SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Daniela Glažar Ivče

KONTAMINACIJA LEGIONELAMA U SUSTAVU DISTRIBUCIJE VODE NA TRAJEKTIMA I BRODOVIMA TE NJIHOVA MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA

Doktorski rad

Mentor: Prof. dr. sc. Darija Vukić Lušić

Komentor: Prof. dr. sc. Marina Šantić

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Daniela Glažar Ivče

CONTAMINATION OF WATER DISTRIBUTION SYSTEMS ON FERRIES AND SHIPS WITH *LEGIONELLA* AND THEIR MOLECULAR CHARACTERISATION

Doctoral thesis

Mentor: Professor Darija Vukić Lušić, PhD

Comentor: Professor Marina Šantić, PhD

Rijeka, 2025.

Mentor rada: prof. dr. sc. Darija Vukić Lušić

Komentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

Doktorski rad obranjen je dana _____na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1.

2.

3.

Rad ima list.

UDK: _____

PREDGOVOR

Doktorski rad izrađen je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije i na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su provedena u sklopu znanstveno istraživačkih projekata financiranih od Sveučilišta u Rijeci i Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske: „Prilagodba novoj EU Direktivi o kvaliteti vode za kupanje„ (UNIRI-BIOMED-18-292) čija je voditeljica prof.dr.sc. Darija Vukić Lušić i projekta "*Francisella*- molekularni mehanizmi prilagodbe na stanice ameba„ (UNIRI-BIOMED-18-128) uz voditeljicu projekta prof. dr. sc. Marinu Šantić.

ZAHVALA

Prije same odluke pri odabiru teme doktorskog rada savjetovala sam sa uvaženim stručnjacima, znanstvenicima i dragim ljudima. Prije svega želim zahvaliti na pruženoj prilici za znanstvenim radom i usavršavanjem prof. dr. sc. Vladimiru Mićoviću i prof. dr. sc. Marini Šantić. Hvala na dragocjenim savjetima, poticaju i usmjeravanju.

Najiskrenije zahvaljujem najboljoj mentorici s energijom prijatelja, prof. dr. sc. Dariji Vukić Lušić na neiscrpnoj motivaciji i inspiraciji, uloženom vremenu i trudu, te na nesebično prenesenom znanju i iskustvu. Zahvaljujem i najboljoj komentorici prof. dr. sc. Marini Šantić na usmjeravanju pri izradi rada, te stručnosti, kolegijalnosti i optimizmu. Hvala Vam za svaki neprocjenjivi zajednički trenutak poticaja, usmjeravanja, praćenja i podrške tijekom izrade doktorskog rada. Zahvaljujem na posebnom i impresivnom, znanstvenom pristupu, dubokim promišljanjima o ovoj temi i razmjeni iskustava uz izniman doprinos.

Zahvaljujem ravnatelju NZZJZ PGŽ doc. dr. sc. Željku Linšaku na podršci i dobroti kroz sve ove godine i svojim dragim suradnicima iz Nastavnog Zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije i Odjela za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju uz voditelja nasl. doc. dr. sc. Marina Glada.

Posebno zahvaljujem nasl. doc. dr. sc. Arijani Cenov, mr. sc. Vandi Piškur i doc. dr. sc. Pauli Žurga na uloženom trudu, upornosti i konstruktivnom, izvrsnom metodološkom pristupu kod obrade rezultata rada.

Zahvaljujem dragoj kolegici doc. dr. sc. Dolores Peruč na svim stručnim savjetima, pomoći i svoj podršci, uz optimizam i pozitivan pristup.

Hvala svim djelatnicima Medicinskog fakulteta koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovog doktorskog rada.

Hvala svim kolegama i kolegicama, mojim prijateljima i učiteljima koji su uvijek nalazili vremena za dijalog, kritike i sugestije tijekom izrade rada, kao i onima iz čijih sam pisanih materijala učila i koje sam u ovom radu citirala.

Zahvaljujem svim uključenim djelatnicima pomorskog prijevoza na trajektima i brodovima koji su pridonijeli izradi ovog rada. Posebno zahvaljujem Sanjinu K. na neiscrpnoj podršci i suradnji prilikom provedbe istraživanja.

Posebno zahvaljujem mojoj majci za vječnu ljubav, sigurnost uz inspirativan životni stav i afirmativnu izjavu koja me vodi kroz život:«Uvijek možeš ako misliš da možeš»

I na kraju, najveće hvala mojoj najboljoj obitelji koja je neiscrpan izvor snage i ljubavi. Prije svega, zahvaljujem suprugu Nenadu za razumijevanje, pomoć i poticaj koji mi uvijek pruža. Zahvaljujem našim sinovima. Najveće hvala Marko, Luka i Lovro za neiscrpnu snagu ljubavi koja me uvijek pokreće. Upravo Vama posvećujem ovaj rad.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: *Legionella* spp. je gram-negativna bakterija koja kolonizira vodovodne sustave brodova i trajekata, predstavljajući javnozdravstveni rizik. Zbog porasta prijavljenih slučajeva legionarske bolesti na putničkim brodovima, potrebno je bolje razumijevanje faktora koji potiču kolonizaciju i širenje. Cilj istraživanja bio je utvrditi učestalost kontaminacije *Legionella* spp. i okolišne čimbenike koji utječu na njezinu proliferaciju.

Materijal i metode: Uzorci vode prikupljeni su s plovnih ruta Jadranskog mora u Hrvatskoj. *Legionella* spp. izolirana je kultivacijom te je određen broj kolonija u 1 L vode. Serogrupe *L. pneumophila* SG 2-14 identificirane su lateks aglutinacijom. Uz mikrobiološku analizu, istraženi su fizikalno-kemijski parametri vode radi procjene njihovog utjecaja na prisutnost *Legionella*. Molekularna tipizacija provedena je metodom SBT, koja omogućava genetsku diferencijaciju sojeva.

Rezultati: Ukupno 29 % uzoraka bilo je pozitivno na *Legionella*, pri čemu je 74 % izolata pripadalo serogrupama SG 2-14. Većina pozitivnih uzoraka (62,1 %) svrstana je u srednju kategoriju opterećenosti, s najvišom učestalošću u rujnu. Dominantni sekvencni tip bio je ST 1317, prisutan u više plovnih područja, dok je fenotipska analiza pokazala da većina izolata pripada serotipu Chicago 8. Kontaminacija je bila izraženija u uzorcima s temperaturom vode ≥20 °C. Pozitivni uzorci imali su niže koncentracije klorida, nitrata i elektroprovodljivosti, dok su koncentracije metala (Pb, Cr, Cu) bile više. *Legionella* je otkrivena na 74 % brodova (14/19), a na pet (26 %) zabilježena je ponavljajuća kontaminacija. Najviša razina utvrđena je u plovnom području Rijeke.

Zaključak: Rezultati potvrđuju da su brodski vodovodni sustavi značajan rezervoar *Legionella* spp., s izraženim sezonskim i okolišnim varijacijama u kontaminaciji. Stalni monitoring i optimizacija kemijskih parametara ključni su za sprječavanje ponovne kolonizacije. Preventivne mjere, uključujući termičku i kemijsku dezinfekciju te kontrolu biofilma, smanjuju rizik legionarske bolesti. Edukacija dionika nužna je za pravovremenu provedbu preventivnih i korektivnih mjera.

Ključne riječi: analiza sekvenci (SBT), brodovi, epidemiologija, genotipizacija, javno zdravstvo, *Legionella* spp., sustavi distribucije vodoopskrbe.

SUMMARY

Objective: *Legionella* spp*.* is a Gram-negative bacterium that colonizes water distribution systems of ships and ferries, posing a public health risk. With the increasing number of reported Legionnaires' disease cases on passenger ships, a better understanding of the factors that promote colonization and spread is needed. The aim of this study was to determine the prevalence of *Legionella* spp. contamination and to identify environmental factors i that influence the spread of these bacteria.

Materials and Methods: Water samples were collected from maritime routes in the Adriatic Sea, Croatia. *Legionella* spp. were isolated using culture methods, and the colony count was determined per liter of water. Serogroups SG 2-14 of *L. pneumophila* were identified using latex agglutination. In addition to the microbiological analysis, physico-chemical water parameters were also examined in order to assess their influence on the occurrence of *Legionella.* Molecular typing was performed using sequence-based typing (SBT), enabling genetic differentiation of the strains.

Results: A total of 29% of samples tested positive for *Legionella*, with 74% of isolates belonging to serogroups SG 2-14. Most positive samples (62.1%) were classified as moderately contaminated, with the highest prevalence recorded in September. The predominant sequence type was ST 1317, which was detected in multiple maritime areas, while phenotypic analysis showed that most isolates belonged to the Chicago 8 serotype. Contamination was higher in water samples with temperatures ≥20°C. Positive samples had lower chloride, nitrate, and conductivity values, while metal concentrations (Pb, Cr, Cu) were higher. *Legionella* was detected on 74% of ships (14/19), with repeated contamination found on five (26%). The highest contamination level was found in the Rijeka maritime area.

Conclusion: The results confirm that the water systems on ships represent a significant reservoir for *Legionella* spp.*,* with pronounced seasonal and environmental variations in contamination. Continuous monitoring and optimization of chemical parameters is essential to prevent recolonization. Preventive measures, including thermal and chemical disinfection and biofilm control, are key to reducing the risk of Legionnaires' disease. Stakeholder education is crucial for the timely implementation of preventive and corrective measures.

Keywords: sequence-based typing (SBT), ships, epidemiology, genotyping, public health, *Legionella* spp., water distribution systems.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1
1.1 Povijest istraživanja roda *Legionella* 1
1.2 Epidemiologija vrsta iz roda *Legionella* 1
1.2.1 Opća obilježja *Legionella* 3
1.2.2 Životni ciklus *Legionella* 5
1.3 Patogeneza legioneloza 6
1.3.1. Mehanizmi virulencije kod *Legionella* 6
1.3.1 Imunološki odgovor domaćina tijekom infekcije s *Lp* 7
1.4 Legioneloze 8
1.4.1 Legionarska bolest 9
1.4.2 Pontijačna groznica 11
1.4.3 Ekstrapulmonalni sindrom 13
1.5 Ekologija i potencijalni okolišni izvori *Legionella* 13
1.6 Putevi prijenosa 15
1.7 Dijagnoza i terapija 15
1.8 Čimbenici rizika za čovjeka 18
1.9 Nadzor nad legionarskom bolesti u EU/EGP 20
1.10 Pojavnost legionarske bolesti u EU/EGP i Hrvatskoj 23
1.11 Čimbenici okoliša koji utječu na preživljavanje *Legionella* 23
1.11.1 Utjecaj temperature 24
1.11.2 Utjecaj simbiotskih mikroorganizama 26
1.11.3 Biofilm 30
1.11.4 Ostali čimbenici (sadržaj metala, talog) 33
1.12 *Legionella* u sustavu distribucije vode na brodovima 34
1.12.1 Plan sigurnosti vode za brodove 38
1.12.2 Mjere suzbijanja *Legionella* na brodovima 49
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 52
3. MATERIJAL I METODE 53
3.1 Uzorkovanje vode 53
3.2 Mikrobiološke metode 53
3.2.1 *Legionella* spp. 53
3.2.2 UBB/37 i UBB/22 54
3.2.3 Koliformne bakterije i *Escherichia coli* 55
3.2.4 Crijevni enterokoki 55
3.2.5 *Pseudomonas aeruginosa* 55
3.2.6 *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. 56
3.3 Fizikalno-kemijske metode i kemijske metode 57
3.3.1 Slobodni rezidualni klor 57
3.3.2 Boja 58
3.3.3 Mutnoća 59
3.3.4 pH 59
3.3.5 Električna vodljivost 60
3.3.6 Utrošak $KMnO_4$ 60
3.3.7 Kloridi (vlastita metoda modificirana) 61
3.3.8 Amonijak 62
3.3.9 Nitriti 62
3.3.10 Nitrati 63
3.3.11 Ortofosfati 64
3.3.12 Metali 64

3.4 Određivanje serogrupa ... 65
3.5 Metoda analize sekvenci (engl. *sequence-based typing*; SBT) ... 66
3.6 Statistička obrada podataka ... 66
4. REZULTATI ... 68
4.1 Udio *Legionella*-pozitivnih uzoraka, distribucija pojedinih sojeva ... 68
4.1.1 Identifikacija pojedinih serogrupa *L. pneumophila* SG 2-14 ... 68
4.2 Fenotipska i genotipska karakterizacija ... 69
4.3 Godišnja i mjesečna distribucija uzoraka ... 70
4.4 Utjecaj temperature vode ... 73
4.5 Utjecaj koncentracije slobodnog rezidualnog klora ... 76
4.6 *Legionella* vs metali ... 77
4.7 Razine opterećenosti legionelama ... 78
4.8 *Legionella*-negativni *vs* pozitivni uzorci ... 80
4.9 PCA analiza: odnos fizikalno-kemijskih parametara i prisutnosti *Legionella* ... 87
4.10 Učinak poduzetih mjera na brodu ... 89
4.11 Pojavnost *Legionella* prema plovnim područjima ... 89
5. RASPRAVA ... 91
6. ZAKLJUČCI ... 104
7. LITERATURA ... 106
ILUSTRACIJE ... 128
Popis slika ... 128
Popis tablica ... 130
Popis pokrata ... 131
Životopis ... 133

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1 Povijest istraživanja roda *Legionella*

Legionarska bolest (LB) prepoznata je u epidemijskom obliku tijekom srpnja 1976. godine u gradu Philadelphia, na području Sjedinjenih Američkih Država (SAD). Prilikom 58. godišnje konvencije 4.400 američkih ratnih, vojnih veterana, legionara, u luksuznom hotelu „Bellevue Stratford“ od intenzivne upale pluća oboljela je 221 osoba, uključujući i prolaznike, odnosno 9 % prisutnih. Stopa smrtnosti je iznosila 15 %, a umrle su 34 osobe. Uzročnik bolesti je ostao mjesecima nepoznat unatoč intenzivnom laboratorijskom istraživanju. Sva epidemiološka istraživanja bila su usmjerena prema otkrivanju uzročnika i načinu širenja bolesti. Sumnjalo se da je najvjerojatniji prijenos uzročnika bolesti aerosol klimatizacijskog sustava na mjestu odvijanja konvencije [1]. U povijesti, ovaj je događaj pobudio najveći interes šire javnosti i bio je presudan za dalja istraživanja.

Zahvaljujući naporima tima istraživača na čelu sa Davidom Fraserom, uz mikrobiologe iz Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centar for Disease Control and Prevention*; CDC) Josepha McDade i suradnika, nakon šest mjeseci izoliran je do tada nepoznati uzročnik bolesti. U čast preminulim legionarima i gradu u kojem je LB otkrivena, bakterija je nazvana *Legionella pneumophila (Lp)* [2]. Rod *Legionella* je izdvojen 1979. godine u zasebnu porodicu *Legionellaceae.* Retrospektivnom analizom zamrznutih seruma je ustanovljeno da je bolest prisutna još od 1947. godine, a isti uzročnik je, kroz analizu, povezan s ranijim neobjašnjivim i zagonetnim epidemijama respiratornih bolesti. Jedan od najistaknutijih slučajeva dogodio se 1968. godine u američkom gradu Pontiacu, kasnije nazvanom "Pontijačna groznica". Stoga se nije radilo o novoj, nego o novootkrivenoj bakteriji [3-5]. Od identifikacije LB i *Lp* 1977. godine, četiri desetljeća istraživanja biologije ovih unutarstaničnih patogena donijela su ključne uvide u molekularne mehanizme koje koriste za izazivanje bolesti kod ljudi te za svoje preživljavanje unutar ameba u okolišu.

1.2 Epidemiologija vrsta iz roda *Legionella*

Nakon otkrivanja LB, karakterizacija sojeva izoliranih u pacijenata dovela je do uspostavljanja novog bakterijskog roda, *Legionella*, koji pripada obitelji *Legionellaceae* [6]. Unutar roda *Legionella* do sada je diferencirano najmanje 66 vrsta, od kojih je za više od polovice dokazana patogenost za ljude. Unutar pojedinih vrsta postoje različite

serogrupe (SG) i trenutno ih se broji više od sedamdeset. Međutim, nisu sve vrste i SG jednako odgovorne za laboratorijski potvrđene slučajeve LB širom svijeta. Najčešći uzročnik bolesti je upravo i prvo opisana *Lp* (originalni Philadelphia soj), te je u Europi i SAD povezana sa 70 % do 90 % slučajeva oboljenja [7, 8]. *Lp* se može serološki klasificirati u 16 SG, od kojih su formalno numerirane 14 SG koje se mogu detektirati komercijalno dostupnim antigenskim testovima, te jedna SG imena Lansing 3 koja je nenumerirana [9, 10]. *Lp* SG1 odgovorna je za većinu prijavljenih slučajeva LB [11]. Ostale SG *Lp* uključujući 2 do 16, poput *Lp* SG3 i SG6, također mogu uzrokovati infekcije, ali su ti slučajevi znatno rijeđi. Dodatno, vrste poput *L. dumoffii*, *L. bozemanii* i *L. micdadei* pojavljuju se kao manje česti uzročnici oboljenja [8, 12-14]. Na području Europe oko 70 % slučajeva LB uzrokuje *Lp* SG1. Unutar sojeva *Lp* SG1 nedavno su se pojavili posebni klonovi, koji već čine više od 50 % prijavljenih slučajeva LB u sjevernoj Europi. To upućuje na adaptaciju tih klonova vodenom okolišu koje je namjenski stvorio čovjek [15].

U Europi od 20 % do 30 % slučajeva oboljenja uzrokuju *Lp* SG 2-14, a od 5 % do 10 % druge vrste *Legionella* [7]. Općenito, *Lp* SG 1, 4 i 6 su najvirulentnije, iako to ovisi i o zemljopisnom položaju, vrsti objekta i izloženoj populaciji [16]. Dakle, *Lp* SG 2-16 uzrokuju do 30 % oboljenja, iako čine više od 50 % izolata iz okoliša [17]. Utvrđena nepodudarnost učestalosti okolišnih i kliničkih izolata vjerojatnije ukazuje na postojanje razlika u virulenciji, nego na veću zastupljenost u vodi distribucijskog sustava [17], a isto se pripisuje i dijagnostičkim ograničenjima urinarnog antigenskog testa, kojim se primarno detektira *Lp* SG1.

Uvažavajući promjene u *Lp*, važno je istaknuti da sojevi unutar iste serogrupe mogu varirati na molekularnoj razini. Kako bi se osigurala točna identifikacija i praćenje tih sojeva, Europska radna skupina za infekcije legionelom (engl. *European Working Group for Legionella Infections;* EWGLI) od 2005. godine koristi tipizaciju temeljenu na sekvenci DNK (engl. *Sequence-Based Typing;* SBT) s više lokusa. Ova široko korištena metoda genotipizacije analizira specifične sekvence u genomu i omogućava razlikovanje povezanih sojeva unutar iste serogrupe, što je posebno korisno u epidemiološkim studijama i praćenju izbijanja zaraza. Internetski alati koje EWGLI koristi pomažu u standardizaciji procesa analize, olakšavaju dijeljenje i usporedbu podataka među istraživačima i zdravstvenim organizacijama.

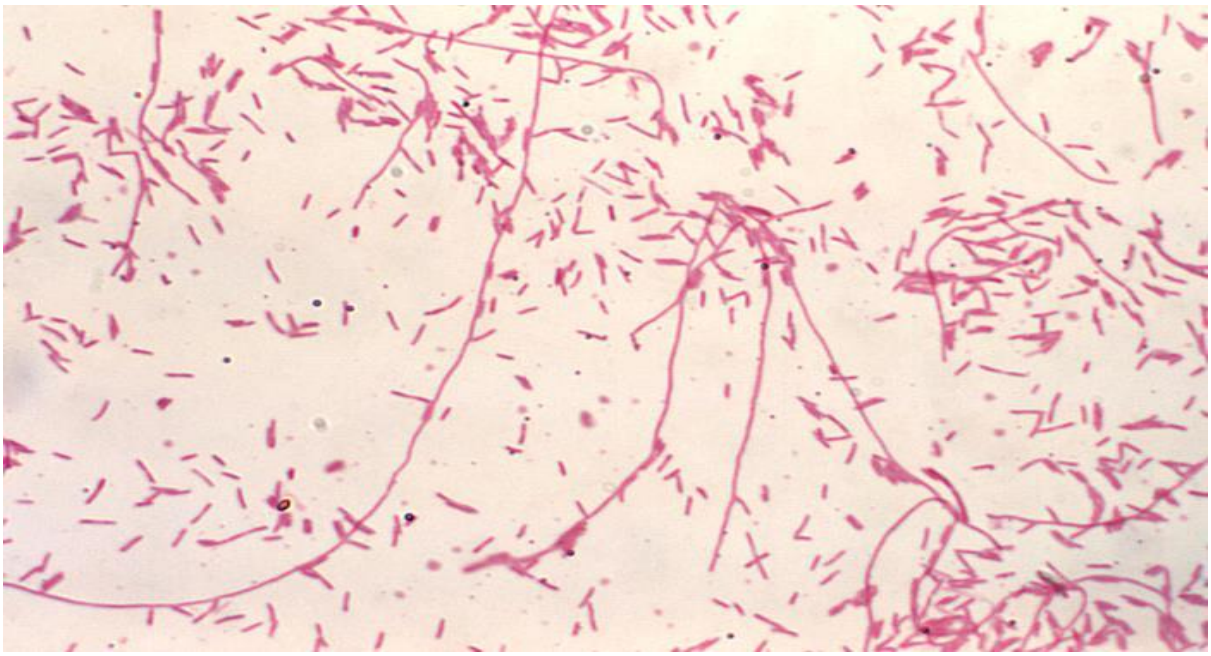
S više od 2.000 različitih tipova sekvenci (engl. *Sequence Types*; ST) za *Legionella pneumophila*, koji se razlikuju na temelju nukleotidnih sekvenci sedam

alela, tipizacija temeljem sekvenci DNK omogućava preciznu identifikaciju sojeva. Kombiniranjem SBT-a s klasičnom epidemiologijom, istraživači mogu identificirati izvore epidemija, analizirati regionalne obrasce zaraze i procijeniti postojanost sojeva u različitim okolišima. Ova integracija molekularnih tehnika s tradicionalnim metodama predstavlja učinkovit alat za unapređenje javnog zdravstva, poboljšavajući prevenciju i kontrolu legioneloze.

Primjerice, Kozak-Muizniek i suradnici su 2016. godine proveli sveobuhvatnu filogenetsku analizu stotinu sojeva *Legionella pneumophila* prikupljenih u SAD-u tijekom epidemija, sporadičnih oboljenja i nadzora okoliša, a svi sojevi su istraženi od strane CDC-a tijekom 30-godišnjeg razdoblja. U svijetu je najrasprostranjeniji ST1 unutar *Lp* SG1. U SAD-u od 1982. do 2012. godine, ovaj sekvencni tip činio je 49 % sojeva *Lp* dobivenih iz uzoraka vode i 25 % izolata sporadičnih slučajeva bolesti [18]. S druge strane, *Legionella longbeachae* (*Llb*) je jedina vrsta iz roda *Legionella* koja se prirodno nalazi u tlu i etiološki je povezana s otprilike 1 % slučajeva širom svijeta. Zanimljiva činjenica jest da je *Llb* povezana s 50 % do 60 % slučajeva oboljenja od legioneloze u Australiji i Novom Zelandu. Tijekom posljednjeg desetljeća bilježe se sve češće infekcije ovom vrstom u Europi, SAD-u [19], Kanadi [20], Tajlandu [21] i Tajvanu [22], što ukazuje na razvoj dijagnostičkih metoda detekcije i jačanje globalnog praćenja ove bakterije.

1.2.1 Opća obilježja *Legionella*

Legionella je aerobna, gram-negativna nesporogena bakterija (Slika 1). *Legionella* karakterizira slabo bojenje po Gramu, prisutnost razgranatih lanaca masnih kiselina te tanki stanični zid koji sadrži ubikinone. Širine je od 0,3 do 0,9 μm i dužine 2 do 20 μm. Ovisno o uvjetima sredine, pojavljuju se kao kokobacilarni ili filamentozni oblici, duljine i do 20 μm u starijim kulturama. Pleomorfizam je uvjetovan vanjskim faktorima, kao što su temperatura i dostupnost nutrijenata.

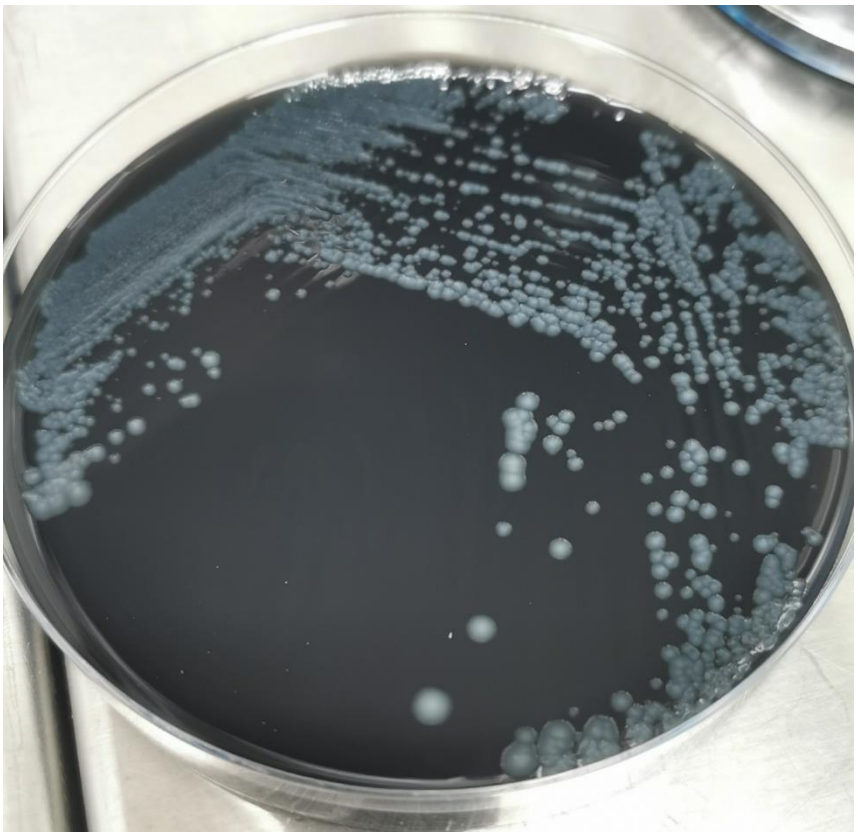


Slika 1. Mikroskopski prikaz legionela bojenjem po Gramu
(https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=6642)

Legionella je fakultativni unutarstanični mikroorganizam, što podrazumijeva da ima sposobnost preživljavanja i razmnožavanja unutar stanica domaćina. Tijekom unutarstaničnog rasta, glukoza i glicerol služe kao glavni izvori energije za legionelu, dok za izvanstanični rast, pri temperaturama od 20 °C do 42 °C, kao ključne nutritivne komponente koristi aminokiseline [23].

Interesantna je činjenica da, dok u prirodi legionele rastu u kompetitivnim sredinama, u laboratorijskim uvjetima postaju izuzetno nutritivno zahtjevne za uzgoj i ne rastu na uobičajenim hranjivim podlogama. Za njihovu kultivaciju potrebne su selektivne i diferencijalne hranjive podloge (Slika 2.).

Legionele se kultiviraju na puferiranom ugljenom agaru s ekstraktom kvasca (Buffered Charcoal-Yeast Extract, BCYE), koji sadrži ključne sastojke za njihov rast. Osim L-cisteina, koji je esencijalan za sintezu proteina, u podlogu se dodaju i soli željeza te α-ketoglutarat, a pH vrijednost se održava na razini od 6,9, kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast. Legionele posjeduju enzim katalazu, koji im pomaže u zaštiti od toksičnih peroksida tijekom metabolizma. Što se tiče pokretljivosti, legionela se pokreće pomoću jedne do dvije flagele koje su smještene polarno ili subpolarno. Osim toga, bakterije se na površinama adheriraju pomoću pila, koje im omogućuju da se učvrste u okruženju i prežive u kompetitivnim uvjetima.



Slika 2. Prikaz kolonija *Legionella* na BCYE hranjivoj podlozi nakon 10 dana inkubacije na 37 °C u modificiranoj atmosferi (2,5 % CO2).

1.2.2 Životni ciklus *Legionella*

Legionele se odlikuju fenotipski različitim dvofaznim životnim ciklusom, u kojem prelaze iz jedne faze u drugu. Razlikujemo nepokretnu, replikativnu fazu te virulentnu/transmisivnu fazu koja uključuje flagelarno kretanje i sposobnost infekcije [24]. Diferencijacija, koja uključuje metaboličke i morfogenetičke promjene, događa se tijekom prijelaza iz unutarstaničnog u izvanstanično okruženje. Ove promjene su rezultat varijacija u ekspresiji gena [25]. U jednostavnom modelu, kada su uvjeti povoljni za replikaciju, kao što je okruženje bogato hranjivim tvarima, *Lp* potiskuje ekspresiju određenih osobina, poput pokretljivosti, otpornosti i citotoksičnosti. Umjesto toga, *Lp* izražava gene potrebne za intracelularnu replikaciju i razmnožavanje unutar domaćinskih stanica, koristeći resurse dostupne u domaćinu. Kada se broj bakterija poveća i dostupnost hranjivih tvari smanji, *Lp* prestaje s replikacijom [26]. Ključni regulator prijelaza između ovih faza je CsrA (regulator za pohranu ugljika A), RNK-vezujući protein koji djeluje kao globalni represor prijenosnih gena tijekom replikativne faze [27, 28].

1.3 Patogeneza legioneloza

1.3.1. Mehanizmi virulencije kod *Legionella*

Mehanizmi virulencije *Lp* su složeni, nepotpuno razjašnjeni i predmet kontinuiranog istraživanja. Uočene su značajne sličnosti u procesima kojima *Legionella* inficira protozoe i fagocitne stanice sisavaca [29-31]. Interakcija virulentnih sojeva *Legionella* s fagocitnim stanicama može se sažeti u nekoliko ključnih koraka: prvo, bakterije se vežu za receptore na površini eukariotskih stanica (adherencija). Nakon toga dolazi do fagocitoze, pri čemu stanice domaćina unose bakterije. *Legionella* zatim razvija strategije za izbjegavanje baktericidnih mehanizama domaćina, što omogućava formiranje replikativne vakuole (fagosoma) unutar stanice, gdje se bakterije razmnožavaju. Na kraju, proces može dovesti do uništenja stanice domaćina, čime se oslobađaju nove bakterije.

Legionele imaju sličan životni ciklus unutar protozoa i ljudskih makrofaga, no postoje značajne razlike u mehanizmima koje koriste za ulazak i izlazak iz tih stanica domaćina. Samo virulentni sojevi mogu se razmnožavati unutar makrofaga i inhibirati fuziju fagosoma s lizosomima [32]. Ovaj proces dovodi do smrti makrofaga i oslobađanja velikog broja bakterija iz stanice. Površinske strukture imaju važnu ulogu za patogenost *Legionella* [33, 34].

Adherencija, nakon kojeg slijedi ulazak bakterija u stanice domaćina, ključan je korak u ciklusu infekcije. Bakterijski površinski proteini koji sudjeluju u prianjanju i ulasku *Legionella* u alveolarne makrofage i protozoe uključuju glavni protein vanjske membrane (engl. *Major Outer Membrane Protein*; MOMP), protein toplinskog šoka (engl. *Heat Shock Protein 60*; HSP60) i glavni protein za infektivnost (engl. *Macrophage infectivity potentiator*; Mip). MOMP se veže za komplementarnu komponentu C3 i posreduje u unosu *Legionella* putem receptora makrofaga za komplementarne komponente CR1 i CR3 [34]. Fagocitoza bakterija od strane makrofaga također se odvija putem mehanizma koji nije ovisan o komplementu [35].

Jedan od proteina *Legionella* jasno povezan s virulentnošću je Mip [36]. Smatra se da je Mip protein konzerviran u cijelom rodu [37-39], te je potreban za učinkovitu infekciju fagocitnih stanica sisavaca i protozoa [40], no njegov mehanizam djelovanja nije u potpunosti istražen. Na virulenciju utječu okolišni čimbenici kao što su temperatura, hranjive tvari i koncentracije natrija. Analiza procesa infekcije u humanim

stanicama identificirala je određene opće čimbenike koji mogu utjecati na virulentnost, uključujući ekspresiju višestrukih proteina tijekom infekcije makrofagima [41], lučenje određenih proteaza [42], te sadržaj plazmida u *Lp* koji mogu prenositi različita svojstva potrebna za unutarstanično preživljavanje [43, 44].

Poznato je ukupno VII tipova sekrecijskog sustava bakterija. Ključnu ulogu u legionelama ima sustav izlučivanja tipa IV. Unutar lokusa koji kodira sustav izlučivanja tipa IV, poznatog kao Dot/Icm, nalazi se 24 gena neophodna za sposobnost infekcije stanica domaćina. Ovi geni doprinose sprječavanju razgradnje bakterija unutar fagolizosoma i omogućavaju unutarstanično razmnožavanje u stanicama sisavaca i protozoa [45].

Geni kao što su *pilE* (engl. *coding for the pilin protein*) i *pilD* (engl. *coding for prepilin peptidase*) važni su za unutarstanični rast *Legionella*. Ostali lokusi uključeni u unutarstanično preživljavanje su mak (engl. *macrophage killing*), mil (engl. *macrophage-specific infectivity loci*) i pmi (engl. *protozoan and macrophage infectivity*). Nedostaci u bilo kojem od ovih lokusa ometaju ili prekidaju unutarstanični rast legionela [46-48].

1.3.1 Imunološki odgovor domaćina tijekom infekcije s *Lp*

Inhalacijom ili aspiracijom kontaminiranog aerosola legionele dospijevaju u pluća. Bakterije su fagocitirane od strane alveolarnih makrofaga, a ovaj proces unutarstaničnog rasta i razmnožavanja *Legionella* predstavlja ključni trenutak u patogenezi. *Legionella* proizvode čimbenike virulencije koji stimuliraju fagocitozu, omogućuju unutarstanično preživljavanje i potiču razmnožavanje bakterija. Nakon unutarstanične replikacije, legionele ubijaju makrofage i prelaze u izvanstanično okruženje, gdje ih ponovo fagocitiraju drugi makrofagi.

Porast broja *Legionella* u plućima nastaje uslijed intezivnog razmnožavanja u makrofagima. Inficirani makrofagi luče citokine i kemokine koji potiču upalni odgovor. Ove signalne molekule privlače neutrofile, monocite koji se transformiraju u makrofage, te eritrocite, što dovodi do stvaranja edema [49].

Imunološki odgovor se dodatno inducira putem tol receptora (engl. *Toll-like receptors*; TLR) na makrofagima i drugim imunosnim stanicama, što rezultira produkcijom citokina i kemokina.

Tijekom infekcije, proupalni citokini imaju ključnu ulogu u obrani domaćina od *Legionella.* Posebno su značajni interferon gama (engl. *Interferon-gamma*; IFN-γ) i

čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor-alpha*; TNFα). NK stanice izlučuju IFN-γ kao odgovor na interleukine (IL), prvenstveno na IL-12 i IL-18 [50, 51]. Kod infekcije *Legionella*, monociti izlučuju IL-12, koji je ključan za nakupljanje NK stanica u plućima i poticanje izlučivanja IFN-γ [50, 52].

Prijenos signala putem TNF-α receptora TNFR1 i TNFR2 ima ključnu ulogu u obrani domaćina od *Lp* [53]. Ovi receptori aktiviraju niz intracelularnih puteva koji potiču upalni odgovor i proizvodnju citokina. Ipak, nekoliko proteinskih efektora *Lp*, uključujući Lgt1-3, SidI, SidL, LegK4 i RavX, inhibiraju sintezu proteina domaćina, što ometa proizvodnju citokina tijekom infekcije. Unatoč snažnoj inhibiciji koju uzrokuju ovi proteinski efektori, stanice zaražene s *Lp* i dalje pojačano izlučuju IL-1 [54]. Signalizacija posredovana IL-1 receptorom (IL-1 R) je ključna za poticanje proizvodnje proupalnih citokina, kao što su IL-12, TNFα i IL-6, od strane monocita i neutrofila [55].

Adaptivan imunološki odgovor na infekciju legionelama je slab i ne osigurava produženi imunitet protiv ovog patogena, što se potvrđuje učestalim prijavama reinfekcija [56]. Iako humoralna imunost doprinosi obrani domaćina, ona nema ključnu ulogu tijekom LB, jer specifična antitijela ne uspijevaju spriječiti intracelularnu replikaciju patogena u plućnim alveolarnim makrofagima.

Obrana domaćina od *Legionella* prvenstveno ovisi o staničnoj imunosti, koja je posredovana putem CD4+ i CD8+ T limfocita [57]. Ova komponenta imuniteta postaje posebno važna kod imunokompromitiranih bolesnika, kod kojih se javlja veća učestalost bolesti, s težim kliničkim simptomima. Osobe s oslabljenim staničnim imunitetom, poput onih nakon transplantacije organa ili onih koji primaju dugotrajnu terapiju imunosupresivnim lijekovima, suočavaju se s povećanim rizikom od razvoja težih oblika bolesti, što dodatno naglašava važnost stanične imunosti u obrani od ovog patogena [58].

1.4 Legioneloze

Legionele dospijevaju do pluća inhalacijom ili aspiracijom kontaminiranog aerosola [59, 60]. Izvor infekcije je kontaminirana voda ili zemlja, u kojoj se bakterije mogu naći u slobodnom obliku ili unutar ameba i/ili biofilma [61].

Infektivna doza *Legionella* u kontaminiranom aerosolu koja može izazvati bolest nije potpuno definirana, a varira ovisno i o imunološkom statusu osobe. Sikora i suradnici navode da koncentracije *Legionella* od 10^3 do 10^5 CFU/L mogu uzrokovati sporadične slučajeve oboljenja, dok se viša koncentracija, iznad 10^5 CFU/L, obično

povezuje s epidemijama [62]. Kada se razmatra pojava kliničkih znakova bolesti, presudni su infektivna doza uzročnika te imunološki status domaćina.

Tijekom infekcije kod ljudi, bakterije se razmnožavaju unutar alveolarnih makrofaga, što dovodi do atipične upale pluća. Osim pluća, ove bakterije mogu zahvatiti različite organe i sustave, što rezultira različitim simptomima i kliničkim slikama. Legionele mogu izazvati legionarsku bolest, koja je potencijalno smrtonosna atipična upala pluća. Osim toga, mogu prouzročiti i Pontijačnu groznicu, koja se klinički očituje kao kratkotrajna, samolimitirajuća bolest s povišenom tjelesnom temperaturom, slična gripi.

1.4.1 Legionarska bolest

Legionarsku bolest uzrokuje bakterija *L. pneumophila*. Prosječno vrijeme inkubacije bolesti iznosi od 2 do 10 dana, s medijanom od 6 do 7 dana [63, 64]; međutim, zabilježena su i dulja inkubacijska razdoblja, od 16 do 20 dana, najčešće kod hospitaliziranih i imunokompromitiranih pacijenata [65]. Epidemiološko istraživanje grupiranja oboljelih od ove bolesti, provedeno na sajmu cvijeća u Nizozemskoj, pokazalo je da 16 % slučajeva imalo je inkubaciju dužu od 10 dana, s medijanom od 7 dana [66, 67].

Razdoblje inkubacije može varirati ovisno o razini izloženosti bakteriji *Legionella* [68]. Stoga je ključno prikupljati informacije u epidemiološkoj anamnezi najmanje 14 dana prije pojave simptoma kod slučajeva infekcija stečenih u zajednici. Tijekom bolesti često izostaju karakteristični pokazatelji koji bi omogućili jasnu diferencijaciju atipične intersticijske pneumonije izazvane legionelom od drugih oblika pneumonija, a ne postoji ni specifičan simptom koji bi ukazivao na ovu infekciju. Uz to, važno je naglasiti da neće svi izloženi pojedinci razviti simptome bolesti [69].

LB manifestira se s različitim težinama kliničke slike, koje mogu varirati od blagih do vrlo ozbiljnih upala pluća s visokom stopom mortaliteta. LB čini 1 % do 10 % svih pneumonija u općoj populaciji (engl. *Community Acquired Pneumonia*; CAP). Obično započinje kao atipična pneumonija ili intersticijska bronhopneumonija i u prosjeku je teža u usporedbi s drugim atipičnim pneumonijama, poput onih uzrokovanih pneumokokom. Klinički simptomi LB su indikativni. Započinje s akutnim febrilnim stanjem, često praćenim tjelesnom temperaturom iznad 40 °C, zimicom, drhtavicom, izraženom općom slabošću i malaksalošću. Kod oboljelih od legionarske bolesti prisutne su intenzivne glavobolje, bolovi u mišićima i zglobovima, te probavne smetnje

poput bolova u abdomenu, povraćanja i dijareje u 50 % slučajeva. Klasični kataralni simptomi respiratornog trakta nisu prisutni, a kašalj se obično javlja dva do pet dana nakon početka bolesti. Kašalj je intenzivan i nadražajan, a s vremenom se razvija produktivan iskašljaj, bol u prsima te otežano i ubrzano disanje [70].

Dijagnostika pneumonije često se provodi kliničkim i rendgenskim pregledom do petog dana od početka legionarske bolesti. Rendgenski nalazi kod prethodno zdravih pacijenata oboljelih od LB obično pokazuju intersticijsku bronhopneumoniju, s čestim mrljastim infiltratima, a može doći i do lobarne konsolidacije. U imunosuprimiranih pacijenata ili onih koji nisu adekvatno terapijski zbrinuti, mogu se primijetiti progresivne promjene u vidu homogenih multifokalnih infiltrata. U gotovo polovice pacijenata prisutne su bilateralne promjene, dok u trećini pacijenata rendgenski nalazi pokazuju znakove pleuralnog izljeva. Epidemiološka anamneza, rendgenski nalazi pluća, klinički simptomi i laboratorijski rezultati ukazuju na akutnu bakterijsku infekciju. Laboratorijski nalazi često pokazuju visoku sedimentaciju, C-reaktivni protein (CRP) iznad 200 mg/L, povišene leukocite uz skretanje ulijevo i neutrofiliju, osim kod imunosuprimiranih pacijenata. Također, do 50 % pacijenata ima umjereno povišene jetrene aminotransferaze. Međutim, prisutni znaci i simptomi su nespecifični, što otežava diferencijaciju između različitih etiologija pneumonija u općoj populaciji.

Pacijenti s LB u 50 % slučajeva imaju neurološke smetnje, uključujući somnolenciju, encefalopatiju, cerebralnu ataksiju te psihotične poremećaje poput halucinacija, dezorijentacije i bipolarnog afektivnog poremećaja. Ovi poremećaji mogu se javiti već u prvom tjednu bolesti. Fizikalni pregled često otkriva tremor ekstremiteta, hiperaktivne reflekse, odsutnost dubokih refleksa tetiva i znakove cerebralne disfunkcije. Ostali neurološki deficiti povezani s LB mogu uključivati rezidualnu cerebralnu disfunkciju [71], retrogradnu amneziju te cerebelarne simptome [72].

Klinički sindrom može biti izražen kod imunokompromitiranih pacijenata, uz simptome koji uključuju kardiovaskularne, hepatičke i bubrežne smetnje. Nepravovremena i zakašnjela dijagnoza, zajedno s neadekvatnom terapijom, može dovesti do progresije LB. U teškim slučajevima, mogući su letalni ishodi uslijed komplikacija kao što su akutno zatajenje respiratornog sustava, akutna bubrežna insuficijencija i multisustavno organsko zatajenje. U diferencijalnoj dijagnozi atipičnih pneumonija važno je razmotriti LB na temelju progresivne kliničke slike, rendgenskih i

laboratorijskih nalaza, uz epidemiološku anamnezu i neodgovarajući odgovor na terapiju betalaktamskim antibioticima [73, 74].

U općoj populaciji, učestalost LB kreće se od 0,1 % do 5 %, dok je među hospitaliziranim osobama izloženim bakteriji *Legionella* između 0,4 % i 14 %. Stopa smrtnosti ovisi o težini bolesti, načinu stjecanja, pravodobnom dijagnosticiranju infekcije i drugim prisutnim čimbenicima rizika [75-77]. Najveći mortalitet od LB zabilježen je u nozokomijalnim epidemijama, osobito kod imunodeficijentnih pacijenata koji nisu adekvatno liječeni, dok je najmanji mortalitet zabilježen tijekom velikih epidemija [78, 79]. Prosječni mortalitet sporadičnih slučajeva LB kreće se između 10 % i 15 %, pri čemu iznosi 5 % u općoj populaciji, a do 15 % među imunokompromitiranim i hospitaliziranim pacijentima [72, 80].

Mortalitet nozokomijalno stečene LB smanjio se za 50 % u posljednja dva desetljeća, zahvaljujući napretku rane dijagnostike i pravovremenog liječenja odgovarajućom antimikrobnom terapijom. U SAD-u je 1997. godine stopa smrtnosti od LB bila do 40 % za nozokomijalne infekcije, u usporedbi s 20 % kod slučajeva stečenih u zajednici [81]. Napretkom rane dijagnostike i terapije, podaci iz 2007. godine iz SAD-a i Australije pokazuju pad smrtnosti na 14 % za nozokomijalne infekcije i 5 % do 10 % za infekcije stečene u zajednici [82, 83]. Prema izvješću Europskog centra za kontrolu bolesti (engl. *European Centar for Disease Control*; ECDC) iz 2020. i 2021. godine, 9 % slučajeva LB u zemljama Europske unije i Europskog gospodarskog prostora (EU/EGP) imalo je smrtni ishod [84, 85].

1.4.2 Pontijačna groznica

Za razliku od LB, Pontijačna groznica ima visoku stopu oboljenja koja pogađa do 95 % izloženih pojedinaca [3]. Nakon inkubacijskog perioda od 24 do 48 sati, bolest se manifestira kao akutna, kratkotrajna, samoograničavajuća febrilna bolest bez pneumonije, slična gripi. Klinička slika uključuje vrućicu, opću slabost, glavobolje, vrtoglavicu, mijalgije, probavne smetnje i dijareju, uz moguće druge simptome [86]. Rendgenska dijagnostika obično pokazuje uredne nalaze pluća, bez znakova pneumonije. Oporavak pacijenata najčešće nastupa unutar tjedan dana, a liječenje je potporno, usmjereno na ublažavanje simptoma.

Budući da mnoge druge bolesti nalikuju Pontijačnoj groznici, dijagnoza se postavlja prepoznavanjem tipičnih kliničkih značajki tijekom epidemija. Sporadični slučajevi vjerojatno će ostati neprepoznati [87]. Pontijačna groznica može biti

nedijagnosticirana u djece, s obzirom na to da su u toj populaciji česte febrilne bolesti koje su obično samoograničavajuće [88]. Nejasno je zašto pacijenti obolijevaju od Pontijačne groznice, a ne od upale pluća. Patogeneza bolesti se istražuje, a postoje pretpostavke o nekoliko putova za razvoj Pontijačne groznice, uključujući bakterijske toksine, imunološki odgovor na alergene te izloženost i reakciju na amebe koje sadrže legionele [89].

Pontijačna groznica je samolimitirajuća bolest koja ne zahtijeva liječenje antibiotskom terapijom, što dovodi do pretpostavke da bolest nije isključivo povezana s infekcijom tim bakterijama. Tijekom ožujka 2004. godine među gostima hotela u Oklahomi došlo je do epidemije LB i Pontijačne groznice. Provedeno je istraživanje s ciljem identifikacije izvora i procjene korisnosti testa na *Legionella* antigene u urinu te serološkog testiranja prilikom dijagnosticiranja Pontijačne groznice. Dokazano je da testiranje na *Legionella* antigene u urinu, sa ili bez serološkog testiranja, može biti korisno za potvrdu slučajeva Pontijačne groznice uzrokovanih s *Lp* SG1, uz povezanost obolijevanja s aspiracijom ili inhalacijom kontaminiranog aerosola istim uzročnikom [90].

Bitan je i mehanizam izlaganja, jer su neke epidemije povezane s oboljelima od LB i Pontijačne groznice, dok su druge vezane isključivo uz oboljele od Pontijačne groznice [91, 92]. Bolest je najčešće povezana s izlaganjem *Lp*, iako se ostale vrste, poput *L. feelii, L. micdadei i L. bozemanii*, također mogu povezati s razvojem Pontijačne groznice [93-96]. Istraživanje Remen i suradnika iz 2011. godine pokazuje povezanost između Pontijačne groznice i izlaganja izvorima vode s višim koncentracijama *Legionella* spp. od 10^3 CFU/L. Zanimljivo je da su medicinski djelatnici mlađe dobi imali veći rizik, što sugerira da dugotrajno ili prethodno izlaganje može potaknuti imunološki odgovor koji pruža određenu zaštitu [97].

Rijetko se javljaju komplikacije Pontijačne groznice, no one mogu uključivati akutni encefalomijelitis, koji je zabilježen u trećem tjednu bolesti uzrokovane *L. cincinnatiensis* [98]. Osim toga, Pontijačna groznica je također povezana sa stvaranjem endotoksina [94]. Upravo ovi endotoksini mogu izazvati komplikacije tijekom bolesti, uključujući febrilna stanja, toksični šok i potencijalno letalne ishode. S obzirom na to, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnila uloga endotoksina u ranoj fazi Pontijačne groznice uzrokovane legionelama. Jedan od značajnih slučajeva je epidemija u Škotskoj, gdje su zabilježeni simptomi Pontijačne groznice uzrokovane *L. micdadei*, poznata kao Lochgoilhead groznica [99].

1.4.3 Ekstrapulmonalni sindrom

Vrlo rijetko se javlja ekstrapulmonalni sindrom kao komplikacija primarne LB. Ovo stanje nastaje kada se *Legionella* proširе izvan respiratornog sustava i dospiju u različite organe, a to je potvrđeno obdukcijskim nalazima. Diseminacija *Legionella* putem krvi može dovesti do zahvaćanja različitih organa i organskih sustava, uključujući srce, središnji živčani sustav, bubrege, jetru, slezenu, koštanu srž, zglobove, ingvinalne i intratorakalne limfne čvorove, kao i probavni trakt oboljelih [100].

Ekstrapulmonalni sindrom može se javiti prije ili nakon pneumonije i može biti jedini znak relapsa bolesti [101]. Kliničke manifestacije ekstrapulmonalnih infekcija legionelama često su složene i kompleksne. Legionele su povezane sa slučajevima sinusitisa, celulitisa, pankreatitisa, peritonitisa i pijelonefritisa, najčešće kod imunokompromitiranih bolesnika [101, 102]. Lowry i suradnici su prije tri desetljeća izvijestili o trinaest ekstrapulmonalnih infekcija legionelama, uključujući apscese mozga i infekcije sternalnih rana [100]. Najčešće zahvaćen organ je srce, a legionele mogu uzrokovati komplikacije bolesti poput miokarditisa, perikarditisa i endokarditisa. Endokarditis etiološki povezan s legionelama zabilježen je u nekoliko publikacija, pri čemu su svi prijavljeni slučajevi uključivali pacijente s implantiranim protetskim zalistkom [103-109]. U kliničkoj slici pacijenata su se razvili simptomi poput febrilnog stanja niskog stupnja, noćnog znojenja, gubitka tjelesne težine, opće slabosti, uz znake kongestivnog zatajenja srca i vegetacije na ehokardiografiji [110].

Legionele se rijetko šire u živčani sustav; međutim, kada se to dogodi, mogu dovesti do neuroloških manifestacija kao što su encefalomijelitis, disfunkcija malog mozga i periferna neuropatija [111]. Meningoencefalitis uzrokovan legionelama može imati sličnu kliničku sliku i simptome kao infekcije uzrokovane drugim patogenima, poput virusa herpesa, što je važno razmotriti u diferencijalnoj dijagnozi [112].

