela nastani u obliku kolonija, ali mogu stvarati i izrazito otpornu strukturu kao što je biofilm, osim navedenih rizika, potencijalnu prijetnju stvara i legionelino parazitiranje unutar amebe.

Kroz ovo istraživanje praćeno je preživljavanje različitih sojeva *Legionella pneumophila*, odnosno vrsta legionela u uzorku morske vode. U pokusu je korišteno dvanaest različitih sojeva *L. pneumophila* te vrste *L. bozemanii*, *L. anisa* i *L. longbeachae*.

Iz rezultata se može donijeti zaključak da različiti sojevi *L. pneumophila* mogu preživjeti morskoj vodi do 7 dana, neovisno o tome da li je riječ kliničkim ili okolišnim rezultatima. Suprotno tome, druge vrste ne preživljavaju u morskoj vodi i već unutar 24 sata ih ne možemo dokazati. Zaključno, morska voda može biti izvor legioneloza ovisno o vrsti i količini bakterija koje se u njoj nalaze.

ABSTRACT:

Legionella is a bacteria which primary residence is in water, from which stand out artificially created residence, like pools, fountains, air conditioners and similar. The greatest risk are blind ends of tube where legionella lives in the form of colonies, but they can make extremely resistant form like biofilm, expect those risks, potential threat make also legionella's parasitism inside amoeba.

Through this research it was monitored the survival of different *Legionella pneumophila* strains and other Legionella species in a seawater sample. In the experiment was used twelve different *L. pneumophila* strains and species *L. bozemanii*, *L. anisa*, and *L. longbeachae*.

From results, we can see that different layers of *L. pneumophila* can survive in sea water for up to seven days independently of clinical or environmental results. Opposite of that, other species do not survive in seawater and within 24 hours we can not prove them. In conclusion sea water can be a source of legionellosis, depending on the species and amount of bacteria contained in it.

SADRŽAJ:

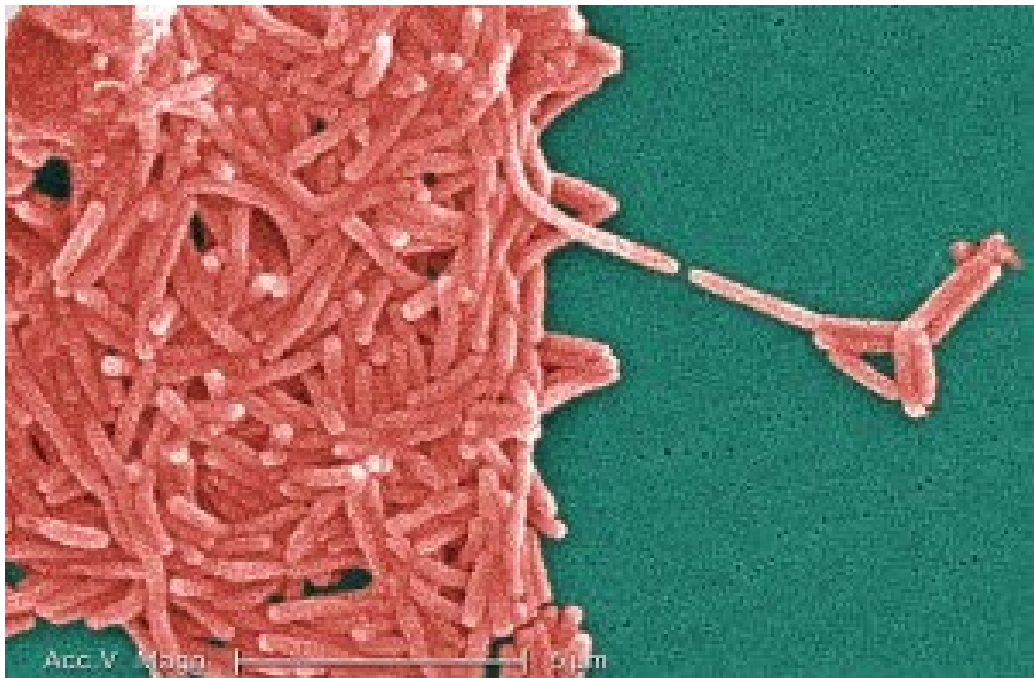
SAŽETAK:.....	5
ABSTRACT:.....	6
1. UVOD:	1
1.1.1. <i>Legionella pneumophila</i>	3
1.3.2. Legionarska bolest.....	6
Trajanje.....	7
Letalitet.....	7
1.4. Kultivacija	9
1.5. Liječenje	11
1.6. Epidemiologija bolesti	11
1.7. Prirodni izvori	12
1.8. Faktori koji utječu na rast bakterije	13
1.9. Legionela i parazitarni način života	14
1.10. Legionela i biofilm	15
1.11. Mjere za suzbijanje	16
1.12. Dezinfekcija bazena	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. METODE I MATERIJALI	19
3.1. Materijali	19
3.1.1. Hranjive podloge	20
3.1.2. Bakterijski sojevi	21
3.1.3. Uzorci morske vode	22
3.2. Metode	22
3.2.1. Priprema bakterijskog inokuluma.....	22
3.2.2. Određivanje broja bakterija u morskoj vodi.....	22
4. REZULTATI	23
4.1. Preživljavanje <i>Legionella pneumophila</i> u morskoj vodi.....	23
5. RASPRAVA	28
6. ZAKLJUČAK	30
7. LITERATURA	31
8. ŽIVOTOPIS	35

1. UVOD:

Legionella je bakterija koja predstavlja veliki javno zdravstveni problem, naročito je opasna za imunokompromitirane bolesnike i bolesnike sa kroničnim bolestima. Mogućnost obolijevanja legionelom moguća je tijekom cijele godine, ali najveći broj oboljelih zabilježen je u ljetnim mjesecima i to boravkom u hotelima koji rade samo za vrijeme trajanja sezone. Posebno su rizične vode koje duže vrijeme stoje u bojlerima, bazenima, klimatizacijskim sustavima i slijepim završecima cijevi. Bolesti koje su uzrokovane *Legionellom* nazivaju se legionelozama. Legionela je poznata kao gram negativna bakterija koja je sveprisutna u vodenom okruženju koja se osim u prirodnom vodenom okruženju može naći i u umjetnom stvorenim vodama. Mogućnost zaraze legionelom je udisajem onečišćenog vodenog aerosola, jer bakterija primarno napada pluća dok se konzumacijom zaražene vode na usta gotovo nemoguće zaraziti. Rizik od obolijevanja bolesti postaje veći sa povećanjem životne dobi osobe koja je izložena zaraženom vodenom aerosolu, posebnu rizičnu skupinu čine i pušači. Budući da je bakterija poznata kao unutar stanični patogen simptomi bolesti se mogu razlikovati, a bolest se najčešće pojavljuje u dva oblika i to kao pontijačka groznica koja je predstavljena kao blaži oblik gripe ili se može pojaviti kao legionarska bolest koja može biti potencijalno letalna. *Legionella* pripada porodici *Legionellaceae* iz koje se ističe i najopasnija je za čovjekovo zdravlje *Legionella pneumophila*.