Od četiri vrste *Legionella* odgovorne za ekstrapulmonalne infekcije, *Lp* najčešće je izolirana bakterija [100].

1.5 Ekologija i potencijalni okolišni izvori *Legionella*

Legionele su okolišne i ubikvitarne gram-negativne bakterije koje se obično nalaze u slatkovodnim ekosustavima i umjetno konstruiranim vodnim sustavima [113]. Voda predstavlja prirodni rezervoar za legionelu, međutim, u prirodnom vodenom okolišu prisutne su u malim brojevima i niskim koncentracijama. Legionele se razmnožavaju do visokih koncentracija i koloniziraju antropogene vodene sustave koje

je čovjek namjenski izgradio. U tim vodnim sustavima, *Legionella* se veže i kolonizira površine izrađene od različitih materijala, poput plastike, propilena, polistirena, stakla i drva. U usporedbi s većinom bakterija koje obitavaju u vodi, legionele su vrlo otporne na vanjske uvjete, posebno na niže pH vrijednosti i kratko izlaganje višim temperaturama. Osim toga, neke vrste bolje rastu u prisutnosti viših koncentracija CO_2 u atmosferi [114].

Legionella se često nalaze u vodnim sustavima različitih građevina, uključujući rashladne tornjeve, sustave distribucije tople i hladne vode u velikim kompleksima kao što su hoteli, kampovi, lječilišta i bolnice. Također, prisutne su u objektima gdje se pruža socijalna skrb, kao što su domovi za korisnike smještaja, vrtići, škole i druge obrazovne ustanove, kao i u učeničkim i studentskim domovima, sportskim dvoranama, kaznenim ustanovama, vojarnama, uredskim kompleksima, tvornicama i postrojenjima, poslovnim zgradama, trgovačkim centrima, te različitim putničkim plovilima kao što su brodovi, trajekti i kruzeri. Legionele se mogu prenijeti aerosolom putem inhalacije ili aspiracije u slučaju kontaminacije sustava. Također su povezane s infekcijama izazvanim putem drugih uređaja, kao što su oprema za respiratornu terapiju, uređaji za zamagljivanje, spa bazeni i hidromasažne kade, uključujući sve sustave ili opremu koji sadrže, pohranjuju ili recirkuliraju kontaminiranu vodu koja se može aerosolizirati.

Potencijalni izvori legionela koji zahtijevaju istraživanje prilikom procjene rizika uključuju spremnike tople i hladne vode, instalacije, sustave distribucije tople i hladne vode, perlatore (štedne ventile na izljevnim mjestima), slavine, tuševe, mobilne toaletne kabine, hidromasažne kade, spa i termalne bazene, ovlaživače u klimatizacijskim uređajima i ovlaživače zraka, kondenzacijske posude u klima uređajima i ventilatorskim zavojnicama, isparavajuće hladnjake, protupožarne sustave (hidrante), sustave navodnjavanja, ukrasne fontane, izvore vode povezane s zemljom i kompostom, rashladne tornjeve, te respiratore i medicinske instrumente.

Infekcije uzrokovane legionelama prema načinu ili mjestu nastanka dijele se na one stečene u zajednicama, koje nisu povezane s putovanjima, bolničkim sredinama i kućanstvima. Nadalje, razlikujemo infekcije stečene u domovima putem vodoopskrbne mreže te nozokomijalne infekcije u zdravstvenim ustanovama. Također, postoji kategorija infekcija nastalih tijekom putovanja unutar zemlje i u inozemstvu, koje čine oko 50 % svih slučajeva.

1.6 Putevi prijenosa

U slučaju kontaminiranog izvora, vjerojatnost bolesti uzrokovane legionelom ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući koncentraciju bakterija u vodi, sposobnosti stvaranja i širenja aerosola uz imunološki status domaćina. Inhalacija kontaminiranog vodenog aerosola glavni je put prijenosa *Legionella*, dok se u rijetkim slučajevima može prenijeti aspiracijom ili inhaliranjem aerosola iz vlažne zemlje, tla i komposta [114]. *Legionella* obično nastanjuje slatkovodna okruženja povezana s biofilmovima ili se nalazi unutar ameba. Aerosolizacija iz kontaminiranog izvora omogućava širenje bakterija, pri čemu čestice promjera manjeg od 5 μm mogu duboko ući u dišne putove i uzrokovati legionelozu/LB [115].

Aerosoli iz hidromasažnih kupki i rashladnih tornjeva imaju veću vjerojatnost da će ući duboko u pluća. Infekcije uzrokovane legionelama mogu se povezati s izvorima zaraze udaljenim do 3,2 km [116]. Istraživanja također sugeriraju mogućnost povezanosti infekcija s izvorima *Legionella* i na puno većim udaljenostima [117]. Ako su atmosferski uvjeti povoljni, poput relativne vlažnosti i smjera vjetra, kontaminirani aerosoli mogu se proširiti na nekoliko desetaka kilometara i uzrokovati LB [118]. Dokazi ukazuju da je virulentnost ključan faktor opstanka *Legionella* u aerosolima, pri čemu najvirulentniji sojevi preživljavaju dulje od manje virulentnih [119].

L. longbeachae, koja se često nalazi u mješavinama tla i komposta, uključujući one s kompostiranom borovom korom, vjerojatno je povezana s populacijama ameba i biofilma. Putovi prijenosa *Llb* se istražuju i mogu uključivati udisanje aerosoliziranih čestica nastalih tijekom manipulacije kontaminiranim pripravcima iz tla. Stoga su aktivnosti poput poljoprivrede, vrtlarstva i korištenja tla za lončanice prepoznati kao specifični čimbenici rizika koji su povezani s infekcijama uzrokovanim *Llb* [120].

1.7 Dijagnoza i terapija

Za postavljanje dijagnoze LB koriste se metode koje se razlikuju po specifičnosti, osjetljivosti, fazi bolesti za koju se primjenjuju, trajanju i dostupnosti. Najčešće korištene metode uključuju dokazivanje antigena u urinu, iskašljaju ili sputumu, kultivaciju respiratornih uzoraka, serološke analize te metode detekcije temeljene na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR). Pravodobna dijagnostika i liječenje antibioticima, uključujući makrolide, kinolone i tetracikline, iznimno su važni. Specifični mikrobiološki testovi za postavljanje etiološke

dijagnoze LB obično su visoko specifični, ali nisko osjetljivi. U praksi se često kombiniraju različite dijagnostičke mikrobiološke metode radi točnije dijagnoze.

Kod infekcije legionelama, pravovremena detekcija i postavljanje dijagnoze od ključne su važnosti za konačni ishod bolesti, posebno kod rizičnih skupina. Pacijenti s LB stečenom u zajednici obično pokazuju simptome pneumonije te izvanpulmonalne simptome, uključujući gastrointestinalne i neurološke manifestacije, relativnu bradikardiju, hipofosfatemiju te povišene razine serumskog feritina [121], ili kombinaciju tih simptoma. Osim kliničkih znakova, laboratorijska potvrda infekcije je neophodna za dijagnozu. Za tu svrhu razvijene su posebne metode otkrivanja *Legionella*, koje uključuju analize ispljuvka ili respiratornih sekreta, uzoraka tkiva, krvi, seruma i urina [122]. Ove metode obuhvaćaju serološke testove, testove na bazi antitijela, bakterijsku kulturu, testove urinarnih antigena te PCR metode [122, 123].

U početku je serologija bila metoda izbora za procjenu infekcija *Legionella*, no njezina upotreba značajno je opala zbog razvoja jednostavnijih i bržih metoda, poput testa urinarnog antigena i PCR metode. Serološki testovi detektiraju titar specifičnih protutijela i ponekad pružaju posredne informacije o LB u kliničkoj praksi. Najčešće se koriste test indirektne imunofluorescencije (engl. *Indirect Immunofluorescent Assay*; IFA) i enzimski vezan imunosorbentni test (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent* Assay; ELISA), pri čemu ELISA ima prednost zbog veće osjetljivosti. Međutim, detekcija protutijela ima nisku osjetljivost i specifičnost, pa je potrebno testirati obje serije: akutni i rekonvalescentni serum [124].

Serologija ostaje relevantna za retroaktivna epidemiološka istraživanja, osobito kada se uzročnik ne može izolirati unatoč čvrstim dokazima bolesti uzrokovane legionelom [122]. Izravna imunofluorescencija (engl. *Direct Fluorescent Assay*; DFA) je učinkovita metoda za detekciju antigena *Legionella* u uzorcima dišnog sustava. Ova tehnika se često koristi za identifikaciju ovog patogena zbog svoje brzine izvođenja, što omogućava bržu dijagnozu. Međutim, osjetljivost DFA može biti vrlo niska, u rasponu od 11 % do 40 %, što najviše ovisi o broju *Legionella* prisutnih u uzorku [125]. Također, važno je napomenuti da DFA često ne otkriva različite serogrupe i vrste *Legionella*, osim *Lp* [87].

Test imunokromatografije (engl. *Immunochromatographic Assay*; ICA) predstavlja metodu za otkrivanje komponenti stanične stijenke *Legionella* u uzorcima urina, koja se koristi za dokazivanje urinarnog antigena. Ova metoda najčešće se primjenjuje u dijagnostici legionarske bolesti kao metoda probira prve linije zbog svoje

visoke specifičnosti, jednostavnosti upotrebe, dostupnosti i brzih rezultata, obično unutar 30 minuta. Ipak, ICA omogućuje otkrivanje samo *Lp* SG 1, što ističe potrebu za razvojem dodatnih testova koji bi omogućili identifikaciju različitih serogrupa i vrsta *Legionella* [45, 122].

Kultivacija *Legionella* na definiranim medijima, poput puferiranog kvašćevog medija uz dodatak ugljena (engl. *Buffered Charcoal Yeast Extract*; BCYE), i dalje je standardna referentna metoda za dijagnozu i identifikaciju *Legionella* iz kliničkih izolata, omogućujući identifikaciju različitih vrsta i serogrupa, što je ključno za epidemiološka istraživanja njihove distribucije [123]. Međutim, zbog niske osjetljivosti od 15 % do 25 % kod blagih oblika legionarske bolesti, a više od 90 % kod teških oblika s respiratornim zatajenjem, njena uporaba u kliničkoj rutini je ograničena [126].

PCR metode pružaju veću osjetljivost od kultivacije i koriste se za dijagnosticiranje blažih oblika bolesti te otkrivanje drugih vrsta *Legionella* [127]. Iako su metode temeljene na PCR-u, kao što su one za *Lp* SG1 [128] i novi klon *Lp* ST 47 [129], prisutne u referentnim centrima, njihova primjena u kliničkoj dijagnostici, osim u Novom Zelandu, još uvijek je rijetka [130].

Korisnost PCR testova kao dopuna drugim dijagnostičkim metodama potvrđena je razvojem brzog i pouzdanog multipleks PCR testa u stvarnom vremenu, koji iz humanih uzoraka ispljuvka omogućuje otkrivanje četiri klinički relevantne vrste *Legionella* koje nisu *Lp* uključujući *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* i *L. micdadei* pornost na antibiotike za infekcije uzrokovane *Lp* još nije globalni izazov, zabilježen je jedan soj otporan na fluorokinolon (ciprofloksacin) kod pacijenta s legionarskom bolešću u Nizozemskoj [133]. Osim toga, *in vivo* mutacije otpornosti na fluorokinolon u *Lp* zabilježene su kod dva pacijenta liječena tim antibioticima u Francuskoj [134], što općenito sugerira da je otpornost na antibiotike rijetka. Ipak, postoji zabrinutost da je otpornost na fluorokinolon podcijenjena, što povećava potrebu za brzom identifikacijom infekcija uzrokovanih legionelama, kako bi se osigurala pravovremena i adekvatna antibiotska terapija [135].

Digitalni PCR test za otkrivanje mutanata *Legionella* otpornih na fluorokinolone u uzorcima pacijenata pokazao se korisnim dijagnostičkim alatom za procjenu učinkovitosti antibiotske terapije [135]. Obzirom na rijetko prijavljene slučajeve rezistencije, preporučena antimikrobna terapija i dalje uključuje fluorokinolone (ciprofloksacin, levofloksacin ili moksifloksacin) te makrolide (azitromicin) [136, 137]. Istraživanja se usmjeravaju na pronalaženje novih i učinkovitih antibiotika za liječenje

infekcija uzrokovanih legionelama, s posebnim osvrtom na mogućnost razvoja otpornosti. Stoga su potrebni lijekovi s različitim mehanizmima djelovanja. Osim konvencionalnih pristupa koji ciljaju bakterijske proteine, novi terapijski trendovi usmjereni su na DNK, RNK i različite proteinske ili makromolekularne komplekse, što može pomoći u prevladavanju izazova u liječenju infekcija uzrokovanih legionelama otpornih na antibiotike.

Ciljanje gena *Legionella* koji su uključeni u manipulaciju staničnim vezikularnim prijenosom uz pomoć antisensne terapije posredovane dendrimerima predstavlja obećavajući pristup inhibiciji bakterijske replikacije unutar ciljnih stanica. Ova terapija ima ključnu ulogu u sintezi bakterijskih proteina, posredujući unutarstanični put prijenosa kako bi se izbjegla fuzija fagosoma i lizosoma u makrofagima. Istraživanja su pokazala da neki od tih proteina sudjeluju u prijenosu *Legionella* kroz fagosom, a njihovim smanjenjem putem antisensne terapije, bakterije gube sposobnost izbjegavanja unutarstaničnih mehanizama, što dovodi do njihove eliminacije u lizosomima fagocitiranjem lizosomskim enzimima. S obzirom na izazove otpornosti na antibiotike, farmaceutske tvrtke i istraživači sve više se usmjeravaju umjesto na proteine, na korištenje različitih oblika RNK, DNK, novih proteinskih struktura ili makromolekularnih kompleksa ovih komponenti, kao alternativnih pristupa za liječenje i uklanjanje patogenih sojeva otpornih na antibiotike [138].

1.8 Čimbenici rizika za čovjeka

Brojni čimbenici povećavaju rizik od legioneloza/LB, uključujući čimbenike domaćina kao i čimbenike izloženosti. S obzirom na to ne obolijevaju svi izloženi legionelama tokom većih epidemija [2, 139]. Rizik za razvoj bolesti kod ljudi vezan je uz stariju dob, oslabljeni imunološki sustav, stanja nakon transplantacije uz korištenje imunosupresivne terapije, maligne i kronične bolesti pluća, srca, kroničnu bubrežnu insuficijenciju, kao i čimbenike poput pušenja, alkoholizma i dijabetesa. Odrasli muškarci imaju veći rizik, obolijevajući otprilike 2,5 puta češće od žena [140-142].

Uistinu, u SAD-u, učestalost prijavljenih slučajeva legioneloze među muškarcima iznosila je 2,31/100.000, što je približno 50 % više nego kod žena, gdje je taj broj bio 1,50/100.000, u 2016. godini. Dob je također prepoznata kao čimbenik rizika za legionelozu, a većina studija sugerira da rizik počinje rasti u dobi od 40 do 50 godina [2, 78, 143]. Podaci o djeci su ograničeni; u pregledu izvješća, većina oboljele djece imala je i druge rizične bolesti, poput zloćudnih novotvorina, a više od 50 % oboljele

djece bilo je dojenačke dobi. Više od 70 % slučajeva pedijatrijske legioneloze stječe se u bolničkim uvjetima, što sugerira ili manju učestalost oboljenja u zajednici ili nedovoljnu dijagnosticiranost. Novorođenčad predstavlja najranjiviju skupinu s najvećim rizikom od legioneloze stečene u bolnici, što je posljedica njihove povećane izloženosti i slabijeg imunološkog statusa [144]. Iako se rijetko prijavljuju, porodi u vodi povezani su s nekim slučajevima neonatalne legioneloze [145, 146].

Također, osobe koje rade u okruženjima s povećanom profesionalnom izloženosti vodi imaju veći rizik od oboljevanja od legioneloze/LB [147]. Takve skupine uključuju pružatelje usluga vodoopskrbe, radnike na održavanju sustava distribucije vode i odvodnje otpadnih voda, osoblje za čišćenje, te radnike u industrijama koje koriste industrijske prskalice za vodu, kao što su tvornice papira, tekstila i plastike. Klasični demografski faktor rizika za legionelozu/LB je oslabljen imunitet, što može biti posljedica anatomskih promjena u dišnim putovima ili prisutnosti respiratornih patogena.

Pušenje se također smatra jasnim čimbenikom rizika, koji djeluje ovisno o intenzitetu i vjerojatno pridonosi većoj učestalosti slučajeva prijavljenih kod muškaraca u usporedbi s ženama. Pušenje mijenja epitel dišnih putova, utječe na njihovu funkciju te modificira aerodigestivni mikrobiom, a svi ovi čimbenici povezani su s povećanim rizikom od bakterijskih upala pluća, uključujući infekcije uzrokovane bakterijama iz roda *Legionella* [148, 149].

Pušači su izloženi većem riziku u usporedbi s nepušačima, pri čemu oni koji puše više od 20 cigareta dnevno tijekom više od 20 godina imaju rizik 25 puta veći od onih koji ne puše, kao i veću učestalost bolesti tijekom epidemija [150]. Osim toga, rizik i ozbiljnost bolesti mogu se dodatno povećati uslijed komplikacija povezanih s pušenjem, kao što su kronična opstruktivna plućna bolest ili emfizem [151]. Također, izloženost pasivnom dimu može doprinijeti povećanju rizika od oboljenja [152].

Populacija osjetljiva na LB obuhvaća pacijente s povećanim rizikom od aspiracije, kao što su osobe s neuromuskularnim bolestima, starije osobe i novorođenčad [22, 153]. Povećana mogućnost mikroaspiracije koja se javlja tijekom pijenja ili u različitim kliničkim stanjima, dodatno povećava rizik od razvoja pneumonije [154]. Pacijenti koji se liječe od karcinoma i oni nakon transplantacije organa izloženi su posebnom riziku zbog duljine imunosupresije [155, 156], a istovremeno su podložni povećanom riziku od legioneloza uzrokovanih *non-Lp* SG1 sojevima. Određeni imunosupresivni lijekovi, osobito glukokortikoidi poput prednizona, također su

povezani s rizikom od legioneloze [157]. Uz to, pacijenti koji primaju terapiju inhibitorima TNF-a za reumatološke i upalne bolesti crijeva također su u povećanom riziku od LB [156]. Pacijenti s disfunkcijom bubrega, uključujući one na dijalizi, bolestima jetre, plućnim bolestima i srčanom disfunkcijom posebno su podložni legionelozama [158].

Osim toga, genetska predispozicija može objasniti povećanu osjetljivost na bolesti uzrokovane *Legionella* spp., kako kod onih s drugim čimbenicima rizika, tako i kod onih bez njih [159]. Legioneloza/LB, povezana je s genetskim polimorfizmima putem tri receptora: TLR-4, TLR-5 i TLR-6, koji čine dio urođenog imunološkog sustava zaduženog za prepoznavanje molekularnih obrazaca povezanih s patogenom [160-162]. Također, uobičajeni haplotip GMP-AMP sintaze i stimulatora interferonskih gena (engl. *Stimulator of Interferon Genes*; STING) povezan je s povećanim rizikom od razvoja legioneloze [163].

1.9 Nadzor nad legionarskom bolesti u EU/EGP

Godine 1986. u Londonu je osnovana Europska radna skupina za infekcije s *Legionella* (engl. *European Working Group for Legionella Infections*; EWGLI). Ova skupina prikuplja i dijeli informacije te iskustva s ciljem smanjenja rizika od LB. Članovi EWGLI-a uspostavili su 1987. godine europski program nadzora infekcija povezanih s putovanjima. Od 2010. godine, nadzor nad legionelozama/LB na području Europe provodi Europska mreža za nadzor legionarske bolesti (engl. *European Legionnaires' Disease Surveillance Network*; ELDSNet), koju koordinira Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC) u Stockholmu. Od 2012. godine, EWGLI je povezana s Europskim društvom za kliničku mikrobiologiju i zarazne bolesti (engl. *The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; ESCMID), pri čemu je naziv promijenjen u Studijska skupina ESCMID-a za infekcije s *Legionella* (engl. *ESCMID Study Group for Legionella Infections*; ESGLI), čime je osnažen rad i suradnja u istraživanju i kontroli ovih infekcija.

Podatke prikupljaju imenovani stručnjaci ELDSNet-a za svaku europsku zemlju te ih elektronički prijavljuju u bazu podataka Europskog sustava nadzora (engl. *European Surveillance System*; TESSy). Podaci o nadzoru dolaze iz dvaju različitih programa: prvi program obuhvaća sve slučajeve prijavljene iz država članica EU-a, Islanda i Norveške, dok drugi program obuhvaća sve slučajeve LB povezane s

putovanjima, uključujući izvješća zemalja izvan EU-a i Europskog gospodarskog prostora (EGP).

Glavni ciljevi prikupljanja godišnjih podataka o svim nacionalno prijavljenim slučajevima legionarske bolesti uključuju praćenje trendova oboljenja tijekom vremena i njihovu usporedbu među državama članicama, pružanje podataka temeljenih na dokazima za donošenje odluka i interventna djelovanja u javnozdravstvenom području na razini EU-a i država članica, praćenje i evaluaciju programa prevencije i kontrole usmjerenih na LB na nacionalnoj i europskoj razini, kao i identifikaciju rizičnih skupina stanovništva kojima su potrebne ciljane preventivne mjere. Svakodnevni nadzor LB povezanih s putovanjima prvenstveno je fokusiran na otkrivanje skupina slučajeva koje bi na nacionalnoj razini mogle ostati neprimijećene, omogućujući pravovremene intervencije, istraživanja i poduzimanje kontrolnih mjera na identificiranim lokacijama gdje su oboljeli boravili tijekom inkubacijskog razdoblja bolesti, s ciljem prevencije novih slučajeva.

ECDC svake godine objavljuje izvješća o rezultatima nadzora, a od 2005. godine oko 20 % svih prijavljenih slučajeva LB povezano je s putovanjima [164]. Ipak, postoji više razloga zbog kojih broj prijavljenih slučajeva LB podcjenjuje pravu učestalost ove bolesti. Na primjer, LB može ostati neprepoznata ako oboljelom pacijentu dijagnosticiraju pneumoniju, a odabrani antibiotik je terapijski učinkovit protiv bakterije *Legionella*. Osim toga, određene dijagnostičke metode za LB imaju smanjenu osjetljivost koja može dovesti do lažno negativnih rezultata. Najčešće korištena metoda za dijagnosticiranje LB je detekcija antigena u urinu, koja primarno otkriva *Lp* SG1. Ako je infekcija uzrokovana drugim serogrupama ili vrstama *Legionella*, ona ostaje neotkrivena. Također, kod imunosuprimiranih osoba koje već imaju teške bolesti, rizik od LB je značajno veći. U slučaju smrti tih pacijenta, uzrok smrti često se pripisuje postojećim bolestima, bez detekcije *Legionella*, što dodatno umanjuje vidljivost stvarne prevalencije bolesti.

LB se smatra bolesti s težom kliničkom slikom, pri čemu mnogi blaži oblici ostaju neotkriveni. Kako bi se otkrili novooboljeli i epidemije LB povezane s putovanjima, uspostavljen je međunarodni program nadzora pod nazivom Europski program nadzora legionarske bolesti povezane s putovanjima (engl. *Travel-Associated cases of Legionnaires' Disease*; TALD). Nadležna tijela u Europi slijede smjernice europskih protokola, a postupci ELDSNet-a osiguravaju standardizirani pristup prijavljivanju

slučajeva i odgovorima na klastere LB povezane s putovanjima. Ovim pristupom omogućava se učinkovito otkrivanje i reagiranje na epidemije u europskim državama.

Operativni postupci ELDSNet-a definiraju pojedinačne slučajeve i grupiranja LB. Pojedinačni slučajevi su oni koji su u razdoblju od dva do deset dana prije pojave bolesti boravili ili posjetili komercijalno smještajno mjesto koje nije povezano s drugim slučajevima LB, ili su boravili na mjestu smještaja koje je povezano s drugim slučajevima LB više od dvije godine ranije. Klasteri LB uključuju dva ili više slučajeva koji su boravili ili posjetili isto komercijalno smještajno mjesto u razdoblju od dva do deset dana prije početka bolesti, s početkom bolesti unutar istog dvogodišnjeg razdoblja. Epidemije LB predstavljaju dva ili više slučajeva koja su boravila ili posjetila isto komercijalno smještajno mjesto u istom vremenskom okviru, a ispitivanja okolišnih uzoraka pružaju dodatne dokaze o zajedničkom izvoru zaraze.

U slučaju potvrđenog slučaja ili grupiranja LB među putnicima ili posadom, te utvrđenog izvora *Legionella* u jednom ili više vodnih objekata broda, potrebno je odmah kontaktirati ostale putnike i članove posade koji su se iskrcali i bili izloženi kontaminiranom izvoru kako bi se utvrdilo jesu li razvili simptome LB. Istraživanje bi trebali provesti stručnjaci nadležnog zavoda za javno zdravstvo u suradnji s drugim relevantnim tijelima. Brodska posada, na zahtjev nadležnog tijela, obavezna je dostaviti potrebne informacije. Također, lučka nadležna tijela moraju prijaviti svaki vjerojatni ili potvrđeni slučaj otkriven na brodovima, zajedno s poduzetim mjerama, nacionalnom nadležnom tijelu u skladu s lokalnim i nacionalnim pravilima i postupcima.

Europska agencija za sigurnost i zdravlje na radu (engl. *European Agency for Safety and Health at Work*; EU-OSHA) objavila je 2011. godine podatke koji potvrđuju da su mnoge europske zemlje uspostavile javnozdravstvene politike i preventivne mjere usmjerene na smanjenje rizika od oboljenja uzrokovanih legionelama, temeljem Direktive 2000/54/EZ koja se odnosi na zaštitu od rizika povezanih s izloženošću biološkim agensima na radu. U cilju upravljanja rizikom od oboljenja uzrokovanih legionelama na brodovima, 2013. godine pokrenut je trogodišnji projekt „EU SHIPSAN Act Joint Action“ [165]. Na temelju rezultata ovog projekta razvijene su smjernice i preporuke za postupanje u slučaju mogućih prijetnji biološkim agensima, uključujući legionele.

1.10 Pojavnost legionarske bolesti u EU/EGP i Hrvatskoj

Prema godišnjem izvještaju ECDC-a za 2021. godinu, zabilježena je najviša godišnja incidencija LB dosad u EU-u/EGP-u, s 2,4 slučaja na 100.000 stanovnika. Dobno standardizirane stope incidencije variraju ovisno o zemlji i kreću se u rasponu od 1 do 5 slučajeva na 100.000 stanovnika. Najviše su obolijevali muškarci stariji od 65 godina, s 8,9 slučajeva na 100.000 stanovnika [84]. U europskim zemljama uočene su značajne razlike u pojavnosti LB. Četiri zemlje – Italija, Francuska, Španjolska i Njemačka – činile su 75 % svih prijavljenih slučajeva, iako stanovnici ovih zemalja čine samo 50 % ukupnog stanovništva EU-a/EGP-a.

Međutim, smatra se da su ove razlike prvenstveno posljedica različitih stupnjeva razvoja nacionalnih sustava za praćenje legionarske bolesti, osposobljenosti laboratorija za ispitivanje prisutnosti i broja *Legionella* te različitih načina prezentacije podataka. Većina infekcija javlja se u kolovozu i rujnu, kada su uvjeti za rast *Legionella* povoljniji, kao i zbog veće izloženosti ljudi u tom razdoblju [84]. U Hrvatskoj se legionarska bolest obično javlja pojedinačno i rijetko u obliku epidemija. U razdoblju od 2017. do 2019. godine zabilježen je rastući trend broja prijavljenih slučajeva LB/Legioneloze (prosječno 65 slučajeva), dok se u razdoblju od 2020. do 2021. godine taj broj smanjio na 34 slučaja oboljenja [166].

Zamjetnom padu broja prijavljenih slučajeva LB vjerojatno su pogodovale okolnosti pandemije COVID-19, koja je rezultirala ograničenjima putovanja i smanjenom izloženošću stanovništva [84]. U razdoblju od 2017. do 2021. godine, broj umrlih od LB kretao se u rasponu od 1 (2017. i 2021. godine) do 10 (2018. godine) [166]. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2022. godini zabilježeno je 48 slučajeva bolesti, od kojih su četiri završila smrtnim ishodom, dok je u 2023. broj prijavljenih slučajeva porastao na 65, uz također četiri smrtna ishoda. U ukupnom broju prijavljenih slučajeva LB, slučajevi na putničkim brodovima postaju sve učestaliji, što negativno utječe na turizam; prema podacima CDC-a, ovi slučajevi čine oko 20 % od ukupnog broja LB [164].

1.11 Čimbenici okoliša koji utječu na preživljavanje *Legionella*

Razumijevanje ekologije *Legionella* i njezine interakcije s drugim vrstama u prirodnom okolišu ključno je za praćenje čimbenika koji potiču opstanak i proliferaciju ove bakterije u umjetno izgrađenim vodnim sustavima. *Legionella* spp. su sveprisutne u prirodnim i umjetnim vodnim sredinama širom svijeta, gdje preživljavaju u različitim

okolišnim uvjetima [167]. Sposobne su rasti u širokom rasponu fizikalnih i kemijskih čimbenika, a na njihovo preživljavanje značajno utječu temperatura, pH, dostupnost hranjivih tvari, koncentracija dezinficijensa, prisutnost teških metala u vodi, te stvaranje biofilma [168]. Formiranje biofilma ne samo da pruža zaštitu od nepovoljnih vanjskih čimbenika, već i potiče rast i razmnožavanje *Legionella*. Također, vrsta vodovodnog materijala igra važnu ulogu u rastu *Legionella*, pri čemu prirodni materijali predstavljaju dodatni izvor nutrijenata koji podržavaju njezin rast i razvoj [168].

Legionele su izuzetno otporne na kiseline i mogu preživjeti kraće vrijeme pri pH vrijednosti od 2,0, dok opstaju u okolišu s pH rasponom od 2,7 do 8,3 [169, 170]. Njihovo prisustvo zabilježeno je u različitim vrstama voda, uključujući vodu u biljkama u prašumama, podzemne vode [171, 172], morsku vodu [173], kao i u umjetnim izvorima slane vode [174].

U pojedinim prirodnim vodnim okolišima, poput podzemnih voda kontaminiranih zemljom i s temperaturom manjom od 20 ºC, legionele mogu biti prisutne u preniskim koncentracijama da bi se mogle potvrditi metodom kultivacije. Međutim, upravo ta kontaminirana voda iz okoliša može predstavljati potencijalni put prijenosa *Legionella* u namjenski izgrađene sustave za distribuciju vode u različitim objektima. U takvim sustavima, optimalni fizički i kemijski uvjeti često mogu poticati njihov rast i razmnožavanje, što predstavlja značajan zdravstveni rizik za korisnike vode.

1.11.1 Utjecaj temperature

Legionella se u prirodnim uvjetima često pronalaze u različitim izvorima vode pri temperaturama između 30 ºC i 70 ºC, ali su također izolirane iz smrznutih rijeka, termalnih ribnjaka, izvora, te izvora vode u blizini vulkana [175]. *Lp* se u prirodnom okruženju opstaje i razmnožava u vodi na temperaturama između 25 ºC i 45 ºC, s optimalnim rasponom od 32 ºC do 42 ºC [176]. Najčešće se izoliraju na temperaturama između 35 ºC i 45 ºC, pri čemu se najveći porast održivih sojeva bilježi između 37 ºC i 42 ºC [177, 178]. Padom temperatura ispod 37 ºC, reproduktivna stopa bakterija opada, dok se ispod 20 ºC primjećuje neznatno povećanje broja bakterija. *Legionella* dugo preživljava na niskim temperaturama, te se, kada temperature porastu, uz povoljne okolišne uvjete, ponovno razmnožava. Složeni vodni sustavi, kao što su sustavi za distribuciju tople vode, klima uređaji i spa bazeni, često koriste vodu u temperaturnom rasponu koji potiče rast *Legionella*. Osim toga, ovi vodni sustavi mogu potencijalno proizvesti aerosole, čime se povećava mogućnost širenja bakterija.

Istraživanje provedeno 2022. godine od strane Knežević i sur. [179] u Primorsko-goranskoj županiji pokazalo je da *Legionella* mogu preživjeti na temperaturi od 53 ºC do 10 minuta. Rizik od proliferacije *Legionella* povećava se u sustavima za distribuciju hladne vode kada temperatura prelazi 22,3 ºC, dok je u sustavima tople vode taj rizik prisutan kada temperatura padne ispod 43,5 ºC. Također, povećani rizik identificiran je u vodi s električnom vodljivošću manjom od 419 µS/L, koncentracijom nitrata ispod 1,7 mg/L, SRK nižim od 0,04 mg/L i pH vrijednostima višim od 7,8. Istraživanje je također otkrilo da *Lp*, nakon rasta unutar amebe, pokazuje veću otpornost na pasterizaciju i natrijev hipoklorit. Rast unutar amebe, međutim, nije značajno utjecao na alelni profil i fenotip bakterije. Ispitivanje transmisijskom elektronskom mikroskopijom pokazalo je da rast unutar amebe nije rezultirao značajnim promjenama u morfologiji stanica, dok je pasterizacija izazvala značajne promjene u morfologiji u usporedbi s netretiranim bakterijama. Zaključno, iako rast unutar amebe ne mijenja genetske i fenotipske karakteristike bakterije, povećava njenu otpornost na pasterizaciju. Preživljavanje *Legionella* poboljšava se u uvjetima višeg pH, dok su veće koncentracije nitrata, električne vodljivosti i SRK-a značajno smanjile preživljavanje bakterije.

Dodatno, istraživanje provedeno u južnoj Hrvatskoj [180] pokazalo je da temperature vode iznad 54 ºC djeluju zaštitno na vodoopskrbni sustav, dok temperaturni raspon od 44 ºC do 54 ºC potiče kolonizaciju bakterije *Legionella*.

Istraživanja provedena u Iranu [181] i Grčkoj [182] pokazala su gotovo jednake postotke pozitivnih uzoraka u sustavima hladne i tople vode, pri čemu su ti udjeli iznosili 20,7 % u hladnoj vodi i 19,6 % u toploj vodi. U 76,8 % uzoraka pozitivnih na *Legionella* u hladnoj vodi temperatura je bila iznad 20 °C, dok je u 81,7 % uzoraka tople vode bila ispod 50 °C. Dimitriadi i Velonakis [182] su u svom istraživanju provedenom u Grčkoj 2014. godine izmjerili srednju temperaturu tople vode pozitivnih uzoraka na *Legionella*, utvrdivši da je bila za 4,4 °C niža u usporedbi s *Legionella*-negativnim uzorcima (49,9 °C naspram 45,5 °C). U studiji iz 2016. godine, koju su proveli Rakić i sur. u Splitsko-dalmatinskoj županiji [183], zabilježena je niža srednja temperatura vode pozitivnih uzoraka na *Legionella* spp. za 7,0 °C u usporedbi s negativnim uzorcima (47 °C naspram 54 °C).

Nasuprot tome, u istraživanju provedenom u Iranu 2016. godine, Tabatabaei i sur. [181] utvrdili su da je prosječna temperatura uzoraka vode pozitivnih na *Legionella* spp. bila za 6,7 ºC viša u usporedbi s prosječnom temperaturom negativnih uzoraka

(44,3 ºC naspram 37,6 ºC). Istraživanje je obuhvatilo ukupno 34 uzorka, od kojih je 9 uzeto iz rashladnih tornjeva, 17 iz sustava vodoopskrbe tople vode, a 8 iz ribnjaka. Srednje vrijednosti temperature *Legionella*-pozitivnih i negativnih uzoraka nalazile su se unutar temperaturnog raspona koji je optimalan za rast bakterija. U uzorcima s potvrđenim sojem *Lp* SG 1, srednje vrijednosti temperature bile su 8,8 ºC više u usporedbi s uzorcima koji su bili pozitivni na *Lp* SG 2–14.

Istraživanje Lee i sur. iz 2010. godine provedeno u Koreji [184] pokazalo je veću raširenost *Lp* SG1 u sustavima distribucije tople vode (58,8 %), dok su *Lp* SG 2–14 u većoj mjeri identificirane u hladnoj vodi (61,8 %). *Legionella* je u toploj vodi izolirana pri temperaturama do 66 ºC, dok se na temperaturama iznad 70 ºC gotovo trenutno uništava [185, 186]. Rast svih testiranih sojeva smanjio se na temperaturama iznad 44 ºC do 45 ºC, pri čemu je temperatura koja ograničava rast bila između 48,4 ºC i 50,0 ºC. Ispitivani sojevi *Legionella* imali su sposobnost stvaranja CO_2 do 51,6 ºC, što ukazuje da neki respiratorni enzimi mogu preživjeti na ovoj temperaturi. Stoga, kako bi se spriječio rizik od infekcija legionelama, preporučena temperatura za skladištenje i distribuciju hladne vode u specijalno izgrađenim sustavima optimalno bi trebala biti ispod 20 °C.

Nedavne *in vitro* studije na mutantnim sojevima *Legionella* pokazuju da bakterije mogu rasti i razmnožavati se pri temperaturama ispod 20 ºC pod određenim uvjetima. Ovi podaci prvi put dokumentiraju da se *Lp* replicira na temperaturama ispod 20 °C i da bakterijski sustav izlučivanja proteina tipa II olakšava rast na niskim temperaturama [187]. Optimalna temperatura u spremnicima tople vode ističe se kao ključan čimbenik u kolonizaciji *Legionella* unutar distribucijskih sustava [188]. Stoga, radi zaštite i smanjenja rizika od infekcija legionelama, važno je održavati temperaturu tople vode u sustavu iznad 55 °C na svim izljevnim mjestima. Održavanje odgovarajuće temperature unutar sustava distribucije tople i hladne vode ključna je preventivna mjera u kontroli i sprječavanju infekcija legionelama.

1.11.2 Utjecaj simbiotskih mikroorganizama

Legionella ostvaruje značajne interakcije sa slatkovodnim protozoama, što značajno povećava njezinu virulentnost [189], a njezin rast u vodi ovisan je o prisutnosti hranjivih tvari. Iako istraživanja pokazuju da *Legionella* može preživjeti u sterilnoj vodi bez mogućnosti razmnožavanja [190, 191], u nesterilnim uvjetima, poput vode iz slavine, u prisutnosti drugih mikroorganizama, uspješno se razmnožava [176]. U

istraživanju je primijenjen model u kojem se koristila filtrirana i sterilizirana voda iz slavine kao jedini izvor nutrijenata za kultivaciju prirodno prisutne mješovite populacije mikroorganizama, uključujući virulentne sojeve *Lp* [192, 193]. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je za rast *Legionella* nužna prisutnost hranjivih tvari u vodi, uključujući otopljene organske tvari nastale razgradnjom mikroorganizama ili prekomjernim unosom hranjivih tvari [176, 194, 195].

Istraživanja pokazuju da su aminokiseline ključne hranjive tvari za rast *Lp* [196-198]. *Lp* je povezana s brojnim mikroorganizmima iz vode izvorišta, uključujući protozoe *Fischerella* spp. [177, 194, 198-201]. Drozanski [202] je 1963. opisao bakterijske parazite ameba izolirane iz tla, koji nisu rasli na hranjivim podlogama. Pretpostavlja se da su ti paraziti pripadali rodu *Legionella*. Rowbotham [203] je 1980. godine prvi put istražio interakciju između ameba i *Lp*, potvrđujući da su legionele fakultativni unutarstanični mikroorganizmi sposobni za rast u raznim uvjetima, uključujući prisutnost kisika. Legionele su sve prisutne u okolišu i preživljavaju unutar slobodno živućih eukariotskih fagotrofa, prvenstveno ameba [167, 203].

Amebe, kao što su *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Hartmannella vermiformis*, *Dictyostelium discoideum* i *Naegleria* spp., prirodni su domaćini *Legionella*, a njihova interakcija je detaljno istražena [204]. Uloga ameba u životnom ciklusu *Legionella* je dvostruka: one djeluju kao domaćini za unutarstaničnu reprodukciju bakterija i pružaju zaštitu od nepovoljnih okolišnih uvjeta. To uključuje otpornost na antibiotike, kemijske tvari, visoke temperature te osmotski stres uzrokovan abiotskim čimbenicima kao što su povišeni salinitet, suša ili ekstremne temperature [169, 205-207]. Stoga, slobodnoživeće amebe imaju važnu ulogu u opstanku i širenju *Legionella* u okolišu, uz uvjerljive dokaze da je razmnožavanje *Lp* unutar stanica ameba preduvjet za infekciju kod ljudi [208]. Osim toga, ekološka postojanost *Legionella* također proizlazi iz kolonizacije biofilmova, koji čine zajednice mikroorganizama u prirodnim i umjetno stvorenim slatkovodnim okruženjima [193, 209].

Unutar biofilma, *Legionella* pokazuje raznolikost u fenotipu i uključuje subpopulacije virulentnih bakterija koje su u sesilnom (stacionarnom) stanju [210]. Fenotipsku varijaciju unutar biofilmova kontrolira Lqs sustav *Legionella* (engl. *Legionella quorum sensing system*), zajedno s transkripcijskim faktorom LvbR i temperaturom [210]. Sesilne stanice su metabolički aktivne, posjeduju visoku toleranciju na antibiotike i izražavaju gene virulencije. Ove virulentne sesilne bakterije

su vrlo zarazne i učinkovito se repliciraju unutar protozoa domaćina [210]. Zahvaljujući ovim prilagodbama, *Legionella* je u mogućnosti učinkovito preživjeti i replicirati se u prirodnim slatkovodnim staništima, što omogućava efikasno koloniziranje specijaliziranih sustava i time povećava rizik od oboljenja kod ljudi.

Legionella se može razmnožavati u 14 vrsta protozoa, uključujući *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp. i *Hartmannella* spp., kao i cilijatima poput *Tetrahymena vorax* [190, 201, 203, 211, 212], te u plijesnima [45, 201, 213]. Protozoe imaju važnu ulogu kao vektori za opstanak i rast *Legionella* u prirodnim i umjetnim okruženjima, a pronađene su u okruženjima koja se smatraju izvorima *Legionella*. Međutim, važno je napomenuti da nisu sve amebe prihvatljivi domaćini, što ukazuje na postojanje određenog stupnja specifičnosti domaćina. U prirodnim uvjetima, *Legionella* se razmnožava unutar fagosoma protozoa, pri čemu vjerojatno proizvodi proteaze s citotoksičnom aktivnošću, što vodi do uništenja stanica domaćina [214].

Opstanak *Lp* unutar ameba ovisi o temperaturnim uvjetima; pri 22 °C amebe fagocitiraju bakterije [215], dok se razmnožavanje *Lp* odvija pri temperaturi od 35 °C [203]. Flagele imaju važnu ulogu u patogenosti brojnih organizama, uključujući *Salmonella* spp. i *Pseudomonas aeruginosa*. Istraživanje Heunera i Steinerta iz 2003. godine [216] pokazalo je da legionele koje nemaju bičeve imaju smanjenu sposobnost zaraze protozoa i makrofaga u usporedbi s divljim tipovima flageliranih sojeva.

Protozoe imaju važnu ulogu u zaštiti *Legionella* od djelovanja biocida i toplinske dezinfekcije [205], a također pomažu i u preživljavanju ove bakterije u nepovoljnim uvjetima okoliša, uključujući opstanak unutar aerosola [217, 218]. Legionele su u stanju preživjeti unutar amebne stanice [219, 220], što se smatra mehanizmom koji omogućava *Lp* da preživi otežane uvjete unutar aerosola. U prirodnom okruženju, replikacija *Legionella* unutar protozoa vjerojatno predstavlja najčešći mehanizam proliferacije bakterija [221]. Slobodno živuće amebe, koje su sveprisutne u tlu i u prirodnim ili umjetnim vodenim ekosustavima, hrane se mikroorganizmima. Interakcije između legionela i ameba tijekom milijuna godina dovele su do sposobnosti *Legionella* da prevlada unutarstaničnu degradaciju, što omogućava njen opstanak i čak replikaciju unutar protozoa. Na taj način, slobodno živuće amebe mogu poslužiti kao zaštita mikroorganizmima od nepovoljnih ekoloških uvjeta [222]. Zanimljivo je da su brojne medicinski važne bakterije, virusi i gljivice iz okoliša povezani s sposobnošću preživljavanja unutar ameba [223]. Interakcije između *Legionella* i ameba zabilježene

su ubrzo nakon što su ove bakterije prvi put identificirane [203], a od tada su postale sve jasnije sličnosti između infekcije ameba i ljudskih makrofaga [208, 224].

Doista, mehanizmi bakterijske inaktivacije isti su u amebama i makrofagima, jer se oba sastoje od lizosomske razgradnje u fagocitima [225]. Između ostalog, pokazalo se da su amebe povezane s bakterijama iz rodova *Legionella*, *Mycobacterium*, *Listeria* i *Chlamydia*; gljivama tla kao što su vrste *Cryptococcus*; i divovskim virusima koji pripadaju obiteljima *Mimiviridae* i *Marseilleviridae* [226]. Patogeni koji postanu specijalizirani za zarazu domaćina općenito se podvrgavaju smanjenju genoma. Međutim, ovaj fenomen nije uočen kod analiza genoma mikroorganizama koji žive u amebama [227]. U suprotnosti s tim, čini se da bakterije *Legionella* doživljavaju neprekidno širenje svog genoma, s više dobitaka gena nego gubitaka. Ovo je rezultat stjecanja gena putem horizontalnog prijenosa, što sugerira da su genomi njihovih predaka vjerojatno bili manji [228].

Slobodno živuće amebe čini se da ograničavaju evolucijske mogućnosti unutar kojih divovski virusi i bakterije mogu zajednički postojati, što dovodi do razmjene gena u više smjerova [227, 229]. Primjer za to je protein identificiran u *Lp*, koji ima homologe samo u Mimivirusu *Acanthamoeba polyphaga*, sugerirajući razmjenu gena koja uključuje eukariotske viruse [230]. Dodatni primeri uključuju bakterije koje su povezane s amebama, kao što su *Rickettsia* [231] i *Amoebophilus asiaticus* [232]. Analize njihovih genoma otkrile su da sadrže proteine koji su slični proteinima eukariota. Ovi proteini su slični proteinima koji se nalaze u vrstama *Legionella*. Mehanizam putem kojeg bakterije stječu i integriraju eukariotske gene može biti povezan s genetskim prijenosom putem RNA, koja se kasnije putem retrotranskripcije vrši uz pomoć reverzne transkriptaze kodirane od strane *Legionella*, što bi moglo objasniti odsutnost introna u genima *Legionella* [229]. Nakon integracije, ovi geni moraju evoluirati kako bi postali specifični izlučeni proteini efektori. Nadalje, pretpostavlja se da domaćin može potencijalno odabrati mutacije za fino podešavanje funkcije proteina, što omogućava odabir učinkovitih signala za translokaciju C-terminala [233]. Amebe predstavljaju specifičnu nišu koja omogućuje opstanak ljudskih patogena, što podrazumijeva potrebu za dubljim razumijevanjem interakcija između *Legionella* i ameba, kako bi se razvili novi mehanizmi za kontrolu i prevenciju bolesti.

Visoka učestalost *Llb* u Australiji i Novom Zelandu može se pripisati prisutnosti ove bakterije u supstratima za lončanice, koji u toj regiji većinom sadrže kompostiranu borovu koru ili piljevinu, za razliku od Europe [234]. Ova pojava sugerira mogućnost

da je *Llb* povezana s drvećem i biljkama te da se aktivno razmnožava tijekom procesa kompostiranja. Analiza genoma *Llb* otkrila je da ova vrsta kodira skup enzima specijaliziranih za razgradnju komponenti biljnih staničnih stijenki, što podržava hipotezu o njenoj povezanosti s biljkama [235] ili mogućoj zarazi biljaka [236].

Ovo otkriće otvara pitanje mogu li organizmi koji nisu protozoe također biti domaćini različitim vrstama *Legionella*. Naime, *Lp* može nadvladati dobro uspostavljene imunološke putove u makrofagima, uključujući mehanizme poput apoptoze posredovane kaspazom ili NF-κB puta, što sugerira da su interakcije između *Lp* i viših eukariota mogle oblikovati repertoar efektora ove bakterije [224]. Dodatno, izvješća pokazuju da *Lp* može kolonizirati probavni trakt nematoda *Caenorhabditis elegans* [237], uzrokovati upalu pluća kod goveda [238], kao i biti identificirana u gastrointestinalnom traktu tropskih slatkovodnih riba, poput *Panaque nigrolineatus* [239]. Buduća otkrića domaćina *Legionella*, osim protozoa, proširit će naše znanje o interakcijama između bakterije i alternativnih domaćina. Ovo će otvoriti istraživačke putove koji mogu otkriti nove mehanizme zaraze i potencijalne rizike za javno zdravstvo. Razumijevanje ovih interakcija može pomoći u razvoju učinkovitijih preventivnih mjera i terapija.

1.11.3 Biofilm

Biofilmovi čine heterogene zajednice mikroorganizama koji rastu pričvršćeni za vlažne površine poput tla, sedimenta, raspadnute organske tvari ili drugih čvrstih materijala. Sastavljeni su od hidratiziranih gelova izvanstaničnih tvari, polimera, ugljikohidrata, masti, proteina i nukleinskih kiselina koje bakterije izlučuju [240]. Gradijenti hranjivih tvari, pH i kisika unutar matrice biofilma omogućavaju zadovoljenje različitih potreba mikroorganizama unutar biofilma. Protozoe se prirodno razvijaju i hrane u biofilmovima, dodatno povečavajući mikrobnu raznolikost. U oligotrofnim okruženjima, poput vode za piće, "zreli" biofilm s relativno stabilnim mikrobnom zajednicom može se razvijati nekoliko godina [241], no većina istraživanja biofilma obično se provodi nakon kraćeg razdoblja razvoja [242].

U laboratorijskim uvjetima *Lp* može stvoriti biofilm jedne vrste i rasti na odumirućim stanicama [243]. Slobodne legionele mogu opstati unutar biofilma, a njihova aktivnost nije nužno smanjena [244]. Međutim, primarno stanište rasta *Lp* su amebe [245] ili druge slobodnoživuće protozoe povezane s biofilmovima [246, 247]. Unutar ovih domaćina, patogene legionele mogu se replicirati do razina koje

predstavljaju opasnost [248-250]. Stoga, mikrobni biofilmovi predstavljaju izuzetno složene heterogene ekosustave koji se sastoje od bakterija, algi i protozoa. Protozoe mogu pokazivati morfološke karakteristike koje se obično ne javljaju kod mikroorganizama uzgajanih u čistoj kulturi [251].

Stvaranje biofilma na površinama započinje adherencijom putem sluzavog sloja ugljikohidrata iz stanica, glikokaliksa [252], pri čemu prvo dolazi do nespecifičnog vezivanja, a zatim se pionirski mikroorganizmi koloniziraju i množe u mikrokolonijama ili nakupinama. Ove mikrokolonije su zaštićene slojem glikokaliksa. U vodoopskrbnim sustavima, dijelovi biofilma mogu se otkinuti uslijed strujanja vode, što omogućava kolonizaciju legionelama drugih dijelova sustava pod povoljnim uvjetima [253, 254]. Ova dinamika može uzrokovati ponovnu kontaminaciju vode nakon dezinfekcije. Osim toga, *Legionella*, u interakciji s mješovitim zajednicama unutar biofilma, postaje otpornija na djelovanje dezinficijensa [255]. Na primjer, pri neadekvatnoj dezinfekciji klornim preparatima, *Legionella* spp. duže preživljavaju i pokazuju veću otpornost u usporedbi s *Escherichia coli* [256, 257]. Ove bakterije simbiotski rastu s drugim bakterijama vezanim za površinu biofilma, u stabilnim strukturama koje su zaštićene od nepovoljnih uvjeta, poput oskudice hranjivih tvari i ekstremnih temperatura, čime postaju znatno otpornije od planktonske legionele.

Različiti čimbenici povećavaju vjerojatnost stvaranja biofilma, uključujući prisutnost hranjivih tvari u izvornoj vodi i materijalima sustava, kamenac, koroziju, optimalnu temperaturu tople vode te stagnaciju ili nizak protok, kao što se događa u slijepim završecima cjevovoda i spremnicima. Biofilmovi, koji često uključuju legionele i protozoe, obično se formiraju na površinama neodržavanih vodnih sustava. Biofilmovi olakšavaju izmjenu hranjivih i plinovitih tvari, čime štite mikroorganizme ne samo od biocida [258-261], već i od promjena temperature i fizičkog uklanjanja, osobito u područjima gdje su površine korodirane.

Biofilmovi se mogu formirati na granicama između vode i čvrstih površina, ali i na granicama između ulja i vode, kao što je slučaj u tekućinama za obradu metala. Formiranje biofilmova je češće u područjima s niskim protokom i stagnacijom vode. Istraživanja bakterijskih interakcija i međudjelovanja unutar ekosustava biofilma ocijenila su učinke različitih parametara, poput temperature i tipa površinskog materijala [261-265], na rast *Lp*, kao i djelovanje biocida na planktonske i sesilne legionele pričvršćene na površinske materijale. U većini tih istraživanja koristile su se prirodne mikrobne zajednice, što povećava vjerodostojnost rezultata [266-269].

Međutim, identifikacija specifičnih organizama u biofilmovima i njihov doprinos preživljavanju i razmnožavanju *Legionella* još uvijek se istražuje. Kontaminacija *Legionella* u namjenski izgrađenim sustavima za distribuciju vode i rashladnim tornjevima potvrđuje prisutnost i naknadni rast ovog mikroorganizma u biofilmovima umjetnih vodnih okoliša [270, 271].

Dostupnost složenih hranjivih tvari u biofilmovima potaknula je istraživače na razmišljanje da ti biofilmovi podržavaju preživljavanje i razmnožavanje *Legionella* izvan stanice domaćina. U istraživanju provedenom 1977. godine, Oleinick je u modelnom sustavu demonstrirao rast *Legionella* unutar biofilma sastavljenog od mikroorganizama iz prirodne vode, pri čemu nisu bili prisutni protozoe. U sustav je dodan cikloheksimid u visokim dozama, koji inhibira sintezu proteina u svim eukariotskim stanicama, utječući na sve faze sinteze proteina (inicijaciju, elongaciju, terminaciju) [272]. U nedostatku protozoa, zabilježen je porast broja heterotrofnih bakterija, uključujući i *Legionella* [265, 273]. Rogers i Keevil su 1992. godine u svom istraživanju [274] koristili imunogold tehniku za označavanje *Legionella* unutar biofilma, gdje su u odsutnosti ameba otkrili prisutnost *Legionella* u mikrokolonijama, što sugerira da su bakterijski konzorciji opskrbljivali *Legionella* dovoljnim količinama hranjivih tvari za izvanstanični rast. Nasuprot tome, istraživanje Murge i suradnika iz 2001. godine ukazalo je na to da se razmnožavanje *Legionella* odvija isključivo unutar ameba [209].

Prevencija stvaranja biofilma ključna je mjera u borbi protiv proliferacije *Legionella*, budući da je jednom formirane biofilmove vrlo teško ukloniti iz složenih cjevovodnih sustava, što dodatno naglašava važnost proaktivnih mjera. Prisutnost kamenca i korozije u sustavu povećava dostupnu površinu i stvara mikroniše zaštićene od djelovanja cirkulirajućih dezinficijensa, čime se dodatno pogoršava situacija. Osim toga, kamenac i korozija doprinose povećanju koncentracije hranjivih tvari i čimbenika rasta u vodenom sustavu, poput željeza. Nekontrolirani biofilmovi mogu uzrokovati začepljenje cjevovoda, što dovodi do područja slabog protoka i stagnacije, te povećava rizik od rasta *Legionella*.

Prisutnost biofilma i protozoa pruža dvostruku zaštitu bakterijama unutar sustava, povećavajući organsko opterećenje i smanjujući učinkovitost preostalih razina dezinficijensa. Uz to, biofilm i bakterije zaštićene unutar protozoa, uključujući *Legionella* spp., pokazuju veću toleranciju prema kloru i drugim antimikrobnim sredstvima, čak i u koncentracijama višim od onih koje se uobičajeno koriste za dezinfekciju vode, dok su u laboratorijskim uvjetima ta sredstva djelovala letalno [205].

Važno je napomenuti da na razvoj biofilma pozitivno utječu dulja razdoblja stagnacije vode, uz specifične temperature u rasponu od 20 °C do 50 °C, koje predstavljaju optimalne uvjete za rast i razmnožavanje *Legionella* i drugih mikroorganizama unutar biofilma.

Legionella u sustavima distribucije tople vode predstavlja značajan javnozdravstveni problem [275]. Materijali korišteni za izgradnju tih sustava, koji dolaze u dodir s vodom, također igraju važnu ulogu u rastu biofilma. Neki vodovodni materijali potiču proliferaciju mikroorganizama, uključujući *Legionella* [193]. Prirodne tvari, poput gumenih brtvi, pružaju mikroorganizmima supstrat bogat hranjivim tvarima, što dovodi do njihove kolonizacije, dok se hranjive tvari s plastičnih dijelova otpuštaju u sustav. Većina projektiranih vodovodnih sustava, posebno onih složenije strukture, sadrži dijelove u kojima se razvijaju biofilmovi, čak i ako se sustav redovito održava putem detaljnog režima kontrole. Kada se mjere kontrole, poput dezinfekcije, ublaže, mikroorganizmi, uključujući legionele, mogu se brzo umnožiti do razina koje se mogu dokazati i koje predstavljaju potencijalnu opasnost.

1.11.4 Ostali čimbenici (sadržaj metala, talog)

Uslijed korozivnih procesa metalnih dijelova sustava vodoopskrbe, koncentracije iona metala u vodi mogu porasti, što zajedno s oksidnim spojevima potiče mikrobni rast u biofilmovima. Brojna istraživanja ukazuju na povezanost između nekoliko metala (npr. željeza, cinka, kalcija, mangana, magnezija) i prisutnosti *Legionella* u vodovodnim sustavima [275-277]. Vickers i suradnici [277] su 1987. godine izvijestili da su kalcij i magnezij, ali ne i željezo i cink, povezani s *Lp* u bolničkim vodnim sustavima, dok su Bargellini i suradnici [275] 2011. godine primijetili korelaciju željeza i cinka s *Lp* u sustavima tople vode u hotelima i privatnim kućama.

Intenzivno se proučava uloga željeznih spojeva u rastu *Lp*, koji se smatra preduvjetom za njezin razvoj u kemijski definiranim medijima [197, 278]. Dodavanje kelatora željeza, poput laktoferina, umanjuje održivost *Lp* [279], dok željezni ioni također potiču virulenciju *Lp* [280]. Preopterećenje željezom povezano je s povećanjem stope infektivnosti *Legionella* u amebama i makrofagima, što ukazuje na povećanu virulenciju [281, 282], iako prekomjerne količine željeza inhibiraju stvaranje biofilma s legionelama [244]. Učinak drugih mineralnih elemenata na rast *Lp* u vodovodnim sustavima još uvijek nije u potpunosti razjašnjen i zahtijeva daljnja istraživanja [283]. Korozijski proizvodi imaju multifaktorijalan utjecaj na proliferaciju

Legionella, a trošenje zaostalog dezinficijensa stvara povoljnije uvjete za njen rast [284]. Povećana bioraspoloživost korozijskih produkata, poput željeza, može povećati virulentnost *Legionella*, potaknuti rast biofilma [246] i doprinijeti razvoju *Legionella* unutar spremnika tople vode [285-287]. Željezo oslobođeno tijekom korozijskog incidenta u Flintu, Michigan, uzrokovalo je smanjenje SRK i poslužilo kao izvor hranjivih tvari za *Legionella* [197, 278], što se također smatra faktorom koji je potaknuo njihov rast [288]. Istraživanje iz 2017. pokazalo je da željezna hrđa u glavama tuševa od nehrđajućeg čelika može rezultirati povećanim brojem izolata *L. anisa*.

Opsežne epidemije legioneloze povezane su s obradom aktivnog mulja u tvornicama celuloze i papira, kao i s otpadnim vodama pivovara, koje se obično ne dezinficiraju i kreću se u temperaturnom rasponu od 30 °C do 40 °C [118, 289]. S druge strane, komunalna otpadna voda koja se pročišćava konvencionalnim postupkom s aktivnim muljem obično pokazuje niske razine *Legionella*, što je vjerojatno djelomično uzrokovano temperaturama nižim od 30 °C [290].

1.12 *Legionella* u sustavu distribucije vode na brodovima

Sve veći razvoj pomorskog prometa doveo je do porasta incidencije pojave LB kod posade i putnika na brodovima, što ovu bolest čini sve ozbiljnijim javnozdravstvenim izazovom [291]. Današnji trajekti i kruzeri okupljaju globalnu zajednicu, gdje se susreću putnici i posada iz različitih dijelova svijeta, često s različitim zdravstvenim profilima i imunološkim statusima. Prvi slučaj LB povezan s brodom zabilježen je 1977. godine na Mediteranu [64], a između 1977. i 2004. zabilježeno je najmanje 55 epidemija ili pojedinačnih slučajeva LB/legioneloze povezanih s kruzerima, trajektima, teretnim brodovima, ribarskim plovilima i pomorskim brodovima [2, 292]. Neki od tih incidenata povezani su sa sustavima za distribuciju vode na brodovima, klimatizacijskim sustavima i rekreacijskim hidromasažnim kadama, no u većini slučajeva izvor infekcije i/ili način prijenosa nije utvrđen. Stoga je važno temeljito ocijeniti rizik od izloženosti *Legionella* na brodovima. Istraživanja na brodovima za opći teret [293] pokazuju da su sustavi pitke vode i klimatizacije kontaminirani *Lp*, dok su serološka istraživanja pomoraca na tim brodovima otkrila prisutnost antitijela na *Lp*. Ove informacije specifične su za tu skupinu ispitanika i ne uključuju uvijek analizu *Legionella* u brodskim vodnim sustavima, no ukazuju na mogući povećani rizik izloženosti LB ili legionelozi u usporedbi s obalnim zajednicama.

Istraživanje Temeshnikova i sur. iz 1996. godine [294] provedeno na šest prekooceanskih brodova dodatno potvrđuje ovaj rizik. U okviru istraživanja uzeto je 19 uzoraka pitke i tehničke vode te 205 uzoraka ispirka iz ventilacijske i klimatizacijske opreme, koji su ispitani na *Legionella*, dok je 300 seruma članova posade analizirano testom indirektne imunofluorescencije (IFA) za detekciju antitijela na *Lp*. *Lp* SG1 izolirana je u šest kultura: iz jednog uzorka pitke vode, dva uzorka klimatizacijske opreme i tri uzorka iz ventilacijskih sustava. Također, 87 od 300 uzoraka seruma članova posade imalo je titre antitijela ≥ 1:128 na *Lp* SG1. Ovo istraživanje potvrđuje kontaminaciju legionelama u vodenim sustavima brodova i prisutnost antitijela kod članova posade, što ukazuje na povećan rizik od legioneloze kod pomoraca. Stoga su potrebne mjere kontrole kako bi se smanjio rizik od legioneloze na prekooceanskim brodovima.

Broj prijavljenih slučajeva legionarske bolesti vjerojatno je podcijenjen u odnosu na stvarnu učestalost, jer se epidemije i slučajevi povezani s brodovima, posebno trajektima, teško otkrivaju. Razdoblje inkubacije od 2 do 10 dana, koje može biti i duže, omogućuje putnicima da prije pojave simptoma otputuju ili promijene destinacije. Kako bi se takve epidemije lakše otkrile, uspostavljen je međunarodni nadzorni program TALD za LB povezanu s putovanjima. Budući da se infekcije često dijagnosticiraju nakon povratka putnika, ključna je pravodobna dojava kroz međunarodni sustav za sprječavanje širenja bolesti.

Učestalost legioneloze kod turista varira ovisno o zemlji prebivališta ili odlaznoj zemlji i zemlji nastanka same infekcije, što je u većoj mjeri rezultat razlika u dijagnostičkim metodama i sustavima prijavljivanja nego prisutnosti *Legionella.* Povijesno gledano, Ujedinjeno Kraljevstvo prijavilo je EWGLINET-u više slučajeva nego druge zemlje, no Italija, Francuska, Španjolska i Njemačka bilježe rastući broj prijava tijekom godina [294-297], vjerojatno zbog napretka u dijagnostici i praćenju. Kad se na brodu ili trajektu pojavi epidemija, često je izazov identificirati plovilo kao izvor zaraze, budući da putnici često prekidaju putovanje na različitim lokacijama ili borave u hotelima prije ili nakon plovidbe. Praćenje incidenata povezanih s brodovima otežava promjena imena plovila, osobito ako se promijenilo i vlasništvo. Da bi se identificirao izvor infekcije, potrebno je usporediti izolirane sojeve *Legionella* iz okoliša s kliničkim izolatima. Međutim, u slučaju brodova to često nije moguće, obzirom će sumnjivo plovilo otploviti u drugu zemlju prije identifikacije slučaja. Zbog toga je ključna dobra suradnja između međunarodnih lučkih, zdravstvenih tijela i pomorskih vlasti.

S obzirom na složene sustave za distribuciju vode na trajektima i brodovima, dokazano je da *Legionella* može kolonizirati tople i hladne vodovodne sustave, klimatizaciju, bazene i rekreacijske vodene sustave [298-310]. Sustavi za distribuciju tople i hladne vode na brodovima često su povezani s epidemijama. Nakon epidemije legionarske bolesti na kruzeru u Italiji tijekom 1995. i 1996. godine, iz pacijenata i brodske vode izolirani su identični sojevi *Lp* SG 1, iako točan izvor infekcije nije utvrđen [301]. Godine 1998. došlo je do epidemije na kruzeru koji je plovio Mediteranom i norveškim fjordovima [311]. Na brodu nije bilo moguće održavati temperaturu vode u sigurnim rasponima, a sustav doziranja klora nije osiguravao adekvatnu dezinfekciju. Tijekom pristajanja broda u Greenocku, 21. lipnja 1998.godine, uzeto je šest uzoraka vode iz glavnih spremnika, tuševa i spa bazena. Rezultati su pokazali značajne razine *Legionella* u pet uzoraka iz sustava za distribuciju tople vode na izljevnim mjestima tuševa, koji su bili kontaminirani legionelama. Sustavi za distribuciju vode [301] i unutarnji bazeni putničkih brodova [306, 312] identificirani su kao izvori infekcije, dok je moguća povezanost sa sustavom klimatizacije dokumentirana [313]. Na brojnim kruzerima i nekim trajektima instalirane su hidromasažne kade, a rizici povezani s njihovim korištenjem slični su onima na kopnu.

Godine 1994., na kruzeru koji je plovio u SAD-u, zabilježeno je 50 slučajeva legionarske bolesti tijekom devet krstarenja. Vjerovalo se da je bolest uzrokovana neadekvatnom dezinfekcijom tri hidromasažne kade na brodu, pri čemu je rizik od oboljenja povećan za 64 % za svaki sat proveden u kadi [306]. Putnici koji su se nalazili u blizini hidromasažnih kada, ali ne i u vodi, također su imali znatno veću vjerojatnost zaraze. *Lp* SG1 izolirana je samo iz pješčanog filtra vruće kupke na brodu [306]. Ovaj izolat, ispitivan monoklonskim antitijelima i PCR-om, bio je podudaran s kliničkim izolatom iz respiratornog sekreta pacijenta.

Godine 1997. na krstarenju Rajnom došlo je do epidemije legionarske bolesti koja je zahvatila šest osoba. U jednom od slučajeva, pacijent je bio izložen aerosolu iz hidromasažne kade na kruzeru, a analiza je pokazala prisutnost *Lp* u uzorcima vode s broda. Ovi rezultati ukazuju na vezu između korištenja hidromasažne kade i oboljenja [308]. Godine 2003., tijekom krstarenja oko Islanda, osam njemačkih putnika oboljelo je od LB, a jedan je preminuo. Izolirani su sojevi *Lp* SG1, a infekcija je epidemiološki povezana s hidromasažnom kadom [314]. Ova epidemija istaknula je važnost međunarodne suradnje u istraživanju bolesti na brodovima, budući da su slučajevi

otkriveni i istraženi u Njemačkoj nakon što je brod pristao, dok je istraga nastavljena u sljedećoj luci, Ujedinjenom Kraljevstvu.

Iako nema potvrđenih izvješća o izbijanju LB izravno povezanih s klimatizacijskim sustavima na brodovima, nekoliko epidemija sugerira da su ti sustavi mogli biti izvor zaraze. Godine 1984. na kruzeru u Bordeauxu, Francuska [308], došlo je do velike epidemije s 50 oboljelih, od kojih je šest osoba preminulo, nakon što je klima uređaj bio uključen. Iako zajednički izvor nije identificiran, epidemiološko istraživanje je utvrdilo da je klimatizacijski sustav mogao doprinijeti ovoj epidemiji.

Rowbotham i sur. [308] istraživali su povezanost LB s brodovima i dokazali vezu između *Legionella* i slučajeva bolesti. Istraživanje je obuhvatilo slučajeve legioneloze/LB na brodovima tijekom dva desetljeća, od 1977. do 1997. godine, s ukupno 100 zabilježenih slučajeva, od kojih je 10 imalo letalan ishod. Većina slučajeva bila je povezana s kruzerima, iako su i druga plovila bila uključena. Uzorci s plovila često su bili nedovoljno mikrobiološki ispitani, a slučajevi povezani s trajektima često su imali druge izvore zaraze. Istraživanje je pokazalo rjeđe slučajeve oboljenja među članovima posade nego među putnicima, te da su slučajevi češće vezani uz LB, dok su legioneloze bez pneumonije povezane s brodovima rijetke. Ova istraživanja istaknula su značajan izazov u održavanju i kontroli vodnih sustava na brodovima kako bi se spriječila kontaminacija legionelama, što je dovelo do razvoja smjernica i postupaka za prevenciju i smanjenje rizika od legioneloze/LB na plovilima.

Neke od ključnih smjernica uključuju redovito čišćenje i dezinfekciju svih vodnih sustava na brodovima, uključujući cjevovode, spremnike za vodu, klimatizacijske sustave, te izljevna mjesta poput tuševa i slavina. Važno je pratiti temperaturu vode u sustavima za distribuciju tople i hladne vode kako bi se osigurala sigurnost, redovito testirati vodu na prisutnost *Legionella*, te poduzeti odgovarajuće mjere ako se otkrije kontaminacija. Također, potrebno je educirati posadu o simptomima legioneloze/LB i mjerama smanjenja rizika, uz pravovremeno reagiranje i izolaciju izvora kontaminacije. Ove smjernice mogu varirati ovisno o specifičnostima brodskih operacija i zakonskim zahtjevima različitih zemalja.

Utvrđeni su brojni čimbenici koji povećavaju rizik kontaminacije legionelama na brodovima, uključujući otežano održavanje sustava za distribuciju vode, neadekvatnu dezinfekciju, stagnaciju vode, nedovoljnu kontrolu temperature, lošu ventilaciju unutarnjih prostora i kratko zadržavanje brodova u lukama. Brod, bilo usidren ili u plovidbi, predstavlja zatvoreno okruženje koje dodatno pogoduje prijenosu infekcije

aerosolom. Sustavi za skladištenje i distribuciju vode na brodovima su složeni i mogu predstavljati povećani rizik od bakterijske kontaminacije. Postoji opasnost od ponovne uporabe već korištene vode bez odgovarajuće obrade, kao i od raspršivanja sedimenta u spremnicima. Ove situacije su vjerojatnije tijekom kretanja broda i prilikom promjena razine vode unutar sustava. Kvaliteta i temperatura napunjene vode u sustavu distribucije brodova također mogu varirati.

U nekim tropskim regijama, rizik od rasta mikroorganizama, uključujući *Legionella*, povećava se u sustavima hladne vode zbog viših temperatura okoliša. Visoka temperatura zraka u strojarnicama brodova može negativno utjecati na temperature vode u cijevima koje prolaze blizu tih prostora. Kretanje broda također može povećati potencijal za stvaranje aerosola, primjerice u klimatizacijskim sustavima. Proliferacija mikroorganizama i formiranje biofilmova mogu nastati uslijed dugotrajnog skladištenja i stagnacije vode u spremnicima i cijevima, a ovaj rizik dodatno se povećava kada se voda u spremnicima zadržava duže vrijeme. *Legionella* se može razmnožavati na temperaturama koje se ponekad postižu u stajaćoj toploj vodi unutar sustava distribucije vode na brodovima, osobito u tropskim regijama, kao i u brodskim spremnicima [315]. Ovi čimbenici ukazuju na potrebu za uspostavljanjem međunarodno prihvaćenog programa specifičnih i ciljanih preventivnih mjera te standarda, temeljenog na znanstvenim saznanjima i stručnom iskustvu, kao i za certificiranje brodova prema dogovorenim sanitarnim standardima.

1.12.1 Plan sigurnosti vode za brodove

Plan sigurnosti vode (engl. *Water Safety Plan*; WSP) predstavlja sustav upravljanja specifičnim zdravstvenim rizicima iz vodnih sustava, što uključuje i izloženost legionelama [271, 316]. Odgovorni subjekti za sigurnost sustava distribucije vode obvezni su razviti WSP prilagođen pojedinom sustavu, a glavne prednosti izrade i provedbe takvog plana uključuju sustavnu i detaljnu procjenu te određivanje prioriteta za biološke, kemijske i fizikalne opasnosti vezane uz vodu, koje mogu izazvati štetne učinke na zdravlje, uz operativno praćenje rizika i kontrolnih mjera za osiguranje zdravstvene sigurnosti. Javnozdravstveni rizik koji predstavljaju LB/legioneloza može se učinkovito smanjiti preventivnim mjerama, iako se izvor *Legionella* ne može potpuno eliminirati. Stoga se WSP primjenjuje za procjenu i upravljanje rizicima povezanim s legionelom na brodovima, te se uklapa u okvir za sigurnost vode koji je razvila Svjetska zdravstvena organizacija (SZO, engl. *World Health Organisation*; WHO). WSP

obuhvaća 10 koraka koji se odnose na tri ključna područja: procjenu, praćenje i upravljanje sustavom, te komunikaciju. Uključuje sveobuhvatnu procjenu sustava, operativno praćenje i plan upravljanja rizicima povezanim s legionelama, s posebnim naglaskom na određene dijelove brodskih sustava, ovisno o njihovoj namjeni [317].

U sustave kontrole vode na brodovima uključeni su i regulatori koji osiguravaju zdravstvenu sigurnost i kvalitetu vode za ljudsku potrošnju u Republici Hrvatskoj, što je usklađeno s važećom zakonskom regulativom, s ciljem zaštite zdravlja ljudi od potencijalnih negativnih učinaka kontaminacije vode. Dana 16. prosinca 2020. godine stupila na snagu nova Direktiva (EU) 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća o kvaliteti vode za ljudsku potrošnju (preinaka) [318], što je dovelo do ažuriranja nacionalnih zakonodavstava zemalja članica. Ova Direktiva je prenesena u hrvatsko zakonodavstvo putem Zakona o vodi za ljudsku potrošnju (NN 30/2023) [319], kojii je donesen u ožujku 2023. godine, uz pripadajuće podzakonske akte. Prvi Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/23 i 88/23) [320], drugi Pravilnik o sanitarno-tehničkim i higijenskim te drugim uvjetima koje moraju ispunjavati građevine za vodoopskrbu i poslovanje u njima (NN 88/23) [321], treći Pravilnik o parametrima zdravstvene ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u dodir s vodom namijenjenom za ljudsku potrošnju (NN 64/23) [322], te četvrti Pravilnik o kontroli parametara kućne vodoopskrbne mreže potrošača i drugih sustava od javnozdravstvenog značaja te planu i programu edukacije svih dionika (NN 43/2024) [323], iz 2024. godine.

Prvi Pravilnik NN 64/23 i 88/23 [320] definira vrstu i opseg analiza, učestalost uzorkovanja, metode uzorkovanja, točke uzorkovanja te metode laboratorijskog ispitivanja. U njemu su specificirani parametri sukladnosti vode namijenjene za ljudsku potrošnju, uključujući mikrobiološke, kemijske, indikatorske parametre, parametre ispravnosti kućne vodoopskrbne mreže, parametre operativnog praćenja i parametre radioaktivnih tvari. Također, određuju se maksimalno dozvoljene vrijednosti ili rasponi pojedinih parametara, podijeljenih u skupine A i B. Parametri skupine A daju osnovne podatke o sukladnosti i učinkovitosti prerade, dok skupina B obuhvaća sve ostale parametre.

Drugi Pravilnik (NN 88/23) [321] propisuje obvezu isporučitelja vode za izradu Planova sigurnosti vode (WSP) i provedbu sustava samokontrole koji se temelji na proaktivnoj procjeni i upravljanju rizicima u cijelom lancu vodoopskrbe, od slivnog

područja do krajnjih potrošača. To obuhvaća slivno područje, zahvat, obradu, skladištenje i distribuciju vode.

Treći Pravilnik (NN 64/23) [322] po prvi puta u Republici Hrvatskoj regulira minimalne higijenske zahtjeve materijala koji dolaze u dodir s vodom koja je namijenjena za ljudsku potrošnju. Zahtjevi su postavljeni za kemikalije koje se koriste prilikom obrade i medija za filtriranje u kontaktu s vodom za ljudsku potrošnju.

Četvrti Pravilnik (NN 43/2024) [323] propisuje obvezu vlasnika prioritetnih objekata da izrade procjenu rizika za kućnu vodoopskrbnu mrežu. Cilj je usmjeriti monitoring na praćenje *Legionella* i razine olova u kućnim vodoopskrbnim mrežama prioritetnih objekata i drugih sustava od javnozdravstvenog značaja. Prioritetni objekti obuhvaćaju velike javne ustanove, poput zdravstvenih ustanova, škola, domova za starije, hotela, kampova, sportskih dvorana i trgovačkih centara. Procjena rizika kućne vodoopskrbne mreže ovih objekata uključuje identificiranje mogućih rizika koji proizlaze iz vodoopskrbe, s ciljem realne procjene izloženosti i mogućih posljedica. Procjena uzima u obzir osjetljivost populacije, broj izloženih osoba i vrstu izloženosti. Svi postupci, planovi i evidencije povezani s procjenom rizika i samokontrolom objedinjeni su u dokument koji služi kao smjernica za upravljanje rizicima i poduzimanje odgovarajućih mjera, uz optimizaciju troškova. Provedbom ovog pravilnika osigurava se dostupnost zdravstveno ispravne vode i u dovoljnim količinama za sve korisnike.

Zakon o vodi za ljudsku potrošnju [319] regulira obveze pomorskih plovila koja pružaju ugostiteljske usluge za više od 20 osoba. Ta plovila, koja prevoze putnike u sklopu komercijalne djelatnosti, dužna su između travnja i lipnja svake godine provesti "A" analize vode te analize na parametre *Legionella* i olovo, prema broju uzoraka određenih pravilnikom iz članka 9. Zakona. Analize provode nadležni zavodi za javno zdravstvo. Svi prioritetni objekti obvezni su osnovati "Povjerenstvo za procjenu rizika kućne vodoopskrbne mreže" ili imenovati odgovornu osobu te uspostaviti sustav samokontrole kućne vodoopskrbne mreže. Također, potrebno je izraditi dokument "Procjena rizika kućne vodoopskrbne mreže", koji uključuje "Plan monitoringa kućne vodoopskrbne mreže" prema kojem se provodi nadzor.

Sustavni pristup upravljanju sigurnošću vode, temeljen na procjeni rizika, sličan je sustavu analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (engl. *Hazard Analysis and Critical Control Point*; HACCP) koji se koristi u poslovanju s hranom. WHO je razvio sličan sustav za vodu za piće, poznat kao Plan sigurnosti vode (engl. *Water Safety*

Plan; WSP), a EU SHIPSAN ACT je usvojio ovaj pristup za upravljanje kvalitetom pitke vode na putničkim brodovima. Operateri putničkih brodova obvezni su primjenjivati WSP koji je već uspostavljen kako bi osigurali sigurnost, zdravstvenu ispravnost i dostupnost vode za ljudsku potrošnju. Oni moraju upravljati mogućim rizicima, prevenirati štetne posljedice po zdravlje te spriječiti mikrobiološku, kemijsku i fizikalnu kontaminaciju prilikom dopreme vode, uz sigurno skladištenje i distribuciju do krajnjih potrošača, u skladu sa smjernicama WHO i Međunarodnog udruženja za vodu (engl. *International Water Association*; IWA).

Smjernice EU SHIPSAN ACT također naglašavaju važnost implementacije WSP-a radi osiguranja zdravstvene sigurnosti vode za ljudsku potrošnju i smanjenja rizika kojima su izloženi osoblje i putnici na brodovima, kroz cijeli sustav dopremanja i distribucije vode do svih izljevnih mjesta [165]. WSP se posebno preporučuje ako se voda doprema iz izvora koji nije u sustavu javne vodoopskrbe, kao i za velike brodove s kompleksnim sustavima. Neučinkovito upravljanje takvim sustavima može dovesti do rizika od *Legionella* i infekcija putem vode, npr. kroz kontaminirane sustave hlađenja, distribucije vode ili rekreacijske objekte. Provedba WSP-a osigurava kvalitetu vode za sve namjene i upravljanje rizicima svih povezanih sustava i opreme.

WSP pristup je preventivan i od posebnog je značaja kada postoje složeniji sustavi i više lokacija. WSP uključuje ažurirani opis svakog sustava i pripadajuće opreme, uz utvrđeni registar imovine koji obuhvaća sve relevantne komponente, poput spremnika, pumpi, ventila za miješanje i ograničavanje protoka. Također, plan uključuje ažurirani shematski dijagram svakog sustava koji prikazuje raspored postrojenja ili sustava, uključujući dijelove koji su privremeno izvan uporabe. WSP predstavlja pojednostavljeni prikaz svih relevantnih komponenti i veza, tako da ga može lako razumjeti i osoba bez tehničke izobrazbe. WSP obuhvaća procjenu rizika koja se provodi za svaki sustav i povezanu opremu koja koristi vodu. Također, sadržava plan upravljanja vodama kako bi se rizici od oboljenja zbog legionela i drugih relevantnih patogena koji se prenose vodom sveli na najmanju moguću mjeru. Nadzor, revizija, osposobljavanje i komunikacija ističu se kao ključni elementi kontinuiranog upravljanja tim rizicima.

WSP također treba uključivati plan za rješavanje predvidivih problema, uključujući korektivne mjere koje se trebaju poduzeti u slučaju pojave takvih događaja. Na primjer, plan bi trebao obuhvatiti situacije kao što su kvarovi kritičnih dijelova opreme, poput cirkulacijske pumpe, za koje se može očekivati da će se dogoditi tijekom

planiranog razdoblja rada, ili poremećaji u isporuci kemikalija za obradu vode. Osim toga, potrebno je imati dokumentirani popis s kontakt podacima odgovornih osoba koje će biti obaviještene u slučaju da se takav incident dogodi. Bitna komponenta WSP-a je timski pristup upravljanju rizicima, što uključuje imenovanje tima stručnjaka (engl. *Water Safety Group*; WSG) ili "Povjerenstva za procjenu rizika kućne vodoopskrbne mreže", odnosno imenovanje odgovorne osobe. Ova struktura osigurava da su uključeni stručnjaci potrebnih profila te da postoji učinkovita međusobna komunikacija, s ciljem sigurne procjene i upravljanja rizicima koji se odnose na vodu za sve vrste namjena i sve korisnike.

Stoga, WSG okuplja multidisciplinarni tim koji obično čine: nadležni inženjer ili tehničar vodnog sustava, predstavnik stručnjaka za proces pročišćavanja vode koji pruža usluge kao što su procjena rizika, dezinfekcija, čišćenje, praćenje i uzorkovanje, konzultant kvalificiran za interpretaciju rezultata praćenja vode te provedbu odgovarajućih korektivnih mjera, neovisni revizor, član višeg rukovodstva i predstavnik korisnika svih specijaliziranih sustava unutar samog sustava. Sastav tima stručnjaka može varirati ovisno o broju i složenosti sustava. Na čelu tima nužno je imenovati osobu koja snosi opću pravnu odgovornost za zdravstvenu sigurnost unutar sustava, a to može biti vlasnik, upravitelj ili glavni izvršni direktor broda. Ova odgovorna osoba imat će svakodnevnu odgovornost za WSP, uključujući dogovaranje projekata za vodne sustave u novim brodovima i preuređenja postojećih sustava kako bi se minimalizirali rizici od infekcija koje se prenose vodom, razvoj i provedbu projekata, preispitivanje procjena rizika, upravljanje dokumentacijom i rezultatima praćenja te implementaciju svih korektivnih mjera. WSP se posebno preporučuje i provodi na putničkim brodovima, budući da je učinkovita implementacija isključivo monitoringa *Legionella* u sustavima distribucije vode ograničena u pogledu sprječavanja infekcija.

Razvoj WSP-a za smanjenje rizika, prevenciju i kontrolu *Legionella* u sustavima za distribuciju vode na trajektima i brodovima obuhvaća hodogram postupanja za svako od tri osnovna područja: procjenu, praćenje i nadzor sustava.

1.12.1.1 Procjena sustava WSP

Procjena sustava WSP je područje koje uključuje identifikaciju, procjenu i analizu potencijalnih rizika koji mogu nastati tijekom opskrbe vodom. To obuhvaća analizu izvora vode, kao i procjenu mogućih kontaminacija i prijetnji koje se mogu pojaviti tijekom obrade, distribucije i skladištenja vode.

Procjena sustava je prvo glavno područje WSP-a, gdje je važno okupiti i uspostaviti WSG za pripremu WSP-a. U tom procesu potrebno je dokumentirati i opisati sustav, procijeniti opasnosti, odrediti prioritetne rizike i provesti sveobuhvatnu procjenu sustava opskrbe pitkom vodom, koja obuhvaća sve aspekte, od opskrbe do potrošača, uključujući izvore vodoopskrbe, pročišćavanje, distribuciju i skladištenje vode [2]. Svi potencijalni događaji ili situacije koje bi mogle dovesti do prisutnosti opasnosti moraju se identificirati i prikazati u dijagramu ili tablici toka, uz temeljito istraživanje, dokumentiranje i opisivanje svih mogućih izvora *Legionella*. Procjena opasnosti, koja uključuje prioritetne rizike, zahtijeva prikupljanje i evaluaciju informacija o opasnostima te uvjetima koji dovode do njihove prisutnosti, kako bi se identificirale one koje su značajne za zdravstvenu sigurnost unutar plana postupanja.

Opasnosti koje se mogu pojaviti u sustavu opskrbe pitkom vodom obuhvaćaju različite kategorije onečišćenja koje predstavljaju značajan rizik za zdravlje korisnika. Mikrobiološka onečišćenja često su posljedica prisutnosti fekalnih mikroorganizama, među kojima su najvažniji enterokoki, *E. coli*, *Cryptosporidium* spp., kao i bakterije poput *Legionella* spp. i *Mycobacterium* spp. Osim mikrobioloških, postoji i rizik od kemijskog onečišćenja koje može nastati izlaganjem teškim metalima, pesticidima, zaostalim dezinfekcijskim sredstvima i njihovim nusproduktima, kao i hlapivim organskim spojevima (engi. *Volatile Organic Compaund's*, iVOC). Uz to, fizikalna kontaminacija vode također predstavlja moguću opasnost, a uključuje onečišćenje sedimentom, česticama i otpuštenim spojevima iz materijala cijevi i spremnika, kao i spojevima željeza i mangana koji se oslobađaju iz biofilmova [165].

Kontaminacija vode na brodovima može se dogoditi tijekom različitih faza opskrbe, počevši od onečišćenja izvora vode u luci gdje se brodovi opskrbljuju pitkom vodom, dok morska voda može predstavljati rizik ako se koristi za proizvodnju pitke vode. Tijekom utovara, kontaminacija može nastati putem crijeva ili sporednih bočnih priključaka, posebno ako oprema nije pravilno održavana ili čišćena. Prilikom skladištenja vode, rizik od onečišćenja povećava se prisutnošću stranih materijala ili drugih tvari zbog neadekvatnog projektiranja i održavanja spremnika, kao i prisutnosti taloga ili sedimenta koji doprinose formiranju biofilma te omogućuju razmnožavanje organizama kao što su *Legionella*, *Mycobacterium* spp., *P. aeruginosa* i ameba. Dodatni čimbenici koji mogu doprinijeti kontaminaciji uključuju oštećenja i neispravnosti spremnika, prodor stranih materijala tijekom popravka, pojava povratnog toka vode, neodgovarajuće praćenje temperatura koje može dovesti do rasta bakterija,

nedovoljnu dezinfekciju i križne veze s drugim sustavima vode, kao što su tehnički, crni ili sivi sustavi, što sve predstavlja značajan rizik za kvalitetu vode za piće na brodovima [70].

Stoga, kako bi se smanjio rizik od kontaminacije vode i prevenirale bolesti kao što su legioneloze, ključno je redovito održavati sustave za distribuciju vode provođenjem higijenskih postupaka, uz dokumentirane i lako dostupne zapise koji su podložni upravnom nadzoru. Rizik od legioneloze posebno se povećava u sustavima na brodovima gdje je utvrđena prisutnost bakterije *Legionella*. Kruzeri, s obzirom na sličnosti u složenosti i specifičnosti svojih vodnih sustava s hotelima, zahtijevaju kontinuiranu i učinkovitu kontrolu *Legionella*. Osoblje zaduženo za održavanje vodnih sustava na brodovima mora biti adekvatno educirano i osposobljeno za provođenje ovih mjera. Značaj osposobljavanja prepoznat je u brojnim objavljenim vodičima za prevenciju, a rezultati edukativnih programa pokazuju ohrabrujuće podatke koji potvrđuju važnost obrazovanja u sprječavanju legioneloza u turističkom sektoru [324]. Stoga je potrebno propisati kontrolne mjere za svaki potencijalno opasan događaj kako bi se dodatno smanjio rizik i osigurala sigurnost putnika i posade.

1.12.1.2 Operativno praćenje WSP – kontrola rizika

U ovom području razvijaju se strategije i mjere kontrole, praćenja tih mjera i provjere učinkovitosti WSP-a, kako bi se smanjili ili eliminirali identificirani rizici. Ovo uključuje implementaciju tehničkih i operativnih mjera, poput filtracije, dezinfekcije i održavanja sustava, kao i uspostavu procedura za nadzor i održavanje kvalitete vode.

Europske smjernice za kontrolu i sprečavanje legionarske bolesti naglašavaju važnost implementacije kontrolnih mjera kako bi se spriječila LB povezana s putovanjima, uz pružanje detaljnih definicija i opisa relevantnih postupaka [294]. Naglasak je stavljen na osiguranje kvalitete izvorišne vode kroz kontrolne mjere, a međunarodni zdravstveni propisi zahtijevaju opskrbu brodova vodom za piće iz luka. Iako ne postoji zahtjev da voda za ljudsku potrošnju bude potpuno slobodna od *Legionella*, što bi bilo nerealno, voda dopremljena na plovilo trebala bi zadovoljiti standarde kvalitete pitke vode i poticati iz pouzdanog izvora.

S obzirom na to da se pouzdanost vodoopskrbe ne može uvijek jamčiti, nužno je poduzeti mjere opreza na plovilu kako bi se osigurala zdravstvena sigurnost vode. U tom smislu, sustavi distribucije tople i hladne vode trebaju uključivati kako kontrolne tako i korektivne mjere. Metode prevencije i kontrole koje se primjenjuju putem

procjene rizika usmjerene su na uklanjanje čimbenika koji doprinose širenju *Legionella* u sustavima distribucije vode. Preventivna djelovanja obuhvaćaju sudjelovanje povjerenstva u svim fazama, uključujući planiranje, izgradnju i puštanje u rad objekta i pripadajućeg vodovodnog sustava, a fokusiraju se na sveobuhvatan pristup koji obuhvaća različite aspekte: obradu vode, kao što su provedba filtracije, dezinfekcije i omekšavanja; tehničke mjere, uključujući kontrolu temperature vode i održavanje sustava; te mjere koje utječu na ponašanje korisnika, kao što su pravilan način korištenja vode. Vrsta i broj kontrolnih mjera variraju ovisno o specifičnostima svakog sustava vodoopskrbe, a njihova pravilna implementacija ključna je za osiguranje učinkovite kontrole kvalitete vode.

Korektivne mjere, utemeljene na utvrđenim opasnostima, nužno je provesti kao zaštitu za zdravlje ljudi. Provedba ovih mjera ovisi o uzrocima nesukladnosti. Primarna prevencija uključuje hitne mjere zaštite zdravlja, kao što su zatvaranje dijela sustava vodoopskrbe, ispiranje vodoopskrbnog sustava, pasterizacija ili hiperkloriranje sustava. Druga razina prevencije obuhvaća sekundarne mjere koje se najčešće očituju u tehničkim rješenjima, kao što su sanacija utvrđenih mjesta stagnacije vode, uklanjanje "slijepih" završetaka mreže vodoopskrbnog sustava izvan funkcije te uspostava sustava recirkulacije vode. Učinkovitost ovih mjera u kontroli izbijanja bolesti dobro je dokumentirana, iako se može pokazati nedovoljnima u objektima koji su više puta povezani sa slučajevima oboljenja od LD.

Na brodovima se izlaganje legionelama može spriječiti implementacijom kontrolnih mjera upravljanja kvalitetom vode, uključujući obradu izvorske vode ukoliko ona nije pogodna za piće; prije utovara vode za piće važno je mlazom vode ispirati crijeva najmanje tri minute, kao i nakon korištenja, uz obavezno pokrivanje otvora cijevi kapicama kako bi se spriječilo daljnje onečišćenje. Spremnici za pitku vodu moraju biti jasno označeni natpisom „pitka voda“ s visinom slova od najmanje 1,3 cm, dok križne veze između spremnika pitke vode i vode namijenjene za druge svrhe moraju biti isključene. Također, smjer toka vode treba biti označen strelicama, uz mjere za prevenciju povratnog toka unutar sustava. Nadzor nad sredstvima za premazivanje cijevi je ključan, s obzirom na to da mogu kontaminirati vodu za piće toksičnim tvarima, a izolacija cijevi i spremnika pomaže u kontroli *Legionella* održavanjem temperature vode izvan raspona od 25 ºC do 50 ºC, koji pogoduje razvoju i razmnožavanju ove bakterije.

Stoga je nužno kontrolnim mjerama u distribuciji hladne vode osigurati temperaturu ispod 25 °C, a u distribuciji tople vode temperaturu iznad 50 °C, s preporukom ciljne temperature od 55 °C [165]. S obzirom na izazove održavanja hladne vode ispod 25 °C u plovnim objektima, osobito tijekom vrućih klimatskih uvjeta, potrebno je provesti dokloriranje vode kako bi se održala koncentracija slobodnog rezidualnog klora iznad 0,2 mg/L [271]. Neki sustavi opskrbe vodom, zbog svojih tehničkih karakteristika, ne mogu postići dovoljno visoku temperaturu tople vode za termalnu dezinfekciju potrebnu za kontrolu rasta *Legionella*, kao što je pasterizacija. U takvim slučajevima, treba razmotriti alternativne dezinfekcijske metode, uključujući kemijsku dezinfekciju (hiperkloriranje, klor-dioksid, ionizaciju bakrom i srebrom) ili fizičku dezinfekciju (UV zračenje), kao i mehaničke postupke (ispuštanje vode, korištenje filtera). Važno je provoditi kontrolne mjere u cilju ocjenjivanja učinkovitosti higijenskih postupaka, ispitivanjem osnovnih pokazatelja kvalitete vode, uključujući pH i SRK u cijelom distribucijskom sustavu. S obzirom na složenost distribucijskih sustava na brodovima, preporučuje se minimiziranje mogućnosti stagnacije vode pravilnim projektiranjem sustava, spremnika i cijevi, kako tijekom prvotne gradnje, tako i tijekom izmjena, uz provedbu režima ispiranja u slučaju neredovitog korištenja pojedinih ispusta.

Potrebno je uspostaviti raspored redovitog čišćenja i dezinfekcije svih komponenti vodnog sustava brodova, prema definiranim vremenskim intervalima. Na primjer, crijeva za punjenje trebaju se prati najmanje tri minute pitkom vodom prije uporabe, uz dezinfekciju najmanje svakih šest mjeseci; pumpe vodovodnog sustava potrebno je čistiti svakih šest mjeseci; spremnici za vodu trebaju se održavati jednom godišnje; cijevi i slavine distribucijskog sustava zahtijevaju rutinske vizualne preglede godišnje; grijače tople vode također treba provjeravati svake godine; a tuš-glave i slavine treba čistiti svakih šest mjeseci ili sukladno nalazima inspekcije. Spremnici tople vode trebaju se isprazniti kada se ne koriste, a kontrola tankova nakon ugradnje treba se provoditi minimalno jednom svakih dvije godine.

Posebnu pažnju valja posvetiti sprječavanju rizika od kolonizacije tijekom popravaka vodovodnih sustava na brodovima. Periodično održavanje i čišćenje spremnika za vodu, uključujući isušivanje, fizičko čišćenje i obradu biocidima, potrebno je provoditi najmanje svakih šest mjeseci. Hidromasažne kade i rekreacijski bazeni na brodovima mogu se kontrolirati na isti način kao i na kopnu, u skladu sa smjernicama WHO-a za sigurna rekreacijska vodena okruženja [165]. CDC je izdao smjernice za

prevenciju legionarske bolesti povezane s hidromasažnim kadama na kruzerima. Kontrolne mjere također trebaju obuhvatiti sustave klimatizacije, a ovlaživače zraka ili uređaje koji mogu pridonijeti širenju *Legionella* potrebno je povremeno čistiti, dezinficirati i mijenjati [315]. Posebna pažnja treba se posvetiti ovlaživačima zraka, jer postoji rizik od proliferacije *Legionella*. Unutar takvih jedinica ne smije se nakupljati tekućina, te je potrebno osigurati odvodnju izvan sustava kako bi se omogućilo lako čišćenje i dezinfekcija.

Operativno praćenje WSP-a treba pružiti rano upozorenje na probleme kao što su neadekvatna dezinfekcija, što je ključno za učinkovito upravljanje vodnim sustavom. Ovo praćenje obično uključuje osnovna ispitivanja kvalitete vode, koja obuhvaćaju mjerenje pH i halogenih ostataka, pri čemu se preporučuju vrijednosti SRK-a veće od 0,2 mg/L i manje od 5,0 mg/L, te pH u rasponu od 6,8 do 7,8. Uspostava operativnog plana praćenja uključuje definiranje točaka i učestalosti uzorkovanja, specifikaciju potrebne opreme za praćenje, utvrđivanje standarda opreme (kalibracija i certifikacija), osiguranje usklađenosti sa standardnim metodama praćenja kvalitete vode, definiranje lokacija kontrole i njihovu učestalost, te određivanje potrebnih kvalifikacija za osoblje koje provodi nadzor. Operativno praćenje WSP-a i nadzor kontrolnih mjera sustava za distribuciju vode na brodovima, uključujući sadržaje s rekreacijskom vodom, potvrđuje učinkovitost provedbe i djelotvornost kontrolnih mjera. Preporučuje se redovito uzorkovanje sustava pitke vode najmanje svakih šest mjeseci, uz kontinuirano praćenje mikrobiološke kakvoće vode, koje uključuje mjesečno uzimanje četiri slučajna uzorka za ispitivanje prisutnosti *E. coli*, dok se pokazatelj *Legionella* treba provjeravati svakih šest mjeseci.

1.12.1.3 Nadzor i upravljanje sustavom WSP

Nadzor i upravljanje sustavom WSP-a je područje koje se fokusira na kontinuirani nadzor i evaluaciju učinkovitosti planova i mjera koje su implementirane. Uključuje praćenje kvalitete vode, analizu podataka i povratnih informacija, kao i periodičku reviziju WSP-a kako bi se prilagodili novim informacijama, promjenama u uvjetima ili identifikaciji novih rizika.

U Planu WSP upravljanja definirane su korektivne mjere koje je potrebno poduzeti kako bi se u najkraćem mogućem roku ponovno uspostavilo sigurno funkcioniranje sustava vodoopskrbe, u slučaju da postojeće mjere nisu učinkovite [165]. Ukoliko se utvrdi izvor prijenosa *Legionella*, posebno nakon potvrde oboljenja,

preporučuje se provođenje dezinfekcije putem pasterizacije ili hiperkloriranja, uz kontinuirano održavanje i provjeru kontrolnih mjera. Pasterizacija podrazumijeva toplinsku dezinfekciju spremnika tople vode i distribucijskog sustava, nakon prethodnog ispiranja, koja se provodi podizanjem temperature tople vode unutar spremnika na raspon od 70 °C do 80 °C, nakon čega ta voda cirkulira cijelim sustavom unutar tri dana.

Bitno je provjeriti da tijekom postupka dezinfekcije temperatura vode na svim izljevnim mjestima bude iznad 65 °C, uz kontaktno vrijeme od četiri sata od početka pasterizacije. Nakon provedene pasterizacije ključno je održavati temperaturu vode između 55 °C i 60 °C na svim izljevnim mjestima. Iako se postupkom može smanjiti broj *Legionella*, važno je napomenuti da može doći do rekolonizacije vodnog sustava u samo nekoliko tjedana nakon tretmana, posebno ako se ne provedu dodatne korektivne mjere [165]. Hiperkloriranje sustava potrošne tople vode potrebno je izvesti prije zagrijavanja, pri čemu se voda mora održavati na temperaturi nižoj od 30 °C, uz postizanje koncentracije slobodnog rezidualnog klora do 50 mg/L u cijelom sustavu, uključujući izljevna mjesta. Nakon kontaktnog razdoblja od najmanje dva sata, sustav se ispire dok razina slobodnog rezidualnog klora ne padne na koncentraciju od 0,2 mg/L do 5,0 mg/L.

Također, identifikacija oboljenja na brodovima zahtijeva uspostavu rutinskog sustava ranog nadzora respiratornih bolesti kod pacijenata, kao i primjenu definiranih postupaka i mjera za svaki utvrđeni slučaj oboljenja od LB ili legioneloza. Slučaj LB može se identificirati tijekom putovanja kada putnik ili član posade zatraži liječničko savjetovanje i kada se potvrdi dijagnoza. Alternativno, slučaj može biti identificiran nakon iskrcavanja pacijenta s putničkog plovila. U takvim situacijama, nadležni s broda mogu dobiti informacije o događaju putem drugih izvora, kao što su ELDSNet ili nacionalni centri za nadzor.

Međutim, važno je napomenuti da pacijent može biti izložen različitim potencijalnim izvorima *Legionella*, poput onih unutar hotela ili drugih objekata na kopnu. Stoga bi istraga slučaja trebala obuhvatiti identifikaciju svih mogućih izvora infekcije. Budući da razdoblje inkubacije legioneloze može biti dulje od trajanja putovanja, epidemije mogu proći neotkrivene čak i kada brod ima uspostavljen sustav nadzora. Iz tog razloga, ključno je da nadležni liječnici, u slučaju pojave simptoma respiratornih bolesti, prikupe informacije o nedavnim putovanjima, poput krstarenja, kroz epidemiološku anamnezu oboljelog. Kako bi se spriječile epidemije, važno je i

redovito nadzirati uvjete na brodu putem inspekcije vanjskih nadležnih tijela, što može obuhvatiti provjeru sustava vodoopskrbe i mjera sigurnosti.