1.1 Opće karakteristike Legionella

Legionela se prvi puta pojavila u drugoj polovici 20. stoljeća i to u velikoj zarazi među američkim legionarima, zbog kojih je između ostalog i dobila naziv(3). Bakterija je prvi puta izolirana 1943. godine iz zamorca, a 1954. godine u Poljskoj bakterija je izolirana iz tla. Od tada je poznato da iz porodice *Legionellaceae* pripada bakterija iz roda *Legionella* koja posjeduje najmanje 52 vrste sa velikim postotkom genetske podudarnosti koja iznosi oko 90% i više od 70 različitih serotipova (2). Uz pomoć mikroskopa uočeno je da se radi o gram negativnoj štapičastoj bakterija koja se koristi aerobnim metabolizmom.



1. Slika 1. Prikaz *L. pneumophila* pod mikroskopom (izvor: https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=bd9qXf7YF8OEacX8vqgH&q=1.+pneumophila&oq=1.+pneumophila&gs_l=img.1.0.0i19.29188.31704..33070...0.0..0.98.1423.16.....0....1..gws-wiz-img.....0i30.mLCUmDNdXDY)

Zanimljivo je kako se ova bakterija vrlo brzo uspije prilagoditi na nepovoljne uvjete s niskim hranjivim tvarima. Zbog toga se *Legionella pneumophila* seroskupine O1 smatra jednim od najčešćih uzročnika legioneloza.

1.1.1. Legionella pneumophila

Kako je već ranija navedeno da je *Legionella pneumophila* jedan od najčešćih razloga obolijevanja od legionarske bolesti, uzrok toga je upravo unutar stanični način života legionele i sposobnost razmnožavanja u ljudskim makrofazima da se pritom izbjegne proces fagocitoze. Jedna od mana ove gram negativne štapićaste bakterije jest nemogućnost preživljavanja u okolišu bez prisustva voda. Kada se jednom nađe u uvjetima koji joj odgovaraju kao što su prirodne vode ili umjetno stvoreni vodeni sustavi primjera bazeni, bojleri, cisterne, slijepi završeci vodovodnih cijevi, jacuzzi može stvoriti veliku prijetnju za čovjekovo zdravlje. Velik broj različitih serotipova koje ova bakterija posjeduje i veličina od samo 2 pa do 20 mikrometara nimalo nisu pogodni za čovjekovu rezistentnost na ovu bakteriju (5). U svojoj građi ima tanki stanični zid u koji su ugrađene masne kiseline i ubikinoni, te za svoju pokretljivost koristi flagele i da bi uspješno adherirala u stanicu domaćina koristi se specifičnim pilima koje posjeduje u svojoj građi (4).

Tablica 1. Karakteristike *L. pneumophila*

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

1.2. Patogeneza

Nakon udisaja kontaminiranog vodenog aerosola, bakterije bivaju progutane u fagosomalnu vakuolu ukoliko su se prije vezale na stanične makrofage. Pri normalnim uvjetima fagolizosom bi se zakiselio, ali adherirane bakterije taj proces sprječavaju i na taj način uspijevaju preživjeti. U fagocitima bakterije se razmnožavaju i kako raste broj novo namnoženih bakterija stanica domaćina bubri i nakon nekog vremena pukne odnosno biva uništena. Tim pucanjem bakterijske stanice su oslobođene i u mogućnosti su za daljnje razmnožavanje i inficiranje drugih humanih stanica (4). Prijenos sa čovjeka na čovjeka nije moguć, već samo putem kontaminirane vode odnosno udisajem njezinog aerosola. Da bi se čovjek obranio od uzročnika u tome mu pomaže mukocilijarni mehanizam obrane i ukoliko ona zakaže infekcija bakterijom je neizbježna.

1.3. Bolesti koje uzrokuje legionela

Nakon obolijevanja američkih legionara još je nekoliko slučajeva bilo zabilježeno sa simptomima upale pluća. To je potaknulo tadašnje znanstvenike da se opuste u pronalazak uzročnika i opišu što je uzrok te bakterijske pneumonije. Pronalaskom uzročnika bolesti, pneumonija je nazvana legionarska bolest. Time je otkriveno da postoji akutna i često smrtonosna upala pluća, ali moguć je i lakši oblik bolesti koji je dobio ime pontijačka groznica i u mnogome je sličan običnoj gripi.

1.3.1. Pontijačka groznica

Pontijačkom groznicom zarazi se velik broj ljudi koji su u doticaju sa legionelom. Simptomi bolesti su vrlo blagi i slični su običnoj gripi jedina je razlika ta što je inkubacija kod gripe puno duža. Smrtnost nije zabilježena, bolest prolazi bez komplikacija i samo limitirajuća je. Inkubacija je vrlo kratka od nekoliko sati do 3 dana, bolest je praćena općim simptomima kao što su glavobolja, visoka temperatura, gubitak snage, proljev te povraćanje.

1.3.2. Legionarska bolest

Uzročnik legionarske bolesti u većini slučajeva je *L. pneumophila*. Komplikacije bolesti nastaju zbog nedovoljno brzog otkrivanja simptoma bolesti. Simptomi su slični drugim vrstama pneumonije i kao takvi nisu jasan pokazatelj pojavnosti legionarske bolesti.

Vrijeme inkubacije odnosno vrijeme od nastanka infekcije pa do pojave prvih simptoma traje od 2 do 10 dana, a on najčešće u prosjeku iznosi 5 dana. U početku bolesti pojavljuju se opći simptomi poput glavobolje i febriliteta, a od samog početka prisutna je i temperatura popraćena zimicom. Nakon izvjesnog vremena pojavljuju se poteškoće u disanju i jak, suhi kašalj bez iskašljaja. Osim navedenih respiratornih simptoma nerijetko se pojavljuju i mučnina, bolovi u trbuhu praćeni proljevom i povraćanjem (11). Za vrijeme trajanja bolesti bolesnik može pasti u depresiju i delirij, halucinirati, mogu se pojaviti određeni bubrežni simptomi. Simptomi mogu varirati od osobe do osobe i ovise o bolesnikovoj dobi, infektivnoj dozi i o imunitetu. Trećeg dana bolesti na rendgenskoj slici vidljive su promjene zbog nakupljanja tekućine u pojedinom dijelu pluća. Procjenjuje se na prestanak simptoma nakon nekoliko tjedana, to naravno može varirati od bolesnika do bolesnika, a normalan rendgen pluća vidljiv je teka nakon 12 tjedana od početka bolesti. Smrtnost je prisutna samo u slučaju ne otkrivanja i ne liječenja simptoma bolesti.