1.12.2 Mjere suzbijanja *Legionella* na brodovima

Postupak dekontaminacije i mjere za suzbijanje *Legionella* spp. u sustavima za distribuciju vode na trajekatima i brodovima provode se u suradnji s vlasnikom plovila, na temelju dobivenih nalaza i razine kontaminacije. Dekontaminacija traje sve dok se ne postignu zadovoljavajući rezultati analize.

U slučajevima kada je utvrđena zanemariva kontaminacija uzoraka, koja ukazuje na zanemarivu kontaminaciju sustava, nije potrebno poduzimati posebne mjere, osim ponavljanja uzorkovanja dva puta godišnje.

Kod srednje razine kontaminacije uzoraka, koja ukazuje na srednju kontaminaciju sustava, potrebno je provesti preventivne mjere, uključujući pojačano čišćenje i dezinfekciju. Nakon provedenih mjera, preporuča se ponoviti uzorkovanje za dva tjedna.

Ako ponovljeno uzorkovanje potvrdi srednju kontaminaciju sustava, potrebno je ponovno provesti čišćenje i dezinfekciju, a uzorkovanje ponoviti nakon dva tjedna od provedenih mjera.

U slučaju visoke ili vrlo visoke kontaminacije uzoraka, osim obveznog istraživanja uzroka, potrebno je provesti korektivne mjere, s obveznim ponavljanjem uzorkovanja odmah nakon provedenih mjera. Tablice 1. i 2. prikazuju razine kontaminacije *Legionella* spp.

Tablica 1. Razine kontaminacije legionelama

Razina kontaminacije	***Legionella* spp. (CFU/mL)**
Zanemariva kontaminacija	< 100 CFU/1000 mL
Srednja kontaminacija	100 – 1000 CFU/1000 mL
Visoka kontaminacija	1000 – 10.000 CFU/1000 mL
Jako visoka kontaminacija	> 10.000 CFU/1000 mL

1.12.2.1 Kontrolne/preventivne mjere na brodovima

Postupak provođenja kontrolnih/preventivnih mjera na brodovima:

- Ispiranje dijelova sustava tople i hladne vode s niskom potrošnjom jednom tjedno, uz obavezno evidentiranje,
- Održavanje temperature tople vode u sustavu potrošne tople vode na minimalno 50 °C/1 min, a po mogućnosti 55 °C na krajnjim točkama sustava, uz redovito praćenje i dokumentiranje najmanje jednom tjedno,
- Održavanje temperature hladne vode u sustavu ispod 20 °C/1 min, uz redovito praćenje temperature na krajnjim točkama sustava i dokumentiranje,
- Redovita kontrola rozeta tuševa i mrežica na slavinama,
- Čišćenje kamenca i po potrebi zamjena dijelova, prema godišnjem planu održavanja,
- Osiguravanje protoka i cirkulacije vode radi sprječavanja zadržavanja vode u sustavu,
- Redovito održavanje bojlera i spremnika, uključujući čišćenje i dezinfekciju, minimalno jednom godišnje.

1.12.2.2 Korektivne mjere na brodovima

Postupak provođenja korektivnih mjera na brodovima:

- Pregled i čišćenje pojedinih dijelova vodoopskrbnog sustava u skladu s preporukama proizvođača,
- Čišćenje bojlera i drugih spremnika u sustavu potrošne tople vode, uz obaveznu dezinfekciju,
- Uklanjanje taloga i kamenca s mrežica na slavinama i rozetama tuševa,
- Ispiranje sustava tople i hladne vode minimalno 5 minuta, uz obavezno evidentiranje,
- Dezinfekcija toplinom/pasterizacija sustava ili primjena drugih prikladnih metoda dezinfekcije,
- Povećanje učestalosti uzorkovanja kako bi se osigurao kontinuirani nadzor,

- Provođenje dodatnih tehničkih korektivnih mjera, uključujući potrebne građevinske i/ili strojarske radove.

Tablica 2. Razine djelovanja nakon uzorkovanja *Legionella* u sustavima tople i hladne vode (EWGLI, 2011.)

***Legionella* (CFU/L)**	**Potrebna je akcija**
Više od 1000, ali manje od 10.000	(i) U slučaju kada je mali udio uzoraka (10-20 %) pozitivan, potrebno je ponoviti uzorkovanje. Ako se ponovno dobije sličan rezultat, trebaju se preispitati kontrolne mjere, a na temelju toga provesti procjenu rizika kako bi se identificirale potrebne korektivne mjere. (ii) (ii) Ako je većina uzoraka pozitivna, to može značiti da je sustav, iako na niskoj razini, koloniziran bakterijom *Legionella*. U tom slučaju, treba razmotriti provedbu dezinfekcije sustava. Također, nužno je provesti hitno preispitivanje mjera kontrole i provesti procjenu rizika, kako bi se utvrdile sve dodatne korektivne mjere koje treba primijeniti.
Više od 10.000	Sustav bi trebalo ponovno uzorkovati i provesti hitno preispitivanje mjera kontrole i procjene rizika kako bi se utvrdile sve korektivne mjere, uključujući dezinfekciju sustava.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Predloženim istraživanjem produbilo se razumijevanje međuodnosa okolišnih čimbenika, kvalitete vode i proliferacije *Legionella*, te se doprinijelo definiranju učinkovitijih mjera prevencije smanjenja rizika od legionarske bolesti u okolišnim uvjetima prisutnim na brodovima.

Opći cilj doktorskog rada je istražiti kolonizaciju bakterije *Legionella* spp. u sustavu distribucije vode u specifičnim uvjetima prisutnim na trajektima i brodovima te procijeniti okolnosti u kojima je rizik proliferacije legionela povećavan.

Specifični ciljevi su slijedeći:

1. Odrediti raširenost kontaminacije bakterijom *Legionella* u sustavu distribucije vode na brodovima i trajektima
2. Odrediti stupanj mikrobiološkog opterećenja sustava distribucije vode bakterijom *Legionella* i ostalim mikrobiološkim pokazateljima zdravstvene ispravnosti vode za piće
3. Odrediti vrstu i serogrupu dobivenih *Legionella* izolata
4. Provesti molekularnu karakterizaciju dobivenih *Legionella* izolata (SBT sekvenciranje)
5. Istražiti utjecaj okolišnih čimbenika (kvalitete vode i fizikalno-kemijskih okolišnih uvjeta) na kolonizaciju sustava distribucije vode legionelom
6. Definirati specifične mjere kontrole i smanjenja rizika od legionarske bolesti na brodovima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Uzorkovanje vode

Uzorci su se uzimali tijekom cijele kalendarske godine kako bi se obuhvatile promjene okolinskih uvjeta. Duž hrvatske obale Jadrana identificirana su plovna područja s ukupno 51 brodom/trajektom. Uzorkovanje je provedeno na 19 putničkih brodova i trajekata, s ciljem da procjena kontaminacije bude temeljena na minimalno 10 % brodova iz svakog plovnog područja. Također, uzorkovalo se na najmanje 10 % od ukupnog broja brodova i trajekata unutar flote. Broj uzoraka bio je određen pomoću statističkog alata za izračunavanje uzoraka dostupnog na internetu (Sample size calculator, http://www.raosoft.com/samplesize.html). S obzirom na marginu pogreške od 5 %, interval pouzdanosti od 90 % i populaciju od 153, koja uključuje 51 brod (gdje svaki sustav vode prati najmanje 3 uzorka), ukupni broj uzoraka iznosio je 98.

Uzorkovanje vode na prisutnost parametra *Legionella* provedeno je prema propisima koji se odnose na plovne objekte koji prevoze putnike. U svakom uzorkovanju uzeta su tri uzorka: jedan uzorak hladne vode na ulazu i dva uzorka tople vode iz sustava potrošne tople vode, pri čemu su uzorkovani na najbližoj i najudaljenijoj točki od spremnika. Prilikom uzorkovanja zabilježeni su vrijeme uzorkovanja, vrsta uzorka, temperatura i SRK. Volumen uzorkovane vode iznosio je 1 L. U spremnik s uzorkom dodano je 1 mL otopine natrij tiosulfata (0,1 M) radi inaktivacije klora. Uzorci su transportirani u prijenosnim hladnjacima, osiguravajući temperaturu od 4 ± 2 °C, te su dostavljeni u laboratorij u najkraćem mogućem roku, unutar 24 do maksimalno 48 sati. Za procjenu sukladnosti kemijskih parametara (prvenstveno olova, bakra i nikla), uzorci se uzimaju s izljevnih mjesta ili slavina potrošača bez prethodnog puštanja mlaza. Uziman je nasumični uzorak od jedne litre tijekom slučajno odabranog doba u danu, sukladno članku 10. Pravilnika [320].

3.2 Mikrobiološke metode

3.2.1 *Legionella* spp.

Određivanje broja legionela provedeno je prema metodi opisanoj u normi HRN EN ISO 11731:2017 [325]. Ukoncentriravanje uzorka provedeno je tehnikom membranske filtracije. Jedna litra uzorka filtira se kroz polikarbonatni membranski filter sa porama od 0,2 µm, promjera 47 mm (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, SAD). Filter se zatim prebacuje u sterilni spremnik s poklopcem i navojem s 10 mL destilirane vode,

izreže se na komade pomoću sterilnih škara kako bi se olakšalo eluiranje. Spremnici se tresu najmanje 2 minute u cilju uklanjanja mikroorganizama s membranskog filtera. Manji volumen (≤ 5 mL) koncentriranog uzorka prenese se u sterilni spremnik koji se drži u vodenoj kupelji na temperaturi od 50 ± 1 °C kroz 30 ± 2 minute. Volumen od 0,1 mL toplinski obrađenih uzoraka rasporedi se po selektivnoj hranjivoj krutoj glicin vankomicin polimiksin B cikloheksimid podlozi (engl. *Glycine Vancomycin Polymyxin B Cycloheximide, OXOID, Basingstoke, UK;* GVPC). Inokulirani GVPC medij inkubira se do deset dana na (36±1) °C pri vlažnoj atmosferi s 2,5 % CO_2, a ploče se ispituju svaka dva do tri dana. Sumnjive kolonije prebacuju se na puferirani ugljeni kvašćani ekstrakt agar (engl. *Buffered Charchoal Yeast Extract agar medium*; BCYE,) te BCYE agar bez cisteina (*BCYE-Cys OXOID, Basingstoke, UK*) ili drugi odgovarajući medij (npr. krvni agar). Ploče se inkubiraju na (36±1) °C manje od 2 dana. Kolonije s karakterističnim morfološkim značajkama koje rastu na BCYE agaru, a nisu porasle na BCYE-Cys, smatraju se legionelama. Izolirane kolonije potvrđuju se pomoću komercijalno dostupnog testa aglutinacije (engl. *DrySpot Legionella Latex Test, Oxoid),* koji omogućuje odvojenu identifikaciju *Lp* SG1 i *Lp* SG 2-14. Granica detekcije opisanog postupka je 100 CFU/L.

3.2.2 UBB/37 i UBB/22

Metoda se temelji na detekciji i brojanju aerobnih heterotrofnih bakterija na temperaturama od 22 °C i 37 °C, prema normi HRN EN ISO 6222:2000 [326]. Postupak započinje homogenizacijom uzorka i spaljivanjem grla boce. Nakon toga određuje se odgovarajuće razrjeđenje uzorka kako bi se broj poraslih kolonija kretao između 30 i 300. Uzorak ili razrjeđenje zatim se nacjepljuje na odgovarajući medij, pri čemu vrijeme koje protekne između dodavanja uzorka i otopljenog temperiranog agara ne smije prelaziti 15 minuta. Slijedi inkubacija uzorka na najmanje jednoj ploči za svaku od navedenih temperatura. Ploče se preokreću i inkubiraju na 22 °C kroz 68±4 sata, odnosno na 37 °C kroz 44±4 sata. Nakon inkubacije, ploče se što prije ispituju, a broj poraslih kolonija (engl. *colony forming unit*; CFU) procjenjuje se po mililitru uzorka. Rezultati se izražavaju kao CFU/mL za svaku temperaturu inkubacije. Ukoliko na ploči s nerazrijeđenim uzorkom nema poraslih kolonija, rezultat se bilježi kao „nije detektirano u jednom mililitru“. Ako je broj kolonija na pločama inkubiranim s najvećim korištenim razrjeđenjem veći od 300, rezultat se izražava kao ">300" ili kao približna vrijednost.

3.2.3 Koliformne bakterije i *Escherichia coli*

Metoda HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017 [327] se temelji na kultivaciji kromogene hranjive podloge CCA (Chromogenic Coliform Agar) za dokazivanje i brojenje koliformnih bakterija i *E. coli*. Volumen uzorka koji se filtrira je 100 mL ili odgovarajuće razrjeđenje. Nakon filtracije, membranski filter se sterilnom pincetom pažljivo prenese na kromogenu CCA podlogu, koja se zatim inkubira na temperaturi od (36±2)°C kroz (21±3) sata. Po završetku inkubacije broje se sve kolonije rozo-crvene boje, neovisno o njihovoj veličini. Ova specifična obojenost kolonija rezultat je reakcije enzima β-D-galaktozidaze (β-gal) s kromogenim supstratom, što uzrokuje stvaranje ružičastog do crvenog precipitata. Da bi se kolonije dodatno potvrdile, podvrgavaju se oksidaza testu. Najmanje 10 kolonija prenosi se na TSA (Triptic Soy Agar) podlogu, koja se potom inkubira na (36±2)°C kroz (21±3) sata, nakon čega slijedi oksidaza test. Kolonije tamno plave ili ljubičaste boje upućuju na aktivnost dva ključna enzima, β-D-galaktozidaze (β-gal) i β-D-glukuronidaze (β-glu). Sve *Escherichia coli* sadrže enzim β-gal, dok je 94-97 % njih također pozitivno na β-glu, što se manifestira stvaranjem plave boje. Istovremena aktivnost oba enzima daje kolonijama *E. coli* karakterističnu ljubičastu boju.

3.2.4 Crijevni enterokoki

Za određivanje crijevnih enterokoka koristi se standardna metoda prema normi HRN EN ISO 7899-2:2000 [328]. Proces započinje filtracijom 100 mL uzorka vode (ili odgovarajućeg razrjeđenja) te inkubacijom filtera na hranjivoj SBA podlozi (Slanetz-Bartley Agar), pri temperaturi od 36 ± 2°C kroz 48 sati. Prisutnost tamno crvenih do smećkastih kolonija preliminarno ukazuje na prisutnost enterokoka. Kako bi se potvrdila prisutnost enterokoka, filter s poraslim kolonijama premješta se na BAA podlogu (Bile-Aesculin Azide Agar), koja se zatim inkubira dodatna 2 sata na temperaturi od 44 ± 0,5 °C. Pozitivna reakcija očituje se stvaranjem crnog haloa oko kolonija, što je rezultat sposobnosti enterokoka da hidroliziraju eskulin do 6,7-dihidroksikumarina, koji u prisutnosti Fe^{3+} tvori crno obojenu tvar koja difundira u medij.

3.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Za identifikaciju i brojenje vrste *Pseudomonas aeruginosa* koristi se standardna metoda prema normi HRN EN ISO 16266:2008 [329]. Proces započinje filtracijom 100 mL uzorka vode ili potrebnog razrjeđenja. Filter se inkubira na selektivnoj hranjivoj

podlozi, CN agaru (Cetrimid agar) tijekom 48 sati na temperaturi od 41±2 °C. Kolonije koje rastu u plavo-zelenoj boji i proizvode pigment piocijanin identificiraju se kao *P. aeruginosa*. Sve ostale porasle kolonije pregledavaju se pod UV svjetlom radi utvrđivanja fluorescencije, nakon čega se provode dodatni potvrdni testovi. Fluorescirajuće kolonije nasađuju se na hranjivi nutrijent agar (NA agar) i inkubiraju 24 sata na 36±2 °C. Nakon toga, kolonije se prenose u acetamid bujon (AB bujon) te inkubiraju daljnjih 24 sata na istoj temperaturi. U bujon se dodaje Nesslerov reagens, koji u prisutnosti amonijaka stvara narančasti talog, potvrđujući prisutnost vrste *P. aeruginosa*. Kolonije crvenkasto-smeđe boje koje ne fluoresciraju broje se kao sumnjive na *P. aeruginosa*, te se njihova identifikacija potvrđuje dodatnim testovima, uključujući oksidaza test (pozitivan rezultat), test produkcije amonijaka uz upotrebu acetamid bujona, te pojavom fluorescencije na King's B mediju.

3.2.6 *Salmonella* spp. i *Shigella* spp.

Za identifikaciju *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. koristi se vlastita modificirana metoda prema normi HRN EN ISO 19250:2013 [330], a volumen uzorka koji se filtrira je 1000 mL. Membranski filter, kroz koji je uzorak profiltriran, prenosi se u 50 mL hranjive puferirane peptonske vode (PPV) i inkubira se na 36°C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, po 1 mL PPV prenosi se u MKTTn bujon (Müller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin broth) za detekciju *Salmonella* spp. te u Selenit-cistein bujon za detekciju *Shigella* spp. Dodatno, 0,1 mL PPV prenosi se u RVS bujon (Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone broth). Nakon inkubacije bujona kroz 24 sata, pri 36±2 °C za MKTTn i Selenit-cistein bujon te 41±1 °C za RVS bujon, suspenzije se ezom prenesu na selektivne hranjive podloge, SS agar (Salmonella-Shigella agar) i XLD agar (Xylose Lysine Deoxycholate agar). Nakon inkubacije kroz 24 sata na 36±2 °C, porasle kolonije nježnog rasta s crnim centrom smatraju se suspektnima za *Salmonella* spp., dok se kolonije bez crnog centra smatraju suspektnima za *Shigella* spp. Potvrdna identifikacija provodi se pomoću automatiziranog sustava VITEK®2, temeljenog na biokemijskim reakcijama, masene spektrometrije s laserskom desorpcijom uz pomoć matrice (MALDI-TOF MS) te aglutinacijskim testovima.

3.3 Fizikalno-kemijske metode i kemijske metode

Temperatura vode utječe na kemijske i biološke procese, uključujući brzinu reakcija, otapanje plinova te rast mikroorganizama i organizama. Promjene temperature mogu ukazivati na zagađenje ili promjene u okolišu.

Postupak mjerenja temperature vode primjenjuje se prema uputama navedenim u Standard methods for the Examination of Water and Wastewater, 24th Edition, 2023.; 2550 [331], a opisuje mjerenje temperature u vodama u rasponu mjerenja od 1,0 °C do 90,0 °C. Temperatura vode izmjerena je pomoću alkoholnog termometra s intervalima skale od 0,1 °C. Nakon mjerenja temperature vode potrebno je termometar isprati destiliranom vodom i dezinficirati (npr. 70 % alkoholom).

3.3.1 Slobodni rezidualni klor

Slobodni rezidualni klor izmjeren je prema HRN EN ISO 7393-2:2018 [332], uz granicu kvantifikacije 0,02 mg Cl_2/L) pomoću Hach prijenosnog kolorimetra Pocket Colorimeter™ II (Colorado, SAD). Određivanje slobodnog rezidualnog klora DPD metodom temelji se na specifičnoj reakciji N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) sa slobodnim klorom u uzorku vode, uz formiranje ružičastog obojenja pri pH 6,2 do 6,5. Mjerenje intenziteta obojenja provodi se uz pomoć spektrometra. DPD reagens dolazi u obliku praška, tableta ili tekućine, ovisno o proizvođaču. Za određivanje ukupnog i rezidualnog klora koriste se gotovi praškasti reagensi raspoloživi na tržištu HACH – DPD Free Chlorine Reagent i HACH – DPD Total Chlorine Reagent.

Slobodni rezidualni klor odnosi se na oblik klora koji je prisutan u vodi i spreman je za dezinfekciju. To je klor koji još nije reagirao s organskim materijalima, amonijakom ili drugim zagađivačima. Sastoji se od hipokloritne kiseline (HOCl) i hipokloritnog iona (OCl^-). Hipokloritna kiselina je najaktivniji oblik slobodnog klora i vrlo je učinkovit u uništavanju bakterija i drugih mikroorganizama. Hipokloritni ion je manje učinkovit u dezinfekciji u usporedbi s hipokloritnom kiselinom (do 80-100 puta), ali i dalje pridonosi ukupnoj dezinfekciji. Ukupni klor označava ukupnu količinu klora u vodi, uključujući slobodni klor i vezane oblike klora (kloramine).

Mjerenje klora provodi se tijekom uzorkovanja (iznimno i u laboratoriju). Prilikom uzorkovanja potrebno je izbjegavati jako svijetlo, trešnju, grijanje, vlagu. Paralelno se u dvije kivete uzimaju dva uzorka od 10 mL. U slučaju kada koncentracija ukupnog klora premašuje 5 mg/l, odnosno slobodnog klora 2,20 mg/l, piše se >5,00 odnosno

>2,20 mg/l Cl_2. U jednu kivetu stavljamo samo uzorak i ta kiveta predstavlja slijepu probu, a u drugu kivetu u uzorak dodajemo reagens. Ukoliko je potrebno izmjeriti koncentraciju rezidualnog klora veću od propisane uzorak je potrebno razrijediti. Ukoliko ukupni i slobodni klor nije moguće odrediti zbog intenzivnog obojenja i muteži uzorka, pod rezultat pisati „Nije moguće odrediti“.

3.3.2 Boja

Boja vode je optičko svojstvo koje uzrokuje promjenu u spektralnoj kompoziciji propuštene vidljive svjetlosti. Boja se u uzorcima vode određuje zbog estetskih razloga, ali također pruža važne informacije o prisutnosti organskih materijala i učinkovitosti pročišćavanja. Određuje se prema metodi za određivanje boje Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (23rd Edition, 2017., 2120 C) u koncentracijskom području 5 do 100 jedinica Pt/Co skale. Prividna boja vode je posljedica topivih i netopivih suspendiranih tvari, određena u originalnom uzorku vode prije filtracije ili centrifugiranja. Prava boja vode je posljedica isključivo otopljenih tvari, određena nakon filtracije uzorka vode kroz membranski filter veličine pora 0,45 µm.

Boja uzorka određuje se spektrofotometrijski na valnoj duljini λ = 456 nm, usporedbom sa standardnim otopinama platina-kobalta prema Beerovom zakonu. Ova metoda se primjenjuje za određivanje prave boje optički čistih uzoraka. Uzorkovanje se vrši u tamnim staklenim bocama ili plastičnim bocama. Analizu je potrebno izvršiti unutar 24 sata. Ako analizu nije moguće izvršiti unutar tog vremena okvira, uzorci se mogu čuvati na hladnom do 5 dana. Prije mjerenja, uzorak je potrebno temperirati na sobnu temperaturu.

Ako je pH uzorka između 4 i 10, bolje ga je ne podešavati. pH može utjecati na topljivost supstanci te posljedično utjecati na rezultat mjerenja. Ako se pH podešava, podesiti na 7 i zabilježiti. Uzorke je potrebno profiltrirati kroz membranski filter, veličine pora 0,45 µm. Može se koristiti i filter sa staklenim vlaknima. Filter i aparaturu za filtraciju prethodno je potrebno isprati s minimalno 50 mL destilirane vode. Nakon toga profiltrirati 25 mL uzorka te odbaciti. Profiltrirati dodatnih 50 mL uzorka za analizu.

Ukoliko je uzorak jako obojen, odnosno ako intenzitet boje prelazi 100 jedinica Pt/Co skale, može ga se razrijediti određenim volumenom destilirane vode. Intenzitet boje otopine mjeri se na 456 nm, u kiveti duljine optičkog puta 50 mm, koristeći destiliranu vodu kao slijepu probu. Mogu se koristiti kivete duljine optičkog puta 25 mm, 40 mm i 100 mm.

3.3.3 Mutnoća

Mutnoća označava stupanj u kojem voda smanjuje prolazak svjetlosti zbog prisutnosti suspendiranih čestica. Te čestice mogu uključivati fine čestice tla koje potječu iz erozije ili gradilišta, organske materijale poput huminskih kiselina i razgradnih proizvoda biljnog i životinjskog materijala, mikroorganizme kao što su bakterije i alge, te kemijske zagađivače koji uzrokuju zamućenje.

Mutnoća mjeri se prema HRN EN ISO 7027-1:2016 [333] (granica kvantifikacije 0,10 NTU) pomoću laboratorijskog turbidimetra HACH 2100N IS (Colorado, SAD). Metoda se bazira na komparaciji intenziteta svijetla raspršenog u uzorku pod definiranim uvjetima u odnosu na intenzitet raspršenog svijetla certificiranog standarda pod istim uvjetima rada. Dobivena vrijednost mutnoće očitava se direktno s instrumenta. Uzorak se dobro promućka i ulije u staklenu kivetu. Kiveta se izvana pažljivo obriše krpicom dobivenom uz certificirane standarde kako bi se uklonili tragovi prstiju i ostalih nečistoća. Mutnoća uzorka očita se s digitalnog pokazivača kako slijedi:

- ako je mutnoća < 1 NTU, zabilježiti do najbliže 0,01 NTU,
- ako je mutnoća ≥ 1,0 i < 10 NTU, zabilježiti do najbliže 0,1 NTU,
- ako je mutnoća ≥ 10 NTU i < 400 NTU, zabilježiti do najbliže 1 NTU.

3.3.4 pH

Vrijednosti pH vode ukazuju na kiselost ili lužnatost otopine, što je važno za ocjenu kemijskih uvjeta i kvalitete vode. pH vrijednost pokazuje koncentraciju vodikovih iona u vodi, gdje pH manji od 7 označava kiselost, pH veći od 7 označava lužnatost, a pH 7 označava neutralnost. Praćenje pH vrijednosti pomaže pri praćenju zagađenja vode, utjecaju različitih procesa te je važan parametar u okviru ekološkog monitoringa.

Vrijednosti pH vode mjerene su višekanalnim, modularnim instrumentom SevenExcellence (S47, Mettler Toledo, Njemačka), u skladu s metodom HRN EN ISO 10523:2012 [334]. Elektrometrijsko određivanje pH temelji se na mjerenju aktivnosti vodikovih iona putem potenciometrijske metode, koristeći kombiniranu staklenu elektrodu. Zbog brzih promjena pH vrijednosti uzorka uslijed kemijskih, fizičkih i bioloških procesa, preporučuje se mjerenje pH vrijednosti što je prije moguće, ali ne kasnije od 6 sati nakon uzorkovanja. Ako to nije moguće, staklena boca od 500 mL se ispire uzorkom, uranja u vodu i puni do prelijevanja. Suvišni mjehurići zraka uklanjaju se laganim trešenjem boce prije nego se boca zatvori čepom.

3.3.5 Električna vodljivost

Električna vodljivost predstavlja brojčani izraz za svojstvo vodenih otopina da provode električnu struju. Ovo svojstvo ovisi o prisutnosti iona, njihovoj koncentraciji, mobilnosti, valenciji i temperaturi mjerenja. Visoka vodljivost može ukazivati na visoku koncentraciju soli, minerala ili kontaminanata, čime se pomaže u procjeni kvalitete vode. Promjene u vodljivosti mogu ukazati na zagađenje i pomažu u praćenju industrijskih procesa i ekološkog stanja prirodnih voda. Mjeri se u mikroSiemensima po centimetru (µS/cm).

Postupak mjerenja PI, IMn provodi se višekanalnim modularnim instrumentom SevenExcellence (S47, Mettler Toledo, Njemačka) u skladu s normom HRN EN 27888:2008 [335], u rasponu od 10 µS/cm do 10 mS/cm, s granicom kvantifikacije od 9 µS/cm. Uzorci se prikupljaju u staklenim bocama, koje se pune do vrha i čvrsto zatvaraju. Mjerenje električne vodljivosti treba se obaviti što je prije moguće, najkasnije 24 sata nakon uzorkovanja, posebno u slučajevima kada je moguće izmjena plinova poput ugljik-dioksida i amonijaka s atmosferom ili gdje postoji rizik od biološke aktivnosti. Biološka aktivnost može se usporiti čuvanjem uzoraka u hladnjaku. Prije mjerenja, uzorke je potrebno izvaditi iz hladnjaka i temperirati na sobnoj temperaturi otprilike jedan sat. Elektroda, prethodno isprana destiliranom vodom, uranja se u čašicu s ispitivanim uzorkom. Rezultati se očitavaju izravno s ekrana instrumenta i prikazuju kao cijeli brojevi.

3.3.6 Utrošak $KMnO_4$

Permanganatni indeks (PI, IMn) je važan indikator ukupne oksidativne sposobnosti vode, što može pružiti informacije o prisutnosti organskih kontaminanata i ukupnog onečišćenja vode.

Određivanje permanganata indeksa, odnosno utroška $KMnO_4$, provedeno je u skladu s normom HRN EN ISO 8467:2001 [336], koja uključuje kvantifikacijsku granicu kationa od 0,25 mg O_2/L. Kontrola kvalitete provedena je korištenjem resorcinola (Merck, Njemačka) s oporabom od 90-105 %, što osigurava točnost i pouzdanost rezultata.

Permanganatni indeks koristi se za određivanje masene koncentracije kisika ekvivalentne količini permanganatnog iona koji se potroši u uzorku tretiranom ovim oksidantom pod definiranim uvjetima. Postupak uključuje zagrijavanje uzorka na točki ključanja u vodenoj kupelji s poznatom količinom kalijevog permanganata i sumporne

kiseline tijekom 10 minuta. U ovom procesu, organske tvari u uzorku redukcijom oksidiraju dio permanganata. Nakon toga, višak permanganata se neutralizira dodatkom otopine natrijevog oksalata, a količina utrošenog permanganata se određuje retitracijom.

Postupak mjerenja započinje temeljitim homogeniziranjem uzorka vode. Zatim se 25,0 mL uzorka pipetira u epruvetu, dodaju 5 mL sumporne kiseline i lagano promiješa. Epruvete se stavljaju u kipuću vodenu kupelj na 10 minuta. Nakon zagrijavanja, dodaje se 5 mL kalijevog permanganata. Nakon još 10 minuta, dodaje se 5 mL standardne volumetrijske otopine natrijevog oksalata i čeka se da se otopina obezboji. Zatim se uzorak, još vruć, titrira s kalijevim permanganatom do pojave svijetlo ružičaste boje koja se zadržava oko 30 sekundi. Na kraju, bilježi se volumen utrošene permanganatne otopine.

3.3.7 Kloridi (vlastita metoda modificirana)

Kloridi, prisutni u obliku kloridnih iona (Cl^-), su među najvažnijim anorganskim ionima u vodi. Vode s koncentracijom od 250 mg Cl^-/l mogu imati prepoznatljiv slankast okus ako je prisutan natrij, dok kod dominantnih iona kalcija i magnezija ovaj okus može biti neprimjetan čak i pri koncentraciji od 1000 mg Cl^-/l.

Određivanje otopljenih klorida u vodi provodi se prema normi HRN ISO 9297:1998 [337]. Metoda je primjenjiva za direktno određivanje otopljenih klorida u koncentraciji između 5 do 150 mg/l. Radno područje metode može doseći 400 mg/l korištenjem birete većeg kapaciteta ili razrijeđivanjem uzorka. Zbog mnogih inteferencija, metoda nije upotrebljiva za jako onečišćene vode niskog sadržaja klorida.

U reakciji klorida sa srebrnim ionima stvara se netopljivi srebrni klorid koji kvantitativno precipitira. Dodavanjem suviška srebrnih iona formira se crvenkasto-smeđi obojeni srebrni kromat, koji služi kao indikator završne točke titracije. pH se održava između 5,0 i 9,5 kako bi se omogućila pravilna precipitacija, a pH uzorka se mjeri standardnim analizama. Za titraciju uzorka, otpipetira se 100 mL originalnog ili razrijeđenog uzorka (do 100 mL) u Erlenmayerovu tikvicu od 250 mL. Dodaje se 1 mL otopine kalijevog kromata i lagano promiješa. Otopina se titrira kap po kap dodavanjem otopine srebrovog nitrata sve dok boja ne pređe iz žućkaste u crvenkasto-smeđu, što označava završnu točku titracije. Ako je utrošak titranta veći od 25 mL, uzorak treba razrijediti ili koristiti biretu većeg kapaciteta. Ako pH uzorka nije u rasponu od 5 do 9,5, podesiti ga korištenjem nitratne kiseline ili natrijevog hidroksida i zabilježiti utrošeni

volumen. Ako su prisutni amonijevi ioni u koncentraciji većoj od 10 mg/l, pH treba podesiti između 6,5 i 7, dok se za pH ispod 5 koristi kalcij karbonat ili natrijev hidrogenkarbonat za poboljšanje puferskog kapaciteta, uz osiguranje da ostatak karbonata ostane u uzorku i nakon titracije.

3.3.8 Amonijak

Amonijak je dušikov spoj koji se prirodno javlja u okolišu, a također se može pronaći u otpadnim vodama te u otjecanju iz poljoprivrednih i industrijskih aktivnosti. Iako amonijak obično nije štetan za ljude u malim količinama, može značajno utjecati na vodeni život i ekosustave.

Određivanje amonijaka u vodi provodi se prema normi HRN ISO 7150-1:1998 [338]. Metoda je primjenjiva za određivanje amonija u uzorcima voda koji sadrže više od 0,003 mg/L N. Metoda se temelji na spektrofotometrijskom određivanju zelenog obojenog kompleksa pri valnoj duljini od 655 nm, koji se stvara reakcijom amonija sa salicilatnim i hipokloritnim ionima u prisustvu natrij-pentacijanoferata(III) (natrij-nitroprusida).

Analizu uzoraka treba provesti unutar 24 sata od uzorkovanja. Ako je potrebno, uzorak se može konzervirati zakiseljavanjem sa sumpornom kiselinom do pH < 2 i čuvati u hladnjaku do 21 dan. Maksimalni volumen uzorka za određivanje koncentracije amonijeva dušika do 1,0 mg/L iznosi 40 mL. Za veće koncentracije amonijeva dušika može se koristiti manji volumen uzorka. Ako uzorak sadrži suspendirane tvari, treba ga filtrirati kroz filter papir sa staklenim vlaknima.

Volumen od 40 mL uzorka prenijeti u odmjernu tikvicu od 50 mL. Dodati 4,00 m reagensa za razvijanje boje i promućkati. Zatim dodati 4,00 mL otopine natrij dikloroisocijanurata, dobro promućkati i razrijediti do oznake destiliranom vodom. Otopinu ponovo promućkati i ostaviti na sobnoj temperaturi. Nakon minimalno 60 minuta, mjeriti apsorbanciju na 655 nm u kiveti duljine optičkog puta od 50 mm.

Slijepa proba se priprema na isti način kao uzorak, samo što umjesto 40 mL uzorka koristi 40 mL destilirane vode.

3.3.9 Nitriti

Nitriti u vodi za piće često potječu iz poljoprivrede, industrije ili neadekvatne obrade otpadnih voda, a mogu nastati i kemijskim reakcijama u vodi. Mogu uzrokovati zdravstvene probleme, osobito kod dojenčadi, jer se u tijelu mogu pretvoriti u nitrate

koji smanjuju sposobnost krvi da prenosi kisik, što može uzrokovati "plavu bolest" ili methemoglobinemiju.

Za određivanje nitrita u vodi koristi se norma HRN EN 26777:1998 [339]. Nitriti u otopini reagiraju s 4-aminobenzen-sulfonaminom u prisutnosti fosforne kiseline (pH 1,9), stvarajući diazonijevu sol koja se oboji u ružičasto kada reagira s N-(1-naftil)-1,2-diaminoetan dihidrokloridom.

Spektrofotometrijsko mjerenje apsorpcije provodi se na valnoj duljini λ = 540 nm. Analizu uzoraka treba izvršiti unutar 24 sata od uzorkovanja; ako to nije moguće, uzorke treba čuvati u hladnjaku na temperaturi od 2 - 5 ºC. U odmjernu tikvicu zapremnine 50 mL prenijeti 40 mL uzorka. Dodati 1,0 mL reagensa za razvijanje boje, odmah promiješati, razrijediti do oznake destiliranom vodom, ponovno promiješati i ostaviti da stoji. Nakon 20 minuta izmjeriti apsorbanciju otopine na 540 nm, koristeći slijepu probu kao referentnu tekućinu (umjesto 40 mL uzorka koristiti 40 mL destilirane vode). Za izračunavanje koncentracije nitrita, izražene kao dušik u miligramima po litri uzorka, primijeniti jednadžbu kalibracijskog pravca na temelju izmjerene apsorbance.

3.3.10 Nitrati

Nitrati su važni nutrijenti za fotosintezu i mogu biti limitirajući faktor rasta za autotrofne biljke. Dok su koncentracije nitrata u površinskim vodama obično niske, u nekim podzemnim vodama mogu biti visoke. Nitrati u vodi često potječu iz poljoprivrednih gnojiva, industrijskih otpadnih voda i neadekvatne obrade otpadnih voda. Visoke koncentracije nitrata u vodi mogu uzrokovati methemoglobinemiju, stanje koje smanjuje sposobnost krvi da prenosi kisik i predstavlja ozbiljnu prijetnju, osobito za dojenčad i malu djecu. Maksimalno dozvoljena koncentracija u pitkoj vodi je 10 mg/L nitrata kao N. U svježoj sirovoj otpadnoj vodi domaćinstava, koncentracije nitrata su niske, dok u efluentima bioloških uređaja, gdje dolazi do nitrifikacije, mogu premašiti 30 mg/L N.

Za određivanje nitrata u vodi koristi se Standard methods 24 edition, 2023, UV spektrofotometrijska metoda [340]. Metoda uključuje mjerenje apsorpcije svjetlosti u UV području na 220 nm i 275 nm. Prikladna je za uzorke s niskim sadržajem organskih tvari, nezagađene prirodne vode i vode za piće. Za analizu, u Erlenmayerovu tikvicu dodaju se 50 mL uzorka vode i 1,0 mL HCl, a zatim se mjeri apsorpcija na 220 nm i 275 nm, bilježeći apsorbancije. Također je nužno mjeriti i slijepu probu kod 220 i 275 nm. Koncentracija nitrata izračunava se prema formuli:

$$[E(220nm) - 2E(275\,nm)]\ x\ f = \frac{mg}{L} N$$

3.3.11 Ortofosfati

Za određivanje ortofosfata u vodi koristi se norma HRN EN ISO 6878:2008 [341], koja je primjenjiva za uzorke voda s koncentracijama ortofosfata većim od 0,003 mg/L kao P.

Ortofosfati u otopini reagiraju s kiselom otopinom koja sadrži molibdat i antimon ione, stvarajući kompleks antimon-fosfomolibdat. Redukcijom ovog kompleksa s askorbinskom kiselinom nastaje intenzivno plavi molibdeni kompleks. Spektrometrijsko mjerenje apsorpcije provodi se na valnoj duljini λ = 880 nm.

Uzorci se mogu zakiseliti do pH < 2 s sulfatnom kiselinom (ρ H_2SO_4 = 1,84 g/mL) i čuvati u hladnjaku do mjesec dana ako analiza ne može biti obavljena unutar 24 sata. Ako je uzorak čuvan u hladnjaku, prije filtriranja treba ga temperirati na sobnu temperaturu. Uzorak filtrirati kroz membranski filter s porama od 0,45 µm, odbaciti prvih 10 mL filtrata i prikupiti potrebnu količinu uzorka. U odmjernu tikvicu zapremnine 50 mL prenijeti 40 mL uzorka, dodati 1,0 mL askorbinske kiseline i 2,0 mL kisele molibdatne otopine. Odmah promiješati, razrijediti do oznake destiliranom vodom, ponovno promiješati i nakon 10 do 30 minuta izmjeriti apsorbanciju otopine na 880 nm u kiveti s optičkim putem 50 mm, koristeći slijepu probu za nulti postavku. Ako spektrofotometar izgubi osjetljivost, mjerenje na 700 nm također je prihvatljivo. Slijepa proba se priprema s 40 mL destilirane vode umjesto uzorka.

3.3.12 Metali

Analiza elemenata (osim žive) izvršena na masenom spektrometru s induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*; ICP-MS) NexION 300x (PerkinElmer Instruments, Waltham, MA, SAD) prema normi HRN EN ISO 17294-2:2016 [342]. Ova se metoda koristi za precizno određivanje metala u vodi. Uključuje pripremu uzorka vode, koji se filtrira i, ako je potrebno, razrjeđuje. Otopina uzorka se raspršuje u finu maglu i unosi u induktivno spregnutu plazmu, gdje se metali ioniziraju zbog visoke temperature (6000-8000 K). Stvoreni ioni se prenose u maseni spektrometar, gdje se analiziraju prema svojim masama. Detektor mjeri intenzitet iona, što omogućava kvantifikaciju koncentracija metala u vodi. NexION 300x nudi visoku

osjetljivost i preciznost te smanjuje interferencije, omogućujući učinkovitu analizu tragova metala.

Uzorci su dostavljeni u posudama od umjetne mase od 50 mL i konzervirani dodatkom 1 kapi 65 % nitratne kiseline (Suprapur, Merck, Darmstadt, Njemačka). Elementi su kvantificirati metodom vanjskog standarda. Kalibracijski pravci sastojali su se od najmanje 6 kalibracijskih točaka dobivenih analizom multielementne standardne otopine (PerkinElmer Instruments, Waltham, MA, SAD), uz uvjet $R^2 \geq 0{,}995$. Granice kvantifikacije su kako slijedi: Sb 1,2 µg/l, Al 20 µg/l, As 0,4 µg/l, Cu 0,3 µg/l, Ba 8 µg/l, Be 0,5 µg/l, B 50 µg/l, Zn 2 µg/l, Cd 0,02 µg/l, Co 1 µg/l, Cr 0,4 µg/l, Mn 1,5 µg/l, Ni 0,8 µg/l, Pb 0,3 µg/l, Se 0,5 µg/l, Ag 1 µg/l, V 1 µg/l, Fe 10 µg/l.

Živa se analizirala na uređaju AMA 254 (Leco, Michigan, SAD) koristeći vlastitu akreditiranu metodu prema preporuci proizvođača. Granica kvantifikacije za živu je 0,25 µg/L.

3.4 Određivanje serogrupa

Specifičnost SG *Lp* daje struktura lipopolisaharida. Serogrupe se mogu podijeliti u MAb subgrupe korištenjem monoklonskih protutijela (Mab 3/1, Mab 10/6, Mab 3, Mab 8/4, Mab 20/1, Mab 26/1). Analizom subgrupa, *L. pneumophila* SG1 karakterizira se u jednu od devet podskupina; Knoxville, Philadelphia, Francuska/Allentown, Benidorm, OLDA, Oxford, Heysham, Camperdown i Bellingham [343]. Bakterijske suspenzije *Lp* pripreme se u natrijevom azidu u koncentraciji 1 po McFarlandu. 15 µl pripremljenih bakterijskih suspenzija stavi se na predmetno stakalce i osuši na sobnoj temperaturi. Stakalca se fiksiraju u acetonu tijekom 15 minuta i zatim osuše na sobnoj temperaturi. Doda se 15 µl primarnog antitijela (Mab 3/1, Mab 10/6, Mab 3, Mab 8/4, Mab 20/1, Mab 26/1) na svako stakalce i inkubira 30 minuta pri 37 °C. Zatim se protutijelo dva puta ispire PBS-om i jednom destiliranom vodom (DDH). Stakalca se zatim inkubiraju sekundarnim fluorescein-5-izotiocijanat (FITC) – konjugiranim antitijelom 30 minuta na 37 °C, 2 puta ispiru PBS-om, jednom s DDH. Pozitivna reakcija detektira se zelenom fluorescencijom pod fluorescentnim mikroskopom Eclipse E400 (Nikon, Tokio, Japan).

Pojedine serogrupe *Lp* 2-14 određene su lateks aglutinacijom prema protokolu Pro-Lab Diagnostics, Malta.

3.5 Metoda analize sekvenci (engl. *sequence-based typing*; SBT)

DNK iz *Lp* ekstrahira se pomoću kita (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA) prema uputama proizvođača. Osam gena iz *Lp* (flaA, mompS, proA, asd, mip, pilE, neuA, neuAh) se amplificira i korišten je standardni protokol EWGLI [344, 345]. Reakcijske smjese za amplifikaciju gena pripreme se u volumenu reakcije od 50 µl. Svaka reakcijska smjesa sadržava 25 mM $MgCl_2$, 10 mM svakog deoksinukleotida (Applied Biosystems), 10 µM svakog primera (Invitrogen, Life Technologies) i 5 U/µl polimeraze AMPLITaq Gold DNA (Applied Biosystems). Nakon početnog koraka denaturacije tijekom 5 min pri 95 °C, odvije se 35 ciklusa amplifikacije u PCR uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). U svakom ciklusu odvija se denaturacija na 95 °C tijekom 30 s, hibridizacija početnica na 55 °C tijekom 30 s i sinteza komplementarnog lanca na 72 °C tijekom 45 s te završava na 72 °C tijekom 10 min. Amplificirani PCR produkti nanesu se na gel kako bi se gel elektroforezom u 2 % agaroznom gelu potvrdila amplifikacija gena. Enzimsko pročišćavanje PCR produkta provede se u reakcijskom volumenu od 6,5 µl pomoću 20 U/µl Exonuclease I (Thermo scientific) i 1 U/µl FastAP Termosenzitive alkalne fosfataze (Termo scientific). Pripremljene reakcije inkubiraju se na 37 °C tijekom 15 minuta, a enzimi se inaktiviraju na 80 °C tijekom 15 minuta. PCR reakcije sekvencioniranja provedu se korištenjem kita (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, USA) prema uputama proizvođača. Nakon početnog koraka od 1 min na 96 °C, reakcijska smjesa se podvrgne 25 ciklusa amplifikacije, 10 s na 96 °C, 5 s pri 50 °C i 4 minute na 60 °C. Pročišćavanje PCR reakcije provede se korištenjem kita (BigDye XTerminator Purification Kit,Applied Biosystems, USA) prema uputama proizvođača. Uređaj za sekvencioniranje (Model 310 ABI DNA, Applied Biosystems) koristi se za analizu produkata. Analiza sekvenci provede se pomoću softwera CLC Main Workbench verzije 6.2. Dobivene sekvence usporede se sa sekvencama u bazi podataka EWGLI SBT kako bi se otkrili alelni brojevi. Kombinacija alela osam analiziranih lokusa definira se kao sekvencni tip (engl. *Sequence - Based Type*; SBT).

3.6 Statistička obrada podataka

Za povezivanje rezultata kvalitete vode i karakteristika okoliša te utvrđivanje razlika između promatranih skupina podataka koriste se neparametrijski statistički

testovi (Spearmanova korelacijska analiza, Mann–Whitney U test, Kruskal-Wallis H test).

Deskriptivna statistika korištena je za prikaz sljedećih podataka: relativna frekvencija, srednja vrijednost (MV) i medijan, standardna devijacija (SD), standardna pogreška (SE), interkvartilni raspon (IQR) i raspon podataka (MIN–MAX) kao mjere disperzije podataka, a podaci su prikazani i grafički.

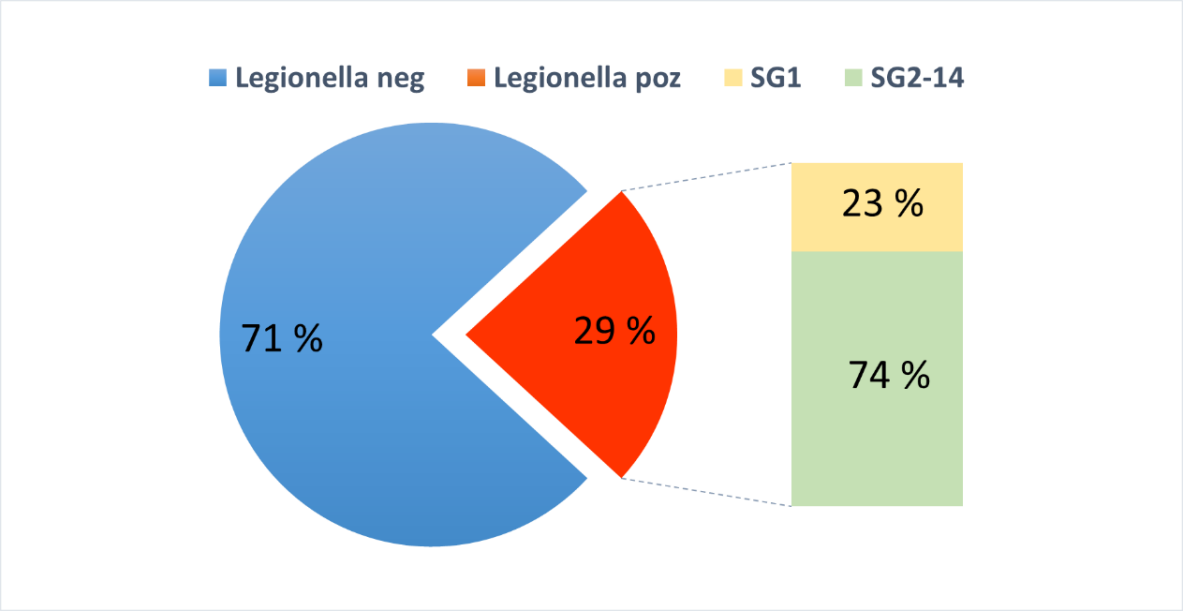
Normalnost distribucije podataka testirana je pomoću Kolmogorov-Smirinov testa. Provedena je logaritamska transformacija mikrobioloških podataka kako bi se normalizirale nenormalne distribucije. Kada su dobiveni, podaci nisu slijedili normalnu distribuciju; neparametarski testovi - Spearmanov koeficijent korelacije, Mann-Whitney U test (M-W U) - provedeni su pomoću softverskog paketa TIBCO Statistica 13.5.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD). Statistička značajnost postavljena je na 0,05. Studentov t-test, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ smatrali su se značajno drugačijima u odnosu na kontrolni uzorak [346].

4. REZULTATI

4.1 Udio *Legionella*-pozitivnih uzoraka, distribucija pojedinih sojeva

Od ukupno ispitanih 100 uzoraka na pokazatelj *Legionella*, 29 uzoraka bilo je pozitivno. Srednja vrijednost broja legionela kod *Legionella*-pozitivnih uzoraka iznosila je 1867,9±3128,1 CFU/1000 mL, broj legionela varirao je u rasponu vrijednosti od 50,0 do 11.800,0 CFU/1000 mL, medijan 400,0 CFU/1000 mL, (IKR 130,0-1300,0 CFU/1000 mL).

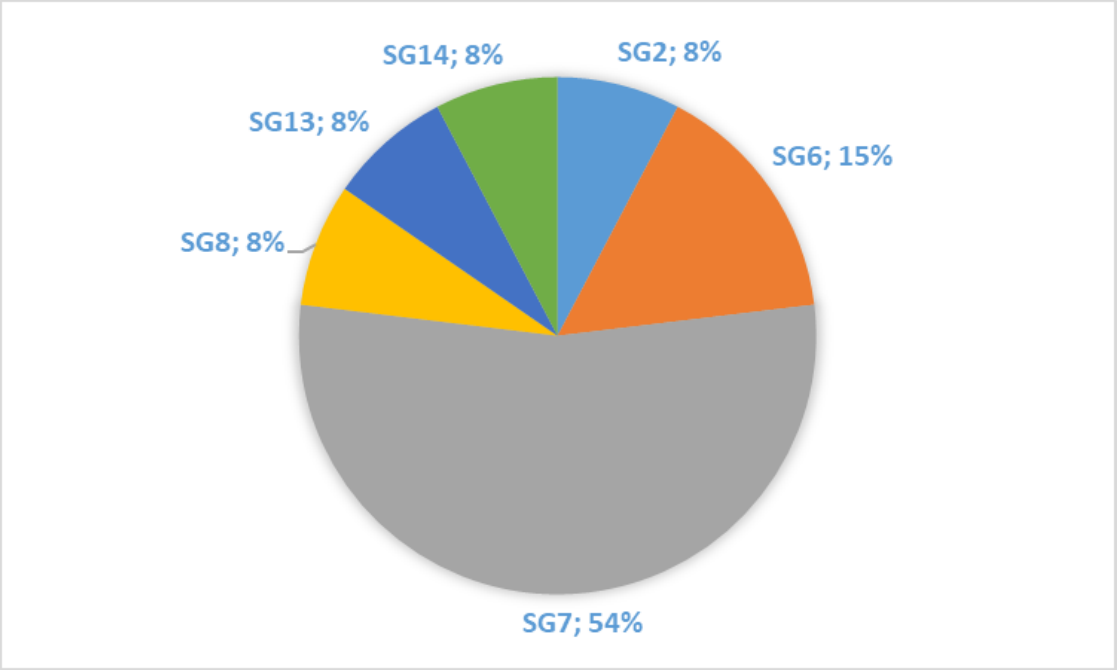
U 29 uzoraka pozitivnih na pokazatelj *Legionella*, ukupno je izoliran 31 izolat. Kao *Lp* SG 2-14 potvrđena su 23 izolata (23/31, 74 %), kao *Lp* SG1 potvrđeno je 7 izolata (7/31, 23 %), a jedan izolat kao *Legionella* spp. (Slika 3). U dva ispitana uzorka istovremeno su potvrđene serogrupe SG 2-14 i SG1.



Slika 3. Udio *Legionella*-negativnih i pozitivnih uzoraka, s prikazom udjela SG1 i SG 2-14 u pozitivnim uzorcima

4.1.1 Identifikacija pojedinih serogrupa *L. pneumophila* SG 2-14

Od ukupno 23 izolata *Lp* SG 2-14, dodatna identifikacija serogrupa pomoću specifičnih protutijela uspješno je provedena za 13 izolata. Među njima, više od polovice (7/13; 54 %) pripadalo je serogrupi 7, dok je 15 % (2/13) identificirano kao serogrupa 6. Po jedan izolat (8 %) pripadao je serogrupama 2, 8, 13 i 14 (Slika 4).



Slika 4. Udio pojedinih serogrupa u *L. pneumophila* SG 2-14 pozitivnim izolatima

4.2 Fenotipska i genotipska karakterizacija

Jedan od ciljeva istraživanja bio je utvrditi prisutnost sekvencnih tipova *L. pneumophila* koji najčešće cirkuliraju na brodovima/trajektima u različitim plovnim područjima Jadranskog mora u Hrvatskoj. SBT analizom tipizirano je pet bakterijskih izolata *L. pneumophila* iz uzroka vode s različitih brodova/trajekata. Alelni profil sedam alela (flaA, pilE, asd, mip, mompS, proS i neuA) dobiven je za svaki izolat. Identificirano je tri različita alelna profila i definirana su tri ST skupine. Prevladavajući ST 1317 pokazao je profil “16, 21, 12, 19, 31, 21, 215” (Tablica 4). Alelni profili dobiveni iz uzoraka već su bili prisutni u EWGLI SBT bazi podataka. Istih pet izolata *L. pneumophila* korišteno je za određivanje fenotipske karakterizacije. Izolati su pokazali različite fenotipske karakteristike, ali najčešći fenotip bio je Chicago 8 (Tablica 3).

Tablica 3. Fenotipovi, ST i alelni profili *L. pneumophila* iz uzorka vode izoliranih s brodova/trajekta

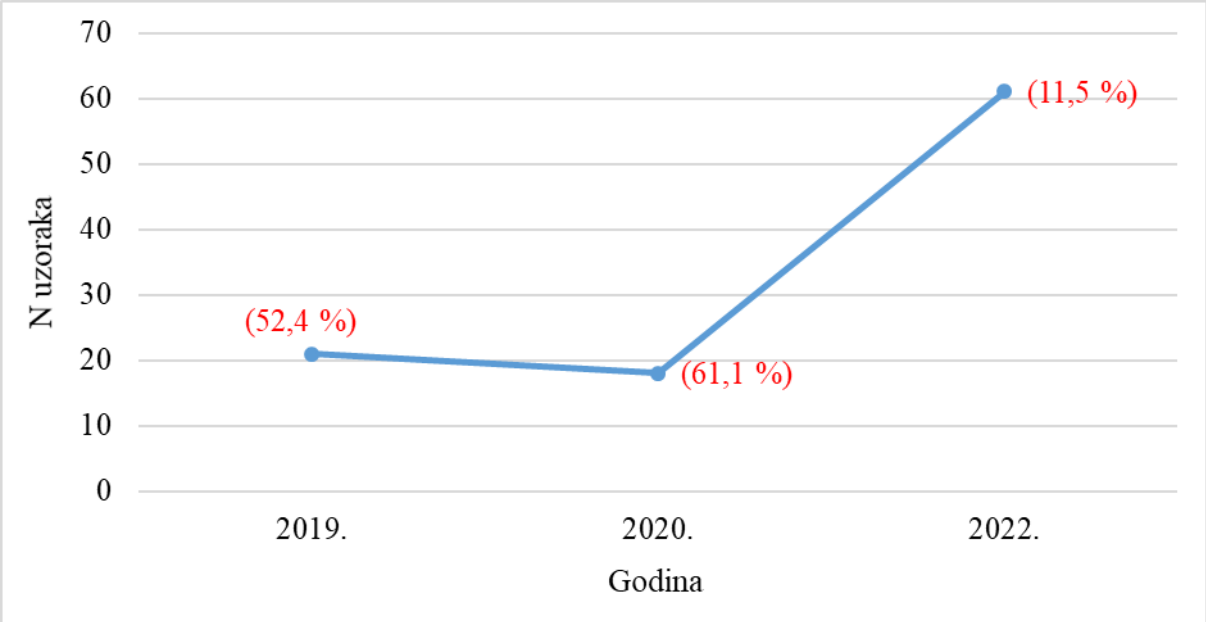
Plovno područje	*Lp* SG	Fenotip	ST	Alelni profil
Zadar	7	Chicago 8	ST 1317	16,21,12,19,31,21,215
Split	6	Chicago 2	ST 187	3,10,21,8, 14, 19, 3
Rijeka	7	Chicago 8	ST 1317	16,21,12,19,31,21,215
Šibenik	7	Chicago 8	ST 1317	16,21,12,19,31,21,215
Split	1	Oxford/Olda	ST 986	1,14,16,16,15,13,2

4.3 Godišnja i mjesečna distribucija uzoraka

Tijekom razdoblja istraživanja od 2019. do 2022. godine ukupno je ispitano 100 uzoraka vode. Uzorci vode uzeti su iz sustava distribucije vode s 19 trajekata i brodova.

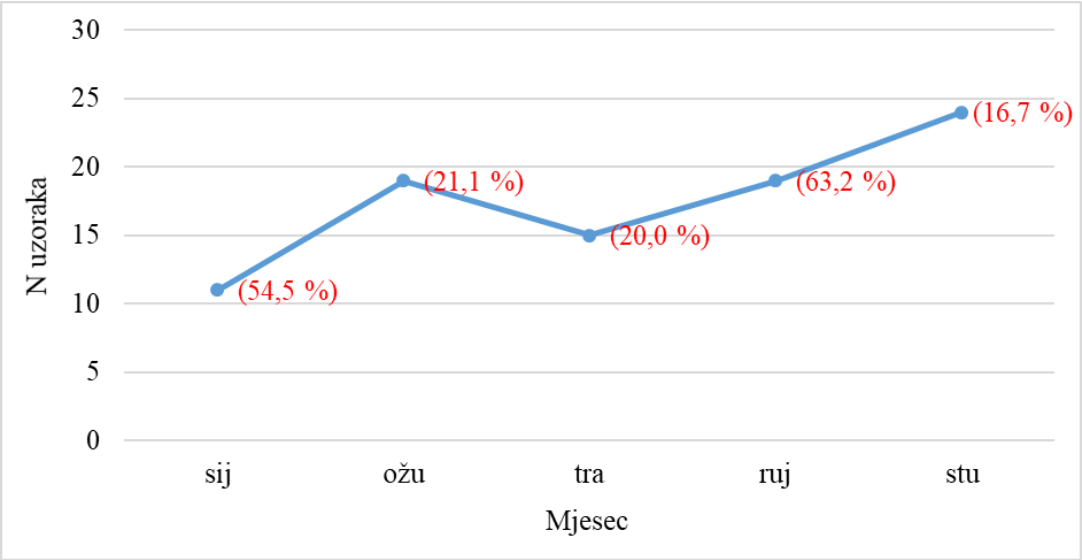
Najveći broj uzoraka ispitan je 2022. godine (61), u 2021. godini nije ispitan niti jedan uzorak, dok je u godinama 2019. i 2020. ispitan podjednak broj uzoraka (21, odnosno 18), Slika 5.

Udio *Legionella*-pozitivnih uzoraka bio je najveći u 2020. godini, kada je iznosio čak 61,1 % (11/18), a najmanji u 2022. godini, u kojoj je u sedam uzoraka od ispitanih 61 dokazana *Legionella* (11,5 %).



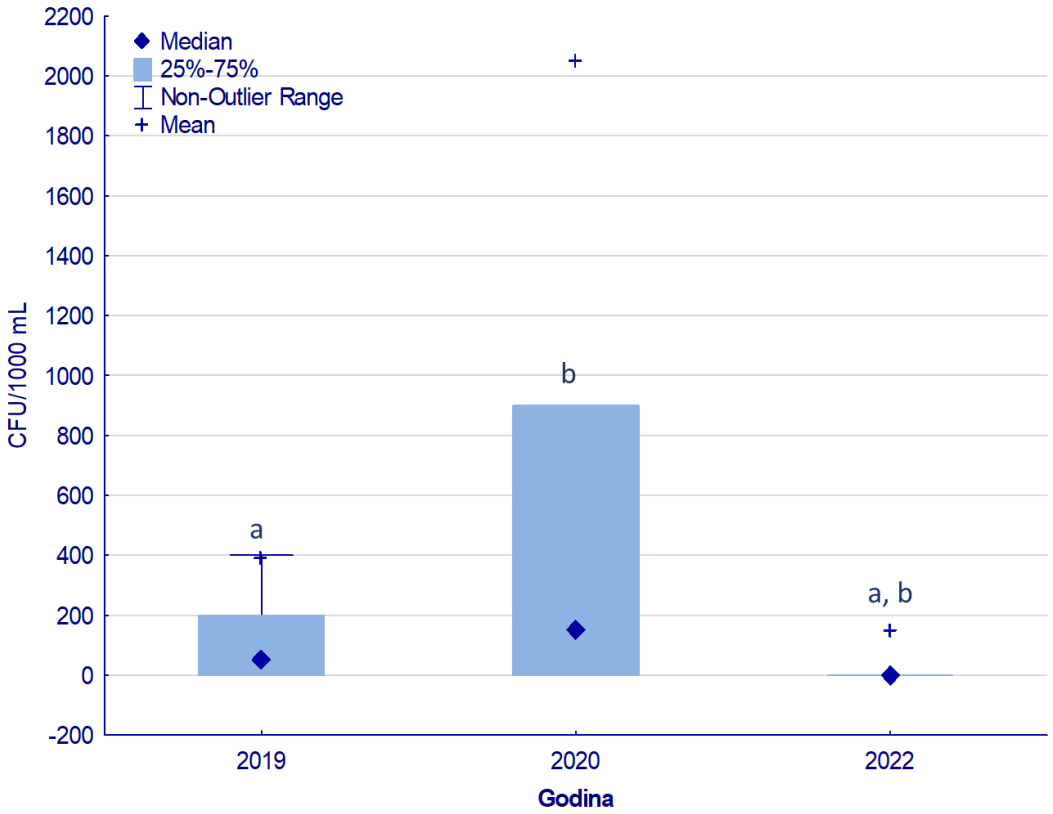
Slika 5. Godišnja distribucija broja ispitanih uzoraka na pokazatelj *Legionella*, s prikazom udjela pozitivnih uzoraka

Najveći broj uzoraka uzet je u mjesecu studenom (N=24), a najmanji u siječnju (N=11). Najveći udio *Legionella*-pozitivnih uzoraka, čak 63,2 %, zabilježeno je u rujnu (12/19), a najmanji od 16,7 % u studenom (4/24), Slika 6.



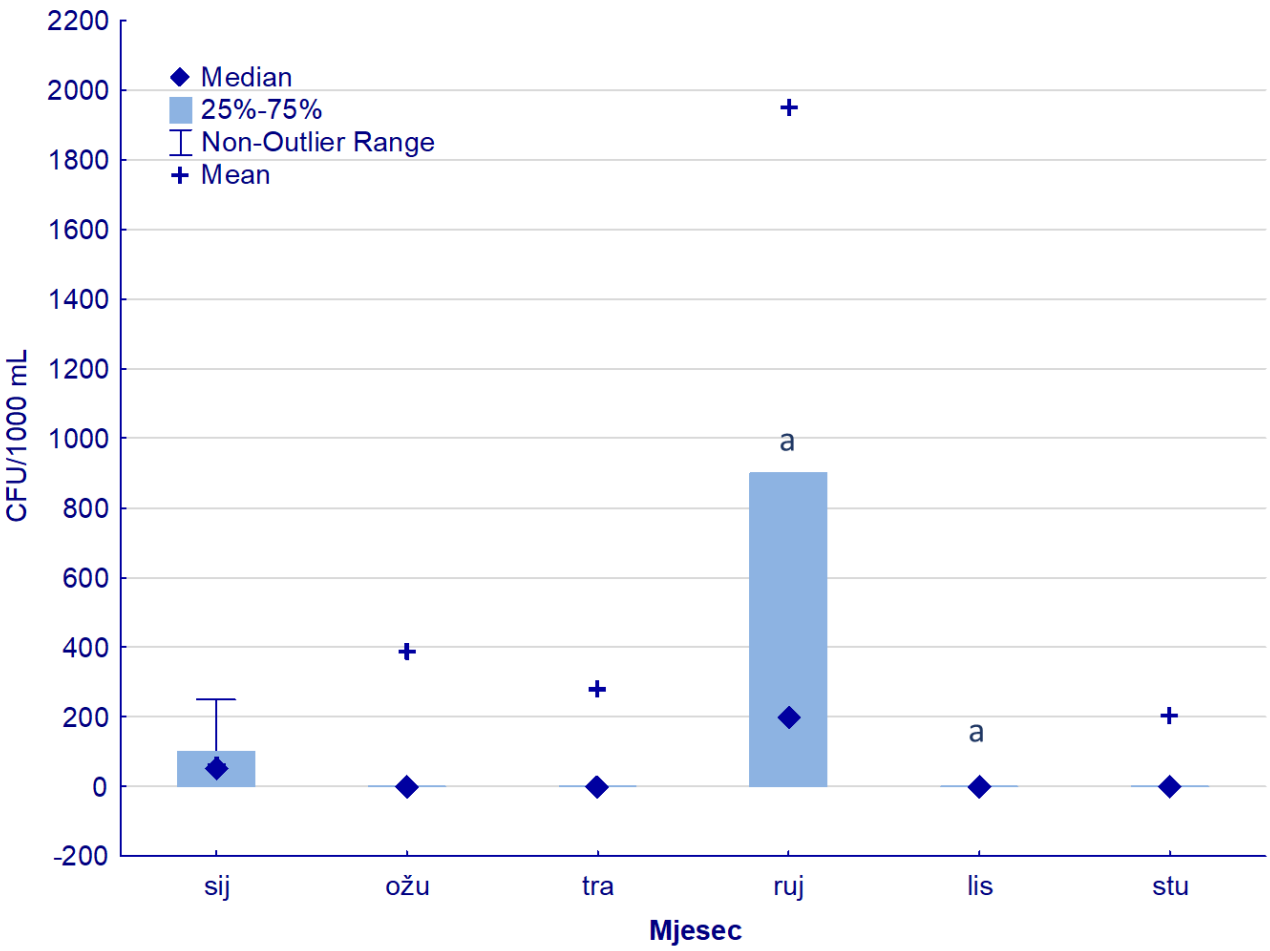
Slika 6. Mjesečna distribucija broja ispitanih uzoraka na pokazatelj *Legionella*, s prikazom udjela pozitivnih uzoraka

Promatrajući godine, 2022. godina statistički značajno se razlikovala od 2019. i 2020. (K-W test, N=100, H=22,37, p<0,0001). U godini 2020. medijan i srednja vrijednost broja legionela u ispitanim uzorcima bili su najviši. Srednja vrijednost broja legionela u 18 ispitanih uzoraka u toj godini iznosila je 2050±3746,9 CFU/1000 mL, raspon vrijednosti 0-11.800,0, medijan 150 CFU/1000 mL (IKR 0,0-900,0 CFU/1000 mL), Slika 7.



Slika 7. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja *Legionella* u uzorcima vode po godinama ispitivanja, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05).

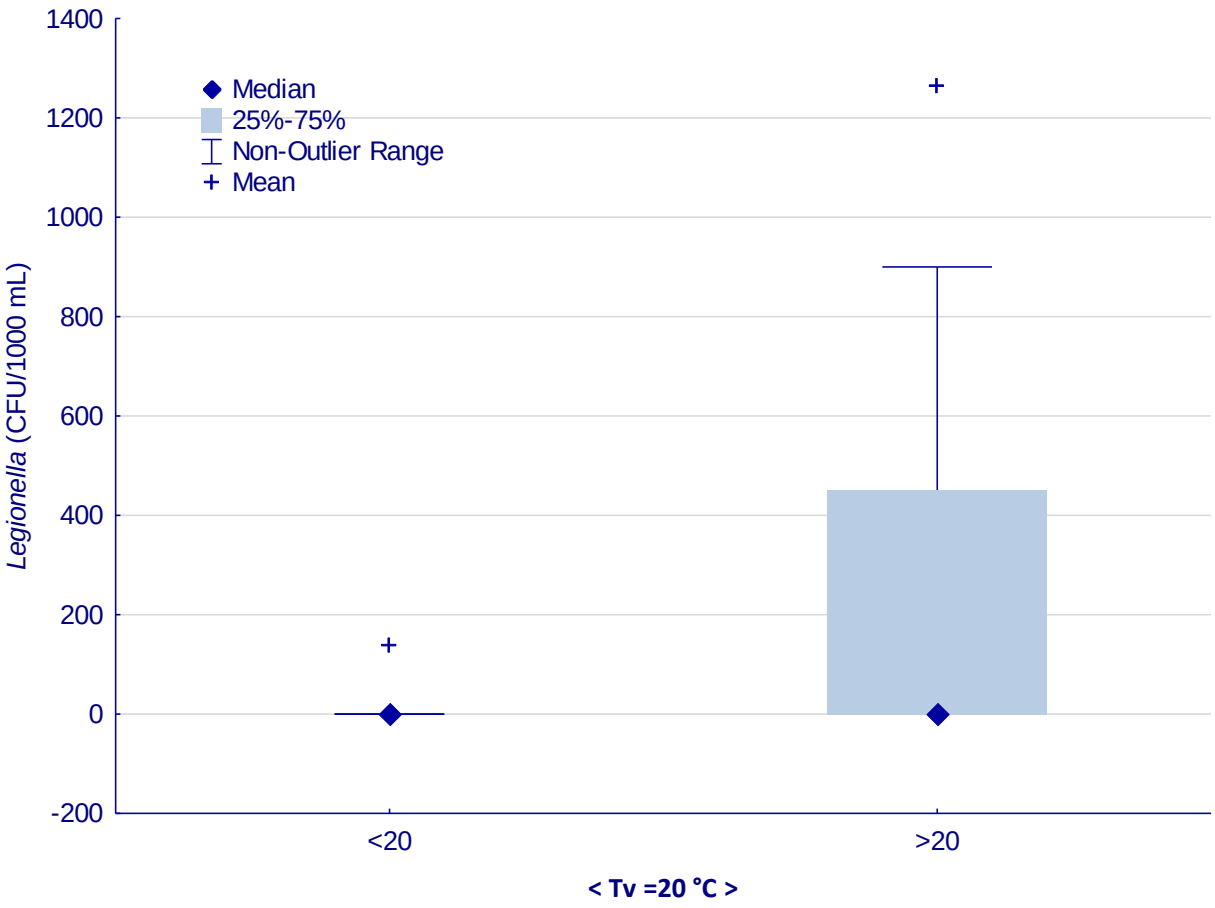
Promatrajući mjesece, prema medijanu broja legionala u ispitanim uzorcima, statistički značajno su se razlikovali rujan i listopad (K-W test, N=100, H=20,54, p=0,001). U najopterećenijem mjesecu rujnu, raspon vrijednosti kretao se je od 0,0-11.800,0 CFU/1000 mL, srednja vrijednost 1947,4±3650,8 CFU/1000 mL, uz medijan broja legionela od 200 (IKR 0,0-900,0 CFU/1000 mL), Slika 8.



Slika 8. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja *Legionella* u uzorcima vode po mjesecima ispitivanja, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05).

4.4 Utjecaj temperature vode

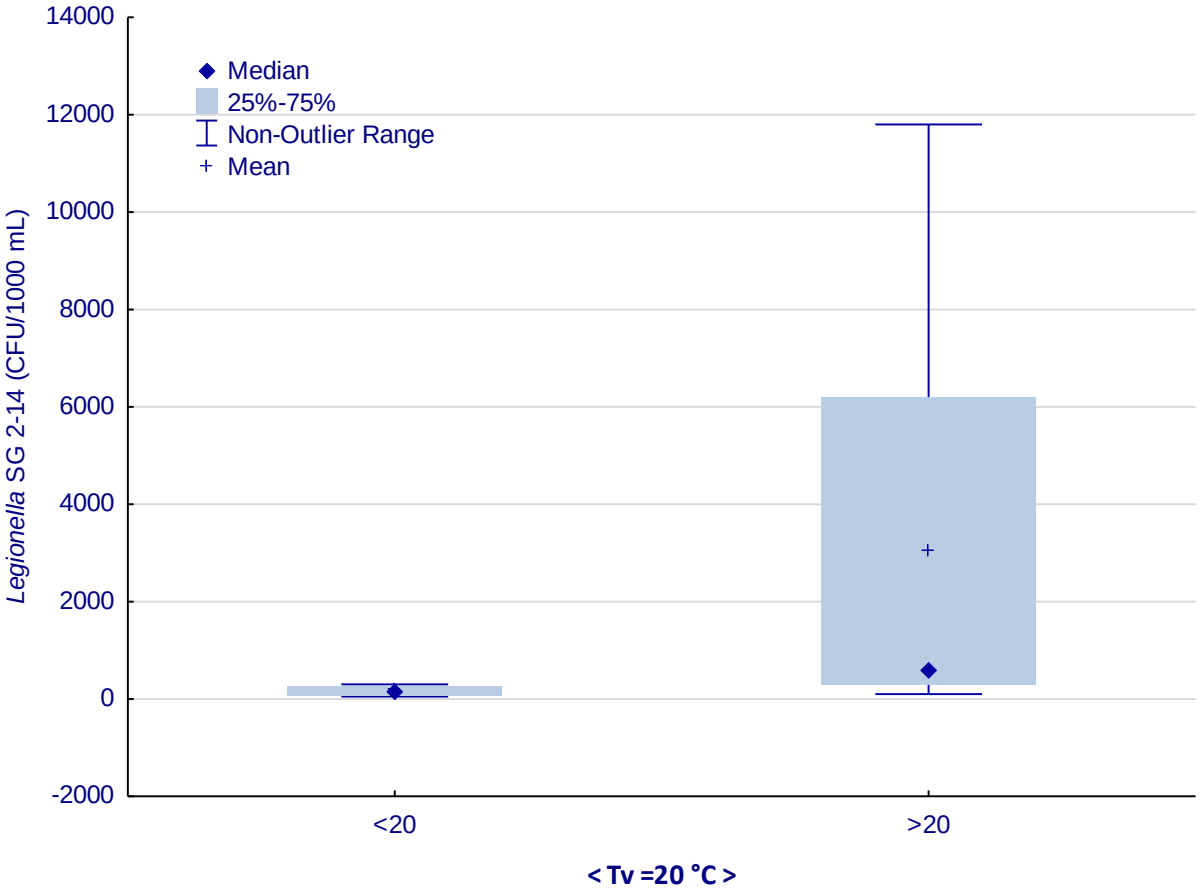
Promatrajući uzorke kategorizirane u dvije grupe, s temperaturom vode <20 °C i ≥20 °C, uočena je statistički značajna razlika u opterećenju legionelama (M-W test, Z=-3,28, p=0,008). Uzoraka u kojima je mjerena temperatura <20 °C bilo je 63, srednja vrijednost broja legionela iznosila je 137,6±588,4 CFU/1000 mL, raspon vrijednosti 0,0-3600 CFU/1000 mL, medijan 0,0 CFU/1000 mL (IKR 0,0-0,0 CFU/1000 mL). Temperatura ≥20 °C izmjerena je u 36 uzoraka, srednja vrijednost broja legionela iznosila je 1263,9±2903,2 CFU/1000 mL, raspon vrijednosti 0,0-11.800,0 CFU/1000 mL, medijan 0,0 CFU/1000 mL (IKR 0,0-450,0 CFU/1000 mL), Slika 9.



Slika 9. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja *Legionella*, u uzorcima s temperaturom vode <20 °C i ≥20 °C, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

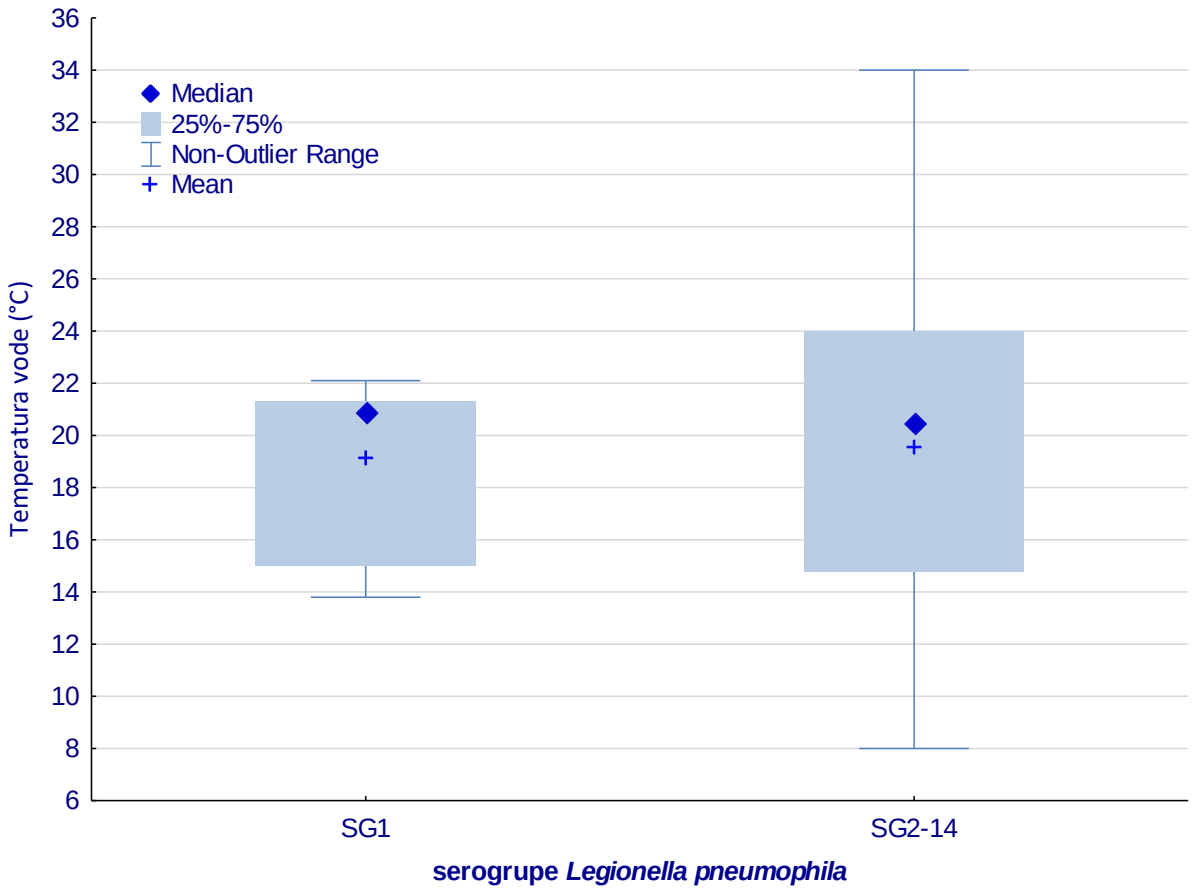
Promatrajući utjecaj temperature vode na koncentraciju pojedinih sojeva legionela (SG1 i SG 2-14), kod *Lp* SG 2-14 utvrđena je statistički značajna razlika između uzoraka u kojima je mjerena temperatura <20 °C i ≥20 °C (M-W test, Z=-2,86, p=0,004), dok kod SG1 ista razlika nije utvrđena.

Uzorci u kojima je dokazan soj legionele SG 2-14, s temperaturum vode od ≥20 °C, bili su značajno jače opterećeni legionelama, u odnosu na uzorke s temperaturom vode <20 °C. U 13 uzoraka broj legionela kretao se je od 100 do 11.800 CFU/1000 mL, srednja vrijednost iznosila je 3038,5±4067,5 CFU/1000 mL, medijan 600,0 CFU/1000 mL (IKR 300,0-6200,0 CFU/1000 mL), Slika 10.



Slika 10. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja *L. pneumophila* SG 2-14, u uzorcima s temperaturom vode <20 °C i ≥20 °C, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

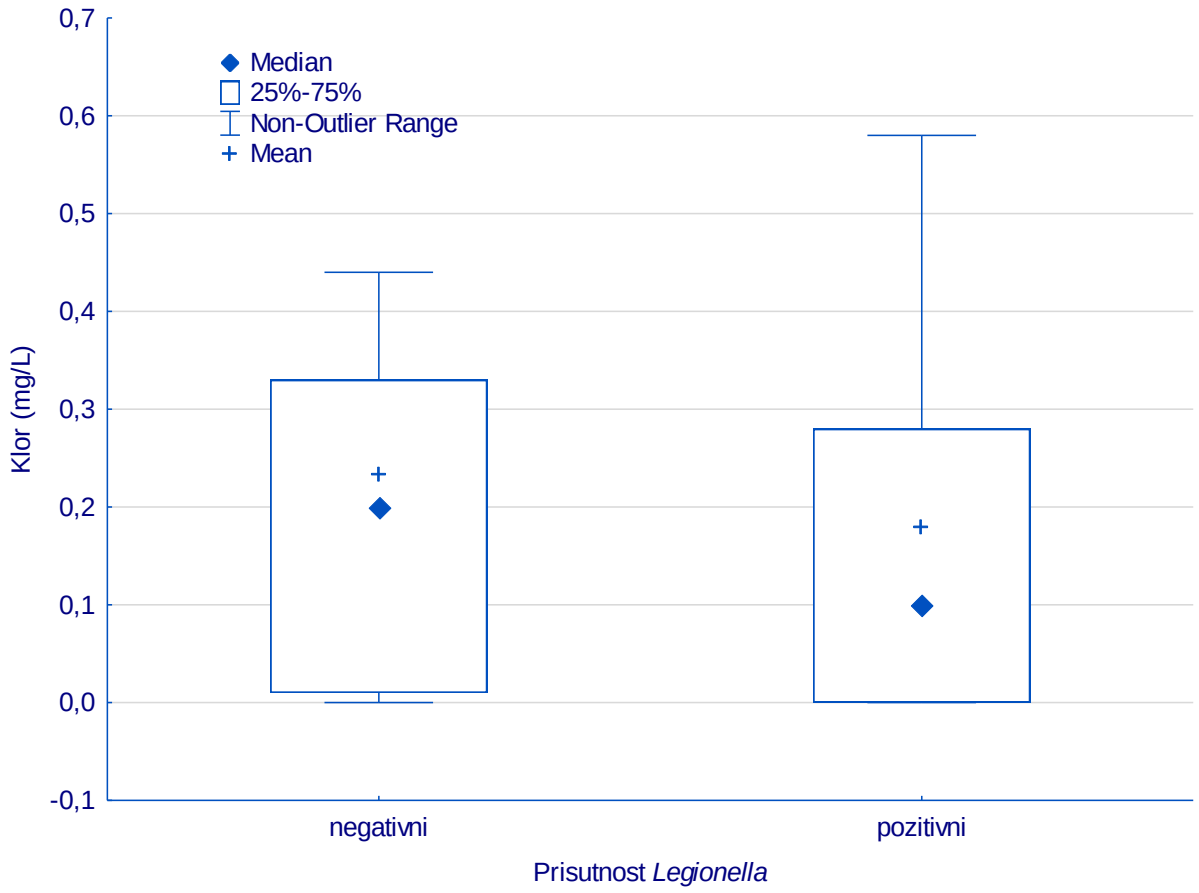
Usporedbom raširenosti serogrupa *L. pneumophila* s temperaturom vode nije utvrđena statistički značajna razlika. Ipak, u uzorcima u kojima je detektirana serogrupa SG 2-14 zabilježen je širi temperaturni raspon (Slika 11).



Slika 11. Temperatura vode u odnosu na medijan (♦) i srednju vrijednost (+) broja *L. pneumophila* (SG1 vs SG 2-14), s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

4.5 Utjecaj koncentracije slobodnog rezidualnog klora

Koncentracija SRK mjerena je u 60 uzoraka, u rasponu od 0,00 – 1,2 mg/L, medijan 0,20 mg/L, sr. vr. 0,23±0,27 mg/L, IKR 0,00-0,32 mg/L). U *Legionella*-pozitivnim uzorcima mjerene su niže vrijednosti koncentracije SRK (0,00 – 0,58 mg/L, medijan 0,10 mg/L, sr. vr. 0,18±0,22 mg/L, IKR 0,00-0,28 mg/L) u usporedbi s *Legionella*-negativnim uzorcima (0,00 – 1,20 mg/L, medijan 0,20 mg/L, sr. vr. 0,23±0,28 mg/L, IKR 0,01-0,33 mg/L), ali razlika nije bila statistički značajna (Slika 12.).



Slika 12. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) koncentracije slobodnog rezidualnog klora (mg/L), u *Legionella*-pozitivnim i negativnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

4.6 *Legionella* vs metali

U tablici 4. prikazani su metali ispitani u uzorcima vode, s pripadajućim srednjim vrijednostima, standardnim devijacijama, rasponom vrijednosti, medijanom te IKR.

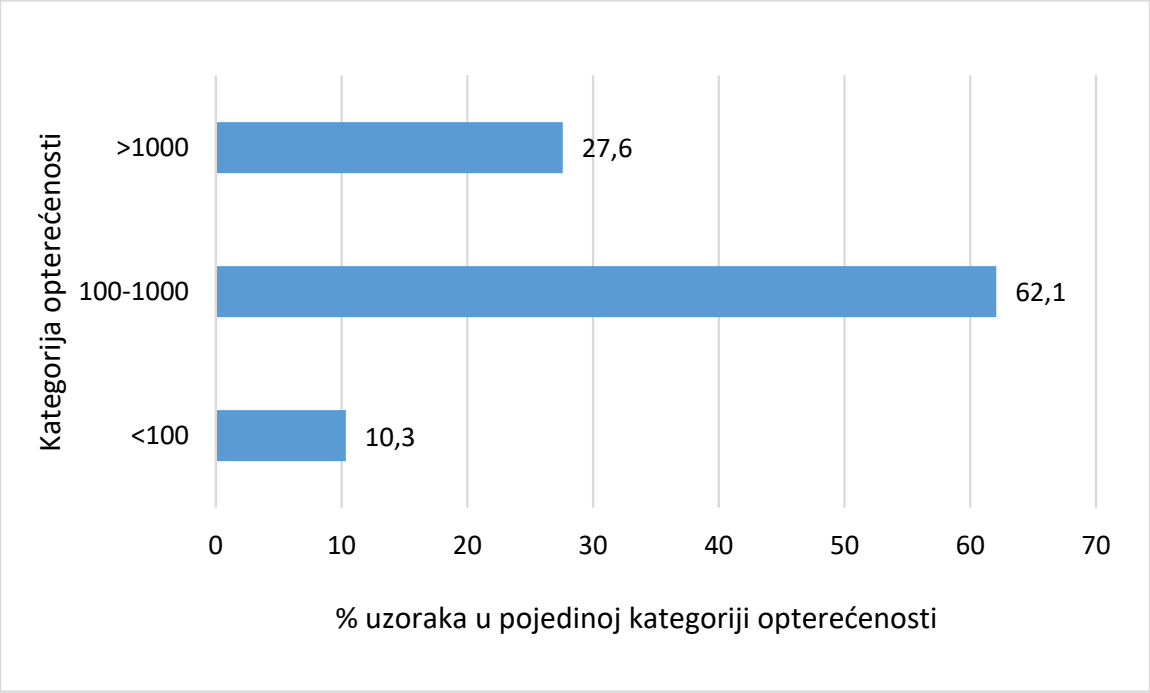
Tablica 4. Koncentracija metala (µg/L) u ispitanim uzorcima vode

Metal	N	SV	Medijan	Min	Max	IKR		SD
Hg	59	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Cr	95	0,5192	0,5935	0,0000	2,0000	0,0000	0,7219	0,4899
Mn	96	0,5062	0,0000	0,0000	26,7280	0,0000	0,0000	2,8334
Fe	96	6,4374	0,0000	0,0000	54,8490	0,0000	0,0000	13,4477
As	95	0,1439	0,0000	0,0000	0,9930	0,0000	0,0000	0,3024
Cd	96	0,0119	0,0000	0,0000	0,1090	0,0000	0,0200	0,0227
Ni	96	0,0391	0,0000	0,0000	1,8490	0,0000	0,0000	0,2322
Cu	96	6,0585	4,8320	0,0000	20,3510	2,4241	8,8411	4,5702
Zn	96	77,7033	34,0319	0,0000	1943,0550	7,3343	58,4991	243,0643
Pb	95	0,0072	0,0000	0,0000	0,3710	0,0000	0,0000	0,0493
Be	95	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Al	95	0,2316	0,0000	0,0000	22,0000	0,0000	0,0000	2,2572
Sb	95	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Co	96	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Se	95	0,3635	0,0000	0,0000	1,7980	0,0000	0,7317	0,4966
V	95	0,2208	0,0000	0,0000	2,0410	0,0000	0,0000	0,5074
Ba	95	16,3951	8,6122	0,0000	97,0000	0,0000	23,2183	22,8767
Ag	95	0,0379	0,0000	0,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,3132
B	96	6,1667	0,0000	0,0000	592,0000	0,0000	0,0000	60,4207
Mo	35	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Li	35	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Sr	35	121,8413	121,0000	44,3381	341,0000	94,0000	133,4391	49,7190
Si	61	1,3679	1,2952	0,3405	2,5190	1,1410	1,4606	0,5179
SiO_2	61	2,9272	2,7718	0,7287	5,3910	2,4417	3,1256	1,1083

SV – srednja vrijednost
SD – standardna devijacija
Min – minimum; Max – maksimum (rasponom vrijednosti)
IKR – interkvartalni raspon

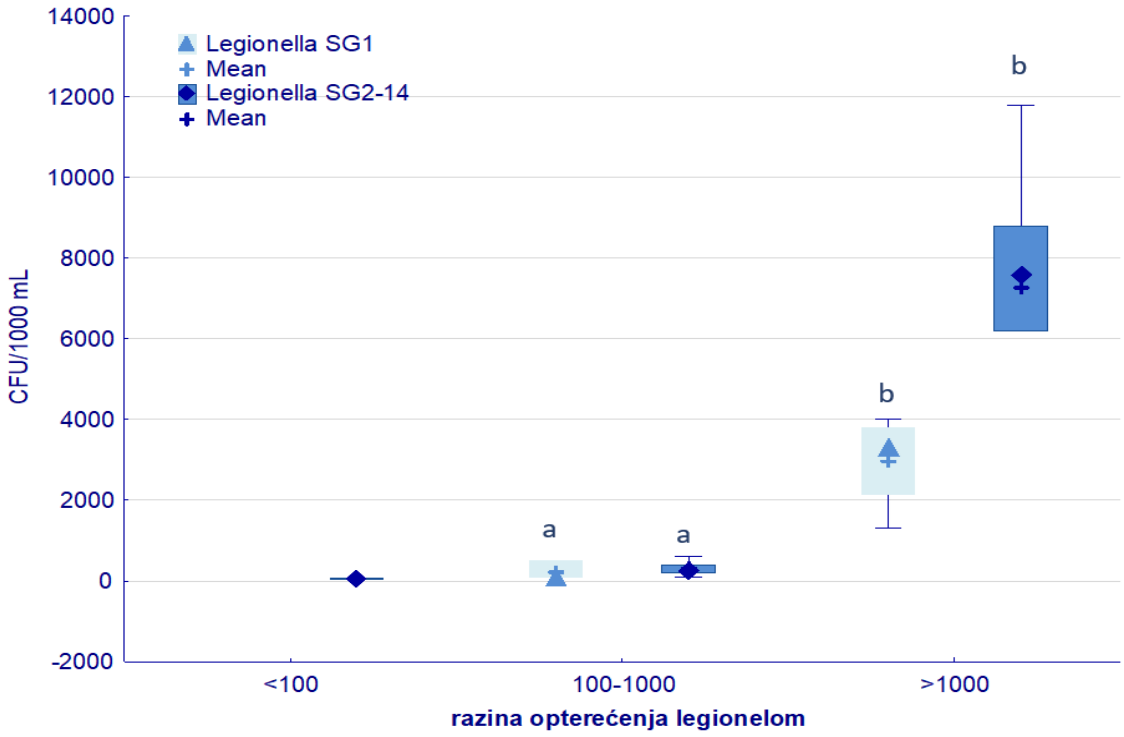
4.7 Razine opterećenosti legionelama

Promatrajući ispitane uzorke vode prema opterećenosti legionelama, nivo opterećenja podijeljen je na tri razine: slabo opterećenje (<100 CFU/1000 mL), srednje opterećenje (100-1000 CFU/1000 mL) te jače opterećenje (>1000 CFU/1000 mL). Najveći udio uzoraka (62,1 %) svrstan je u srednje opterećene uzorke, dok nešto manje od trećine uzoraka (27,6 %) pripada kategoriji jače opterećenih uzoraka, Slika 13.



Slika 13. Udio uzoraka u pojedinoj kategoriji opterećenosti legionelama

Sagledavajući pojedine SG legionela, na Slici 14. se može uočiti da se SG 2-14 javljaju u višim koncentracijama, u odnosu na SG1.



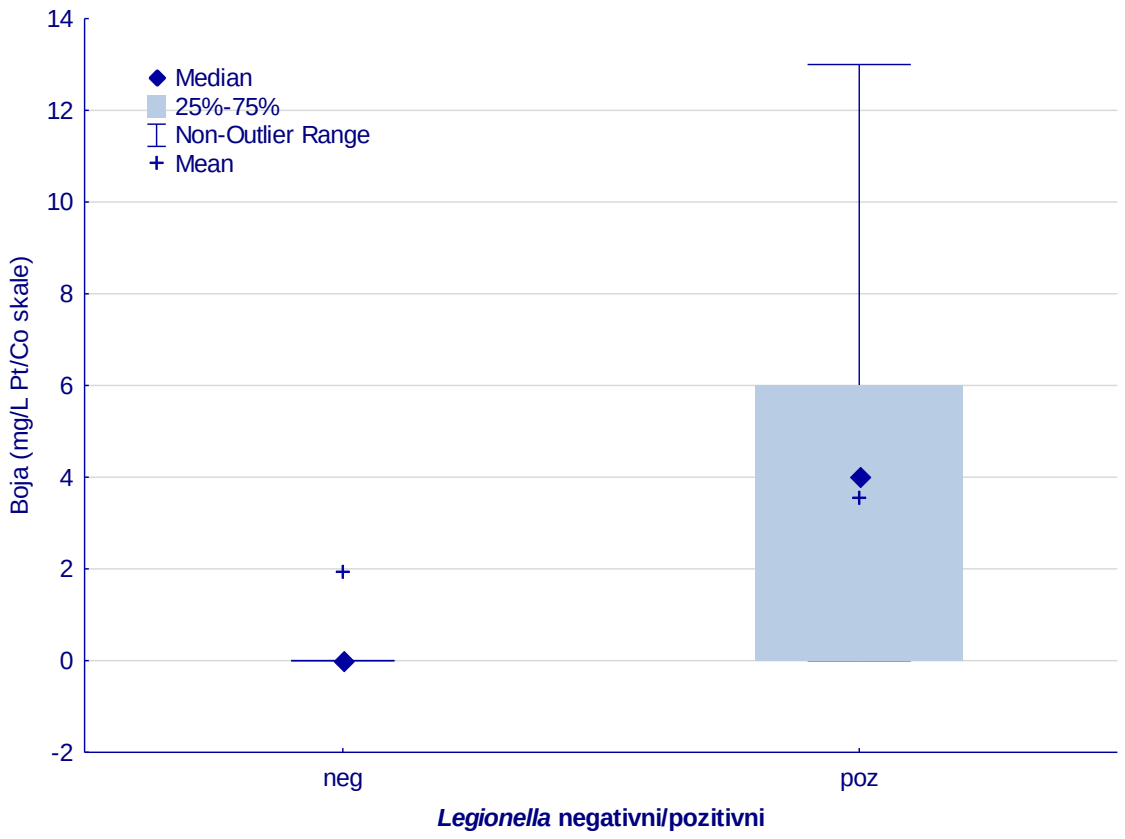
Slika 14. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja legionela u tri kategorije opterećenosti: niskoj, srednjoj i višoj, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i rasponom rezultata bez ekstrema (┬). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05).

4.8 *Legionella*-negativni *vs* pozitivni uzorci

Promatrajući ispitane uzorke kao *Legionella*-negativne i pozitivne, kod slijedećih ispitanih parametara utvrđene su statistički značajne razlike u navedene dvije skupine uzoraka:

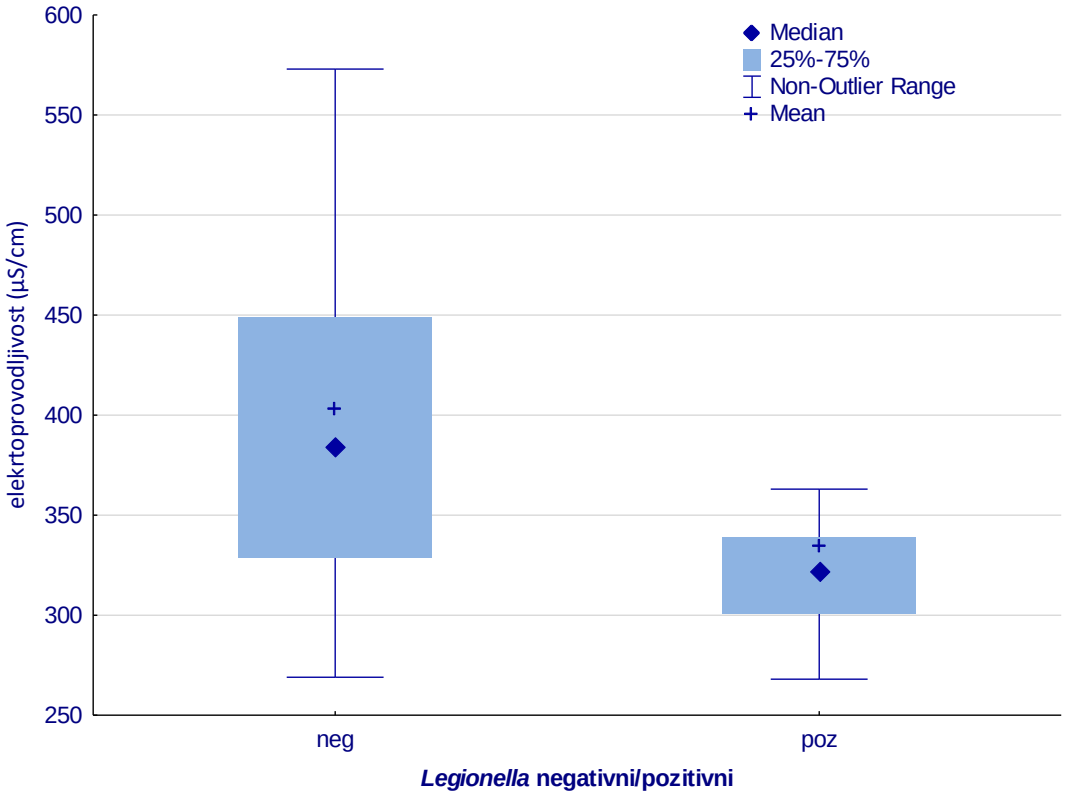
1. *P. aeruginosa*,
2. boja,
3. elektroprovodljivost,
4. kloridi,
5. NO_3,
6. Cr,
7. Cu,
8. Pb.

Na Slici 15. prikazane su vrijednosti boje kod *Legionella*-pozitivnih i negativnih uzoraka. Mann Whitney testom utvrđeno je da je boja značajno viša kod uzoraka u kojima je dokazana legionela (Z=-2,23, p=0,0127).



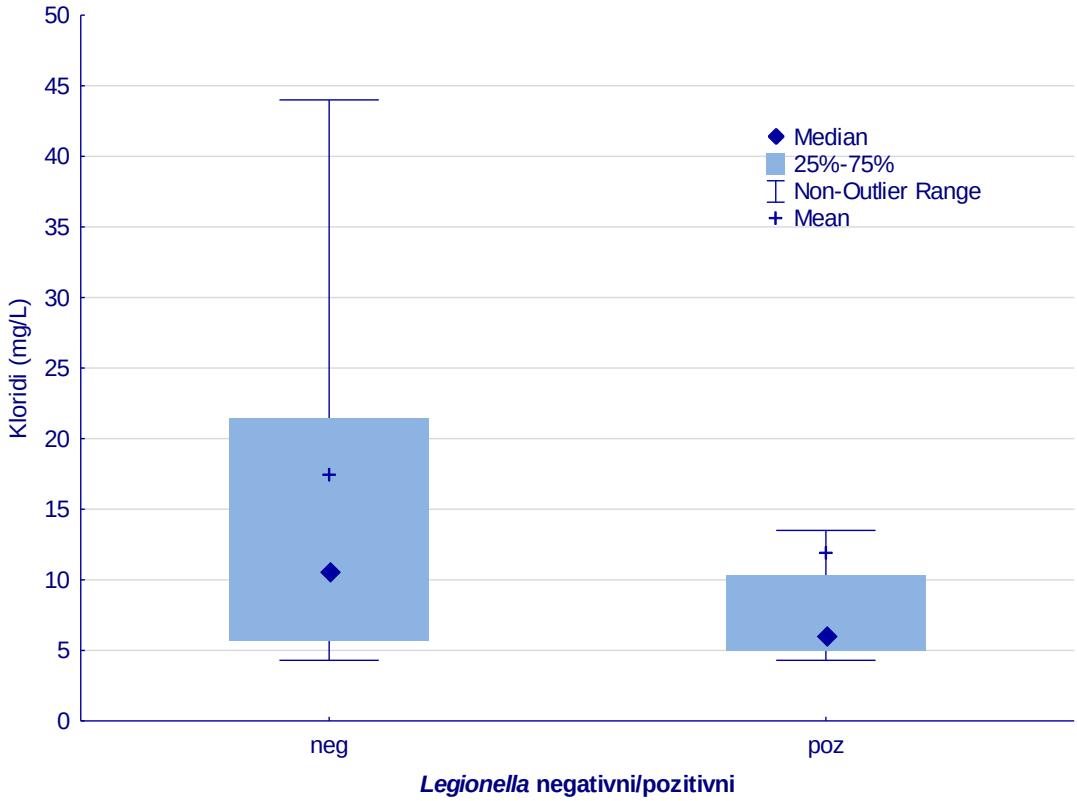
Slika 15. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) boje u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

Na Slici 16. prikazane su vrijednosti elektroprovodljivosti kod *Legionella*-pozitivnih i negativnih uzoraka. Mann Whitney testom utvrđeno je da je elektroprovodljivost značajno niža kod uzoraka u kojima je dokazana legionela (Z=3,78, p=0,0001).