Tablica 2. Karakteristike legioneloza

Karakteristike	Legionarska bolest	Pontijačka groznica
Inkubacija	2- 10 dana	24-48h
Trajanje	Tjedni	2-5 dana
Letalitet	Ovisno o osjetljivosti; pacijenti u bolnici 40-80%	Nije zabilježeno
Postotak obolijevanja	0.1–5% opće populacije; 0.4–14% u bolnicama	1 do 95%
Simptomi	<ul style="list-style-type: none"> • nespecifični • gubitak snage • visoka temperatura • glavobolja • neproduktivni suhi kašalj • zimica • mijalgije • teško disanje; bol u prsima • dijareja • povraćanje, mučnina • konfuzije i delirij • bubrežna insuficijencija • hiponatrijemija • otpornost na beta laktamske antibiotike ili aminoglikozide 	<ul style="list-style-type: none"> • bolest slična gripi • gubitak snage; umor • visoka temperatura i zimica • mijalgije • glavobolje • artralgija • dijareja • mučnina, povraćanje • teškoće u disanju i suhi kašalj

Dijagnostika

Brzo otkrivanje i dijagnosticiranje legionela je nužno je kako bi liječnik pravovremeno reagirao i dao potreban antibiotik bolesniku da se spriječi daljnja progresija bolesti. To je bitno samim epidemiolozima kako bi spriječili daljnje širenje bolesti i time bitno smanjili rizik od obolijevanja bolesti. Metoda koja se danas najčešće koristi za otkrivanje uzročnika jest metoda detekcije antigena u urin. Osjetljivost ovog testa je vrlo velika i bazirana je na točno određeni serotip bakterije. Prednost metoda je ta što do detekcije može doći u vrlo kratkom vremenskom periodu, antigene je moguće dokazati u prva tri dana od kad se jave prvi simptomi. Ova metoda može detektirati antigene i u drugim tjelesnim tekućinama, ali gotovo u svim slučajevima za to se koristi urin. Jedni od nedostataka ove metode mogu biti nedovoljna osjetljivost na legioneloze izazvane u bolničkom okruženju, osim toga ponekad problem u postavljanju dijagnoze može biti i davanje lažno negativnih rezultata. Osim opisane metode postoji još niz testova koji se koriste u laboratorijima za otkrivanje uzročnika, a to mogu biti: serološke metode, detekcija bakterijske DNK uz PCR (eng. Polymerase Chain Reaction), detekcija bakterije u tkivu ili tjelesnoj tekućini koristeći imunoflorescentni mikroskop.

Metoda u serološkim testovima koja se najviše koristi jest ELISA. Ta metoda korisna je za otkrivanje vrsta legionela koje su kultivirane u hranjivoj podlozi(3).

Metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) uvelike je poboljšala i ubrzala dijagnozu legioneloza. Koristi se za okolišne uzorne, iako mogu biti korisni i za kliničke uzorke, ali se za to koriste vrlo rijetko (13).

Uzorci iz plućnih tekućina i respiratorni sekreta pogodni su za analizu kod imunoflorescencijske metode detekcije(1). Moguće su direktne i indirektne metode. Indirektna metoda koristila se u epidemiji legionarske bolesti u Philadelphiji (3).

1.4. Kultivacija

Kroz povijest razvijale su se mnoge hranjive podloge pogodne za rast legionela. Danas se najviše ističe i najčešće je korišten BCYE (engl. Buffered Charocal-Yeast Extract) agar. Ovaj agar pogodan je za rast većine legionela (3). Kako bi bakterija uspješno rasla na hranjivoj podlozi potrebno joj je osigurati sve tvari, a među tim tvarima ističu se cistein koji se nalazio u hranjivim podlogama koje su se koristile u ranijim istraživanjima, zatim su važne soli željeza, kao izvor proteina se koristi ekstrakt kvasca, a za uklanjanje vodikovog peroksida služi aktivni ugljen. Vodikov peroksid je toksičan za legionelu pa ga je zato potrebno ukloniti. Važan je i optimalan pH podloge koji iznosi 6,9, a može se regulirati različitim puferima. Ukoliko je potrebno inhibirati rast pojedinih bakterija u navedeni agar mogu se dodati različiti selektivni agensi (14). Kada se uzorak uspješno nasadi slijedi inkubacija koja traje nekoliko dana, a to najčešće iznosi od 3 do 5 dana na 37°C°. Kao rezultat vidljiv je porast karakterističnih kolonija koje su okrugle i blago ispupčene, bijelo sive boje s pravilnim rubom. Kako bi ova metoda bila što točnija i uspješnija uzorak u obliku krvi, stolice i respiratornog sekreta potrebno je uzeti prije konzumacije antibiotika (1).



Slika 2. Porast legionele na BCYE agaru

1.5. Liječenje

Kako bi se smanjio rizik od obolijevanja legionelom i započelo pravovremeno sa terapijskim liječenjem potrebno je svakog bolesnika koji boluje od težeg oblika pneumonije testirati na legionela, bezobzira na to da li postoji indikacija na legionelozu. Liječenje antibioticima je najučinkovitija terapija protiv legioneloze. Iako se antibiotici protiv ove bolesti još u razvojnem stadiju, neki od njih se koriste i dosta su učinkoviti u liječenju. Među njima najučinkovitiji su makroidi: azitromicin i klaritromicin koji su svoju djelotvornost pokazali u tkivima, ali isto tako i intracelularno. U ovu skupinu još spadaju i beta laktamski antibiotici, ali se oni više koriste u liječenju pneumokokne pneumonije. Kombinacija makroida i beta laktamskih antibiotika korisno je pri liječenju legioneloze, ali istovremeno se liječi pneumonija uzrokovana sa više uzročnika.

Liječenje legioneloze traje dugo, iako je prisutnost simptoma vrlo kratka i traje od 3 do 5 dana. Uzimanje terapije traje između 10 i 14 dana, međutim u slučaju oboljenja osoba sa slabim imunitetom može potrajati do 21 dan (1).

1.6. Epidemiologija bolesti

Epidemijski slučajevi najčešći su u ljetnim mjesecima, kada je turizam u svom najvećem zamahu, ali moguća je pojava i sporadičnih slučajeva legioneloze (17). Najveću prijetnju za čovjekovo zdravlje predstavljaju vodeni tornjevi, bazeni sa pjenom te ovlaživači zraka. Čovjek se u ovakvom okruženju može zaraziti na način da se tušira ili kupa u bazenima, te tako inhalira aerosol kontaminiran bakterijama (15). Mogućnost inhalacije je velika, jer su čestice aerosola vrlo male. Poznato je da čestice veličine 5 μm mogu vrlo lako dospjeti u čovjekov dišni sustav i uzrokovati legionelozu (21).

Osobe u riziku od oboljenja jesu srednje i starije životne dobi, a posebno one kod kojih je imunost oslabljena ili oštećena nekim drugim uzrokom. Kronični bolesnici, posebno oni sa kardiovaskularnim bolestima i dijabetesom melitusom također su velika prijetnja od obolijevanja legionelom (16).

Kako bi se spriječio nastanak povoljnih uvjeta za rast i razvoj legionela epidemiološke mjere podrazumijevaju uporabu kemijski dezinficijensa, jednako je bitno i održavanje dovoljno visoke temperature u sustavu (18).

1.7. Prirodni izvori

Kao što je već poznato mjesto gdje možemo pronaći legionelu je voda. Nalazak bakterije je moguć u prirodnim vodama i u umjetno nastalim vodama. Legionela u onečišćenim prirodnim vodama najčešće obitava u jezerima, rijekama, termalnim vodama. Od voda koje su nastale ljudskim djelovanjem odnosno umjetno stvorenim vodama kao što su bazeni, raznorazne fontane, tuševi, jacuzzi i mnogi drugi predstavljaju mnogo veći rizik koloniziranja bakterije, a posebno ukoliko su ti vodeni sustavi neodržavani i nekorišteni dulje vrijeme (20). Pronalazak bakterije je moguć i u ne vodenim sredinama, ali takvi slučajevi zabilježeni su doista rijetko. U takvim slučajevima bakterije se mogu izolirati iz zemlje za sadnju biljaka (17). Bitno je napomenuti da osim epidemiološkog značaja kolonizacija legionele može imati i velike ekonomske troškove za njezino suzbijanje. Zbog toga je potrebno održavati temperaturu vodenog sustava dovoljno visokom u kombinaciji sa raznim kemijskim sredstvima kako do pojave bakterije ne bi ni došlo.

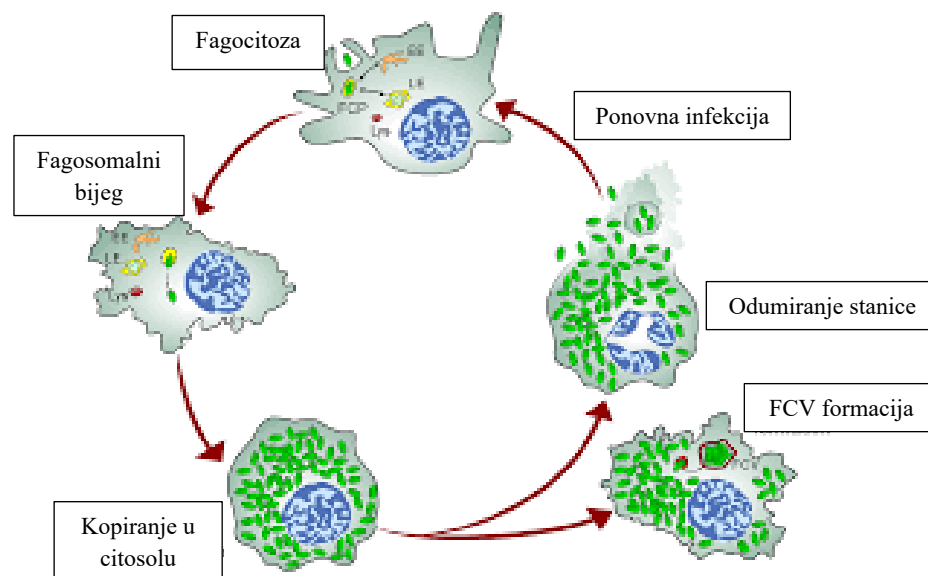
1.8. Faktori koji utječu na rast bakterije

Legionela ima mogućnost rasta i razvoja na različitim temperaturama i pri različitim pH vrijednostima. Optimalna temperatura za rast bakterije je 35°C, ali može rasti u rasponu od 12°C do 42°C (17). U nekoliko istraživanja dokazano je da legionela posjeduje visoku termo tolerantnost, jer je moguće njezino preživljavanje i na temperaturama višim od navedenih. Bakterija je u mogućnosti preživjeti nekoliko sati na temperaturi od 50°C (1). Termostabilnost bakterije može se dokazati primjerom termalnih sustava. U tim sustavima je temperatura vode vrlo visoka, ali parazitiranjem u protozoama bakterija je u mogućnosti preživjeti u tim uvjetima (3). Osim na visokim temperaturama legionela ima mogućnost preživljavanja i na niskim temperaturama, povišenjem temperature drastično će porasti broj namnoženih bakterija. Što se tiče pH vrijednosti, najoptimalniji je pH 8,0 u sustavima sa vodom visoke temperature. Rast bakterije moguć je u slabo kiselim i slabo lužnatim sredinama, što nam dokazuje i raspon od 6,0 do 8,0 (5).

Bakterija nije u mogućnosti rasti u sterilnoj destiliranoj vodi. Ukoliko se voda razrijedi nekoliko puta vidljiv je znatan pad u broju kolonija (5). U slanoj vodi također nije moguć rast legionele, zbog inhibicijskog djelovanja natrijeva klorida (24).

1.9. Legionela i parazitaran način života

Kako bi rast legionela u prirodnim i umjetnim vodenim sredinama bio što uspješniji, one za to koriste druge mikroorganizme u kojima parazitiraju. Mikroorganizmi koji služe za razvoj najčešće jesu protozoe u obliku slobodno živućih protista ili neke druge bakterije (23). Budući da se bakterija razmnožava intracelularno u fagosomima ona izaziva destrukciju tkiva domaćina prilikom proliferacije. Da bi u tome bila što uspješnija bakterija mora ispuniti neke faktore, a jedan od najvažnijih faktora je posjedovanja flagela bez kojeg legionela ne bi mogla inficirati protoze. Drugi važan čimbenik je temperatura, koja mora biti na 35°C kako bi mogla proliferirati, dok će na nešto nižim temperaturama kao što su 22°C bakterija biti probavljena od strane amebe (25). Rezervoar koji pomažu legionela za takav rast i razvoj služe protozoe među kojima se najviše ističu *Acanthamoeba* i *Naegleria* (1). Parazitaran način života omogućuje legioneli veću otpornost na razne dezinficijense i uvelike povećava virulentnost bakterije (24).



Slika 3. Ciklus legionele u amebama (izvor: https://www.google.hr/search?q=ciklus+legionela+u+amebama&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjT1Ni36rfkAhXDMewKHdhuCHwQ_AUIEigB&biw=1366&bih=608#imgrc=8gk_vjc1hlx93M):

1.10. Legionela i biofilm

Čovjek ponekad nesvjesno svojim nemarom stvara povoljne uvjete za rast legionele. To se događa kada bakterija stvori tanke i sluzave slojeve koji se nazivaju biofilmom (22). Idealna mjesta za stvaranje biofilma jesu mjesta sa sporim protokom vode u što možemo ubrojiti klimatizacijske sustave, stjenke slavine i ventilacije, pogotovo ukoliko je materijal koji izgrađuju ove vodene sustave plastika (26). Da bi se stvorili uvjeti za nastanak biofilma potrebno je zadovoljiti određene faktore, od koji je najvažniji prisutnost hranjivih tvari i mikroorganizma, te površina u dodiru sa vodom (22). Biofilm omogućava bakterijama sve uvjete da mogu mirno rasti i razmnožavati se, k tome još postići visok stupanj rezistencije na faktore koji inhibiraju njihov rast (15). Kada se tome još nadoda da je legionela u mogućnosti stvoriti biofilm i u korelaciji sa protozoama, to stvara idealne uvjete za nastanak potencijalno velike epidemije legioneloze (26). Početni sloj odnosno vezanje mikroorganizma na površinu je temelj svakog biofilma, zatim se bakterija razmnožava i proizvodi polimerne supstance što su rezultat pravog biofilma sa mikroorganizmima (23). To se može još opisati na način da su stanice mikrobne populacije adherirane na supstrat i ugrađene u matriks, što štiti bakteriju od nepovoljnih uvjeta.