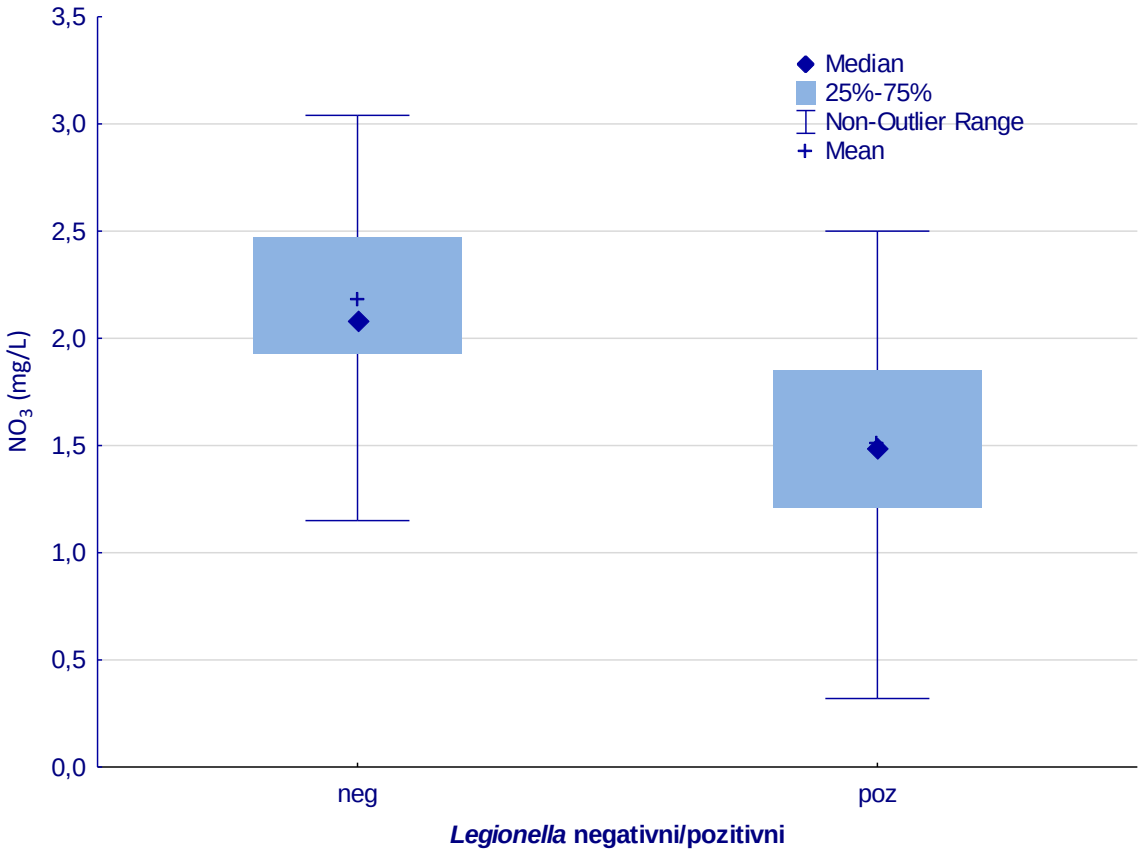
Slika 16. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) elektroprovodljivosti u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

Vrijednosti klorida kod *Legionella*-pozitivnih i negativnih uzoraka prikazane su na Slici 17. Mann Whitney testom utvrđeno je da je koncentracija klorida značajno niža kod uzoraka u kojima je dokazana legionela (Z=2,17, p<0,0001).



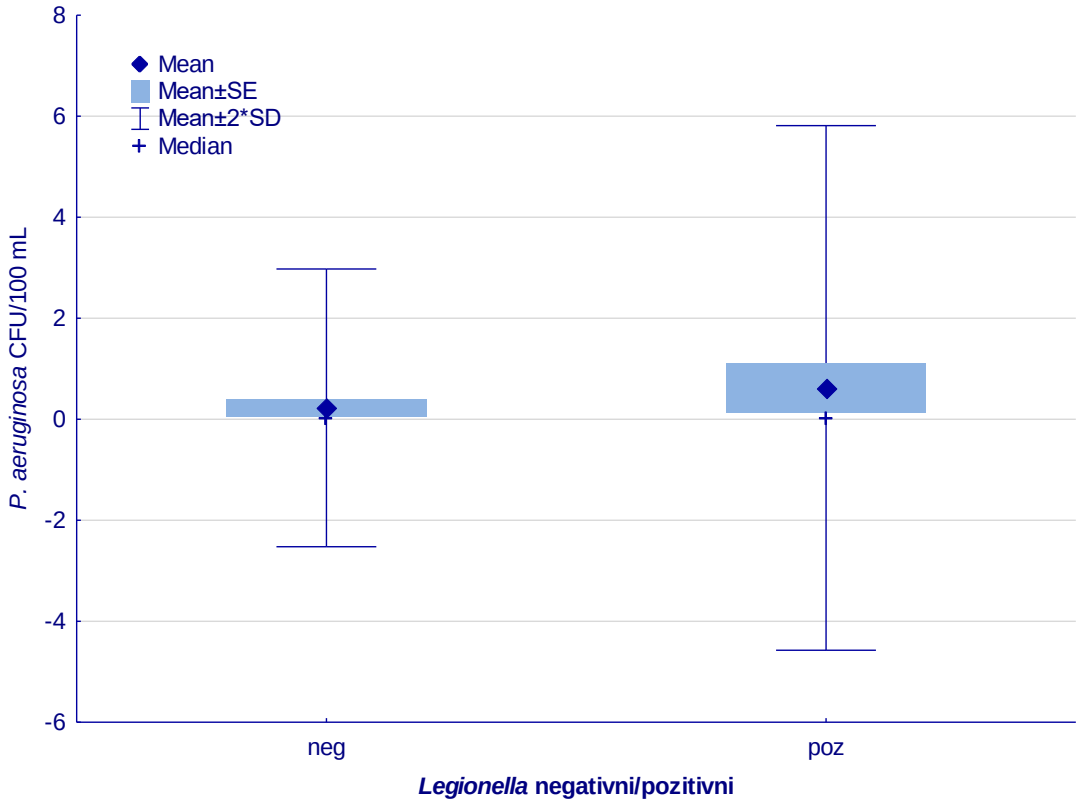
Slika 17 Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) klorida u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

Na Slici 18. prikazane su vrijednosti nitrata kod *Legionella*-pozitivnih i negativnih uzoraka. Mann Whitney testom utvrđeno je da je koncentracija nitrata značajno niža kod uzoraka u kojima je dokazana legionela (Z=3,90, p=0,0001).



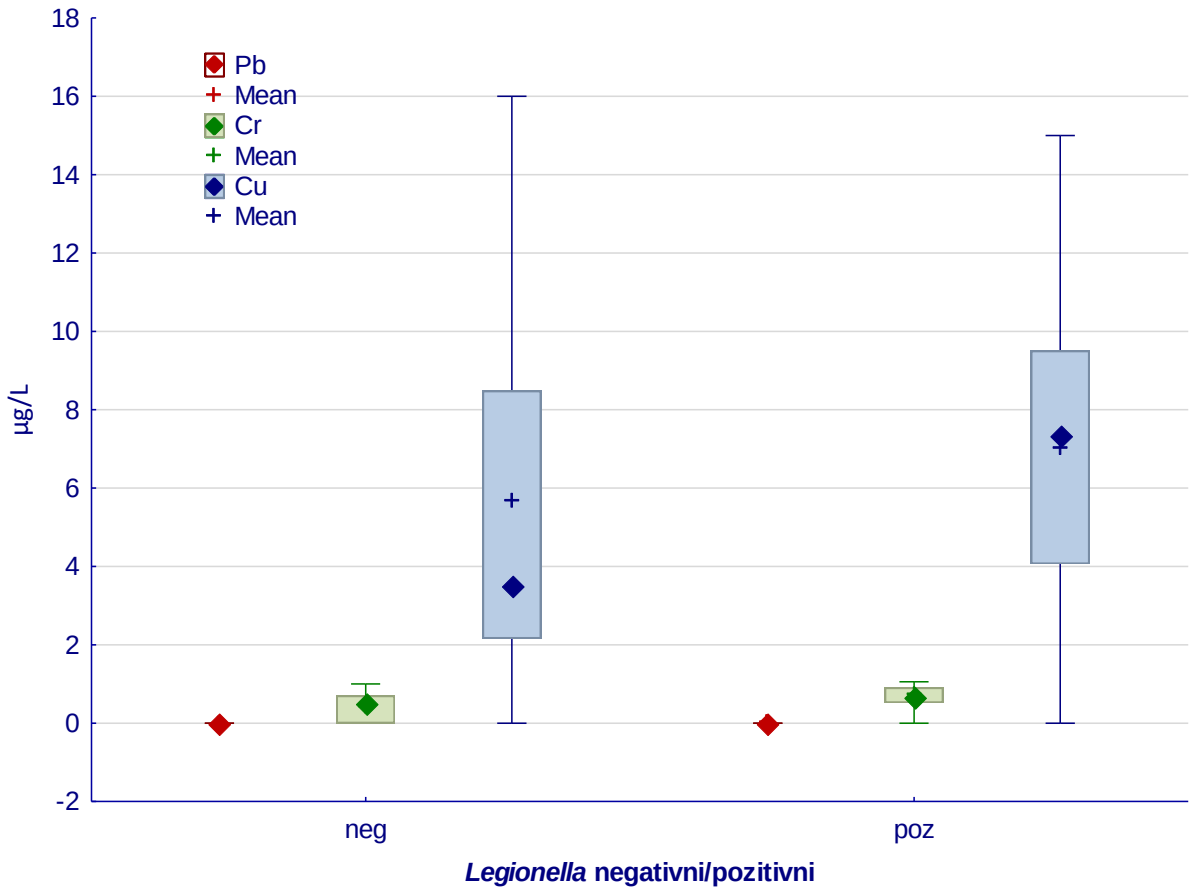
Slika 18. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) nitrata u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

Slika 19. prikazuje broj *P. aeruginosa* u 100 mL kod *Legionella*-pozitivnih i negativnih uzoraka. Mann Whitney testom utvrđeno je da je broj *P. aeruginosa* značajno viši kod uzoraka u kojima je dokazana legionela (Z=-2,49, p=0,00128).



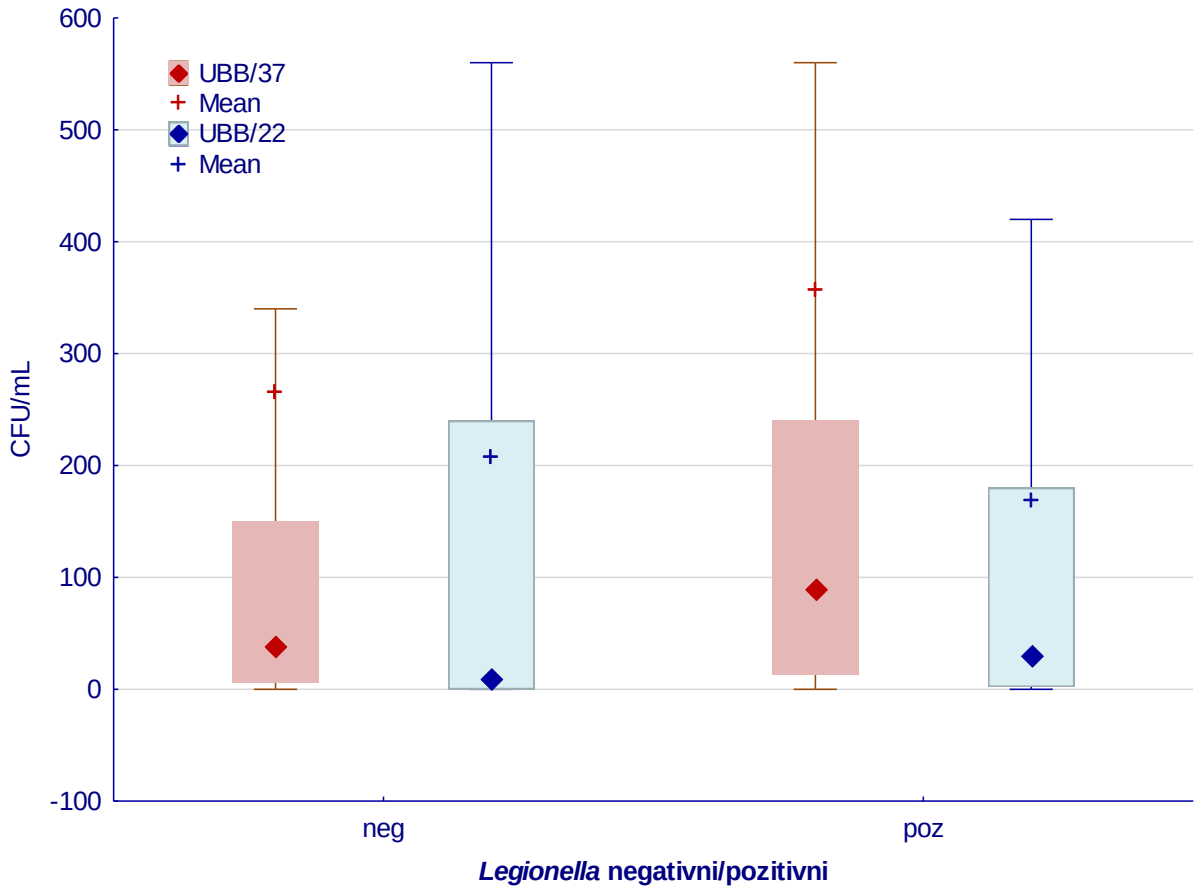
Slika 19. Srednja vrijednost (♦) i medijan (+) broja *P. aeruginosa* u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom srednje vrijednosti ± SE (□) i srednje vrijednosti ± 2SD bez ekstrema (┬).

Na Slici 20. prikazane su koncentracije metala olova, kroma i bakra kod *Legionella*-pozitivnih i negativnih uzoraka. Mann Whitney testom utvrđena je značajno viša koncentracija olova (Z=-2,18, p=0,0291), kroma (Z=-2,30, p=0,0214) i bakra (Z=-2,03, p=0,0426) kod uzoraka u kojima je dokazana legionela.



Slika 20. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) olova (crveno), kroma (zeleno) i bakra (plavo) u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

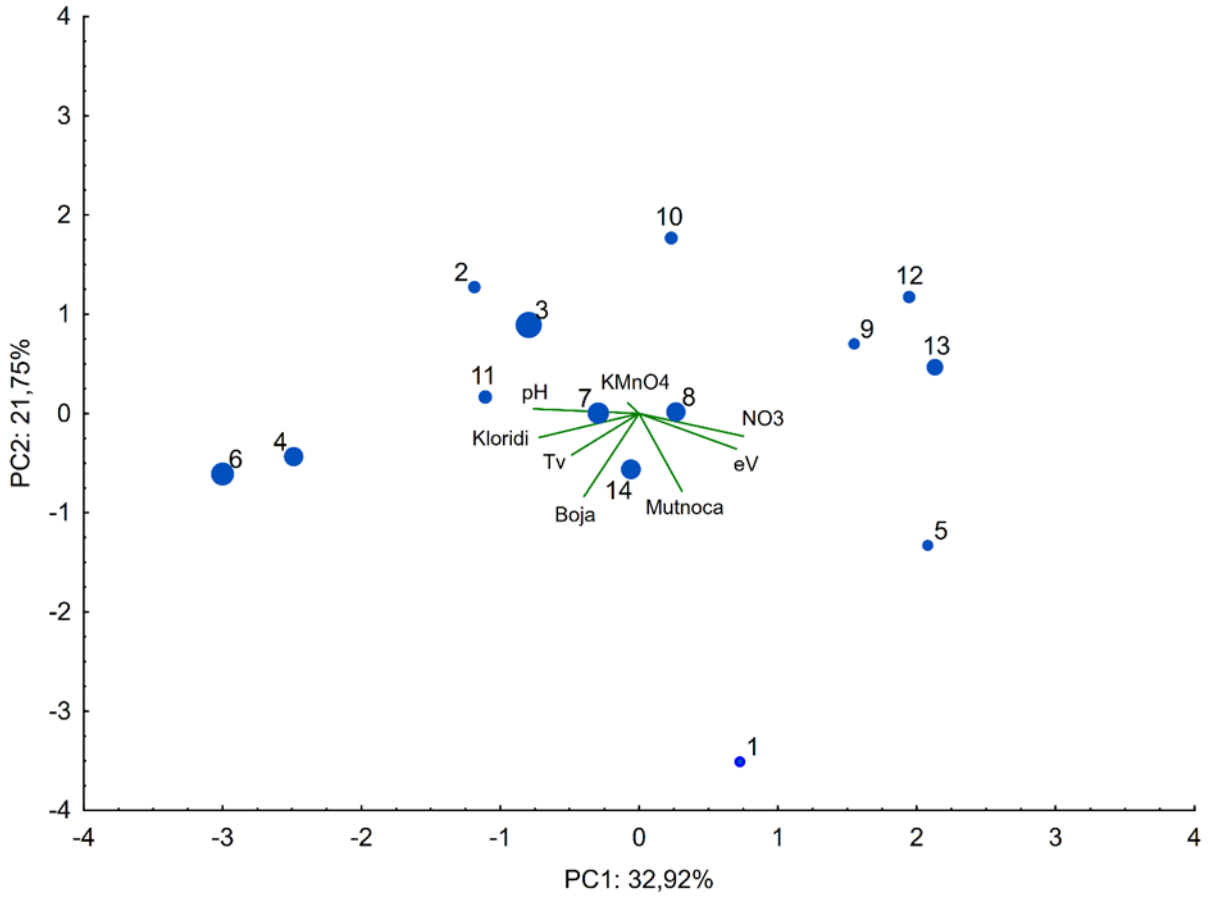
U *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima UBB/37 i UBB/22, iako su za oba ova pokazatelja više vrijednosti utvrđene u uzorcima u kojima je legionela dokazana (Slika 21.). Uspoređujući vrijednosti UBB/37 i UBB/22, utvrđene su značajno veće vrijednosti za broj kolonija pri inkubaciji na 37 °C u odnosu na 22 °C (Z=-2,00, p=0,0460)



Slika 21. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) UBB/37 (crveno) i UBB/22 (plavo) u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬).

4.9 PCA analiza: odnos fizikalno-kemijskih parametara i prisutnosti *Legionella*

Prikaz na slici 22. temelji se na analizi glavnih komponenti (PCA), kojom su brodovi grupirani prema osnovnim kemijskim pokazateljima uzoraka iz sustava distribucije vode, uz prikaz logaritamskih koncentracija *Legionella* spp.

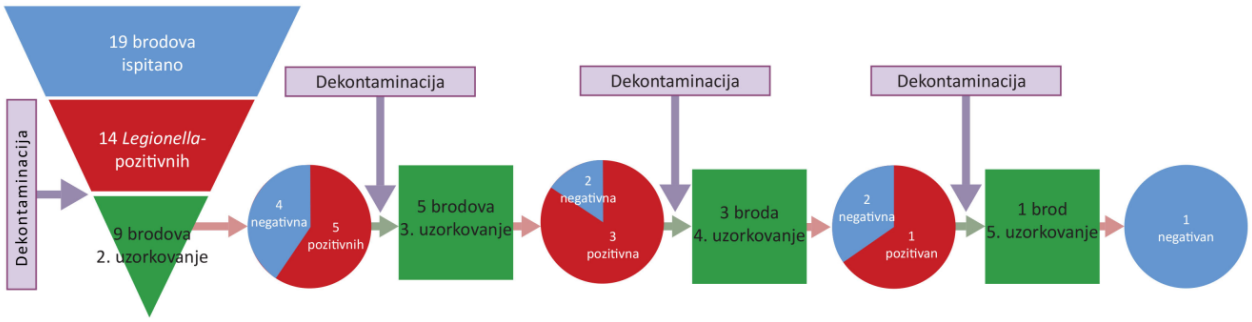


Slika 22. PCA raspodjela brodova na bazi osnovnih kemijskih pokazatelja uzoraka iz sustava distribucije vode. Prikazane su prve dvije komponente (PC1 i PC2) s vektorima za 8 osnovnih kemijskih pokazatelja i supraponiranim vrijednostima logaritma koncentracije *Legionella* spp.

Prve dvije komponente opisuju preko 53 % ukupne varijabilnosti. Prva komponenta (PC1), koja opisuje 32,92 % ukupne varijabilnosti, podjednako korelira s elektrovodljivosti i nitratima a manje s mutnoćom u pozitivnom smjeru. PC1 korelira u negativnom smjeru najviše s temperaturom vode, kloridima i pH te manje bojom vode i organskom tvari ($KMnO_4$). Druga komponenta (PC2), koja opisuje 21,75 % ukupne varijabilnosti, u pozitivnom smjeru korelira s pH vode i organskom tvari, a u negativnom s ostalim kemijskim pokazateljima, najviše s bojom i mutnoćom. Prema prve dvije komponente u ovoj PCA brodovi su se grupirali u četiri grupe. Supraponirane logaritamske vrijednosti koncentracija legionele ukazuju da raspodjela prema odabranim kemijskim pokazateljima nije jasno grupirala brodove ovisno o koncentracijama legionele.

4.10 Učinak poduzetih mjera na brodu

Istraživanje prisutnosti legionela provedeno je u sustavu distribucije vode na ukupno 19 brodova. Na 14 brodova (74 %) zabilježeno je prisustvo ove bakterije, dok je na pet brodova (26 %) došlo do ponavljane kontaminacije: na dva broda jednom, na dva broda dvaput, a na jednom brodu čak četiri puta. Nakon implementacije mjera, na svih pet brodova s ponavljanom kontaminacijom zabilježen je značajan pad razine legionela, što je prikazano na Slici 23.



Slika 23. Provedba mjera dekontaminacije na 14 brodova na kojima je utvrđena prisutnost legionela

Na pet brodova gdje se kontaminacija legionelom ponavljala, najviše koncentracije zabilježene su na brodu na kojem je tek nakon petog uzorkovanja postignut negativan rezultat. Na tom brodu uzeto je 7 uzoraka, s medijanom koncentracije legionela od 200,0 CFU/1000 mL, IQR 0,0 – 600,0 CFU/1000 mL, SV 1008,6 ± 2210,7 CFU/1000 mL, te rasponom vrijednosti od 0,0 do 6000 CFU/1000 mL.

Na drugom brodu, gdje je uzeto 13 uzoraka, a kontaminacija se ponovila tri puta, također su zabilježene visoke vrijednosti: medijan koncentracije iznosio je 100,0 CFU/1000 mL, IQR 0,0 – 600,0 CFU/1000 mL, SV 1100,0 ± 2462,2 CFU/1000 mL, s rasponom od 0,0 do 8800 CFU/1000 mL.

4.11 Pojavnost *Legionella* prema plovnim područjima

Slika 24. prikazuje srednje vrijednosti i medijane prisutnosti legionela prema plovnim područjima obuhvaćenim uzorkovanjem (Rijeka, Zadar, Split i Šibenik).

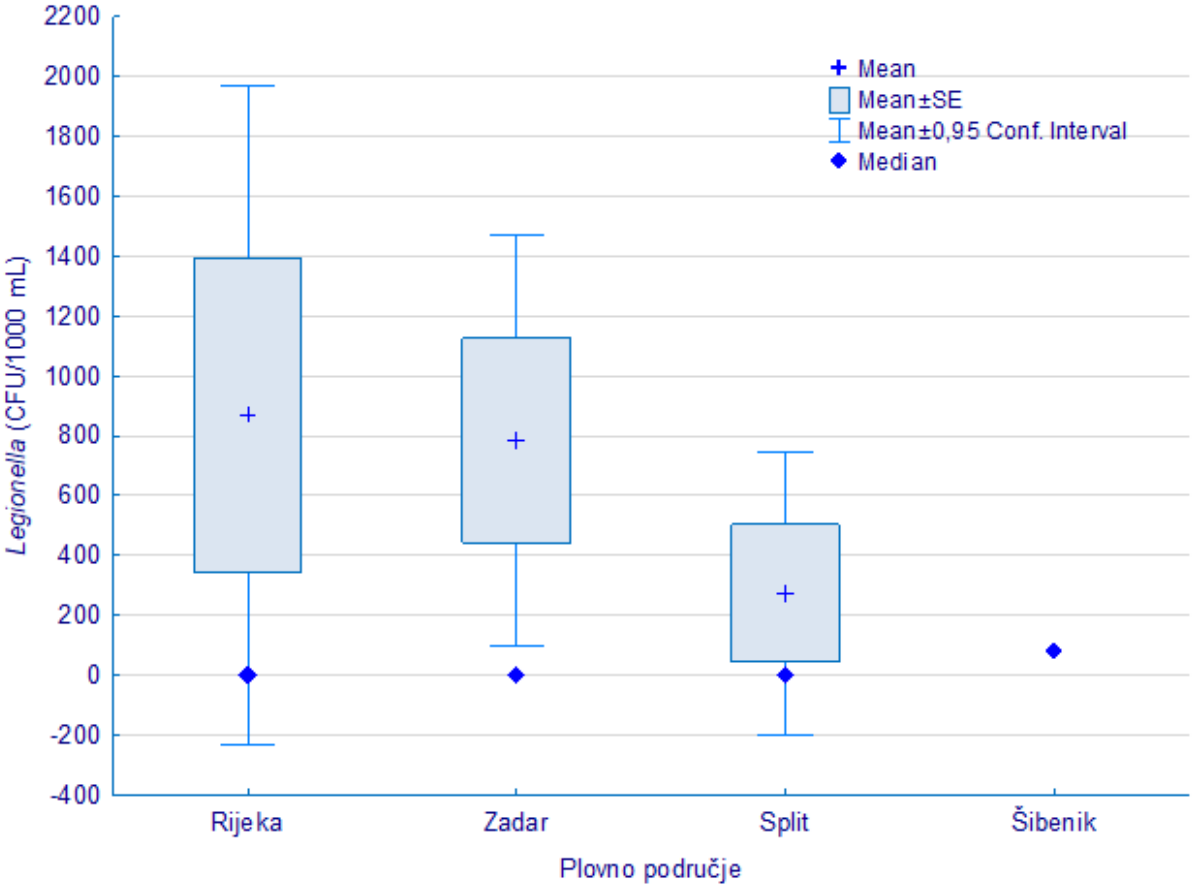
U plovnom području Rijeke uzeto je 17 uzoraka koji su pokazali najvišu razinu kontaminacije legionelom u usporedbi s drugim plovnim područjima. Zabilježena je SV

legionela od 920±2276,4 CFU/1000 mL, medijan je iznosio 0,00 CFU/1000 mL., IQRbio je od 0,0 do 300,0 CFU/1000 mL, a raspon vrijednosti od 0,0 do 7600 CFU/1000 mL.

Na plovnom području Zadra uzet je najveći broj uzoraka, ukupno 55. Srednja vrijednost legionela iznosila je 786,2 ± 2534,3 CFU/1000 mL, dok je medijan bio 0,0 CFU/1000 mL, IQR kretao se od 0,0 do 100,0 CFU/1000 mL, a ukupni raspon vrijednosti bio je od 0,0 do 11.800,0 CFU/1000 mL.

Na plovnom području Splita uzeto je 26 uzoraka vode, koji su ispitani na prisutnost legionela. Srednja vrijednost broja legionela bila je 273,5±1174,8 CFU/1000 mL, dok je medijan iznosio 0,0 CFU/1000 mL (IQR 0,0 - 0,0 CFU/1000 mL), a raspon vrijednosti bio je od 0,0 do 6000,0 CFU/1000 mL.

Na šibenskom plovnom području uzet je jedan uzorak vode, u kojem je utvrđena prisutnost legionela u koncentraciji od 80 CFU/1000 mL.



Slika 24. Srednja vrijednost (+) i medijan (♦) *Legionella* u uzorcima vode s brodova prema plovnim područjima, s prikazom srednje vrijednosti±SE (□) i srednje vrijednosti ± Interval pouzdanosti bez ekstrema (┬).

5. RASPRAVA

Legionella spp. predstavlja važan javnozdravstveni izazov zbog svoje sposobnosti kolonizacije umjetno stvorenih vodenih sustava i uzrokovanja legionarske bolesti (LB), teške atipične upale pluća koja može rezultirati ozbiljnim komplikacijama, pa čak i smrtnim ishodom. Prvi slučaj LB zabilježen je 1976. godine, a od tada su istraživanja značajno unaprijedila razumijevanje ekologije, epidemiologije i patogenih mehanizama ove bakterije. Najčešći uzročnik bolesti je *Lp* SG1, dok su serogrupe 2–14, kao i druge vrste poput *L. micdadei*, također epidemiološki relevantne [93-96].

Legionele prirodno nastanjuju slatkovodne ekosustave, ali često koloniziraju umjetno stvorene vodene sustave s toplom vodom, poput rashladnih tornjeva, sustava tople vode i brodskih sustava za distribuciju vode. Njihovo preživljavanje u biofilmovima [193, 209] i unutar ameba [347] čini ih otpornima na dezinfekcijska sredstva poput klora, osobito u uvjetima stagnacije vode ili nepravilnog održavanja. Prijenos infekcije kod ljudi gotovo isključivo se događa inhalacijom aerosola kontaminirane vode, a rizik je veći kod osoba starije dobi, kroničnih bolesnika, pušača i imunokompromitiranih. Infektivna doza legionela varira, pri čemu se koncentracije između 10^3 i 10^5 CFU/L najčešće povezuju sa sporadičnim slučajevima, dok koncentracije iznad 10^5 CFU/L predstavljaju značajan rizik za izbijanje epidemija legionarske bolesti [62].

Povećanje broja prijavljenih slučajeva LB posljedica je poboljšane dijagnostike, unaprijeđenog sustava prijavljivanja [294-297], ali promjena u okolišnim uvjetima kao što su globalno zatopljenje i povećanje prosječnih temperatura vode, koje stvaraju povoljne uvjete za rast i razmnožavanje *Legionella* [348-350]. Održavanje optimalnih uvjeta u vodenim sustavima, uz stalno praćenje najvažnijih fizikalno-kemijskih parametara poput temperature, slobodnog rezidualnog klora i prisutnosti biofilma, ostaje glavni alat u borbi protiv širenja legionela. Brojna istraživanja provedena u Europi i Hrvatskoj potvrđuju da su zdravstvene ustanove, sustavi za distribuciju tople vode i plovne jedinice najkritičniji izvori kontaminacije legionelama [2, 180, 293, 351]. Usvajanje nacionalnih propisa o procjeni rizika i redovitom provođenju mjera kontrole identificirano je kao ključni korak u sprječavanju širenja legionela i smanjenju zdravstvenih rizika.

Oko 90 % slučajeva legionarske bolesti uzrokuje *Lp* SG1, dok SG 2-14, iako izolirane iz više od 50 % antropogenih vodenih sustava [17, 352, 353], uzrokuju samo

15 do 20 % slučajeva pneumonije stečene u zajednici. Različiti bakterijski sojevi pokazali su razlike u svojstvima poput adhezije, penetracije i reprodukcije u preferiranom tipu domaćina [354], a distribucija serogrupa *L. pneumophila* može značajno varirati ovisno o vrsti objekta.

U ovom istraživanju analizirana je prisutnost *Legionella* spp. u uzorcima vode kako bi se utvrdila koncentracija bakterija, zastupljenost serogrupe i trendovi tijekom promatranog razdoblja. Rezultati pokazuju da je 29 % uzoraka bilo pozitivno na *Legionella* spp., pri čemu je srednja vrijednost koncentracije u pozitivnim uzorcima iznosila 1867,9 ± 3128,1 CFU/1000 mL. Broj legionela varirao je u širokom rasponu, od 50,0 do 11.800,0 CFU/1000 mL, što ukazuje na izrazitu varijabilnost u koncentracijama unutar analiziranih uzoraka. Analiza serogrupe otkrila je da je 74 % pozitivnih uzoraka pripadalo SG 2-14, unutar kojih je serogrupa 7 bila dominantna. Serogrupa 1 bila je prisutna u 23 % uzoraka, dok je 1 % izolata identificiran kao *Legionella* spp. Opterećenje legionelama bilo je značajno veće u uzorcima u kojima je potvrđena prisutnost *Lp* serogrupe 2–14, u odnosu na uzorke s potvrđenim izolatima SG1.

Ovi rezultati potvrđuju slične nalaze istraživanja provedenog u Rimu, Italija, u razdoblju 2014. – 2017. [355], a mogli bi ukazivati na specifičnu otpornost ili prilagodbu *Lp* SG 2-14 uvjetima u sustavima vode. Također, naši rezultati podudaraju se s istraživanjem u Francuskoj (2001.–2002.) koje je zabilježilo prisutnost *Lp* SG1 u 28,2% uzoraka iz okoliša [356]. Značajno je da je *Lp* SG3 također bila česta (10,8%), dok je 13,8 % izolata pripadalo non-*L. pneumophila* vrstama, poput *L. anisa*.

Istraživanje provedeno u Južnoj Koreji 2008. godine [184] otkrilo je prisutnost različitih vrsta bakterija *Legionella* u javnim objektima, pri čemu je *Lp* bila najčešća (85,5 % *Legionella*-pozitivnih izolata). Analiza serogrupa unutar vrste *Lp* pokazala je da je SG1 bila dominantna (54,7 % *Lp*-pozitivnih izolata), slijedile su je serogrupe 5, 6 i 7. *L. anisa* i *L. bozemanii* prevladavale su među non-*L. pneumophila* vrstama, čija je zastupljenost varirala ovisno o tipu objekta.

Suprotno tome, istraživanje koje su proveli Sikora i sur. [351] u 26 poljskih bolnica i javnih zgrada tijekom razdoblja 2007.–2010. pokazalo je isključivu prisutnost *Lp* serogrupa 2–14, što dodatno naglašava njihovu široku rasprostranjenost u okolišnim vodenim sustavima, unatoč manjoj povezanosti s kliničkim slučajevima.

Tijekom promatranog razdoblja od 2019. do 2022. godine, najveći broj pozitivnih uzoraka zabilježen je 2020. godine, kada je 61,1 % uzoraka bilo pozitivno. Ovaj

podatak dodatno naglašava važnost održavanja vodenih sustava, jer povećanje broja pozitivnih uzoraka može biti posljedica smanjene potrošnje vode i stagnacije tijekom pandemije bolesti COVID-19, što je stvorilo povoljne uvjete za rast legionela. Navedeno potvrđuje kako neodržavani sustavi distribucije mogu poslužiti kao ključna mjesta za kolonizaciju, osobito u uvjetima smanjene cirkulacije vode.

Istraživanje Glažar Ivče i sur. [357], provedeno u Primorsko-goranskoj županiji tijekom sedmogodišnjeg razdoblja, potvrđuje porast pozitivnih uzoraka vode na *Legionella* spp. i podržava tvrdnju o povećanju broja testiranih i pozitivnih uzoraka, kao i prijavljenih slučajeva legioneloze u Hrvatskoj [358]. Istraživanje je podijeljeno u dva dijela: prvi dio obuhvaća razdoblje 2013.–2018. (kada je uzorkovanje provedeno samo u slučaju sumnje ili izbijanja legionarske bolesti), dok drugi dio obuhvaća 2019. godinu, kada je po prvi put uveden proaktivan pristup kontroli legionela, a uzorkovanje se provodilo bez zabilježenih slučajeva bolesti. Glavni cilj ovog istraživanja bio je procijeniti opravdanost provedbe obveznog programa nadzora legionela u okolišu.

Rezultati istraživanja [357] pokazuju sličnu raširenost *Legionella* u vodovodnim sustavima za distribuciju tople i hladne vode, što ukazuje na mogućnost kolonizacije *Legionella* spp. u neprikladno održavanim sustavima opskrbe hladnom vodom. Najveći rizik i najveći udio pozitivnih uzoraka dolazi iz sustava distribucije vode zdravstvenih ustanova te ustanova za skrb i njegu starijih osoba, koje su također bile najviše mikrobiološki opterećene. Četiri petine izolata uzoraka iz okoliša identificirane su kao *Lp* SG 2-14, što sugerira mogućnost nedovoljno dijagnosticiranih slučajeva bolesti zbog ograničenja u primjeni dijagnostičkih testova. Konačno, udio uzoraka pozitivnih na *Legionella* bio je sličan u razdoblju prije (nakon prijavljenih slučajeva LB) i nakon primjene programa prevencije (bez utvrđenih slučajeva bolesti).

Ovim istraživanjem [357] zaključeno je da je proaktivan pristup kontroli *Legionella* u okolišu opravdan te da postoji potreba za provedbom obveznog programa prevencije, posebno za visokorizične ustanove i prioritetne objekte, poput bolnica, domova za starije, sportskih dvorana, teretana, sezonskih hotela, kampova i odgojno-obrazovnih institucija. Također, istaknuta je potreba za definiranjem nacionalnih kriterija koji će poslužiti kao temelj za interpretaciju rezultata, te za utvrđivanje daljnjeg tijeka djelovanja, pravodobnu dijagnostiku i liječenje LB. Na nacionalnoj razini uvodi se obavezan proaktivan pristup procjeni i upravljanju rizicima donošenjem Zakona o vodi za ljudsku potrošnju iz 2023. godine [319], zajedno s pratećim podzakonskim aktima.

Informacije o podrijetlu infekcije pokazale su se iznimno važnima za uspostavljanje učinkovitih preventivnih mjera kontrole *Legionella* [357].

Analiza sezonalnosti i utjecaja temperature na prisutnost *Legionella* u vodenim uzorcima pokazala je povezanost s vremenskim razdobljima i klimatskim uvjetima. Najveći broj pozitivnih uzoraka zabilježen je u rujnu (63,3 %), dok je najmanji broj detektiran u studenom (16,7 %). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Glažar Ivče i sur. [357], kao i s ECDC izvješćem iz 2023. godine [85] u kojem je navedeno da je tri četvrtine TALD slučajeva oboljelo između srpnja i listopada. Navedeni podaci ukazuju na izraženu sezonalnost pojave legionela, koja je vjerojatno povezana s promjenama temperature okoliša i vode, stvarajući povoljne uvjete za njihov rast i širenje.

Utjecaj temperature na pojavu *Legionella* u vodoopskrbnim sustavima dobro je istražen [182, 359] i potvrđuje povezanost između temperaturnih uvjeta i povećanog rizika od kontaminacije. Studije pokazuju da su *Legionella*-pozitivni uzorci češće detektirani u sustavima hladne vode kada je temperatura viša od 20 ºC, te u sustavima tople vode gdje temperatura ne prelazi 55 ºC [360]. Ovi uvjeti temperature identificirani su kao najznačajniji čimbenici koji pogoduju rastu *Legionella* [182, 357]. Iako su temperature od 20 °C do 50 °C pogodne za rast, temperaturni raspon od 35 °C do 45 °C smatra se optimalnim [180].

U ovom istraživanju analiza utjecaja temperature vode pokazala je da su uzorci s temperaturom ≥20 °C imali značajno višu koncentraciju legionela u usporedbi s uzorcima u kojima je temperatura bila ispod 20 °C. Posebno je izražena razlika za SG 2-14, gdje je medijan koncentracije legionela dosegao 600 CFU/1000 mL kod temperatura ≥20 °C. U istraživanju Glažar Ivče i sur. [115] u *Legionella*-pozitivnim uzorcima, temperatura hladne vode bila je statistički značajno viša ($z=3,89$, $p<0,001$), dok je temperatura tople vode bila značajno niža ($z=-6,79$, $p<0,001$) u usporedbi s uzorcima negativnim na *Legionella*. Medijan temperature hladne vode u uzorcima pozitivnim na *Legionella* bio je samo 0,1 °C viši nego u negativnim uzorcima (20,0 °C naspram 19,9 °C), dok je u uzorcima tople vode pozitivnim na *Legionella* medijan bio niži za čak 9 °C (42,3 °C naspram 51,3 °C).

Koncentracija slobodnog rezidualnog klora (SRK), iako niža u *Legionella*-pozitivnim uzorcima, nije pokazala statistički značajnu razliku u usporedbi s negativnim uzorcima. Ovi rezultati ukazuju na to da SRK ima određenu ulogu u inhibiciji rasta legionela, ali njegova učinkovitost može biti ograničena u uvjetima koji pogoduju njihovom razvoju, poput prisutnosti biofilmova ili povećanog organskog opterećenja.

Ovo naglašava potrebu za primjenom kombiniranih metoda dezinfekcije kako bi se postigla učinkovitija kontrola. Učinkovitost različitih metoda tretmana vode ispitivali su Marchesi i sur. u bolničkim sustavima tople vode u Italiji [361]. Rezultati pokazuju da klor dioksid (ClO_2), pri optimalnim koncentracijama, može održavati razine legionela ispod granice detekcije, čime se pokazao kao jedno od najučinkovitijih rješenja. Zhang i sur. [362] istaknuli su da ClO_2 ne samo da uspješno kontrolira legionelu već također smanjuje broj ukupnog broja bakterija, čime se dodatno smanjuje rizik od kolonizacije. S druge strane, filtar na mjestu korištenja i termička dezinfekcija pokazali su djelotvornost u specifičnim uvjetima, no njihova široka primjena ograničena je visokim troškovima i operativnim zahtjevima, posebno u dugoročnom održavanju sustava. Ovi nalazi naglašavaju važnost integriranog pristupa u dezinfekciji, gdje se kombinacijom kemijskih tretmana i fizikalnih metoda može značajno smanjiti rizik od kolonizacije *Legionella.*

Dodatno, u *Legionella*-pozitivnim uzorcima uočene su statistički značajne razlike u odnosu na negativne uzorke za nekoliko fizikalno-kemijskih parametara i dodatnih mikrobioloških pokazatelja. Boja vode i prisutnost *P. aeruginosa* bile su značajno više u pozitivnim uzorcima, što upućuje na moguću povezanost između povećanog organskog opterećenja i stvaranja uvjeta pogodnih za rast bakterija. *P. aeruginosa* je poznata po stvaranju biofilmova, koji pružaju zaštitno okruženje i olakšavaju kolonizaciju legionela unutar vodenih sustava. Međutim, istraživanja Paranjape i sur. [363] te Core i sur. [364] pokazala su da neki izolati *P. aeruginosa* imaju anti-*Legionella* djelovanje. Njihovi rezultati ukazuju na snažnu negativnu korelaciju između prisutnosti pseudomonasa i legionela, sugerirajući da određeni sojevi *P. aeruginosa* mogu djelovati kao prirodni antagonisti, smanjujući brojnost *Legionella* u okolišnim sustavima.

S druge strane, elektroprovodljivost, kloridi i nitrati bili su značajno niži u *Legionella*-pozitivnim uzorcima. Niže vrijednosti ovih parametara mogu ukazivati na na potrošnju ovih spojeva unutar biofilma, što dovodi do slabljenja učinkovitosti dezinfekcije i omogućava bakterijama povoljne uvjete za rast. Biofilm djeluje kao zaštitna barijera za *Legionella* i mijenja kemijski sastav vode lokalno [365-367], što se može očitovati u smanjenim vrijednostima navedenih parametara.

Posebno su se istaknule koncentracije metala poput olova, kroma i bakra, koje su u *Legionella*-pozitivnim uzorcima bile znatno više. Prisutnost metala može biti posljedica korozije cijevi ili oslobađanja iz materijala od kojih su izgrađeni dijelovi

sustava distribucije vode. Korozija, uzrokovana promjenama temperature ili pH vrijednosti, često dovodi do povećanja koncentracija metala u vodi, koji mogu poslužiti kao nutrijenti za bakterije ili stvoriti uvjete pogodne za stvaranje biofilmova.

Mikrobiološka korozija odnosi se na degradaciju materijala uzrokovanu različitim mikroorganizmima koji koloniziraju unutarnje površine zidova cijevi. Ti mikroorganizmi proizvode ekstracelularne polisaharide, proteine, nukleinske kiseline i molekule za „quorum-sensing“ (hrv. sustav međustanične komunikacije), stvarajući složene uvjete za preživljavanje. Nastali metabolički proizvodi izravno ili neizravno oštećuju zidove cijevi distribucijskih sustava. Elektrokemijska korozija dodatno pogoršava mikrobiološku koroziju, što rezultira pucanjem cijevi i gubitkom vode. Iz korodiranih naslaga kontinuirano se oslobađaju ioni metala, uključujući ione željeza(II) (fero), željeza(III) (feri), bakra(II), cinka, kroma, olova, vanadija i kadmija [368]. Ovi metali stvaraju povoljno okruženje za razvoj biofilmova, koji pružaju zaštitu bakterijama poput *P. aeruginosa*, *Mycobacterium* i *Legionella*. Korozijom oslobođeni metali također smanjuju kompetitivnost drugih mikroorganizama zbog svojih toksičnih učinaka, čime dodatno potiču kolonizaciju legionela. Bakar i krom su esencijalni mikroelementi, no njihova toksičnost ovisi o dozi. Dok u fiziološkim dozama djeluju kao kofaktori enzima i sudjeluju u metaboličkim procesima, u visokim koncentracijama mogu ometati te iste procese i izazvati oksidativni stres. Konzumacija vode za piće s povišenim koncentracijama bakra povezana je s gastrointestinalnim tegobama, uključujući mučninu, povraćanje, proljev i bolove u trbuhu, koji su često opisani kao simptomi toksičnih učinaka akutne izloženosti bakru [369]. Studija provedena u Grčkoj [370], u kojoj su koncentracije kroma u pitkoj vodi iznosile od 8,3 do 51 µg/L, pokazala je značajno povećanje smrtnosti od primarnog raka jetre, pluća, bubrega i drugih genitourinarnih organa kod žena. U sustavima opskrbe pitkom vodom, oslobađanje olova predstavlja značajan zdravstveni rizik zbog njegove toksičnosti i mogućnosti bioakumulacije. Uz rizik od legionela, ovaj problem je prepoznat kao jedan od ključnih čimbenika u procjeni rizika kućnih vodovodnih sustava, budući da predstavlja ozbiljnu prijetnju zdravlju ljudi [318]. Olovo se u vodi za piće obično pojavljuje zbog korozije kućnih vodovodnih sustava koji sadrže olovne cijevi, spojeve, elemente ili premaze. Količina olova koja se otapa iz sustava ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući pH vrijednost, temperaturu, alkalitet, prisutnost naslaga unutar cijevi i vrijeme zadržavanja vode [371]. Najveća topljivost olova javlja se u mekoj i kiseloj vodi.

U sustavima za distribuciju voda, utjecaj bakrenih cijevi na legionele može biti različit, vjerojatno zbog razlika u mikrobioti biofilma i fiziološkog statusa stanica. Nekoliko laboratorijskih studija navodi da bakar inhibira rast *Lp* npr. Learbuch i sur. 2019. godine [372]; Rogers i sur., 1994. godine [373]; Schoenen i sur., 1988. godine [374]. Osim toga, zgrade s bakrenim cijevima u sustavu za distribuciju vode u Danskoj imale su manji broj *Legionella* u usporedbi s zgradama koje koriste željezne cijevi [375]. Nasuprot tome, neka istraživanja ukazuju na pojačani rast *Lp* na bakrenim cijevima u usporedbi s PVC-U ili PVC-C sustavima [376-378]. Naknadno istraživanje iste skupine autora [376] pokazalo je da su bakrene cijevi bile kolonizirane te je oslobođen veći broj *Lp* kada su inokulirane u *Acanthamoebae polyphaga*, što je potvrđeno qPCR-om. Međutim, *Lp* su se mogle uzgajati samo iz PVC-U cijevnog sustava. Postoji nekoliko mogućih objašnjenja za učinak bakrenih cijevi na *Legionella*. Istraživanje van der Kooija i suradnika [379] iz 2005. godine sugerira da novi, neiskorišteni bakar u početku inhibira rast *Lp* zbog oslobađanja bakrenih iona, ali kada bakar počne korodirati, oslobađanje iona se smanjuje, čime nestaje inhibicijski učinak. Također, treba uzeti u obzir međudjelovanje bakrenih cijevi s kemijskim sastavom voda.

Proctor i suradnici [287] su 2017. ukazali na prednosti bakrenih cijevi u smanjenju razine *Lp*, što je međutim ovisilo o temperaturi vode i bilo primjetno samo pri ili ispod 41 °C. Iznad 53 °C, *Lp* više nije bila prisutna, pa materijal cijevi nije igrao ključnu ulogu [287]. Buse i suradnici [380] su iste godine primijetili da viši pH vode (iznad 8,2) ograničava otapanje i antimikrobnu aktivnost bakrenih cijevi. Nakupljanje korozijskih nusprodukata s vremenom dodatno smanjuje antimikrobnu učinkovitost bakra protiv *Legionella* [379]. Osim što slobodni Cu^{2+} ioni imaju jača antimikrobna svojstva od čvrstog bakra, mogu izazvati i druge reakcije, poput korozije i proizvodnje vodika, što bi neizravno moglo utjecati na *Legionella* [287, 381].

Trogodišnje istraživanje Rakić i sur., provedeno u južnoj Hrvatskoj 2016. godine, otkrilo je prisutnost *Lp* u 32,6% ispitanih uzoraka vode, uglavnom iz slavina u hotelima i domovima za starije i nemoćne osobe. Pozitivni uzorci na *Lp* pokazali su više koncentracije Cu, Fe, Mg i Ca, te niže koncentracije Mn u usporedbi s negativnim uzorcima [382]. Istraživanje pokazalo je da cink i željezo pozitivno koreliraju s prisutnošću i koncentracijom *Legionella* spp., dok više koncentracije bakra inhibiraju nastanak biofilmova i prisutnost *Legionella.* Rezultati ukazuju da starost vodoopskrbnog sustava negativno utječe na mikrobiološke i fizikalno-kemijske

parametre kakvoće vode [183]. Izvješća također ukazuju na to da je rast *Lp* pojačan unutar biofilmova u kojima dominiraju α-proteobakterije [383].

Analiza glavnih komponenti (PCA) pružila je uvid u međuodnose fizikalno-kemijskih parametara u uzorcima vode i njihovu povezanost s prisutnošću *Legionella*. Prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2) objasnile su ukupno 53 % varijabilnosti podataka, što predstavlja zadovoljavajući udio za preliminarnu interpretaciju rezultata.

Prva glavna komponenta (PC1), koja objašnjava 32,92 % varijabilnosti, pokazala je pozitivnu korelaciju s elektroprovodljivošću i nitratima, dok je negativno korelirala s temperaturom, kloridima i pH vrijednosti. Ovi rezultati ukazuju na to da PC1 uglavnom opisuje kemijsku stabilnost vodenih sustava, gdje niska temperatura i pH, zajedno s nižim koncentracijama klorida, mogu biti povezani s uvjetima koji pospješuju kolonizaciju biofilmova i rast bakterija. Pozitivna korelacija s elektroprovodljivošću i nitratima sugerira da prisutnost topljivih iona može igrati ključnu ulogu u definiranju fizičko-kemijskih karakteristika vode i njihovog utjecaja na mikrobiološku dinamiku.