1.11. Mjere za suzbijanje

Ponekad se dogodi da se bakterija osim u prirodnim vodama može naći i u vodenim sredinama koje koristi čovjek na dnevnoj bazi i uzrokuje mu velike probleme. Da bi se to spriječilo potrebno je provesti neke mjere koje smanjuju rizik od pojave legionela. Pa se tako provodi sustav fizikalno-kemijskih mjera, od kojih se dosta često primjenjuje tretiranje sustava natrijevim hipokloritom i dezinfekcije klor dioksidom. Ove metode su relativno jeftine i učinkovite s obzirom na jednostavnu upotrebu, klor dioksid je u mogućnosti uništiti biofilm i spriječiti njegovo ponovno stvaranje. Jedinstvena mana ovih dviju metoda je ta što se nakon njihove uporabe u vodi javlja intenzivan miris po kloru, k tome je natrijev hipoklorit nestabilan u toploj vodi. Metoda koja se još koristi, a nije učinkovita je dezinfekcija hidrogen peroksidom, za razliku od nje ionizacija sa bakrom i srebrom je vrlo uspješna metoda, ali je i vrlo zahtjevna pa se zbog toga rijetko koristi. Metoda kojom se vrlo uspješno uklanjaju spore i biofilm i osigurava da ne dođe do ponovnog nastanka je dezinfekcija ozonom. Ova metoda je sama po sebi vrlo skupa, a dodatan trošak još predstavlja i uklanjanje ozona prije nego voda dođe u ljudsku upotrebu. Još se koristi i metoda upotrebe UV zračenja, ali se njome ne uklanja biofilm i spore i samim time zaštita vode je kratkotrajna. Osim fizikalno kemijskih mjera vrlo je bitno provesti i tehničke mjere. Temeljni korak je održavanje dovoljno visoke temperature kako bi uništavanje legionele bilo što uspješnije. U kupaonicama bilo bi poželjno da se temperatura tople vode kreće od 35°C do 45°C, a za kuhinje ta je vrijednost malo viša i iznosi od 55°C do 60°C (22). U veliki vodenim sustavima temperatura vode ne bi smjela pasti ispod 60°C, ali rizik predstavljaju stari vodoopskrbni sustavi gdje je moguće da dođe do oštećenja instalacija na tako visokoj temperaturi duži vremenski period (1). za hladnu vodu gornju granicu predstavlja temperatura od 25°C koja se nikako ne bi smjela prelaziti. Za objekte koji posluju samo u ljetnom dijelu sezone nužno je na početku sezone provesti hiperdezinfekciju, a kada sezona završi potrebno je provesti dezinfekciju cjevovoda.

1.12. Dezinfekcija bazena

Osim vode za piće koja je esencijalni dio našeg života, potrebno je održavati i bazensku vodu higijenski čistom i bistrom, bilo da se radi o privatnim bazenima ili većim hotelskim i wellness bazenima. Bazeni se mogu onečistiti osobama koje koriste bazen, zatim vremenske neprilike imaju također velik utjecaj ukoliko se radi o vanjskim bazenima, moguće je nakupljanje nečistoća u oblogama bazena gdje se one zadržavaju u njihovim neravninama i izbočinama. Takve nečistoće moguće je ukloniti uz pomoć vodenog usisavač i filtera. No osim njih u bazenima se mogu naći razne bakterije i gljive. Njih da bi uklonili moramo ih tretirati različitim dezinfekcijskim i kemijskim sredstvima poput klora, broma ili pomoću različitih soli, Važno je i reguliranje pH vrijednosti vode. U bazenima se mogu stvoriti i raznorazne alge koje je potrebno tretirati algicidima.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ovog rada bio je pratiti preživljavanje različitih sojeva *Legionella pneumophila*, odnosno vrsta legionela u uzorku morske vode.

3. METODE I MATERIJALI

3.1. Materijali

- Automatske pipete
 - 2-20 μ L, 20-200 μ L i 100-1000 μ L "GilsonPipetman" (Gilson, USA)
 - nastavci za pipete (Gilson, USA)
- Epruvete
- Petrijeve zdjelice
- Sterilna destilirana voda
- Plamenik
- Pincete
- Sterilne igle
- Termostat (35 \pm 2 $^{\circ}$ C, 32 \pm 2 $^{\circ}$ C)
- Mikrotitar pločice

3.1.1. Hranjive podloge

Prilikom izvođenja ovog istraživanja koristile su se sljedeće podloge: BCYE agar.

- Za uzgoj bakterija legionela korištena je hranjiva kruta BCYE agar sastava (pH 6,9): 10 g/l N-[2-acetamido]-2-aminoetansulfonske kiseline (ACES; Sigma, UK), 10 g/l kvašćevog ekstrakta (Oxoid, UK), 2 g/l aktivnog ugljena (Sigma, UK), 20 g/l agara (Oxoid, UK) te 1g/l alfa-ketoglutarat (Sigma, UK) uz dodatak 10 ml/l 0,1 M željezovog (III) nitrata (Sigma, UK) te 10 ml/l 0,33 M L-cisteina (Sigma, UK) i tekuća podloga AYE sastava (pH 6,9): 10 g/l kvašćev ekstrakt (Oxoid, UK), 10 g/l ACES (Sigma,UK), 1 g/l alfa-ketoglutarat (Sigma,UK) uz dodatak 3,3 mL/l 1M L-cisteina (Sigma, UK) i 3,3 mL/l 1M željezovogpirofosfata (Sigma,UK).

3.1.2. Bakterijski sojevi

U pokusu je korištena dvanaest različitih sojeva *L. pneumophila* te vrste *L. bozemanii*, *L. anisa* i *L. longbeachae*. Bakterije su čuvane u zamrzivaču na -80°C. Nakon uzgoja 3–5 dana na BCYE podlozi pri 37°C u atmosferi obogaćenoj 4–5% CO₂, bakterija se koristila u pokusima. Legionele su suspendirane u 10 % - tnom glicerol bujonu. Suspenzija je zatim alikvotirana i zamrznuta na -80 °C. U istraživanju su prevladavali klinički sojevi kojih je bilo 8, dok je okolišnih sojeva bilo 6 i svi s navedeni u tablici 3.

Tablica 3. sojevi *L. pneumohila* korišteni u istraživanju

IME I SEROGRUPA	KLINIČKI IZOLAT/OKOLIŠNI IZOLATI
<i>L. pneumophila</i> sg1 Oxford	Klinički izolat
<i>L. pneumophila</i> sg1 Oxford st 1	Okolišni izolat 1
<i>L. pneumophila</i> sg1 Oxford st 1	Okolišni izolat 2
<i>L. pneumophila</i> sg1 Philadelphia st 1	Klinički izolat
<i>L. pneumophila</i> sg1 Philadelphia ST 37	Klinički izolat
<i>L. pneumophila</i> sg1 Benidorm ST1299	Klinički izolat
<i>L. pneumophila</i> sg1 Benidorm ST1299	Okolišni izolat
<i>L. pneumophila</i> sg8 Concord 3 ST1324	Klinički izolat
<i>L. pneumophila</i> sg6 Chicago 2 ST421	Klinički izolat
<i>L. pneumophila</i> sg1 Bellingham ST334	Klinički izolat
<i>L. pneumophila</i> sg1 Bellingham ST728	Klinički izolat
<i>L. pneumophila</i> sg1 Bellingham ST728	Okolišni izolat
<i>L. bozemanii</i>	Okolišni izolat
<i>L. anisa</i>	Okolišni izolat
<i>L. longbeachae</i> NSW	Klinički izolat

3.1.3. Uzorci morske vode

Uzorci morske vode su dopremljeni u sterilnim staklenim bocama u hladnjaku. Svaki od uzoraka dopremljen je u zasebnoj, označenoj boci. Uzorak predstavlja sirovu morsku vodu uzorkovanu uz obalu otoka Lošinja. Morska voda je filtrirana pomoću filtera za šprice promjera pora 0,22 µm i korištena je za daljnje istraživanje.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema bakterijskog inokuluma

Da bi odredili broj bakterija u inokuluma nakon što se u sterilnoj morskoj vodi pripremi bakterijska suspenzija, za to se koristi spektrofotometrijska metoda. Mjerena je apsorbancija pri 600 nm i namještena je na OD1 (eng. Optical Density). Ta apsorbancija označava koncentraciju bakterija od 1×10^9 CFU/mL. Nakon toga bakterije su dodane u pripremljene uzorke vode i početna koncentracija bakterija je iznosila $\sim 10^8$ CFU/mL.

3.2.2. Određivanje broja bakterija u morskoj vodi

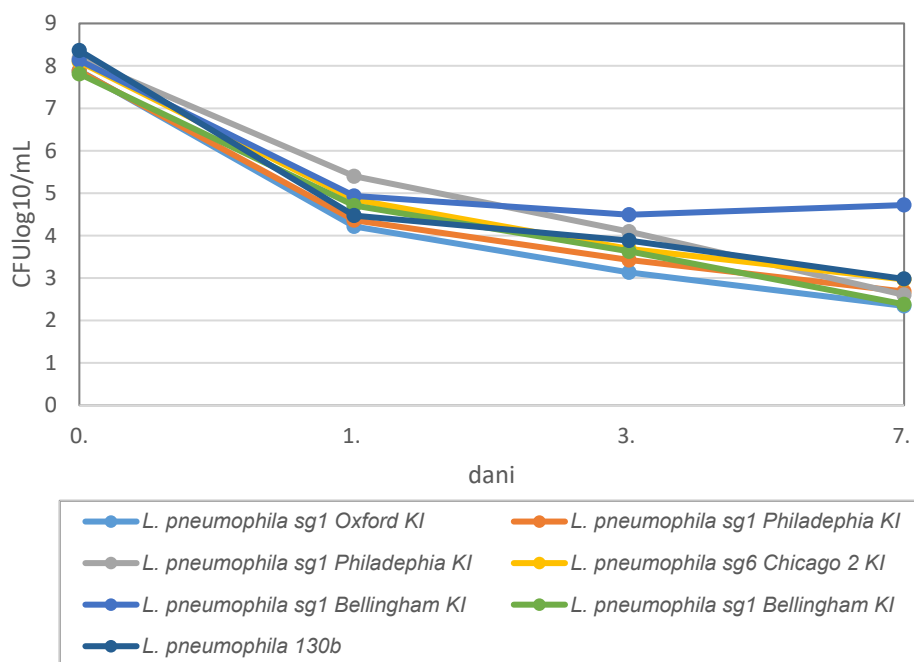
Broj varijabilnih legionela u morskoj vodi određen je nasađivanjem desetorostrukih razrjeđenja na BCYE agar u različitim vremenskim intervalima tijekom 7 dana. Brojanjem poraslih kolonija nakon 3-5 dana određen je broj bakterija po ml morske vode.

4. REZULTATI

Poznato je da legionele osim u slatkim vodama mogu određeno vrijeme preživjeti i u morskoj vodi. U ovom smo radu ispitali kako različiti sojevi *L. pneumophila*, odnosno različite vrste legionela preživljavaju u morskoj vodi tijekom 7 dana. Početni broj bakterija bio je 1×10^8 CFU/mL, a temperatura na kojoj je rađena inkubacija iznosi 37°C. Vrijeme u kojem je praćen razvoj pojedinih bakterija iznosi sedam dana.

4.1. Preživljavanje Legionella pneumophila u morskoj vodi

Prvo smo ispitali preživljavanje sedam kliničkih izolata *L. pneumophila* u morskoj vodi pri 37°C. Broj bakterija se određivao 1., 3. i 7. dan nakon inokulacije. Rezultati su prikazani na Slici 4.

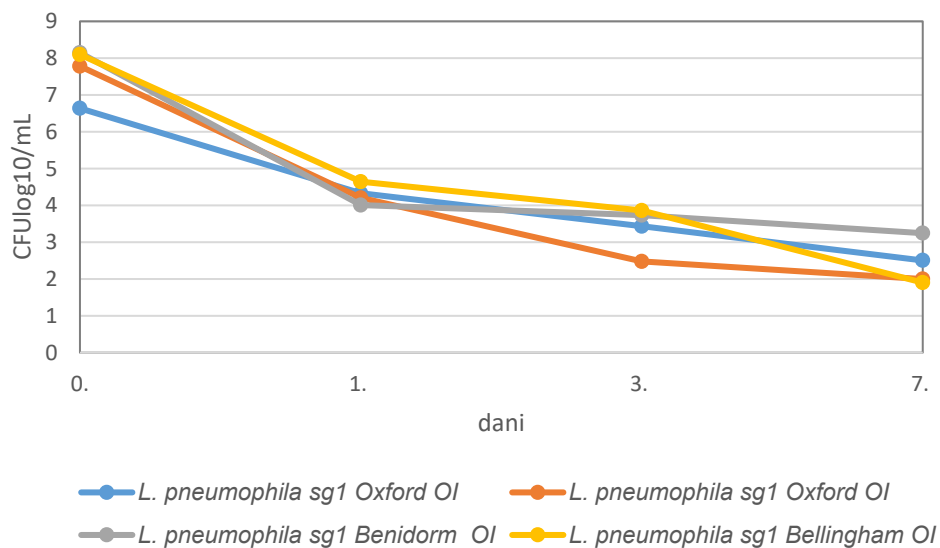


Slika 4. Krivulje preživljavanja različitih kliničkih izolata (KI) *L. pneumophila* u morskoj vodi. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL.

Iz dobivene krivulje vidljivo je da nakon 1. dana najbolje preživljavaju *L. pneumophila* sg1 Philadelphia KI sa postotkom inhibicije 99.83 % te *L. pneumophila* sg1 Bellingham KI kod koje postotak inhibicije iznosi 99.93 %. Najviše se smanjio broj bakterija soja *L. pneumophila* sg1 Philadelphia KI označen narančastom linijom i soja *L. pneumophila* sg1 Oxford KI kod kojih je postotak inhibicije približno jednak i iznosi 99.98 %. Od 1. do 3. dana ponovno je najviše primjetan pad u broju bakterija kod soja *L. pneumophila* sg1 Oxford KI sa postotkom inhibicije 99.99 % i *L. pneumophila* sg1 Philadelphia KI kod koje je postotak inhibicije 99.99 %. Najmanji pad u broju bakterija ima *L. pneumophila* sg1 Philadelphia KI (99.99 %), gotovo je zanemariv pad postotka inhibicije kod *L. pneumophila* sg1 Bellingham KI koji je skoro isti kao i 1. dan i iznosi 99.98 %. Potrebno je istaknuti kako je 7. dana najprimjetniji pad vidljiv kod *L. pneumophila* sg1 Philadelphia KI i gotovo je najveći postotak inhibicije (99.99 %).