Druga glavna komponenta (PC2), koja objašnjava 21,75 % varijabilnosti, pokazuje pozitivnu korelaciju pH i koncentracije organske tvari ($KMnO_4$) s višim koncentracijama *Legionella*. S druge strane, boja vode i mutnoća negativno su korelirani s koncentracijom *Legionella*, što ukazuje na to da niže vrijednosti boje i mutnoće mogu stvoriti povoljnije uvjete za njihov rast. Ovi rezultati sugeriraju da PC2 odražava kompleksne kemijske i optičke uvjete u vodi, pri čemu prisutnost topljivih iona i organskih tvari podržava kolonizaciju bakterija, dok povišena mutnoća i boja mogu ograničiti njihov razvoj. Općenito, brojna istraživanja pokazala su da više vrijednosti pH, niže temperature i smanjen sadržaj klora znatno povećavaju sposobnost preživljavanja *L. pneumophila* [246, 359, 361, 384].

Raspodjela brodova na temelju PCA analize pokazala je formiranje četiri skupine prema fizikalno-kemijskim parametrima. Ove skupine odražavaju sličnosti između uzoraka u pogledu kemijskog sastava vode, ali koncentracija *Legionella* nije jasno pratila ovo grupiranje. Odsutnost jasne povezanosti između koncentracije legionela i specifičnih kemijskih parametara sugerira da prisutnost bakterija ovisi istovremenom djelovanju kompleksnog skupa čimbenika, poput formiranja biofilmova, dinamike protoka vode, stagnacije i interakcije s drugim mikroorganizmima.

Rezultati PCA analize ukazuju na to da se prisutnost *Legionella* ne može u potpunosti objasniti samo fizikalno-kemijskim parametrima vode. Iako su određeni pokazatelji, poput temperature, pH, organske tvari, važni za stvaranje povoljnih uvjeta,

njihova međusobna povezanost i složeni mehanizmi rasta bakterija zahtijevaju daljnja istraživanja. Poseban naglasak treba staviti na analizu biofilmova i uvjeta stagnacije vode, koji predstavljaju ključne čimbenike u kolonizaciji vodenih sustava [258-261].

Rezultati istraživanja pokazali su da je prisutnost *Legionella* potvrđena na 74 % brodova obuhvaćenih istraživanjem (14 od 19 analiziranih brodova), što ukazuje na široku rasprostranjenost ove bakterije u sustavima vodoopskrbe na plovilima. Nadalje, na 5 brodova (26 %) je zabilježena ponavljana kontaminacija, što sugerira prisutnost trajnih uvjeta pogodnih za rast i razmnožavanje legionela. U jednom slučaju, kontaminacija je potvrđena čak četiri puta, što upućuje na posebno izazovne uvjete održavanja i potencijalnu prisutnost biofilmova ili nedovoljnu učinkovitost primijenjenih mjera. Međutim, unatoč izazovima, učinkovitost provedenih mjera dekontaminacije dokazana je smanjenjem koncentracije legionela na svih pet brodova na kojima je kontaminacija ponavljano potvrđena. Ovi rezultati naglašavaju važnost pravovremene provedbe ciljanih mjera kontrole i održavanja sustava, što uključuje mehaničko čišćenje, kemijsku dezinfekciju i optimizaciju ključnih parametara vode kao što su temperatura i koncentracija dezinfekcijskih sredstava.

U epidemiji respiratornih bolesti sličnih gripi i dijareje iz 1987. godine na kruzeru koji je plovio između luka južne Europe i sjeverne Afrike, izvor bolesti također nije identificiran. Međutim, istraga je otkrila poteškoće s jedinicama za rukovanje zrakom [385]. Klimatizacijski sustavi na brodovima obično su suhi i nemaju isparavajuće hladnjake, ali ovlaživači koji se često ugrađuju na brodove mogu generirati aerosole, uključujući one iz jedinica za skladištenje hrane. U istraživanju iz 1996. godine, Temeshnikova i suradnici [386] identificirali su *Lp* SG1 u uzorcima iz klimatizacijske opreme i sustava ventilacije na brodovima.

Ülger i sur. [310] objavili su 2022. godine rezultate istraživanja u kojem je11,4 % ispitanih uzoraka vode iz vodovodnih sustava trajekata i teretnih brodova koji pristaju u međunarodnoj luci Mersin u Turskoj bilo pozitivno na *Legionella* rpoB gen. Sličan udio, 12 % *Lp*-pozitivnih uzoraka, zabilježen je u istraživanju iz 2013. godine Ahléna i sur., u kojem je analizirano 439 uzoraka vode iz sustava za distribuciju vode na 41 vojnom brodu obalnog područja Norveške. Na 20 plovila (48,8 %) potvrđena je prisutnost *Legionella*, dok je na njih 7 (17 %) izolirana *Lp* SG1.

Azar i suradnici proveli su 2004. godine istraživanje na dva kruzera i sedam trajekata usidrenih u lukama sjeverne Sardinije, pri čemu je *Legionella* dokazana na šest od sedam trajekata (86 %). Od ukupno 90 uzoraka, 38 (42 %) bilo je pozitivno na

Legionella, s koncentracijom ≥10 000 CFU/L u 77,8 % uzoraka [299]. U istraživanju Lagana i sur. [387] iz 2017. godine, *Legionella* je bila prisutna na deset trajekata i šest kruzera na Siciliji, Italija. Na trajektima je *Legionella* spp. izolirana iz 59 od 92 uzorka (64 %), od čega 21 (36 %) pripada SG1, a 30 (51 %) SG 2-14. Na kruzerima je potvrđena prisutnost *Legionella* u šest od 136 uzoraka (4 %), pri čemu je u četiri od šest uzoraka (67 %) izolirana SG1, a u dva (33 %) SG 2-14.

Istraživanje Goutziana i sur. iz 2008. godine [304] pokazalo je slične nalaze. U tom istraživanju ispitano je 33 spremnika za vodu na brodovima u Ateni, a rezultati su pokazali da je prisutnost *Legionella* spp. bila približno 40 % na kruzerima i trajektima. *Legionella* nije pronađena u vodenim sustavima 10 kruzera, dok je od 21 trajekta, 14 pokazalo pozitivne rezultate nakon analize 276 uzoraka tople i hladne vode, što je potaknulo provedbu sanacijskih mjera. Veća kontaminacija zabilježena je u sustavima tople vode na trajektima, pri čemu su pozitivni uzorci sadržavali 38 % *Legionella* spp., od čega je 34 % pripadalo *Lp* SG1, 15 % *Lp* SG 2-14, a 7 % uzoraka pozitivnih na *Lp* SG1 istodobno s drugim SG. U hladnoj vodi, pozitivni uzorci sadržavali su 18 % *Legionella* spp., 15 % *Lp*, 11 % *Lp* SG1,4 % *Lp* SG 2-14, te 2 % uzoraka pozitivnih na *Lp* SG1 zajedno s drugim SG. U sličnom istraživanju, koje su proveli Mouchtouri i sur. 2015. godine [388], *Legionella* je otkrivena u 81,1 % trajekata (23/28) i 48,9 % hotela (587/1.200), dok su svi pregledani brodovi za kružna putovanja (12/12) bili negativni na prisutnost bakterije.

Caylà JA i sur. [302] opisali su dva slučaja legioneloze s letalnim ishodom kod mehaničara teretnog broda na popravku. U lipnju 2001. godine prijavljeno je da su dva mehaničara, koja su radila na popravku teretnog broda u Barceloni, Španjolskoj, umrla od LB. Mehaničari su radili s pumpom brodskog vodovoda, a molekularno podudarni izolati *Lp* SG1, podskupine Pontiac (Knoxville), izolirani su kod jednog od pacijenata i iz ventila za distribuciju rashladne vode brodske pumpe. U drugom slučaju, Castellani Pastoris i sur. [301] istražili su izvor zaraze 67-godišnjeg putnika koji je obolio na kruzeru i preminuo 9 dana nakon povratka s broda. Koristeći kombinaciju molekularnih metoda i epidemiološkog istraživanja, utvrđeni su uzroci infekcije. Ovo predstavlja prvi dokumentirani dokaz uključenosti brodskog vodoopskrbnog sustava u prijenos infekcije s *Legionella* na brodovima. Ovi slučajevi ističu važnost međunarodnog sustava nadzora i suradnje među javnozdravstvenim organizacijama u praćenju i sprječavanju epidemija.

Beyrer i sur. [300] su 2007. godine istražili slučaj oboljenja osmero od 215 njemačkih putnika na krstarenju Nordijskim morem. U istraživanju je primijenjena tipizacija temeljena na DNK sekvencama kako bi se usporedili alelni profili kliničkih izolata s EWGLI *Legionella* SBT bazom podataka te s okolišnim izolatima, koristeći šest ciljnih gena: flaA, pilE, asd, mip, mompS i proA. Klinički i okolišni izolati genotipizirani su *Lp* SG1, podskupina monoklonskog antitijela (mAb) "Knoxville". Genotipizacija je ključna u molekularnoj epidemiologiji jer omogućuje povezivanje patogena iz okoliša s oboljelim osobama, što je važno za praćenje legionarske bolesti i identifikaciju izvora infekcije. Većina uzoraka vode s brodova u ovom istraživanju pripadala je ST 1317, dok je najčešći fenotip bio Chicago 8. Naša prethodna istraživanja na uzorcima vode iz različitih objekata, uključujući hotele, rashladne tornjeve, kampove, rehabilitacijske centre također je pripadala ST 1317 s fenotipom Chicago 8 i Oxford/Olda [179]. Istraživanje Collins i suradnika iz 2016. godine na teretnim brodovima Velike Britanije pokazalo je zastupljenost *Lp* SG1 u 46 % pozitivnih uzoraka s različitim ST (0, 1, 152, 187 i 579) [389].

Analiza pojavnosti *Legionella* prema plovnim područjima pokazala je različite razine kontaminacije između promatranih lokacija. Najviša razina kontaminacije zabilježena je u plovnom području Rijeke, gdje je srednja vrijednost koncentracije iznosila 920 CFU/1000 mL. Nakon Rijeke, niže razine kontaminacije utvrđene su u plovnim područjima Zadra, Splita i Šibenika, što ukazuje na regionalne razlike u uvjetima vodoopskrbe i održavanja sustava. Ovi podaci sugeriraju da određena plovna područja imaju specifične čimbenike koji mogu pogodovati rastu i kolonizaciji legionela, uključujući kvalitetu vode, temperaturu, učestalost održavanja i moguće prisustvo biofilmova unutar distribucijskih sustava.

Klimatske promjene, osobito visoka vlažnost zraka u riječkom području, mogu dodatno objasniti veće koncentracije legionela na toj lokaciji. Vlažan okoliš, u kombinaciji s regionalnim klimatskim uvjetima, može pogodovati razvoju bakterija u vodenim sustavima. Prema istraživanju Dupke i sur. [349], globalno zagrijavanje i ekstremni vremenski događaji povećavaju rizik od izloženosti kontaminiranoj vodi, dok Karagiannis i sur. [350] i Beauté i sur. [348] potvrđuju povezanost između toplog, vlažnog vremena i povećane pojavnosti legionarske bolesti, posebno u ljetnim mjesecima. Najveća incidencija zabilježena je pri temperaturama oko 17,5 °C, uz visoku relativnu vlažnost zraka i intenzivne oborine. Ovi uvjeti ne samo da potiču stvaranje biofilmova u sustavima za distribuciju vode, nego također omogućuju

preživljavanje i razmnožavanje bakterija unatoč dezinfekcijskim mjerama. Nadalje, kombinacija klimatskih čimbenika kao što su vlažnost, toplinski valovi, obilne kiše i stagnacija vode dodatno povećava rizik od aerosolizacije kontaminirane vode i inhalacije legionela, što je posebno izraženo u područjima s povoljnim klimatskim uvjetima poput Rijeke. Ovi obrasci potvrđuju složenost utjecaja klimatskih promjena na epidemiologiju legionarske bolesti, pri čemu kombinacija temperature, vlažnosti i oborina ima ključnu ulogu.

Legionella je sveprisutna bakterija koja predstavlja značajan javnozdravstveni izazov, posebno u sustavima za distribuciju vode na brodovima i trajektima gdje se voda dulje vrijeme zadržava u spremnicima, izložena promjenama okolišnih uvjeta. Ti specifični uvjeti, koji utječu na kolonizaciju distribucijskih sustava vodom, u literaturi nisu dovoljno istraženi, no rezultati ovog istraživanja doprinijeli su boljem razumijevanju povezanosti ključnih čimbenika i razvoja tehnički provedivih i ekonomičnih mjera kontrole te smanjenja rizika od legionarske bolesti (LB). Ovi zaključci korisni su za upravljanje legionelom u vodnim sustavima brodova i trajekata, pri čemu se ističe važnost izrade plana procjene rizika, uspostave sustava samokontrole te kontinuiranog nadzora u suradnji sa ZZJZ/HZJZ. Temperatura, koncentracija metala, uz dodatne fizikalno-kemijske parametare, pokazali se se ključnim čimbenicima za rast *Legionella*. Stoga je istaknuta važnost rutinskog ispitivanja koncentracije slobodnog rezidualnog klora (SRK) i prisutnosti *Legionella* i olova u vodi za ljudsku potrošnju, u cilju zaštite zdravlja korisnika. Provedene mjere dekontaminacije bile su učinkovite u smanjenju razine kontaminacije, no naglašena je važnost stalnog monitoringa i optimizacije kemijskih parametara kako bi se spriječila ponovna kolonizacija sustava. Za daljnja istraživanja preporučuje se uključivanje dinamičkih varijabli, poput protoka vode, stagnacije i učestalosti potrošnje, jer one imaju ključnu ulogu u stvaranju uvjeta pogodnih za rast legionela. Analiza glavnih komponenti (PCA) ukazuje na složenost međusobnih odnosa između parametara te potvrđuje potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se bolje razumjeli uvjeti koji pogoduju rastu *Legionella*.

Edukacija svih dionika ključna je za provedbu pravovremenih preventivnih i korektivnih mjera, dok procjena rizika omogućuje realnu procjenu stvarne izloženosti i poduzimanje odgovarajućih kontrolnih mjera za smanjenje troškova i rizika. Putnički brodovi trebaju implementirati plan procjene kućne vodoopskrbne mreže kako bi osigurali sustavno i pravovremeno reagiranje na procijenjene rizike te povećali razinu

zaštite korisnika. Multidisciplinarni pristup izradi plana procjene rizika i kontinuirana provedba preventivnih mjera podižu razinu zaštite od bolesti povezanih s vodom za ljudsku potrošnju na najvišu moguću razinu.

6. ZAKLJUČCI

- Ukupno 29 % uzoraka bilo je pozitivno na *Legionella*, s maksimalnom koncentracijom od 11.800 CFU/1000 mL i medijanom od 400 CFU/1000 mL.
- 74 % uzoraka pripadalo je serogrupama SG 2-14, dok je 23 % uzoraka pripadalo SG1. Serogrupa 7 bila je najzastupljenija unutar SG 2-14.
- Većina uzoraka (62,1 %) svrstana je u srednje opterećene kategorije (100–1000 CFU/1000 mL), dok je 27,6 % pripadalo kategoriji jače opterećenih uzoraka (>1000 CFU/1000 mL).
- Najviše pozitivnih uzoraka zabilježeno je u rujnu (63,3 %), uz najviši medijan i srednju vrijednost. Najmanje pozitivnih uzoraka (16,7 %) zabilježeno je u studenom.
- U 2020. godini zabilježen je najveći broj pozitivnih uzoraka (61,1 %), s najvišim medijanom i srednjom vrijednošću koncentracije *Legionella*.
- Uzorci s temperaturom ≥20 °C pokazali su znatno jaču kontaminaciju legionelama u odnosu na uzorke s temperaturom <20 °C.
- Koncentracije SRK bile su niže u pozitivnim uzorcima, međutim razlika nije bila statistički značajna.
- Pozitivni uzorci imali su niže koncentracije klorida, nitrata i elektroprovodljivosti, dok su koncentracije metala (Pb, Cr, Cu) bile značajno više, međutim utjecaj pojedinih fizikalno-kemijskih parametara vode na rast *Legionella* ovisi o specifičnim uvjetima u distribucijskom sustavu.
- PCA analiza ukazuje da prisutnost *Legionella* nije izravno povezana s pojedinačnim fizikalno-kemijskim parametrima, već ovisi o složenoj interakciji čimbenika poput biofilmova, dinamike protoka vode i interakcije s drugim mikroorganizmima.
- SBT analizom utvrđeno je da je ST 1317 najzastupljeniji sekvencni tip u uzorcima vode s brodova i trajekata na istraživanom području, što ukazuje na njegovu postojanost u okolišnim uvjetima distribucijskih sustava.
- Fenotipskom karakterizacijom utvrđeno je da su svi izolati unutar ST 1317 imali fenotip Chicago 8, što ukazuje na stabilnu genetsku strukturu unutar dominantnih sojeva i potencijalno veći epidemiološki značaj ovog genotipa.

- Najviša razina kontaminacije legionelama zabilježena je u plovnom području Rijeke, što se može povezati s lokalnim klimatskim uvjetima poput visoke relativne vlažnosti, blagih temperatura i obilnih oborina, koji u kombinaciji s potencijalnim nedostatcima u održavanju sustava za distribuciju vode stvaraju povoljne uvjete za rast i kolonizaciju bakterija.
- *Legionella* je otkrivena na 74 % analiziranih brodova (14/19), pri čemu je na pet brodova (26 %) zabilježena ponavljajuća kontaminacija, no provedene mjere dezinfekcije i sanacije rezultirale su značajnim smanjenjem koncentracije legionela, što naglašava učinkovitost ciljane intervencije u suzbijanju bakterijske kontaminacije.

7. LITERATURA

1. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W i sur. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N Engl J Med 1977;297(22):1189-97.
2. World Health Organization (WHO). *Legionella* and the prevention of legionellosis. Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S, editors. Geneva: World Health Organization Press; 2007. str.
3. Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW, Jr., Kassanoff I. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. Am J Epidemiol 1978;107(2):149-60.
4. McDade JE, Brenner DJ, Bozeman FM. Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. Ann Intern Med 1979;90:659–61.
5. Terranova W, Cohen ML, Fraser DW. 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. Lancet 1978;2(8081):122-4.
6. Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. Ann Intern Med 1979;90:656–8.
7. CA J. Surveillance of Legionnaires' Disease in Europe. U: Marre R et al, ur. *Legionella*. Washington DC: ASM Press, 2002; str. 311-7.
8. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC i sur. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. J Infect Dis 2002;186(1):127-8.
9. Brenner DJ, Steigerwalt AG, Epple P i sur. *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. pneumophila subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. fraseri subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. pascullei subsp. nov. J Clin Microbiol 1988;26(9):1695-703.
10. Science Direct. *Legionella* 2024 [Available from: https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/legionella.
11. Bacigalupe R, Lindsay D, Edwards G, Fitzgerald JR. Population Genomics of *Legionella longbeachae* and Hidden Complexities of Infection Source Attribution. Emerg Infect Dis 2017;23(5):750-7.
12. Beauté J. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. Euro Surveill 2017;22(27).
13. Currie SL, Beattie TK. Compost and *Legionella longbeachae*: an emerging infection? Perspect Public Health 2015;135(6):309-15.
14. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti C. Comparison of BCYEα+AB agar and MWY agar for detection and enumeration of *Legionella* spp. in hospital water samples. BMC Microbiol 2021:21:48.
15. David S, Rusniok C, Mentasti M i sur. Multiple major disease-associated clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently and independently. Genome Res 2016;26(11):1555-64.
16. Medscape. Legionnaires Disease 2024 [Available from: https://emedicine.medscape.com/article/220163-overview?&icd=login_success_email_match_fpf.
17. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Rivera SR, Raso R, Ferrero P, Zotti CM. Virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water system and healthcare-associated Legionnaires' disease in Northern Italy between 2004 and 2009. BMC Infect Dis 2014;14:483.

18. Kozak-Muiznieks NA, Morrison SS, Sammons S i sur. Three Genome Sequences of *Legionella pneumophila* subsp. *pascullei* Associated with Colonization of a Health Care Facility. Genome Announc 2016;4(3).
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Legionnaires' disease associated with potting soil - California, Oregon, and Washington, May–June 2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000;49(34):777–78.
20. Picard-Masson M, Lajoie E, Lord J i sur. Two Related Occupational Cases of *Legionella longbeachae* Infection, Quebec, Canada. Emerg Infect Dis 2016;22(7):1289-91.
21. Phares CR, Wangroongsarb P, Chantra S i sur. Epidemiology of severe pneumonia caused by *Legionella longbeachae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Chlamydia pneumoniae*: 1-year, population-based surveillance for severe pneumonia in Thailand. Clin Infect Dis 2007;45(12):e147-55.
22. Wei SH, Chou P, Tseng LR i sur. Nosocomial neonatal legionellosis associated with water in infant formula, Taiwan. Emerg Infect Dis 2014;20(11):1921-4.
23. Hauslein I, Manske C, Goebel W, Eisenreich W, Hilbi H. Pathway analysis using (13) C-glycerol and other carbon tracers reveals a bipartite metabolism of *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol 2016;100(2):229-46.
24. Molofsky AB, Swanson MS. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. Mol Microbiol 2004;53(1):29-40.
25. Oliva G, Sahr T, C. B. The life cycle of *Legionella pneumophila*: Cellular differentiation is linked to virulence and metabolism. Front Cell Infect Microbiol 2018; 8:3.
26. Bruggemann H, Hagman A, Jules M i sur. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol 2006;8(8):1228-40.
27. Molofsky A, Swanson M. *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. Mol Microbiol 2003; 50(2):445–61.
28. Fettes PS, Forsbach-Birk V, Lynch D, Marre R. Overexpresssion of a *Legionella pneumophila* homologue of the *Escherichia coli* regulator csrA affects cell size, flagellation, and pigmentation. Int J Med Microbiol 2001; 291(5):353–60.
29. Bozue JA, Johnson W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: Uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome lysosome fusion. Infect Immun 1996;64(2):668-73.
30. Horwitz MA. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism - engulfment within a pseudopod coil. Cell 1984;36(1):27-33.
31. Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Allan D, Hoffman P. Morphological and physiological evidence for a development cycle in *Legionella pneumophila*. U: Marre R, Abu Kwaik Y, Bartlett C, Cianciotto NP, Fields BS, Frosch M, et al., ur. *Legionella*. Washington, D.C.: ASM Press, 2001; str. 82–5.
32. Horwitz M. Toward an understanding of host and bacterial molecules mediating pathogenesis. In: *Legionella*: current status and emerging perspectives. Barbaree J, Breiman R, Dufour A, editors. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993 str. 55–62.
33. Cianciotto NP. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. Int J Med Microbiol 2001;291(5):331-43.

34. Heuner K, Steinert M, Dietrich C, Fischer G, Köhler R, Hacker J. Function and Expression of *Legionella pneumophila* Surface Factors. *Legionella*. Wiley Online Books, ASM Press, 2001; str. 43-8.
35. Weissgerber P, Faigle M, Northoff H, Neumeister B. Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of *Legionella pneumophila* by human cells. FEMS Microbiol Lett 2003;219(2):173-9.
36. Fields BS. The molecular ecology of legionellae. Trends Microbiol 1996;4(7):286-90.
37. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. Infect Immun 1989;57(4):1255-62.
38. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Engleberg NC. A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. J Infect Dis 1990;162(1):121-6.
39. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. J Clin Microbiol 1998;36(6):1560-7.
40. Cianciotto NP, Fields BS. *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89(11):5188-91.
41. Abukwaik Y, Eisenstein BI, Engleberg NC. Phenotypic Modulation by *Legionella pneumophila* Upon Infection of Macrophages. Infect Immun 1993;61(4):1320-9.
42. Rechnitzer C, Kharazmi A. Effect of *Legionella pneumophila* cytotoxic protease on human neutrophil and monocyte function. Microb Pathog 1992;12(2):115-25.
43. Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Hackman B. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. Appl Environ Microbiol 1985;50(5):1128-31.
44. Chien M, Morozova I, Shi S i sur. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. Science 2004;305(5692):1966-8.
45. Fields B, Benson R, Besser R. *Legionella* and Legionnaire's disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002(3):506–26.
46. Sadosky AB, Wiater LA, Shuman HA. Identification of *Legionella pneumophila* Genes Required for Growth within and Killing of Human Macrophages. Infect Immun 1993;61(12):5361-73.
47. Gao Y. Wasserhygiene ohne Zusatz von Chemikalien - ein elektrochemisches Verfahren zur wirksamen Desinfektion. WLB 1997; 7–8:25–8.
48. Gao LY, Harb OS, Kwaik YA. Identification of macrophage-specific infectivity loci (mil) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. Infect Immun 1998;66:883–92.
49. Winn WC, Jr., Myerowitz RL. The pathology of the legionella pneumonias. A review of 74 cases and the literature. Hum Pathol 1981;12(5):401-22.
50. Archer KA, Alexopoulou L, Flavell RA, Roy CR. Multiple MyD88-dependent responses contribute to pulmonary clearance of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol 2009;11(1):21-36.
51. Brieland JK, Jackson C, Hurst S i sur. Immunomodulatory role of endogenous interleukin-18 in gamma interferon-mediated resolution of replicative *Legionella pneumophila* lung infection. Infect Immun 2000;68(12):6567-73.

52. Casson CN, Doerner JL, Copenhaver AM i sur. Neutrophils and Ly6Chi monocytes collaborate in generating an optimal cytokine response that protects against pulmonary *Legionella pneumophila* infection. PLoS Pathog 2017;13(4):e1006309.
53. Ziltener P, Reinheckel T, Oxenius A. Neutrophil and Alveolar Macrophage-Mediated Innate Immune Control of *Legionella pneumophila* Lung Infection via TNF and ROS. PLoS Pathog 2016;12(4):e1005591.
54. Barry KC, Ingolia NT, Vance RE. Global analysis of gene expression reveals mRNA superinduction is required for the inducible immune response to a bacterial pathogen. Elife 2017;6:e1004229.
55. Copenhaver AM, Casson CN, Nguyen HT, Duda MM, Shin S. IL-1R signaling enables bystander cells to overcome bacterial blockade of host protein synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112(24):7557-62.
56. Buchholz U, Reber F, Lehfeld AS i sur. Probable reinfection with Legionella pneumophila - A case report. Int J Hyg Environ Health 2019;222(2):315-8.
57. Susa M, Ticac B, Rukavina T, Doric M, Marre R. *Legionella pneumophila* infection in intratracheally inoculated T cell-depleted or -nondepleted A/J mice. J Immunol 1998;160(1):316-21.
58. Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med 1994;154(21):2417-22.
59. Banga S, Gao P, Shen X i sur. *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(12):5121-6.
60. Luo ZQ. Striking a balance: modulation of host cell death pathways by *Legionella pneumophila*. Front Microbiol 2011;2:36.
61. Berk SG, Faulkner G, Garduno E, Joy MC, Ortiz-Jimenez MA, Garduno RA. Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by Tetrahymena spp. does not require bacterial replication and depends on a Dot/Icm-mediated survival mechanism. Appl Environ Microbiol 2008;74(7):2187-99.
62. Sikora A, Wojtowicz-Bobin M, Koziol-Montewka M, Magrys A, Gladysz I. Prevalence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland. Ann Agric Environ Med 2015;22(2):195-201.
63. (WHO) WHO, Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, S. S-L. *Legionella* and the prevention of legionellosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2007.
64. Meenhorst PL, van der Meer JW, Borst J. Sporadic cases of Legionnaires' disease in the Netherlands. Ann Intern Med 1979;90(4):529-32.
65. Bargellini A, Marchesi I, Marchegiano P i sur. A culture-proven case of community-acquired legionella pneumonia apparently classified as nosocomial: diagnostic and public health implications. Case Rep Med 2013;2013:303712.
66. Den Boer JW, Yzerman EP, Schellekens J i sur. A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. Emerg Infect Dis 2002;8(1):37-43.
67. Lettinga KD, Verbon A, Weverling GJ i sur. Legionnaires' disease at a Dutch flower show: prognostic factors and impact of therapy. Emerg Infect Dis 2002;8(12):1448-54.
68. Prasad B, Hamilton KA, Haas CN. Incorporating Time-Dose-Response into *Legionella* Outbreak Models. Risk Anal 2017;37(2):291-304.

69. Gupta SK, Imperiale TF, Sarosi GA. Evaluation of the Winthrop-University Hospital criteria to identify *Legionella pneumonia*. Chest 2001;120(4):1064-71.
70. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Legionella* (Legionnaires' Disease and Pontiac Fever) 2024 [Available from: https://www.cdc.gov/legionella/hcp/clinical-signs/index.html.
71. Barker J, Farrell ID, Hutchison JG. Factors affecting growth of *Legionella pneumophila* in liquid media. J Med Microbiol 1986;22(2):97-100.
72. Edelstein PH, Meyer RD. Legionnaires' disease: a review. Chest 1984; 85(1):114–20.
73. Kuzman I, Puljiz I. Legionarska bolest: praktični pristup dijagnostici i liječenju. Medicus 2005;14:107-13.
74. Sopena N, Sabria-Leal M, Pedro-Botet ML. Comparative study of the clinical presentation of *Legionella pneumophila* and other community-acquired pneumonias. Chest 1998; 113:1195-200.
75. García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D i sur. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. Emerg Infect Dis 2003;9(8):915-21.
76. Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 7th edition. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone 2005. str. 2711-25.
77. Roson B, Carratala J, Fernandez-Sabe N, Tubau F, Manresa F, Gudiol F. Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. Arch Intern Med 2004;164(5):502-8.
78. Sopena N, Force L, Pedro-Botet ML i sur. Sporadic and epidemic community legionellosis: two faces of the same illness. Eur Respir J 2007;29(1):138-42.
79. Vanhems P, Pires-Cronenberger S, Lasset C. Re: sporadic and epidemic community legionellosis: two faces of the same illness. Eur Respir J 2007;30(4):813.
80. Roig J, Rello J. Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. J Antimicrob Chemother 2003;51:1119–29.
81. Centers for Disease and Control Prevention (CDC). Guidelines for prevention and control of nosocomial pneumonia. Morbidity and Mortality Weekly Repor 1997a;46:31–4.
82. Benin AL, Benson RF, Arnold KE i sur. An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. J Infect Dis 2002;185(2):237-43.
83. Howden BP, Stuart RL, Tallis G, Bailey M, Johnson PD. Treatment and outcome of 104 hospitalized patients with legionnaires' disease. Intern Med J 2003;33(11):484-8.
84. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Legionnaires' disease. Stockholm: ECDC; 2022. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2020.pdf.
85. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2021 Stockholm, June 2023: ECDC; 2023 [Available from: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2021.pdf.
86. Tossa P, Deloge-Abarkan M, Zmirou-Navier D, Hartemann P, Mathieu L. Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. BMC Public Health 2006;6:112.

87. Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin Infect Dis 2003;36(1):64-9.
88. Qin X, Abe PM, Weissman SJ, Manning SC. Extrapulmonary *Legionella micdadei* infection in a previously healthy child. Pediatr Infect Dis J 2002;21(12):1174-6.
89. Edelstein PH. Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis. Clin Infect Dis 2007;44(2):229-31.
90. Burnsed LJ, Hicks LA, Smithee LM i sur. A large, travel-associated outbreak of legionellosis among hotel guests: utility of the urine antigen assay in confirming Pontiac fever. Clin Infect Dis 2007;44(2):222-8.
91. Euser SM, Pelgrim M, den Boer JW. Legionnaires' disease and Pontiac fever after using a private outdoor whirlpool spa. Scand J Infect Dis 2010;42(11-12):910-6.
92. Leoni E, Catalani F, Marini S, Dallolio L. Legionellosis Associated with Recreational Waters: A Systematic Review of Cases and Outbreaks in Swimming Pools, Spa Pools, and Similar Environments. Int J Environ Res Public Health 2018;15(8).
93. Cramp GJ, Harte D, Douglas NM, Graham F, Schousboe M, Sykes K. An outbreak of Pontiac fever due to *Legionella longbeachae* serogroup 2 found in potting mix in a horticultural nursery in New Zealand. Epidemiol Infect 2010;138(1):15-20.
94. Fields BS, Haupt T, Davis JP, Arduino MJ, Miller PH, Butler JC. Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. J Infect Dis 2001;184(10):1289-92.
95. Herwaldt LA, Gorman GW, McGrath T i sur. A new *Legionella* species, *Legionella feeleii* species nova, causes Pontiac fever in an automobile plant. Ann Intern Med 1984;100(3):333-8.
96. Huhn GD, Adam B, Ruden R i sur. Outbreak of travel-related pontiac fever among hotel guests illustrating the need for better diagnostic tests. J Travel Med 2005;12(4):173-9.
97. Remen T, Mathieu L, Hautemaniere A, Deloge-Abarkan M, Hartemann P, Zmirou-Navier D. Pontiac fever among retirement home nurses associated with airborne *Legionella*. J Hosp Infect 2011;78(4):269-73.
98. Spieker S, Petersen D, Rolfs A i sur. Acute disseminated encephalomyelitis following Pontiac fever. Eur Neurol 1998;40(3):169-72.
99. Goldberg DJ, Wrench JG, Collier PW i sur. Lochgoilhead fever: outbreak of non-pneumonic legionellosis due to *Legionella micdadei*. Lancet 1989;1(8633):316-8.
100. Lowry PW, Tompkins LS. Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. Am J Infect Control 1993;21(1):21-7.
101. Evans CP, Winn WC. Extrathoracic localization of *Legionella pneumophila* in Legionnaires' pneumonia. Am J Clin Pathol 1981:813-5.
102. Stout JE, Yu VL. Legionellosis. N Engl J Med 1997;337(10):682-7.
103. Chen TT, Schapiro JM, Loutit J. Prosthetic valve endocarditis due to *Legionella pneumophila*. J Cardiovasc Surg (Torino) 1996;37:631–3.
104. Fraz MSA, Dahle G, Skaug KM i sur. Case report: A prosthetic valve endocarditis caused by *Legionella bozemanae* in an immunocompetent patient. Front Med (Lausanne) 2022;9:1055465.
105. Fukuta Y, Yildiz-Aktas IZ, William Pasculle A, Veldkamp PJ. *Legionella micdadei* prosthetic valve endocarditis complicated by brain abscess: case report and review of the literature. Scand J Infect Dis 2012;44(6):414-8.
106. Kundsin RB, Walter CW. *Legionella* prosthetic-valve endocarditis. N Engl J Med 1988;319(9):581.

107. McCabe RE, Baldwin JC, McGregor CA, Miller DC, Vosti KL. Prosthetic valve endocarditis caused by *Legionella pneumophila*. Ann Intern Med 1984;100(4):525-7.
108. Tompkins LS, Roessler BJ, Redd SC, Markowitz LE, Cohen ML. *Legionella* prosthetic-valve endocarditis. N Engl J Med 1988;318(9):530-5.
109. Young JS, Farber BF, Pupovac SS, Graver LM. Prosthetic Valve *Legionella* Endocarditis. Ann Thorac Surg 2019;108(4):e271-e2.
110. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev 2001;14:177–207.
111. Shelburne SA, Kielhofner MA, Tiwari PS. Cerebellar involvement in legionellosis. South Med J 2004;97(1):61-4.
112. Karim A, Ahmed S, Rossoff LJ. Legionnaires' disease associated with acute encephalitis and arrhythmia. Crit Care Med 2002;30(5):1028–9.
113. Carvalho FR, Nastasi FR, Gamba RC, Foronda AS, Pellizari VH. Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic peninsula. Curr Microbiol 2008;57(4):294-300.
114. Sanchez-Parra B, Nunez A, Moreno DA. Preventing legionellosis outbreaks by a quick detection of airborne *Legionella pneumophila*. Environ Res 2019;171:546-9.
115. Fitzgeorge RB, Baskerville A, Broster M, Hambleton P, Dennis PJ. Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence: comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection. J Hyg (Lond) 1983;90(1):81-9.
116. Addiss DG, Davis JP, Laventure M, Wand PJ, Hutchinson MA, Mckinney RM. Community-Acquired Legionnaires-Disease Associated with a Cooling-Tower - Evidence for Longer-Distance Transport of *Legionella pneumophila*. Am J Epidemiol 1989;130(3):557-68.
117. Nguyen TM, Ilef D, Campese C i sur. A prolonged outbreak of Legionnaires' disease associated with an industrial cooling tower - how far can airborne transmission spread? The 6th International Conference on *Legionella* in Chicago; Chicago: Santé Publique France; 2004.
118. Nygård K, Werner-Johansen Ø, Rønsen S i sur. An outbreak of legionnaires disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway. Clin Infect Dis 2008;46(1):61-9.
119. Dennis PJ, Lee JV. Differences in Aerosol Survival between Pathogenic and Non-Pathogenic Strains of *Legionella pneumophila* Serogroup-1. J Appl Microbiol 1988;65(2):135-41.
120. Kenagy E, Priest PC, Cameron CM i sur. Risk Factors for *Legionella longbeachae* Legionnaires' Disease, New Zealand. Emerg Infect Dis 2017;23(7):1148-54.
121. Cunha BA. Legionnaires' disease: clinical differentiation from typical and other atypical pneumonias. Infect Dis Clin North Am 2010;24(1):73–105.
122. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clin Microbiol Rev 2015;28(1):95-133.
123. Dunne WM, Picot N, van Belkum A. Laboratory tests for Legionnaire's disease. Infect Dis Clin North Am 2017;31(1):167–78.
124. Cecchini J, Tuffet S, Sonneville R i sur. Antimicrobial strategy for severe community-acquired legionnaires' disease: a multicentre retrospective observational study. J Antimicrob Chemother 2017;72(5):1502-9.
125. Hayden RT, Uhl JR, Qian X i sur. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler

PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. J Clin Microbiol 2001;39(7):2618-26.
126. Edelstein PH, Roy CR. Legionnaires' disease and Pontiac fever. 9th ed. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors: Elsevier; 2020. str. 2814-1815.
127. Roig J, Rello J, Yu V. Legionnaires` disease: a guide to diagnosis and therapy. J Respir Dis 2002;23:229-34.
128. Merault N, Rusniok C, Jarraud S i sur. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. Appl Environ Microbiol 2011;77(5):1708-17.
129. Mentasti M, Cassier P, David S i sur. Rapid detection and evolutionary analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 sequence type 47. Clin Microbiol Infect 2017;23(4):264 e1- e9.
130. Murdoch DR, Podmore RG, Anderson TP i sur. Impact of routine systematic polymerase chain reaction testing on case finding for Legionnaires' disease: a pre-post comparison study. Clin Infect Dis 2013;57(9):1275-81.
131. Botelho-Nevers E, Grattard F, Viallon A i sur. Prospective evaluation of RT-PCR on sputum versus culture, urinary antigens and serology for Legionnaire's disease diagnosis. J Infect 2016;73(2):123-8.
132. Cross KE, Mercante JW, Benitez AJ, Brown EW, Diaz MH, Winchell JM. Simultaneous detection of *Legionella* species and *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* and *L. micdadei* using conserved primers and multiple probes in a multiplex real-time PCR assay. Diagn Microbiol Infect Dis 2016;85(3):295-301.
133. Bruin JP, Koshkolda T, Ijzerman E i sur. Isolation of ciprofloxacin-resistant *Legionella pneumophila* in a patient with severe pneumonia. J Antimicrob Chemother 2014;69(10):2869-71.
134. Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S i sur. Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. EBioMedicine 2015;2(9):1179-85.
135. Hennebique A, Bidart M, Jarraud S i sur. Digital PCR for Detection and Quantification of Fluoroquinolone Resistance in *Legionella pneumophila*. Antimicrob Agents Chemother 2017;61(9).
136. Pedro-Botet L, Yu VL. *Legionella*: macrolides or quinolones? Clin Microbiol Infect 2006;12 Suppl 3:25-30.
137. Ruiz-Spinelli A, Rello J. *Legionella* pneumonia in hospitalized adults with respiratory failure: Quinolones or macrolides? Eur J Intern Med 2023.
138. Pashaei-Asl R, Khodadadi K, Pashaei-Asl F i sur. *Legionella pneumophila* and Dendrimers-Mediated Antisense Therapy. Adv Pharm Bull 2017;7(2):179-87.
139. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T i sur. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. Lancet Infect Dis 2014;14(10):1011-21.
140. Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. Lancet 2016;387(10016):376-85.
141. MacIntyre CR, Dyda A, Bui CM, Chughtai AA. Rolling epidemic of Legionnaires' disease outbreaks in small geographic areas. Emerg Microbes Infect 2018;7(1):36.
142. World Health Organization (WHO). Legionellosis 2024 [Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis.
143. Farnham A, Alleyne L, Cimini D, S B. Legionnaires' disease incidence and risk factors, New York, New York, USA, 2002-2011. Emerg Infect Dis 2014;20(11):1795-802.

144. Levy I, Rubin LG. *Legionella* pneumonia in neonates: a literature review. J Perinatol 1998;18(4):287-90.
145. Franzin L, Scolfaro C, Cabodi D, Valera M, Tovo PA. *Legionella pneumophila* pneumonia in a newborn after water birth: a new mode of transmission. Clin Infect Dis 2001;33(9):e103-4.
146. Granseth G, Bhattarai R, Sylvester T, Prasai S, Livar E. Notes from the Field: Two Cases of Legionnaires' Disease in Newborns After Water Births - Arizona, 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2017;66(22):590-1.
147. Principe L, Tomao P, Visca P. Legionellosis in the occupational setting. Environ Res 2017;152:485-95.
148. Gao Z, Kang Y, Yu J, Ren L. Human pharyngeal microbiome may play a protective role in respiratory tract infections. Genom Proteom Bioinf 2014;12(3):144-50.
149. Morris A, Beck JM, Schloss PD i sur. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. Am J Respir Crit Care Med 2013;187(10):1067-75.
150. Che D, Campese C, Santa-Olalla P i sur. Sporadic community-acquired Legionnaires' disease in France: a 2-year national matched case-control study. Epidemiol Infect 2008;136(12):1684-90.
151. el-Ebiary M, Sarmiento X, Torres A i sur. Prognostic factors of severe *Legionella pneumonia* requiring admission to ICU. Am J Respir Crit Care Med 1997;156(5):1467-72.
152. Wang SP, Wang JS, Li HF. A study on the risk factors of *Legionella* infection in children. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 1995;16(2):88-91.
153. Blatt SP, Parkinson MD, Pace E i sur. Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. Am J Med 1993;95(1):16-22.
154. Lee AS, Ryu JH. Aspiration Pneumonia and Related Syndromes. Mayo Clin Proc 2018;93(6):752-62.
155. del Castillo M, Lucca A, Plodkowski A i sur. Atypical presentation of *Legionella pneumonia* among patients with underlying cancer: A fifteen-year review. J Infect 2016;72(1):45-51.
156. Lanternier F, Ader F, Pilmis B, Catherinot E, Jarraud S, Lortholary O. Legionnaire's Disease in Compromised Hosts. Infect Dis Clin North Am 2017;31(1):123-35.
157. Htwe TH, Khardori NM. Legionnaire's Disease and Immunosuppressive Drugs. Infect Dis Clin North Am 2017;31(1):29-42.
158. Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S i sur. Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. Eur Respir J 2012;39(4):963-70.
159. Berrington WR, and T. R. Hawn TR. Human susceptibility to Legionnaires' disease. In: *Legionella* Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols) C Buchrieser and H Hilbi (eds) Totowa, NJ: Humana Press 2013:541-51
160. Hawn TR, Verbon A, Janer M, Zhao LP, Beutler B, Aderem A. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(7):2487-9.
161. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD i sur. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. J Exp Med 2003;198(10):1563-72.

162. Misch EA, Verbon A, Prins JM, Skerrett SJ, Hawn TR. A TLR6 polymorphism is associated with increased risk of Legionnaires' disease. Genes Immun 2013;14(7):420-6.
163. Ruiz-Moreno JS, Hamann L, Shah JA i sur. The common HAQ STING variant impairs cGAS-dependent antibacterial responses and is associated with susceptibility to Legionnaires' disease in humans. PLoS Pathog 2018;14(1):e1006829.
164. Centers for Disease and Control Prevention (CDC). Cruise-ship-associated Legionnaires disease, November 2003-May 2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005;54(45):1153-5.
165. EU SHIPSAN ACT. European Manual for Hygiene Standards and Communicable Diseases Surveillance on Passenger Ships, European Commission Directorate General for Health and Food Safety, 2nd edition. Larissa, Greece; 2016.
166. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveno statistički ljetopis za 2021. Zagreb: HZJZ; 2022.
167. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl Environ Microbiol 1981;41(1):9-16.
168. Ožanić M, Marečić V, Knežević M i sur. The Important Role of Metal Ions for Survival of *Francisella* in Water within Amoeba Environment. BioMed Research International 2021.
169. Anand CM, Skinner AR, Malic A, Kurtz JB. Interaction of *L. pneumophilia* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). J Hyg (Lond) 1983;91(2):167-78.
170. Sheehan KB, Henson JM, Ferris MJ. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. Appl Environ Microbiol 2005;71(1):507-11.
171. Brooks T, Osicki R, Springthorpe V i sur. Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. J Toxicol Environ Health A 2004;67(20-22):1845-59.
172. Riffard S, Douglass S, Brooks T, Springthorpe S, Filion LG, Sattar SA. Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. Water Sci Technol 2001;43(12):99-102.
173. Ortiz-Roque CM, Hazen TC. Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. Appl Environ Microbiol 1987;53(9):2231-6.
174. Heller R, Holler C, Sussmuth R, Gundermann KO. Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. Lett Appl Microbiol 1998;26(1):64-8.
175. Tison DL, Seidler RJ. *Legionella* incidence and density in potable drinking water supplies. Appl Environ Microbiol 1983;45(1):337-9.
176. Yee RB, Wadowsky RM. Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water. Appl Environ Microbiol 1982;43(6):1330-4.
177. Wadowsky RM, Yee RB. Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of Flavobacterium breve. Appl Environ Microbiol 1983;46(6):1447-9.
178. Schulze-Robbecke R, Rodder M, Exner M. Propagation and killing temperatures for *Legionella*. Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg 1987;72:83-9.
179. Knežević M, Rončević D, Vukić Lušić D i sur. Decreasing Pasteurization Treatment Efficiency against Amoeba-Grown *Legionella pneumophila* - Recognized Public Health Risk Factor. Int J Environ Res Public Health 2022;19(3).

180. Rakić A, Štambuk-Giljanović N, Foglar L. Monitoring *Legionella pneumophila* in drinking water distribution systems in southern Croatia. Fresenius Environ Bull 2013;22:3390–7.
181. Tabatabaei M, Hemati Z, Moezzi MO, Azimzadeh N. Isolation and identification of *Legionella* spp. from different aquatic sources in south-west of Iran by molecular &culture methods. Mol Biol Res Commun 2016;5(4):215-23.
182. Dimitriadi D, Velonakis E. Detection of *Legionella* spp. from Domestic Water in the Prefecture of Arta, Greece. J Pathog 2014;2014:407385.
183. Rakić A, Štambuk-Giljanović N. Physical and chemical parameter correlations with technical and technological characteristics of heating systems and the presence of *Legionella* spp. in the hot water supply. Environ Monit Assess 2016;188(2):73.
184. Lee HK, Shim JI, Kim HE, Yu JY, Kang YH. Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in South Korea. Appl Environ Microbiol 2010;76(19):6547-54.
185. Dennis PJ, Green D, Jones BP. A note on the temperature tolerance of *Legionella*. J Appl Bacteriol 1984;56(2):349-50.
186. Dennis R. Legionnaires' disease - preventative maintenance. J Instit Hospit Eng 1988;42:14–5.
187. Söderberg MA, Rossier O, Cianciotto NP. The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. J Bacteriol 2004;186(12):3712-20.
188. Yu V. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Philadelphia: Churchill Livingston; 2000. str. 2424–35.
189. Kelava I, Marecic V, Fucak P i sur. Optimisation of External Factors for the Growth of *Francisella novicida* within *Dictyostelium discoideum*. Biomed Res Int 2020;2020:6826983.
190. Fields BS, Shotts EB, Jr., Feeley JC, Gorman GW, Martin WT. Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Appl Environ Microbiol 1984;47(3):467-71.
191. Skaliy P, McEachern H. Survival of the Legionnaires' disease bacterium in water. Ann Intern Med 1979;90:662.
192. Lee JV, West AA. Survival and growth of *Legionella* species in the environment. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 1991;20:121S-9S.
193. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl Environ Microbiol 1994;60(5):1585-92.
194. Tesh MJ, Miller RD. Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. J Clin Microbiol 1981;13(5):865-9.
195. Stout J, Yu V, Best M. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. Appl Environ Microbiol 1985;49(1):221–8.
196. Pine L, George JR, Reeves MW, Harrell WK. Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 1979;9(5):615-26.
197. Warren W, Miller R. Growth of Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. J Clin Microbiol 1979;10:50–5.
198. Wadowsky RM, Yee RB. Effect of non-*Legionellaceae* bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water. Appl Environ Microbiol 1985;49(5):1206-10.

199. Bohach GA, Snyder IS. Characterization of surfaces involved in adherence of *Legionella pneumophila* to *Fischerella* species. Infect Immun 1983;42(1):318-25.
200. Grimes DJ. Ecology of estuarine bacteria capable of causing human disease. Estuaries 1991;14:334–60.
201. Rowbotham TJ. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. Isr J Med Sci 1986;22:678–89.
202. Drozanski W. Studies of intracellular parasites of free-living amoebae. Acta Microbiol Pol 1963;12:3–8.
203. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol 1980;33(12):1179-83.
204. Hoffmann C, Harrison CF, Hilbi H. The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. Cell Microbiol 2014;16(1):15-26.
205. Barker J, Brown MR, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. Appl Environ Microbiol 1992;58(8):2420-5.
206. Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun 1999;67(9):4427-34.
207. King CH, Shotts EB, Jr., Wooley RE, Porter KG. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. Appl Environ Microbiol 1988;54(12):3023-33.
208. Richards AM, Von Dwingelo JE, Price CT, Abu Kwaik Y. Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. Virulence 2013;4(4):307-14.
209. Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. Microbiology (Reading) 2001;147(Pt 11):3121-6.
210. Personnic N, Striednig B, Hilbi H. Quorum sensing controls persistence, resuscitation, and virulence of *Legionella* subpopulations in biofilms. ISME J 2021;15(1):196-210.
211. Tyndall RL, Domingue EL. Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. Appl Environ Microbiol 1982;44(4):954-9.
212. Wadowsky RM, Wilson TM, Kapp NJ i sur. Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. Appl Environ Microbiol 1991;57(7):1950-5.
213. Fields BS, Fields SR, Loy JN, White EH, Steffens WL, Shotts EB. Attachment and entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*. J Infect Dis 1993;167(5):1146-50.
214. Quinn FD, Keen MG, Tompkins LS. Genetic, immunological, and cytotoxic comparisons of *Legionella* proteolytic activities. Infect Immun 1989;57(9):2719-25.
215. Nagington J, Smith DJ. Pontiac fever and amoebae. Lancet 1980;2(8206):1241.
216. Heuner K, Steinert M. The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. Int J Med Microbiol 2003;293(2-3):133-43.
217. Berendt RF. Survival of *Legionella pneumophila* in aerosols: effect of relative humidity. J Infect Dis 1980;141(5):689.
218. Hambleton P, Broster MG, Dennis PJ, Henstridge R, Fitzgeorge R, Conlan JW. Survival of virulent *Legionella pneumophila* in aerosols. J Hyg (Lond) 1983;90(3):451-60.