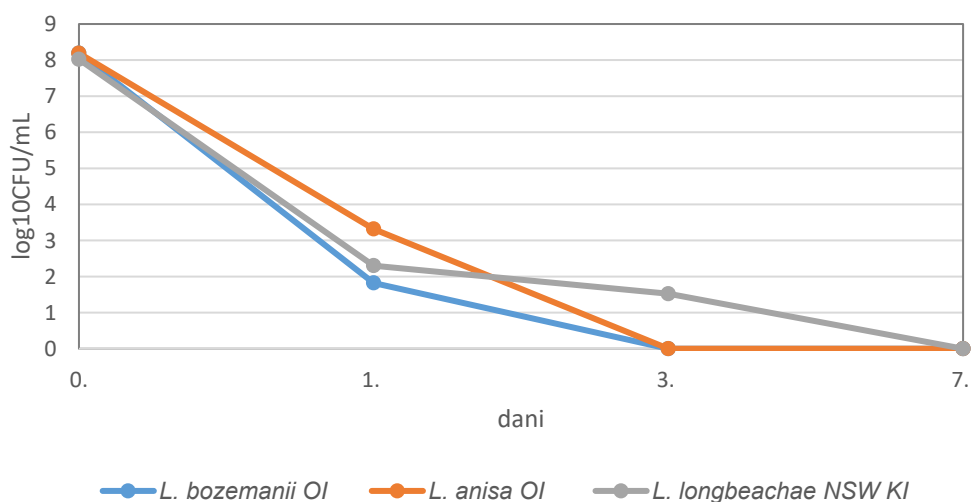
Zatim smo ispitivali preživljavanje četiri kliničkih izolata *L. pneumophila* u morskoj vodi pri 37°C. Broj bakterija se određivao 1., 3. i 7. dan nakon inokulacije. Rezultati su prikazani na Slici 4.

Iz krivulje se jasno može očitati da sa 1. dan broj bakterija najviše smanjio u slučaju *L. pneumophila* *sg1 Benidorm OI* kod koje postotak inhibicije iznosi 99.99 %, dok je kod ostalih sojeva legionela inhibicija gotovo jednaka i iznosi 99.97 %. Od 1. do 3. dana najviše pozornosti ponovno plijeni *L. pneumophila* *sg1 Benidorm OI* koji je broj bakterija isti kao i 1. dana (99.99 %). Od ostalih sojeva valja istaknuti *L. pneumophila* *sg1 Oxford OI* koja za razliku od 1. dana bilježi najveći pad u broju bakterija sa postotkom inhibicije 99.99 %. Na posljertku od 3. do 7. dana najviši broj preživjelih bakterija je kod *L. pneumophila* *sg1 Benidorm OI* (99.99 %). Najveći pad u broju bakterija vidljiv je kod sojeva *L. pneumophila* *sg1 Oxford OI* i *L. pneumophila* *sg1 Bellingham OI* (99.99 %). Kada usporedimo krivulje sa kliničkim i okolišnim izolatom možemo primijetiti da se kod okolišnih izolata broj bakterija od 1. do 7. više smanjuje i da je taj pad brži. Zbog toga dolazimo do zaključka da bakterije slabije preživljavaju u okolišnom izolatu.



Slika 5. Krivulja preživljavanja različitih okolišnih izolata (OI) *L. pneumophila* u morskoj vodi. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL.

Pratili smo i preživljavanje tri vrste legionela, *L. bozemanii*, *L. anisa* i *L. longbeachae* u morskoj vodi pri istim uvjetima.



Slika 5. Krivulja preživljavanja zasebnih vrsta legionela. Rezultati su prikazani kao logaritam srednje vrijednosti broja CFU/mL.

U slučaju kod zasebnih vrsta legionela jasno se već 1. dana vidi drastičan pad u broju bakterija, jedino valja istaknuti *L. anisa OI* kojoj broj bakterija najsporije pada (99.99 %). U razdoblju od 1. do 3. dana preživljava jedino *L. longbeachae NSW KI* (99.99 %), dok su ostali sojevi bakterija potpuno mrtvi. Posljednjeg 7. dana nijedan soj bakterija nije preživio.

5. RASPRAVA

Turizam predstavlja jedan od najvećih izvora prihoda kako u Hrvatskoj, tako i ostalim državama svijeta. Međutim, turizam što se tiče legionele predstavlja veliku prijetnju obolijevanja od iste ukoliko se ne poduzmu svi koraci u njenom sprječavanju. Naime legionela je poznata kao vrlo otporna i sveprisutna baterija. Prirodno stanište joj predstavljaju vodeni sustavi i tlo, od čega se najviše ističu veliki vodoopskrbni sustavi poput hotela. Osobito veliku prijetnju za čovjeka predstavlja ukoliko se ti vodeni sustavi ne održavaju, jer se lako prenosi inhalacijom. Klimatizacijski uređaji i ovlaživači zraka također predstavljaju čest primjer širenja zaraze legionelom. Stvari se dodatno kompliciraju kod bakterija koje su sa amebama sposobne stvoriti biofilm, najotporniju bakterijsku strukturu koja predstavlja velik javnozdravstveni problem koji je potrebno što brže riješiti. Legionela može uzrokovati tešku upalu pluća koja se može proširiti na ostale organske sustave. Bolesnici u riziku od obolijevanja posebno su imunokompromitirani bolesnici i bolesnici sa kroničnim bolestima. Dakle, problema sa legionelama može se smanjiti redovitim održavanje vodoopskrbnih sustava i dodavanjem kemijskih sredstava koji inhibiraju rast legionele.

Ovim istraživanjem obratili smo pozornost na preživljavanje legionele kroz određeno vremensko razdoblje u morskoj sredini. Uzorci morske vode koji su korišteni u ovom istraživanju prikupljeni su na otoku Lošinju. U istraživanju je praćeno preživljavanje dvanaest sojeva *L. pneumophila* u morskoj vodi i neke druge vrste legionela. U svrhu istraživanje koristila se početna doza bakterija koja je iznosila 10^8 i inkubacija se vršila na 37°C kroz 7 dana.

U proteklim istraživanjima je dokazano da povećana koncentracija NaCl-a u vodi uzrokuje isušivanje bakterijske stanice odnosno njezinu smrt. Pri koncentraciji od 5 i 10% NaCl-a broj

legionele preživljavaju do 7 dana, a pri koncentraciji od 30% NaCl-a bakterija ne preživljavaju duže od 1 dana (33).

U našem istraživanju iz navedenih krivulja može se uočiti da u slučaju kliničkih izolata iz uzorka morske vode broj bakterija značajno pada 1. dan, dok je pad broja bakterija kroz 3. i 7. dan postepen za sve sojeve, osim za soj *L. pneumophila* sgl Bellingham KI koja 7. dan ukazuje na polagan rast broja bakterija. Za usporedbu kod krivulje sa okolišnim izolatima primjetan je veći pad u broju bakterija u razdoblju od 1. do 7. dan. Broj bakterija je u padu za sve sojeve podjednako, a najizraženiji je 1. dan. Kod krivulje sa zasebnim sojevima legionela prisutan je nestanak svih bakterija već 3. dana, osim soja *L. longbeachae* NSW KI, ali taj soj ugiba 7. dana. Posljedica brzog ugibanja bakterija vjerojatno jesu nepovoljni uvjeti u morskoj vodi, prvenstveno sadržaj soli.