219. Skinner AR, Anand CM, Malic A, Kurtz JB. *Acanthamoebae* and environmental spread of *Legionella pneumophila*. Lancet 1983;2(8344):289-90.
220. Harf C, Monteil H. Interactions between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. Water Sci Technol 1988;20:235–9.
221. Boamah DK, Zhou G, Ensminger AW, O'Connor TJ. From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of *Legionella*. Front Cell Infect Microbiol 2017;7:477.
222. Barker J, Brown MR. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiology (Reading) 1994;140 (Pt 6):1253-9.
223. Scheid P. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. Parasitol Res 2014;113(7):2407-14.
224. Escoll P, Rolando M, Gomez-Valero L, Buchrieser C. From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. U: Hilbi H, ur. Molecular Mechanisms in *Legionella* Pathogenesis. Berlin: Springer, 2013; str. 1-34.
225. Broderick NA. A common origin for immunity and digestion. Front Immunol 2015;6:72.
226. Casadevall A, Fu MS, Guimaraes AJ, Albuquerque P. The 'Amoeboid Predator-Fungal Animal Virulence' Hypothesis. J Fungi (Basel) 2019;5(1).
227. Moliner C, Fournier PE, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. FEMS Microbiol Rev 2010;34(3):281-94.
228. Gomez-Valero L, Rusniok C, Carson D i sur. More than 18,000 effectors in the *Legionella* genus genome provide multiple, independent combinations for replication in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2019;116(6):2265-73.
229. Gomez-Valero L, Buchrieser C. Genome dynamics in *Legionella*: the basis of versatility and adaptation to intracellular replication. Cold Spring Harb Perspect Med 2013;3(6).
230. Lurie-Weinberger MN, Gomez-Valero L, Merault N, Glöckner G, Buchrieser C, Gophna U. The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*. Int J Med Microbiol 2010;300(7):470-81.
231. Schulz F, Martijn J, Wascher F i sur. A Rickettsiales symbiont of amoebae with ancient features. Environ Microbiol 2016;18(8):2326-42.
232. Schmitz-Esser S, Tischler P, Arnold R i sur. The genome of the amoeba symbiont "*Candidatus Amoebophilus asiaticus*" reveals common mechanisms for host cell interaction among amoeba-associated bacteria. J Bacteriol 2010;192(4):1045-57.
233. Ensminger AW. *Legionella pneumophila*, armed to the hilt: justifying the largest arsenal of effectors in the bacterial world. Curr Opin Microbiol 2016;29:74-80.
234. Weber MM, Faris R. Subversion of the Endocytic and Secretory Pathways by Bacterial Effector Proteins. Front Cell Dev Biol 2018;6:1.
235. Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C i sur. Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. PLoS Genet 2010;6(2):e1000851.
236. Whiley H, Bentham R. *Legionella longbeachae* and legionellosis. Emerg Infect Dis 2011;17(4):579-83.
237. Brassinga AK, Kinchen JM, Cupp ME, Day SR, Hoffman PS, Sifri CD. Caenorhabditis is a metazoan host for *Legionella*. Cell Microbiol 2010;12(3):343-61.

238. Fabbi M, Pastoris MC, Scanziani E, Magnino S, Di Matteo L. Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf. J Clin Microbiol 1998;36(7):1942-7.
239. McDonald R, Schreier HJ, Watts JE. Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. PLoS One 2012;7(10):e48018.
240. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat Rev Microbiol 2016;14(9):563-75.
241. Martiny AC, Jørgensen TM, Albrechtsen HJ, Arvin E, Molin S. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. Appl Environ Microbiol 2003;69(11):6899-907.
242. Storey MV, Ashbolt J, Stenstrom TA. Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila*--a quantitative risk assessment for distributed water. Water Sci Technol 2004;50(1):77-82.
243. Temmerman R, Vervaeren H, Noseda B, Boon N, Verstraete W. Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. Appl Environ Microbiol 2006;72(6):4323-8.
244. Hindré T, Brüggemann H, Buchrieser C, Héchard Y. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. Microbiology (Reading) 2008;154(Pt 1):30-41.
245. Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans AD, Beumer RR, van der Kooij D. Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. Appl Environ Microbiol 2004;70(11):6826-33.
246. Buse HY, Schoen ME, Ashbolt NJ. *Legionellae* in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. Water Res 2012;46(4):921-33.
247. Hellinga JR, Garduño RA, Kormish JD i sur. Identification of vacuoles containing extraintestinal differentiated forms of *Legionella pneumophila* in colonized *Caenorhabditis elegans* soil nematodes. Microbiologyopen 2015;4(4):660-81.
248. Ashbolt NJ. Environmental (Saprozoic) Pathogens of Engineered Water Systems: Understanding Their Ecology for Risk Assessment and Management. Pathogens 2015;4(2):390-405.
249. Declerck P, Vanysacker L, Hulsmans A, Lambert N, Liers S, Ollevier F. Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*. Water Res 2010;44(3):703-10.
250. Hamilton KA, Hamilton MT, Johnson W i sur. Risk-Based Critical Concentrations of *Legionella pneumophila* for Indoor Residential Water Uses. Environ Sci Technol 2019;53(8):4528-41.
251. Cloete T, Jacobs L, Brözel V. The use of planktonic bacterial populations in open and closed recirculating water cooling systems for the evaluation of biocides. Int Biodeterior Biodegradation 1989;25:115–22.
252. Morton LHG, Greenway DLA, Gaylarde CC, Surman SB. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. Int Biodeterior Biodegradation 1998;41:247–59.
253. Trulear MG, Characklis WG. Dynamics of biofilm processes. J Water Pollut Control Fed 1982; 54:1288–301.
254. Eighmy TT, Bishop PL. Effect of reactor turbulence on the binding-protein-mediated aspartate transport system in thin wastewater biofilms. Appl Environ Microbiol 1985;50(1):120-4.

255. Kilvington S, Price J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. J Appl Microbiol 1990;68 519-25.
256. Cunliffe DA. Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine. J Appl Bacteriol 1990;68(5):453-9.
257. Freije MR, Barbaree JM. *Legionella* Control in Health Care Facilities: A Guide for Minimizing Risk. Indianapolis, IN: Hc Information Resources Inc; 1996. str.
258. Green PN, Pirrie RS. A laboratory apparatus for the generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms. J Appl Bacteriol 1993;74(4):388-93.
259. Ridgway HF, Olson BH. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. Appl Environ Microbiol 1982;44(4):972-87.
260. Walker JT, Roberts AD, Lucas VJ, Roper MA, Brown RG. Quantitative assessment of biocide control of biofilms including *Legionella pneumophila* using total viable counts, fluorescence microscopy, and image analysis. Methods Enzymol 1999;310:629-37.
261. Walker JT, Sonesson A, Keevil CW, White DC. Detection of *Legionella pneumophila* in biofilms containing a complex microbial consortium by gas chromatography-mass spectrometry analysis of genus-specific hydroxy fatty acids. FEMS Microbiol Lett 1993;113(2):139-44.
262. Atlas RM. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. Environ Microbiol 1999;1(4):283-93.
263. Keevil C, Walker J, McEvoy J, Colbourne J. Detection of biofilms associated with pitting corrosion of copper pipework in Scottish hospitals. Corrosion. Preston Biodeterioration Society, 1989; str. 99–117.
264. Moorer WR. Water pollution in dental units. Ned Tijdschr Tandheelkd 1996;103(10):409-10.
265. Surman SB, Morton LHG, Keevil CW. Growth of *Legionella pneumophila* in aquatic biofilms is not dependent on intracellular multiplication. U: CW K, ur. Biofilms in the aquatic environment. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999; str. 160–70.
266. Colbourne JS, Dennis PJ. Distribution and persistence of *Legionella* in water systems. Microbiol Sci 1985;2(2):40-3.
267. Colbourne JS, Pratt DJ, Smith MG, Fisher-Hoch SP, Harper D. Water fittings as sources of *Legionella pneumophila* in a hospital plumbing system. Lancet 1984;1(8370):210-3.
268. Storey M, Ashbolt J, Stenstrom. The fate of legionellae within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment. Water Sci Technol 2004;49:269–75.
269. Veríssimo A, Vesey G, Rocha GM i sur. A hot water supply as the source of *Legionella pneumophila* in incubators of a neonatology unit. J Hosp Infect 1990;15(3):255-63.
270. ASHRAE. ASHRAE Guideline 12-2000. Minimizing the risk of legionellosis associated with building water systems. Atlanta, GA: American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, 2000.
271. World Health Organization (WHO). Guidelines for Drinking Water Quality. Vol 1. 3rd edition. Geneva: WHO, 2004.
272. Oleinick NL. Initiation and elongation of protein synthesis in growing cells: differential inhibition by cycloheximide and emetine. Arch Biochem Biophys 1977;182(1):171-80.

273. Surman S, Morton G, Keevil B, Fitzgeorge R. *Legionella pneumophila* Proliferation Is Not Dependent on Intracellular Replication. U: Reinhard M, Kwaik A, Bartlett Y, Cianciotto C, Fields N, Frosch B, et al., ur. *Legionella*. ASM Press, 2002; str. 86–9.
274. Rogers J, Keevil C. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. Appl Environ Microbiol 1992;58:2326–30.
275. Bargellini A, Marchesi I, Righi E i sur. Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. Water Res 2011;45(6):2315-21.
276. van der Kooij D, van der Wielen P, editors. Microbial Growth in Drinking-Water Supplies: Problems, Causes, Control and Research Needs. London, England: IWA Publishing; 2013.
277. Vickers RM, Yu VL, Hanna SS i sur. Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. Infect Control 1987;8(9):357-63.
278. Reeves MW, Pine L, Hutner SH, George JR, Harrell WK. Metal requirements of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 1981;13(4):688-95.
279. Goldoni P, Sinibaldi L, Valenti P, Orsi N. Metal complexes of lactoferrin and their effect on the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. Biometals 2000;13(1):15-22.
280. Allard KA, Dao J, Sanjeevaiah P i sur. Purification of Legiobactin and importance of this siderophore in lung infection by *Legionella pneumophila*. Infect Immun 2009;77(7):2887-95.
281. Buracco S, Peracino B, Andreini C, Bracco E, Bozzaro S. Differential Effects of Iron, Zinc, and Copper on *Dictyostelium discoideum* Cell Growth and Resistance to *Legionella pneumophila*. Front Cell Infect Microbiol 2017;7:536.
282. James BW, Mauchline WS, Dennis PJ, Keevil CW, Wait R. Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. Appl Environ Microbiol 1999;65(2):822-7.
283. Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. Biotechnol Annu Rev 2005;11:355-80.
284. Brazeau RH, Edwards MA. Role of Hot Water System Design on Factors Influential to Pathogen Regrowth: Temperature, Chlorine Residual, Hydrogen Evolution, and Sediment. Environ Eng Sci 2013;30(10):617-27.
285. Dai D, Proctor CR, Williams K, Edwards MA, Pruden A. Mediation of effects of biofiltration on bacterial regrowth, *Legionella pneumophila*, and the microbial community structure under hot water plumbing conditions. Environ Sci Water Res Technol 2018;4(2):183-94.
286. Ji P, Rhoads WJ, Edwards MA, Pruden A. Impact of water heater temperature setting and water use frequency on the building plumbing microbiome. ISME J 2017;11(6):1318-30.
287. Proctor CR, Dai D, Edwards MA, Pruden A. Interactive effects of temperature, organic carbon, and pipe material on microbiota composition and *Legionella pneumophila* in hot water plumbing systems. Microbiome 2017;5(1):130.
288. Rhoads WJ, Garner E, Ji P i sur. Distribution System Operational Deficiencies Coincide with Reported Legionnaires' Disease Clusters in Flint, Michigan. Environ Sci Technol 2017;51(20):11986-95.

289. Maisa A, Brockmann A, Renken F i sur. Epidemiological investigation and case-control study: a Legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, August-September 2013. Euro Surveill 2015;20(46).
290. Caicedo C, Rosenwinkel KH, Nogueira R. Temperature-driven growth of *Legionella* in lab-scale activated sludge systems and interaction with protozoa. Int J Hyg Environ Health 2018;221(2):315-22.
291. United Nations (UN), editor Review of Maritime Transport 2019. United Nations Conference on Trade and Development; 2019; Geneva: United Nations Publications.
292. World Health Organization (WHO). Sanitation on Ships. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
293. Pavić D, Kralj P, Lenac D. *Legionella pneumophilia* on board ship's freshwater systems and technological and organizational measures of prevention and suppression. J Mar Res 2017;31:74-6.
294. Ricketts KD, Joseph C. Travel associated legionnaires' disease in Europe: 2002. Euro Surveill 2004;9(2):6-9.
295. Joseph CA. Legionnaires' Disease in Europe 2000-2002. Epidemiol Infect 2004;132(3):417-24.
296. Lever F, Joseph C. Travel associated legionnaires' disease in Europe in 1999. Euro Surveill 2001;6(4):53-60.
297. Slaymaker E, Joseph C, Bartlett CLR. Travel associated legionnaires'disease in Europe: 1997 and 1998. Euro Surveill 1999;4(11):120–4.
298. Ahlen C, Aas M, Nor A i sur. *Legionella pneumophila* in Norwegian naval vessels. Tidsskr Nor Laegeforen 2013;133(14):1445-8.
299. Azara A, Piana A, Sotgiu G i sur. Prevalence study of *Legionella* spp. contamination in ferries and cruise ships. BMC Public Health 2006;6:100.
300. Beyrer K, Lai S, Dreesman J l, Lee JV, Joseph C, Harrison T ea. Legionnaires' disease outbreak associated with a cruise liner, August 2003: epidemiological and microbiological findings. Epidemiol Infect 2007;135:802–10.
301. Castellani Pastoris M, Lo Monaco R, Goldoni P i sur. Legionnaires' disease on a cruise ship linked to the water supply system: clinical and public health implications. Clin Infect Dis 1999;28(1):33-8.
302. Caylà JA, Maldonado R, Pellicer T, Ferrer D, al. PCe. Legionellosis study group. A small outbreak of Legionnaires' disease in a cargo ship under repair. Eur Respir J 2001;17:1322–7.
303. de Jong B, Payne Hallström L, Robesyn E, Ursut D, Zucs P. Travel-associated Legionnaires' disease in Europe, 2010. Euro Surveill 2013;18(23):20498.
304. Goutziana G, Mouchtouri VA, Karanika M i sur. *Legionella* species colonization of water distribution systems, pools and air conditioning systems in cruise ships and ferries. BMC Public Health 2008;8:390.
305. Guyard C, Low DE. *Legionella* infections and travel associated legionellosis. Travel Med Infect Dis 2011;9(4):176-86.
306. Jernigan DB, Hofmann J, Cetron MS i sur. Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. Lancet 1996;347(9000):494-9.
307. Regan CM, McCann B, Syed Q i sur. Outbreak of Legionnaires' disease on a cruise ship: lessons for international surveillance and control. Commun Dis Public Health 2003;6(2):152-6.
308. Rowbotham TJ. Legionellosis associated with ships: 1977 to 1997. Commun Dis Public Health 1998;1(3):146-51.

309. Sedgwick J, Joseph C, Chandrakumar M, Harrison T, Lee J, de Jong B. Outbreak of respiratory infection on a cruise ship. Euro Surveill 2007;12(8):E070809 1.
310. Ülger M, Tezcan Ülger S, Bekçi A, Nar Ötgün S, Delialioğlu N, Su AGG. Sistemlerinden İzole Edilen *Legionella* Türleri ve Moleküler Karakterizasyonu [*Legionella* Species Isolated in the Water Systems of Ships and Their Molecular Characterization]. Mikrobiyol Bul 2022(1):11-24.
311. Arthur J. EHOs Steer cruise ship from unsafe waters. Environm Health 1998;106(10):285–8.
312. Kura F, Amemura-Maekawa J, Yagita K i sur. Outbreak of Legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. Epidemiol Infect 2006;134(2):385-91.
313. Joseph CA, Hutchinson EJ, Dedman D, Birtles RJ, Watson JM, Bartlett CL. Legionnaires' disease surveillance: England and Wales 1994. Commun Dis Rep CDR Rev 1995;5(12):R180-3.
314. Lai S. An investigation of Legionnaires' disease associated with the Ocean Monarch cruise liner in 2003. United Kingdom Health Protection Agency Annual Conference; Brighton: The UK Public Health Association's 2004.
315. Edelstein P, Cetron M. Editorial response: sea, wind and pneumonia. Clin Infect Dis 1999;28:39–41.
316. Davison A, Howard G, Stevens M i sur. Water safety plans: managing drinking-water quality from catchment to consumer / Annette Davison ... [et al]. Geneva: World Health Organization; 2005.
317. Mouchtouri VA, Bartlett CL, Diskin A, Hadjichristodoulou C. Water Safety Plan on cruise ships: a promising tool to prevent waterborne diseases. Sci Total Environ 2012;429:199-205.
318. Direktiva 2020/2184. Direktiva (EU) 2020/2184 Europskog parlamenta i Vijeća o kvaliteti vode za ljudsku potrošnju (preinaka). Bruxelles: Europski parlament, Vijeće Europske unije; 2020.
319. NN 30/2023. Zakon o vodi za ljudsku potrošnju. Zagreb: Hrvatski sabor; 2023.
320. NN 64/2023 88/2023. Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju. Zagreb: Ministarstvo zdravstva; 2023.
321. NN 88/2023. Pravilnik o sanitarno-tehničkim i higijenskim te drugim uvjetima koje moraju ispunjavati građevine za vodoopskrbu i poslovanje u njima. Zagreb, Hrvatska: Ministarstvo zdravstva; 2023.
322. NN 64/2023. Pravilnik o parametrima zdravstvene ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u dodir s vodom namijenjenom za ljudsku potrošnju Zagreb: Ministarstvo zdravstva; 2023.
323. NN 43/2024. Pravilnik o kontroli parametara kućne vodoopskrbne mreže potrošača i drugih sustava od javnozdravstvenog značaja te planu i programu edukacije svih dionika. Zagreb: Ministarstvo zdravstva; 2024.
324. Crespi S, Ferrer J. Educational Program for Prevention of Legionellosis in the Tourism Sector. U: Marre R, Abu Kwaik Y, Bartlett C, Cianciotto N, Fields B, Frosch M, et al., ur. *Legionella*. 2001; str. 425-7.
325. HRN EN ISO 11731:2017. Kvaliteta vode -- Brojenje *Legionella* (ISO 11731:2017; EN ISO 11731:2017). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2017.
326. HRN EN ISO 6222:2000. Kakvoća vode -- Brojenje uzgojenih mikroorganizama -- Broj kolonija nacjepljivanjem na hranjivi agar (ISO 6222:1999; EN ISO 6222:1999). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2000.

327. HRN EN ISO 9308-1:2014/A1:2017. Kvaliteta vode -- Brojenje Escherichia coli i koliformnih bakterija -- 1. dio: Metoda membranske filtracije za vode s niskom pozadinom bakterijske flore (ISO 9308-1:2014/Amd 1:2016; EN ISO 9308-1:2014/A1:2017). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2014.
328. HRN EN ISO 7899-2:2000. Kakvoća vode -- Detekcija i brojenje crijevnih enterokoka -- 2. dio: Metoda membranske filtracije (ISO 7899-2:2000; EN ISO 7899-2:2000). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2000.
329. HRN EN ISO 16266:2008. Kakvoća vode -- Detekcija i brojenje *Pseudomonas aeruginosa* -- Metoda membranske filtracije (ISO 16266:2006; EN ISO 16266:2008). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2008.
330. HRN EN ISO 19250:2013. Kvaliteta vode -- Detekcija vrsta roda Salmonella (ISO 19250:2010; EN ISO 19250:2013). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2013.
331. APHA Method 2550 B.Temperature of Water. Standard Methods for the examination of water and waste water, 23st edition. Washington, D.C., USA: Amer Public Health Assn (APHA). 2017.
332. HRN EN ISO 7393-2:2018. Kvaliteta vode -- Određivanje slobodnoga i ukupnoga klora -- 2. dio: Kolorimetrijska metoda s N,N-dialkil-1,4-fenilendiaminom u svrhu rutinske kontrole (ISO 7393-2:2017; EN ISO 7393-2:2018). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2018.
333. HRN EN ISO 7027-1:2016. Kvaliteta vode -- Određivanje mutnoće -- 1. dio: Kvantitativne metode (ISO 7027-1:2016; EN ISO 7027-1:2016). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2016.
334. HRN EN ISO 10523:2012. Kvaliteta vode -- Određivanje pH vrijednosti (ISO 10523:2008; EN ISO 10523:2012). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2012.
335. HRN ISO 7888:2001. Kakvoća vode -- Određivanje električne vodljivosti (ISO 7888:1985). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2001.
336. HRN EN ISO 8467:2001. Kakvoća vode -- Određivanje permanganatnog indeksa (ISO 8467:1993; EN ISO 8467:1995). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2001.
337. HRN ISO 9297:1998. Kakvoća vode -- Određivanje klorida -- Volumetrijska metoda sa srebrnim nitratom uz kromatni indikator (Mohrova metoda) (ISO 9297:1989). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 1988.
338. HRN ISO 7150-1:1998. Kakvoća vode -- Određivanje amonija -- 1. dio: Spektrometrijska metoda (ISO 7150-1:1984). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 1988.
339. HRN EN 26777:1998. Kakvoća vode -- Određivanje nitrita -- Molekularna apsorpcijska spektrometrijska metoda (ISO 6777:1984; EN 26777:1993). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 1988.
340. Standard Mathods 4500-NO3 B. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 24rd Edition. Washington, D.C., SAD: American Public Health Association (APHA) u suradnji s American Water Works Association (AWWA) i Water Environment Federation (WEF); 2023.
341. HRN EN ISO 6878:2008. Kakvoća vode -- Određivanje fosfora -- Spektrometrijska metoda s amonijevim molibdatom (ISO 6878:2004; EN ISO 6878:2004). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2008.
342. HRN EN ISO 17294-2:2016. Kvaliteta vode -- Primjena spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) -- 2. dio: Određivanje odabranih elementa

uključujući uranijeve izotope (ISO 17294-2:2016; EN ISO 17294-2:2016). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2016.
343. Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. Methods Mol Biol 2013;954:119-48.
344. Gaia V, Fry NK, Afshar B i sur. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 2005;43(5):2047-52.
345. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidylyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol 2007;45(6):1965-8.
346. TIBCO Statistica. TIBCO Statistica, verzija 13.5.0. Palo Alto, CA, USA: TIBCO Software Inc.; 2021.
347. Rowbotham TJ. Legionellae and Amoebae. In: Thornsberry C, Balows A, Feeley JC, Jakubowski W, eds *Legionella*: proceedings of the 2nd international symposium, American Society for Microbiology, Washington DC, ASM Press 1984:325–7.
348. Beauté J, Sandin S, Uldum SA i sur. Short-term effects of atmospheric pressure, temperature, and rainfall on notification rate of community-acquired Legionnaires' disease in four European countries. Epidemiol Infect 2016;144(16):3483-93.
349. Dupke S, Buchholz U, Fastner J i sur. Impact of climate change on waterborne infections and intoxications. J Health Monit 2023;8(Suppl 3):62-77.
350. Karagiannis I, Brandsema P, Van Der Sande M. Warm, wet weather associated with increased Legionnaires' disease incidence in The Netherlands. Epidemiology and Infection 2009;137(2):181-7.
351. Sikora A, Wójtowicz-Bobin M, Kozioł-Montewka M, Magryś A, Gładysz I. Prevalence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland. Ann Agric Environ Med 2015;22(2):195-201.
352. Barna Z, Kádár M, Kálmán E, Scheirich Szax A, Vargha M. Prevalence of *Legionella* in premise plumbing in Hungary. Water Research 2016;90:71-8.
353. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M i sur. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21(10):710-6.
354. Arslan-Aydoğdu E, Kimiran A. An investigation of virulence factors of *Legionella pneumophila* environmental isolates. Braz J Microbiol 2018;49(1):189-99.
355. D'Alò G L, Messina A, Mozzetti C, P DF. *Legionella* detection in hot water distribution systems of closed community and tourist accommodation facilities in the Lazio Region, Italy: risk assessment and prevention. Biomedicine & Prevention issues 2018;2.
356. Doleans A, Aurell H, Reyrolle M i sur. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. J Clin Microbiol 2004;42(1):458-60.
357. Glažar Ivče D, Rončević D, Šantić M i sur. Is a Proactive Approach to Controlling *Legionella* in the Environment Justified? Food Technol Biotechnol 2021;59(3):314-24.
358. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Legionarska bolest 2024 [Available from: https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/legionarska-bolest/?utm_source=chatgpt.com.

359. Rakić A, Perić J, Foglar L. Influence of temperature, chlorine residual and heavy metals on the presence of *Legionella pneumophila* in hot water distribution systems. Ann Agric Environ Med 2012;19(3):431-6.
360. Arvand M, Jungkind K, Hack A. Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: do we know the true dimension? Euro Surveill 2011;16(16).
361. Marchesi I, Marchegiano P, Bargellini A i sur. Effectiveness of different methods to control legionella in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. J Hosp Infect 2011;77(1):47-51.
362. Zhang Z, McCann C, Hanrahan J i sur. *Legionella* control by chlorine dioxide in hospital water systems. 2009;101(5):117-27.
363. Paranjape K, Bédard É, Whyte LG, Ronholm J, Prévost M, Faucher SP. Presence of *Legionella* spp. in cooling towers: the role of microbial diversity, Pseudomonas, and continuous chlorine application. Water Research 2020;169:115252.
364. Corre MH, Delafont V, Legrand A, Berjeaud JM, Verdon J. Exploiting the Richness of Environmental Waterborne Bacterial Species to Find Natural *Legionella pneumophila* Competitors. Front Microbiol 2018;9:3360.
365. Abu Khweek A, Amer AO. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. 2018;8.
366. Bonetta S, Pignata C, Bonetta S i sur. Effectiveness of a neutral electrolysed oxidising water (NEOW) device in reducing *Legionella pneumophila* in a water distribution system: A comparison between culture, qPCR and PMA-qPCR detection methods. Chemosphere 2018;210:550-6.
367. Fakhri Y, Nasiri MJ, Asadi A, Avazpour M, Alinejad A, Gholami Z. The prevalence of *Legionella pneumophila* in different water systems: A global systematic review and meta-analysis. 2019.
368. Song X, Zhang G, Zhou Y, Li W. Behaviors and mechanisms of microbially-induced corrosion in metal-based water supply pipelines: A review. Science of The Total Environment 2023;895:165034.
369. Araya M, Olivares M, Pizarro F, González M, Speisky H, Uauy R. Gastrointestinal symptoms and blood indicators of copper load in apparently healthy adults undergoing controlled copper exposure123. The American Journal of Clinical Nutrition 2003;77(3):646-50.
370. Linos A, Petralias A, Christophi CA i sur. Oral ingestion of hexavalent chromium through drinking water and cancer mortality in an industrial area of Greece--an ecological study. Environ Health 2011;10:50.
371. Jarvis P, Fawell J. Lead in drinking water – An ongoing public health concern? Current Opinion in Environmental Science & Health 2021;20:100239.
372. Learbuch KLG, Lut MC, Liu G, Smidt H, van der Wielen P. *Legionella* growth potential of drinking water produced by a reverse osmosis pilot plant. Water Res 2019;157:55-63.
373. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. Appl Environ Microbiol 1994;60(6):1842-51.
374. Schoenen D, Schulze-Röbbecke R, Schirdewahn N. Microbial contamination of water by pipe and tubing material. 2. Growth of *Legionella pneumophila*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B Umwelthyg Krankenhaushyg Arbeitshyg Prav Med 1988;186(4):326-32.

375. Pringler N, Brydov P, Uldum S. Occurrence of *Legionella* in Danish hot water systems. U: Cianciotto N, Kwaik Y, Edelstein P, Fields B, Geary D, Harrison T, et al., ur. *Legionella*. Washington, DC: ASM Press, 2002.
376. Buse HY, Lu J, Lu X, Mou X, Ashbolt NJ. Microbial diversities (16S and 18S rRNA gene pyrosequencing) and environmental pathogens within drinking water biofilms grown on the common premise plumbing materials unplasticized polyvinylchloride and copper. FEMS Microbiol Ecol 2014;88(2):280-95.
377. Buse HY, Lu J, Struewing IT, Ashbolt NJ. Preferential colonization and release of *Legionella pneumophila* from mature drinking water biofilms grown on copper versus unplasticized polyvinylchloride coupons. Int J Hyg Environ Health 2014;217(2-3):219-25.
378. Gião MS, Wilks SA, Keevil CW. Influence of copper surfaces on biofilm formation by *Legionella pneumophila* in potable water. Biometals 2015;28(2):329-39.
379. van der Kooij D, Veenendaal HR, Scheffer WJ. Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. Water Res 2005;39(13):2789-98.
380. Buse HY, Ji P, Gomez-Alvarez V, Pruden A, Edwards MA, Ashbolt NJ. Effect of temperature and colonization of *Legionella pneumophila* and *Vermamoeba vermiformis* on bacterial community composition of copper drinking water biofilms. Microb Biotechnol 2017;10(4):773-88.
381. Rhoads WJ, Pruden A, Edwards MA. Interactive Effects of Corrosion, Copper, and Chloramines on *Legionella* and *Mycobacteria* in Hot Water Plumbing. Environ Sci Technol 2017;51(12):7065-75.
382. Rakić A, Giljanović N, Foglar L. Monitoring *Legionella pneumophila* in drinking water distribution systems in southern Croatia. Fresenius Environ Bull 2013;22:3390–7.
383. van der Kooij D, Veenendaal HR, Italiaander R, van der Mark EJ, Dignum M. Primary Colonizing Betaproteobacteriales Play a Key Role in the Growth of *Legionella pneumophila* in Biofilms on Surfaces Exposed to Drinking Water Treated by Slow Sand Filtration. Appl Environ Microbiol 2018;84(24).
384. Mouchtouri V, Velonakis E, Hadjichristodoulou C. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. Am J Infect Control 2007;35(9):623-7.
385. Christenson B, Lidin-Janson G, Kallings I. Outbreak of respiratory illness on board a ship cruising to ports in southern Europe and northern Africa. J Infect 1987;14(3):247-54.
386. Temeshnikova ND, Brudny PA, Marakusha BI, Tartaknvskii I, Prosorovskii S. The presence of *Legionella* spp in the water system of ships. Proceedings of the 11th meeting of the European Working Group on *Legionella* Infections; Norway1996.
387. Lagana P, Gambuzza ME, Delia S. *Legionella* risk assessment in cruise ships and ferries. Ann Agric Environ Med 2017;24(2):276-82.
388. Mouchtouri VA, Rudge JW. Legionnaires' Disease in Hotels and Passenger Ships: A Systematic Review of Evidence, Sources, and Contributing Factors. J Travel Med 2015;22(5):325-37.
389. Collins SL, Stevenson D, Mentasti M i sur. High prevalence of *Legionella* in non-passenger merchant vessels. Epidemiol Infect 2017;145(4):647-55.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Mikroskopski prikaz legionela bojenjem po Gramu.....4
Slika 2. Prikaz kolonija *Legionella* na BCYE hranjivoj podlozi nakon 10 dana inkubacije na 37 °C u modificiranoj atmosferi (2,5 % Co2).....5
Slika 3. Udio *Legionella*-negativnih i pozitivnih uzoraka, s prikazom udjela SG1 i SG 2-14 u pozitivnim uzorcima…….....68
Slika 4. Udio pojedinih serogrupa u *L. pneumophila* SG 2-14 pozitivnim izolatima…69
Slika 5. Godišnja distribucija broja ispitanih uzoraka na pokazatelj *Legionella*, s prikazom udjela pozitivnih uzoraka…….....70
Slika 6. Mjesečna distribucija broja ispitanih uzoraka na pokazatelj *Legionella*, s prikazom udjela pozitivnih uzoraka…….....71
Slika 7. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja *Legionella* u uzorcima vode po godinama ispitivanja, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05)….....72
Slika 8. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja *Legionella* u uzorcima vode po mjesecima ispitivanja, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05)…….....73
Slika 9. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja *Legionella*, u uzorcima s temperaturom vode <20 °C i ≥20 °C s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)…….....74
Slika 10. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja *L. pneumophila* SG 2-14, u uzorcima s temperaturom vode <20 °C i ≥20 °C, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)…….....75
Slika 11. Temperatura vode u odnosu na medijan (♦) i srednju vrijednost (+) broja *L. pneumophila* (SG1 *vs* SG 2-14), s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)……...76
Slika 12. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) koncentracije slobodnog rezidualnog klora (mg/L), u *Legionella*-pozitivnim i negativnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)……...……77
Slika 13. Udio uzoraka u pojedinoj kategoriji opterećenosti legionelama ..……....79
Slika 14. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) broja legionela u tri kategorije opterećenosti: niskoj, srednjoj i višoj, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i rasponom rezultata bez ekstrema (┬). Lokacije označene istim slovima statistički se značajno razlikuju (p<0,05)……..80
Slika 15. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) boje u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)……..……81
Slika 16. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) elektroprovodljivosti u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)……..……...82
Slika 17. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) klorida u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)……...83

Slika 18. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) nitrata u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)……...84
Slika 19. Srednja vrijednost (♦) i medijan (+) broja *P. aeruginosa* u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom srednje vrijednosti ± SE (□) i srednje vrijednosti ± 2SD bez ekstrema (┬)……..……..……...85
Slika 20. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) olova (crveno), kroma (zeleno) i bakra (plavo) u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)……...……86
Slika 21. Medijan (♦) i srednja vrijednost (+) UBB/37 (crveno) i UBB/22 (plavo) u *Legionella*-negativnim i pozitivnim uzorcima, s prikazom interkvartilnog raspona (25. – 75. percentil) (□) i raspona rezultata bez ekstrema (┬)…..…….……...87
Slika 22. PCA raspodjela brodova na bazi osnovnih kemijskih pokazatelja uzoraka iz sustava distribucije vode. Prikazane su prve dvije komponente (PC1 i PC2) s vektorima za 8 osnovnih kemijskih pokazatelja i supraponiranim vrijednostima logaritma koncentracije *Legionella* spp……88
Slika 23. Provedba mjera dekontaminacije na 14 brodova na kojima je utvrđena prisutnost legionela…….…….…….……89
Slika 24. Srednja vrijednost (+) i medijan (♦) Legionella u uzorcima vode s brodova prema plovnim područjima, s prikazom srednje vrijednosti±SE (□) i srednje vrijednosti ± Interval pouzdanosti bez ekstrema (┬)…….…...…….……90

Popis tablica

Tablica 1. Razine kontaminacije legionelama……...49
Tablica 2. Razine djelovanja nakon uzorkovanja *Legionell*a u sustavima tople i hladne vode (EWGLI, 2011.).....51
Tablica 3. Fenotipovi, ST i alelni profili *L. pneumophila* iz uzorka vode izoliranih s brodova/trajekta.).....70
Tablica 4. Koncentracija metala (µg/L) u ispitanim uzorcima vode …….....78

Popis pokrata

BAL - Bronhoalveolarni lavat (engl. *Bronchoalveolar Lavage*)
BCYE - puferirani agar s kvaščevim ekstraktom i ugljenom (engl. *Buffered Charchoal Yeast Extract*)
BCYE-Cys - BCYE agar bez cisteina (engl. *Buffered Charchoal Yeast Extract agar medium without L-cysteine*)
CAP - Pneumonija iz opće populacije (engl. *Community acquired pneumonia*)
CDC - Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centar for Disease Control and Prevention)*
CFU - Jedinica formirajućih kolonija (engl. *Coloy forming unit*)
CsrA - regulator za pohranu ugljika A
CO_2 - ugljikov (IV) oksid ili ugljikov dioksid
CRP - *C-reaktivni protein* (engl. *C-Reactive Protein)*
Dot/Icm T4SS- Konzervirani sustav izlučivanja IVB tipa
ECDC - Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (engl*. European Centre for Disease Prevention and Control)*
EGP - Europski gospodarski prostor
ELISA - Vezan imunosorbentni test (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)
ELDSNet - Europska mreža za nadzor legionarske bolesti (engl. *The European Legionnaires' disease Surveillance Network*)
ESCMID - Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i zarazne bolesti (engl. *The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*)
ESGLI - Studijska skupina ESCMID-a za infekcije legionelom (engl*. ESCMID Study Group for Legionella Infections*).
EU - Europska unija
EU /EGP – Zemlje Europske unije i Europskog gospodarskog prostora
EU-OSHA - Europska agencija za sigurnost i zdravlje na radu (engl. *European Agency for Safety and Health at Work*)
EWGLI - Europska radna skupina za infekcije legionelom (engl. *European Working Group for Legionella Infections*)
EWGLINET- Europska mreža nadzora za legionarsku bolest povezanu s putovanjem (engl. *the European Surveillance Scheme for Travel Associated Legionnaires' Disease*),
GVPC - Selektivn hranjia j kruta glicin vankomicin polimiksin B cikloheksimid podloga (engl. *Glycine Vancomycin Polymyxin B Cycloheximide, OXOID, Basingstoke, UK;*
HACCP - Sustavni preventivni pristup za sigurnost hrane (engl*. Hazard Analysis and Critical Control Point)*
HSP60 - Protein toplinskog šoka (engl. *Heat Shock Protein 60*)
ICA - Test imunokromatografije (engl. *Immunochromatographic Assay*)
ICP-MS - MasenI spektrometar s induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*)
IFA - Test indirektne imunofluorescencije (engl. *indirect fluorescent antibody assay*)
IFN-γ - Interferon gama (engl*. interferon-gamma*)
IL - Interleukin
IL1 - Interleukin 1
IL 6 – Interleukin 6
IL12 – Interleukin 12
IL18 – Interleukin 18
IL-1R - Receptor interleukina 1 (IL-1 R)
IWA - Međunarodna udruga voda (engl. *International Water Association*)

L - Litra
LCV - Vakuola koja sadrži legionelu *(*engl. *the Legionella-containing vacuole)*
LB - Legionarska bolest
Llb - Legionella longbeachae
Lp - Legionella pneumophila
Lqs - Sustav *Legionella* u biofilmu *(*engl. *quorum sensing system*)
mak (engl. *macrophage killing*)
mL - mililitar
mil - (engl*. macrophage-specific infectivity loci*)
µL - mikrolitar
µm - mikrometar
Mip - (engl. *Macrophage Infectivity Potentiator*)
MOMP - Glavni protein vanjske membrane (*engl. Major Outer Membrane Protein*)
NF- κB - Nuklearni faktor kapa B (engl. *Nuclear factor kappa B transcription factor*)
NK stanice - Prirođeno ubilačke stanice (engl. *Natural killer*)
non-Lp SG 1 - Druge serogrupe izuzev *Legionella pneumophila* SG1
PCR - Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*)
qPCR- Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. Quantitative *polymerase chain reaction*)
pmi - engl*. protozoan and macrophage infectivity*
pilD - engl. *coding for prepilin peptidase*
pilE - engl. *coding for the pilin protein*)
SAD - Sjedinjene američke države
SBT - Tipizacija temeljena na sekvenci DNK (engl. *Sequence-Based Typing*)
ST - Tipovi sekvenci (engl. *Sequence-Typing;* ST)
SG - Serogrupe
SRK - Slobodni rezidualni klor
SZO - Svjetska zdravstvena organizacija
TALD - Europski program nadzora legionarske bolesti povezane sa putovanjima (engl.*Travel-Associated cases of Legionnaires' Disease*).
TESSy - baza podataka Europskog sustava nadzora (engl, *The European Surveillance System*)
TLR - receptor (engl. *Toll like receptor)*
TNFα - čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. *Tumor necrosis factor-alpha*)
TNF - čimbenik nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor*)
TNFR1 - Receptor 1 čimbenika nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor receptor 1*)
TNFR2 - Receptor 2 čimbenika nekroze tumora (engl.*Tumor necrosis factor receptor 2)*
UV - Ultraljubičasto svjetlo
VOC - Hlapivi organski spojevi (engl. *Volatile Organic Compaund's*)
WHO - Svjetska zdravstvena organizacija *(engl, World Health Organisation*)
WSG - Skupine za sigurnost vode u sustavu (engl. Water Safety Group)
WSP - Plan za sigurnost vode (engl*. Water Safety Plan*).

Životopis

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Daniela Glažar Ivče
Adresa	Lopar 39 b, 51281 Lopar
Telefon	Fiksni telefon:+385 51775354; Mobilni telefon:+385 917860501
Telefaks	+385 51775354
Elektronička pošta	danielaglazar@net.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	18. lipnja 1974.

PODACI RADNOG MJESTA

Ime tvrtke	Nastavni Zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije-Ispostava/Podružnica Rab

Adresa	Palit 143a, 51280 Rab
Telefon	Fiksni telefon:+385 51776925; Mobilni telefon:+385 917860501
Telefaks	+385 51776925
Elektronička pošta	daniela.glazar-ivce@zzjzpgz.hr

RADNO ISKUSTVO

• Datumi (od – do)	2003. – danas
Ustanova zaposlenja	Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije
Naziv radnog mjesta	liječnik
Funkcija	voditelj Ispostave Rab
Područje rada	Epidemiologija, školska medicina; zdravstvena ekologija, javno zdravstvo
• Datumi (od – do)	2001. – 2003.
Ustanova zaposlenja	Dom zdravlja Rab
Naziv radnog mjesta	liječnik
Funkcija	-
Područje rada	Hitna medicina
• Datumi (od – do)	2000. – 2003.
Ustanova zaposlenja	Dom zdravlja Rab
Naziv radnog mjesta	liječnik
Funkcija	-
Područje rada	Opća medicina
• Datumi (od – do)	1999. – 2000.
Ustanova zaposlenja	Dom zdravlja Senj

Naziv radnog mjesta	liječnik
Funkcija	pripravnik
Područje rada	opća medicina
• Datumi (od – do)	1999. – 2000.
Ustanova zaposlenja	Dom zdravlja Krk
Naziv radnog mjesta	liječnik
Funkcija	pripravnik

ŠKOLOVANJE

Datum	1993. – 1999.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Ustanova	Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Zvanje	doktor medicine
Datum	1989. – 1993.
Mjesto	Senj, Hrvatska
Ustanova	Gimnazija
Zvanje	-

USAVRŠAVANJE

Godina	2020.
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet
Područje	specijalizacija iz epidemiologije uža specijalizacija iz zdravstvene ekologije
Godina	2016.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Ustanova	Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Područje	Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina

Godina	2004. - 2007.
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet
Područje	specijalizacija iz epidemiologije
Godina	2000.-2009.
Mjesto	Rijeka, Hrvatska
Ustanova	Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
Područje	Poslijediplomski studij Biomedicina- mr.sc.
Godina	2004.
Mjesto	Zagreb, Hrvatska
Ustanova	Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet
Područje	Poslijediplomski stručni studij iz školske medicine

ZNANSTVENI PROJEKTI

1. Okolišno praćenje brojnosti i raznolikosti gljiva na pješčanim plažama i moru u Primorsko-goranskoj županiji“, UNIRI-BIOMED-23-245. Financiranje: Sveučilište u Rijeci. Suradnik na projektu.
2. ”*Francisella* – molekularni mehanizmi prilagodbe na stanice ameba“, UNIRI-BIOMED-18-128. Financiranje: Sveučilište u Rijeci. Izrada doktorskog rada u sklopu projekta.
3. „ Prilagodba novoj EU Direktivi o kvaliteti vode za kupanje“, UNIRI-BIOMED-18-29. Financiranje: Sveučilište u Rijeci. Izrada doktorskog rada u sklopu projekta.
4. „ Čimbenici zdravlja u primorskom okolišu Hrvatske“ broj 062-1080315-0243. Financiranje: Sveučilište u Rijeci. Izrada magistarskog rada u sklopu projekta.

ZNANSTVENI RADOVI

1. **Glažar Ivče D,** Rončević D, Šantić M, Cenov A, Tomić Linšak D, Mićović V, Lušić D, Glad M, Ljubas D, Vukić Lušić D. Is a proactive approach to controlling *Legionella* in the environment justifled. Food Technology and Biotechnology 2021; 59 (3): 314-324.

2. Knežević M, Rončević D, Vukić Lušić D, Mihelčić M, Kogoj R, Keše D, Glad M, Cenov A, Ožanič M, **Glažar Ivče D**, Šantić M. Decreasing Pasteurization Treatment Efficiency against Amoeba-Grown *Legionella pneumophila*-Recognized Public Health Risk Factor. Int J Environ Res Public Health. 2022;19(3).

3. Farkaš, M, **Glažar Ivče, D**, Stojanović, S, Mavrinac, M, Mićović, V, Tambić, Andrašević, A. Parental knowledge and awareness linked to antibiotic use and resistance: Comparison of urban and rural population in Croatia, Microbial Drug Resistance, 2019,25 (10), pp 1430-1436.

4. **Glažar Ivče, D.** Epidemiološka analiza zaraznih bolesti u Primorsko-goranskoj županiji (magistarski rad), Rijeka, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2009.173 str.

KONGRESNA PRIOPĆENJA	1. 18.05.2023.-21.05.2023. *Dvadeseta obljetnica "Zavoda u malom " na otoku Rabu***. Glažar Ivče, Daniela**, Čapo, Nedeljka, Majstorović, Suzana, Mišić, Vladimir, Rimac, Vladimir, Šćerbe Zoran, Valovičić, Josipa, Linšak, Željko. Poster prezentacija. 5. hrvatski epidemiološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem Osijek, Hrvatska 2. 21.-22.3.2019. *Kakvoća vode za piće na brodovima*. Vukić Lušić, Darija, Javornik, Ema, Cenov, Arijana , Piškur, Vanda , Lušić Dražen, **Glažar Ivče Daniela.** Usmena sekcija. Proceedings of 8th International Conference WATER FOR ALL. Osijek: Prehrambeno tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 3. 30.8.-1.9.2019. *Prirodni ljekoviti činitelji u Hrvatskoj.* Cattunar, Albert, Rončević, Dobrica, Klarić, Davor, **Glažar Ivče, Daniela**, Paparić, Dominik, Glavaš, Jerko, Mićović, Vladimir. Usmena prezentacija. Drugi znanstveno - stručni kongres "Lječilišni turizam i prirodni ljekoviti činitelji" Rab, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije Rijeka. 4. 14.-16.6. 2019. *Zdravstveni radnici biomedicinskog profila kao stručnjaci u ispitivanju, mjerenju i procjeni rizika svjetlosnog onečišćenja.* **Glažar Ivče, Daniela**, Cattunar, Albert, Cvetković, Bruno, Mićović, Vladimir, Rončević, Dobrica, Klarić, Davor. Oralna prezentacija. Prvi znanstvenostručni kongres s međunarodnim sudjelovanjem „ Svjetlosno onečišćenje“, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko goranske županije, Rijeka 5. 30.8.-1.9.2019. *„ Zavod u malom” na otoku Rabu – prevencijom do sigurnijeg turizma***. Glažar Ivče, Daniela**, Čapo, Nedeljka, Mišić, Vladimir, Rimac, Vladimir, Majstorović, Suzana, Rončević, Dobrica, Cattunar, Albert, Vukić Lušić, Darija, Cenov, Arijana, Tomić Linšak, Dijana i sur. Oralna prezentacija. Drugi znanstveno-stručni kongres "Lječilišni turizam i prirodni ljekoviti činitelji"; Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka. 6. 30.8.-1.9.2019. *Legionella pneumophila* – novi pokazatelj zdravstvene ispravnosti vode prema prijedlogu Direktive o vodi za ljudsku potrošnju. Vukić Lušić, Darija, Cenov, Arijana, Horvat, Valentina,

Rončević, Dobrica, Šušnić, Vesna, Tomić Linšak, Dijana, **Glažar Ivče, Daniela**, Linšak, Željko. Oralna prezentacija. Drugi znanstveno-stručni kongres "Lječilišni turizam i prirodni ljekoviti činitelji" Rab, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka.

7. 24.10.2019-27.10.2019*. Znanje i stavovi o upotrebi antibiotika i otpornosti bakterija na antibiotike kod roditelja.* Farkaš, Maja, Glažar Ivče, Daniela, Stojanović, Senka, Mavrinac, Martina, Mićović, Vladimir, Tambić Andrašević, Arjana. Poster prezentacija. 12. Hrvatski kongres kliničke mikrobiologije ; 9. Hrvatski kongres o infektivnim bolestima (CROCMID 2019) Split, Hrvatska.

8. 30.08.2018.-02.09.2018**.** *Legionarska bolest – kroz prevenciju do sigurnijeg turizma***. Glažar Ivče, Daniela**, Lakošeljac, Danijela, Rončević, Dobrica, Cattunar, Albert, Vučković, Darinka, Mićović, Vladimir. Oralna prezentacija. Prvi znanstvenostručni kongres „Lječilišni turizam i prirodni ljekoviti činitelji“ Rab, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka.
9. 16.05.2019.-18.05.2019. *Epidemija scabiesa u Domu za psihički bolesne odrasle osobe Mihek u Pirovcu te povezanost sa hospitalizacijama i prijavljivanjem bolesti*. Kronja, Ljubica; **Glažar Ivče, Daniela**, Medić, Alan, Pažanin, S. Poster prezentacija. 4. hrvatski epidemiološki kongres Opatija, Hrvatska.
10. 30.08.2018.-02.09.2018. *15. godina Ispostave Rab Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko goranske županije - prevencijom do sigurnijeg turizma.* **Glažar Ivče, Daniela**, Čapo Nedeljka, Majstorović, Suzana, Mišić, Vladimir, Rimac, Vladimir, Mićović, Vladimir. Usmena prezentacija. Prvi znanstvenostručni kongres „Lječilišni turizam i prirodni ljekoviti činitelji“ Rab, Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka.
11. 30.03.2017.- 02.04.2017. *Trendovi cjepljenja- proaktivni ili reaktivni pristup javnozdravstvenih djelatnika*. Kresina, Sandro, Kružić Lulić, Andrea, Dragaš Zubalj, Nataša, Milohanić, Anton, Glibotić Kresina, Helena, Gašparović Babić, Svjetlana, Turčić, Marijana, **Glažar Ivče,**

Daniela, Rončević, Dobrica. Oralna prezentacija. 5. hrvatski kongres školske i sveučilišne medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska,

12. 30.03.2017. - 02.04.2017. *Imunizacija protiv hepatitisa B.* **Glažar Ivče, Daniela**, Lakošeljac, Danijela, Gastović Bebić, Dorotea, Dragaš Zubalj, Nataša, Kresina, Sandro. Usmena prezentacija. 5. hrvatski kongres školske i sveučilišne medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska.
13. 24.11.2016.-24.11.2016. *Cijepljenje protiv hepatitisa B*. **Glažar Ivče, Daniela**, Kovačević, Marinka, Stojanović, Senka. Usmena prezentacija. Simpozij Virusni hepatitisi, NZZJZ PGŽ Rijeka, Hrvatska.
14. 01.10.2013.-04.10.2013.*Legionarska bolest - mjere prevencije u hotelsko-turističkim objektima Primorsko goranske županije.* Pahor, Đana, **Glažar Ivče, Daniela.** Usmena prezentacija. XVII Znanstveno-stručni skup "VODA I JAVNA VODOOPSKRBA" Lopar, Hrvatska.

STRUČNI RAD

1. **Glažar Ivče, D.** Tetanus: zaraza iz tla vreba rane. Narodni zdravstveni list. 2017; LIX (22-24): 686-687.
2. **Glažar Ivče, D**. Toksoplazmoza: opasnost za nerođeno dijete. Narodni zdravstveni list. 2012;LIV (8-10): 630-631.
3. **Glažar Ivče, D.** Salmoneloze: opreza nikada dosta. Narodni zdravstveni list, 2009; LI (16-18): 592-593.
4. **Glažar Ivče, D.** Denga i chinkungunya: Tropske bolesti. Narodni zdravstveni list, 2019. LXI (12-15):712-713.

OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinji jezik	Hrvatski

Strani jezici

Jezik	Slovenski	Engleski	Talijanski	Njemački
Govori	B1	B1	A1	A1
Piše	A2	B1	A1	A1
Čita	C1	B2	A1	A1

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE	Microsoft office (Word, Excel, Power Point).

ČLANSTVA	Hrvatsko epidemiološko društvo Hrvatsko društvo za školsku i sveučilišnu medicinu, Hrvatsko društvo za zdravstvenu ekologiju, Hrvatsko društva za biosigurnost i biozaštitu HLZ.

VOZAČKA DOZVOLA	B kategorija