Iz prijašnjih studija koja su pratila preživljavanje legionela u morskoj vodi u određenom vremenskom periodu može se povući paralela i reći kako se u filtriranim uzorcima sa morskom vodom broj bakterija, konkretno je to bio slučaj sa *L. pneumophila* 130b značajno smanjuje u vrlo kratkom vremenskom periodu. Dok je primjera radi u nefiltriranoj morskoj vodi pad broja bakterija gotovo dvostruko sporiji nego je to slučaj sa filtriranim uzorcima. Pretpostavlja se da je uzrok tome raspadanje prirodne mikroflore koja time povećava količinu hranjivih tvari potrebnih za preživljavanje legionela. Velik utjecaj na broj bakterija ima i temperatura. Budući da je optimalna temperatura za rast legionela 35°C, broj bakterija je i bio najveći na toj temperaturi, odnosno kako prijašnja istraživanja nalažu da je to raspon od neki 22°C i 37°C (32). Zaključno, morska voda predstavlja nepovoljan medij za dugotrajno preživljavanje legionela, iako bi promjenom određenih faktora kao što je dodatak pitke vode ili prisutnost mikrobiote mora moglo potaknuti njezino održavanje u ovakvim sustavima. Dakle, potrebno je redovito održavanje sustava s morskom vodom gdje bi se eventualno kombiniranom dezinfekcijom moglo spriječiti preživljavanje ovih bakterija.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da bakterije uspijevaju preživjeti u uzorcima morske vode. Uzrok preživljavanja stoji u tome da je legionela vrlo otporna bakterija i uspijeva se prilagoditi na različite nepovoljne uvjete, a samo preživljavanje ne ovisi o kojem soju *L. pneumophila*. Stoga je vrlo bitno da se redovito održavaju i nadgledaju svi vodoopskrbni sustavi, neovisno o tome da li se radi o morskoj ili vodovodnoj vodi i samim time je moguće smanjiti broj oboljelih od legionarske bolesti.

7. LITERATURA

2. World Health Organization. Legionella and the prevention of legionellosis. Švicarska, World Health Organization; 2007
3. M. Potočnjak, M.Široka, D. Rebić, I. Gobin. The survival of *legionella* in rainwater. *International journal Sanitary engineering research* 6(1):30-36
4. Fields B., Benson F., Besser R. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* 15(3), 506-26
5. Washington C. Winn Jr. Legionella. U: Medical Microbiology, 4th edition. Baron S, ur. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Poglavlje 40.
6. OhnoA., KatoN., YamadaK., YamaguchiK.. Factor influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and environmental microbiology* 69(5), 2540-2547
7. Gobin I. Virulencija *Legionella longbeachae* u intratrahealno inokuliranih miševa. Magistarski rad, Medicinski fakultet, Rijeka 2005.
8. https://en.wikipedia.org/wiki/Legionella_longbeachae
9. H. Whiley, R. Bentham *Legionella longbeache* and legionellosis. *Emerging infectious diseases* 17(4), 579-583
10. R. Cameron, K. Pollock, D. Lindsay, E. Anderson. Comparison of *Legionella longbeache* and *Legionella pneumophila* cases in scotland; implications for diagnosis, treatment, and public health response *Journal of medical microbiology* 65(2), 142-146
11. M. Castellani Pastoris, R. Lo Monaco, P. Goldoni, B. Mentore, G. Balestra, L. Ciceroni, P. Visca. Legionnaires disease on a cruise ship linked to the water supply system: clinical and public health implications *Clinical infectious diseases* 28(1), 33-8

12. Allegheny county commissioners. Approaches to prevention and control of *legionella* infection in Allegheny county health care facilities. 1st edition, Allegheny health department, 1977.
13. V. Borges, A.Nunes, D. Sampaio , L. Vieira, J. Machado, M. Simões, P. Gonçalves, J. Gomes. *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person to person transmission of legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. Scientific report, 2016.
14. D. Lindsay, W. Abraham, W. Findlay, P. Christie, F. Johnston, G Edwards. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods *Journal of medical microbiology* 53(3), 183-187
15. <https://microbeonline.com/buffered-charcoal-yeast-extract-bcye-agar-composition-uses-colony-characteristics/>
16. J. Berjeaud, S. Chevalier, M. Schlüsselhuber, E. Portier, C. Loiseau, W. Aucher, O. Lesouhaitier, J. Verdon. *Legionella pneumophila*: the paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. *Frontiers in microbiology* 2016.
17. B. Tićac, I. Žižić, P. Kesovija, M. Farkaš, Đ. Pahor, T. Rukavina. Infekcije vrstom *Legionella pneumophila* u Primorsko-goranskoj županiji. *Medicina fluminensis* 45(1), 78-86
18. Lesnik R., Brettar I., Hofle MG. *Legionella* species diversity and dynamics from surface reservoir to tap water: from cold adaptation to thermophily. *The ISME journal* 10(5), 1064-1080
19. P. Sheffer, J. Stout, M. Wagener, R. Muder. Efficacy of new point of use water filter for preventing exposure to *legionella* and waterborne bacteria. *American journal of infection control* 33(5), 20-25

20. V. Yu. *Legionella* surveillance: political and social implications – a little knowledge is a dangerous thing. *The journal of infectious disease* 185(2), 259-261
21. <https://www.cdc.gov/legionella/about/causes-transmission.html>
22. S. Allegra, L. Leclerc, P. Massard, F. Girardot, S. Riffard, J. Pourchez. Characterization of aerosols containing *legionella* generated upon nebulization. Scientific report, 2016.
23. A. Rakić, D. Ljoljo, D. Ljubas. Tehničke mjere za sprječavanje razmnožavanja bakterija *Legionella* spp. u sustavima za opskrbu toplom vodom *Hrvatske vode* 96(24), 109-118
24. M. Ožanić, V. Marečić, I. Gobin, M. Šantić. Intracellular life of *Francisella* and *Legionella* within amoebae cells *Medicina fluminensis* 52(1), 49-54
25. R. Gast, D. Moran, M. Dennett, W. Wurtsbaugh, L. Amaral- Zettler. Amoebae and *Legionella pneumophila* in saline environments. *Water health* 9(1), 37-52
26. Y. Abu Kwaik, L. Gao, B. Stone, C. Venkataraman, O. Harb. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and environmental microbiology* 64(9), 3127-3133
27. M. Abdel-Nour, C. Duncan, D. Low, C. Guyard. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *International journal of molecular sciences* 14(11), 21660-21675
28. J. Mercante, J. Winchell. Current and Emerging Legionella Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clinical microbiology reviews* 28(1) 95-133
29. <http://emedicine.medscape.com/article/965492-overview#a5>
30. https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=bd9qXf7YF8OEacX8vqgH&q=l.+pneumophila&oq=l.+pneumophila&gs_l=img.1.0.0i19.29188.31704..33070...0.0..0.98.1423.16.....0....1..gws-wiz-img.....0i30.mLCUmDNdXDY
31. https://www.google.hr/search?q=ciklus+legionela+u+amebama&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjT1Ni36rfkAhXDMewKHdhuCHwQ_AUIEigB&biw=1366&bih=608#imgre=8gk_vjc1hlx93M:

32. Gašaj A. Preživljavanje legionele u morskoj vodi. Završni rad, Medicinski fakultet, Rijeka 2017.
33. Magdalenić Z. Utjecaj temperature i natrij klorida na preživljavanje *Legionella longbeachae* u vodi. Diplomski rad, Medicinski fakultet, Rijeka 2009.

8. ŽIVOTOPIS

Zovem se Filip Janeš, rođen sam 25.05.1995. u Rijeci. Osnovnu školu do 7. razreda pohađao sam u Gerovu, OŠ Petar Zrinski, zatim sam 8. razred završio u Buzetu u OŠ Vazmoslava Gržalje. Nakon toga upisao sam Opću gimnaziju u Buzetu. Zatim sam fakultetsko obrazovanje nastavio na Medicinskom fakultetu u Rijeci, smjer Sanitarno inženjerstvo.