

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Dobrica Rončević

RAŠIRENOST LEGIONELA U SUSTAVIMA S VODOM
PRIORITETNIH OBJEKATA U PRIMORSKO-GORANSKOJ
ŽUPANIJI TE UTJECAJ ŽIVOTNOG CIKLUSA BAKTERIJA U
AMEBAMA NA OTPORNOST PRI POSTUPKU PASTERIZACIJE

Doktorski rad

Mentor: prof. dr. sc. Darija Vukić Lušić

Komentor: prof. dr. sc. Marina Šantić

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Dobrica Rončević

PREVALENCE OF *LEGIONELLA* IN THE WATER SYSTEMS OF
PRIORITY FACILITIES IN PRIMORJE-GORSKI KOTAR
COUNTY AND THE INFLUENCE OF THE LIFE CYCLE OF
BACTERIA WITHIN AMOEBAE ON RESISTANCE DURING
PASTEURISATION

Doctoral thesis

Mentor: Professor Darija Vukić Lušić, PhD

Comentor: Professor Marina Šantić, PhD

Rijeka, 2026.

Mentor rada:

prof. dr. sc. Darija Vukić Lušić, dipl. sanit. ing.

Komentor:

prof. dr. sc. Marina Šantić, dipl. sanit. ing.

Doktorski rad obranjen je dana _____

u/na _____

pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

Rad ima _____ listova.

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. Dio istraživanja proveden je uz novčanu potporu Primorsko-goranske županije i projekt *Legionella – novi parametar nove Direktive* te projekte HRZZ-IP-2022-10-8445, UNIRI-MZI-25-12 i UNIRI-IZ-25-82. Drugi je dio istraživanja proveden na osnovi rezultata monitoringa vode za ljudsku potrošnju koji je Nastavni zavod za javno zdravstvo prikupio u sklopu provedbe programa *Zdravstvene mjere zaštite okoliša* koji je pod nazivom *Legionella Pneumophila – monitoring i edukacija na području Primorsko-goranske županije* financirala Primorsko-goranska županija.

ZAHVALA

Osim vlastita dugogodišnjeg javnozdravstvenog rada, za odabir teme bila je presudna interdisciplinarna, plodonosna i kreativna suradnja s nizom uvaženih stručnjaka, znanstvenika i praktičara neposredno ili posredno posvećenih očuvanju i unaprjeđenju ljudskoga zdravlja i zdravstveno-ekološkoj sigurnosti okoliša. Na dugogodišnjem zalaganju za moj profesionalni i osobni razvoj, motivaciji za zdravstveno-ekološke teme, kao i na prilici za stručan, znanstveni i nastavni rad, posebno zahvaljujem svojem profesionalnom uzoru i prijatelju prof. dr. sc. Vladimiru Mićoviću. Na mentorstvu i svakoj drugoj potpori i strpljenju, neizmjereno sam zahvalan mentoricama prof. dr. sc. Marini Šantić, prof. dr. sc. Dariji Vukić Lušić i izv. prof. dr. sc. Marinu Gladu, voditelju Odjela za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju. Zahvaljujem ravnatelju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ-a izv. prof. dr. sc. Željku Linšaku koji mi je pružio veliku podršku kao voditelj, kolega i prijatelj. Zahvaljujem na dugogodišnjoj izvrsnoj i plodnoj suradnji svojim dragim radnim kolegama na epidemiološkom i zdravstveno-ekološkom odjelu te u ispostavama Zavoda. Hvala kolegama iz drugih javnozdravstvenih ustanova čije je bavljenje srodnim temama u prošlosti i sadašnjosti ugrađeno u moje današnje profesionalne temelje. Hvala svim djelatnicima Medicinskog fakulteta koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovoga doktorskog rada. Hvala kolegama koje nisam osobno upoznao, ali čiji je stručan i znanstveni doprinos u znatnoj mjeri oblikovao moje profesionalno i znanstveno iskustvo. Posebno sam zahvalan svojoj supruzi Ingrid i kćeri Ileani čija su ljubav, potpora i strpljenje neiscrpan izvor motivacije i uz koje i ono što je teško postaje zadovoljstvo.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: *Legionella* spp. okolišni je patogen koji se učinkovito razmnožava i održava u tehničkim sustavima s vodom, osobito u uvjetima povoljne temperature, prisutnosti biofilma i interakcije s amebama. Cilj istraživanja bio je utvrditi učestalost i razinu kolonizacije *Legionella* spp. u različitim vodoopskrbnim i tehničkim sustavima Primorsko-goranske županije, s naglaskom na prioritetne sustave, te ispitati utjecaj unutarstaničnog rasta u *Acanthamoeba castellanii* na fenotip, genotip i termičku otpornost *L. pneumophila*.

Materijal i metode: Analizirana su 4473 uzorka vode iz sustava tople i hladne vode u zdravstvenim ustanovama, hotelima, kampovima, *wellness*-objektima, bazenima, rehabilitacijskim centrima, rashladnim tornjevima i brodovima (1932 uzorka 2013. – 2019.; 2541 uzorak 2019. – 2024.). *Legionella* spp. detektirana je kultivacijom prema HRN EN ISO 11731:2017, uz praćenje fizikalno-kemijskih parametara. Okolišni izolati *L. pneumophila* tipizirani su metodom SBT-a (*engl.* Sequence-Based Typing – metoda sekvencijske tipizacije), a fenotip je analiziran transmisijском elektronskom mikroskopijom (TEM). Eksperimentalno je ispitana otpornost izolata na pasterizaciju (50 – 63,5 °C) prije i nakon rasta u amebama.

Rezultati: Učestalost *Legionella* spp. porasla je s 8,9 % (2013. – 2019.) na 19,8 % (2019. – 2024.), uz povećanje svih stupnjeva kontaminacije 2023. – 2024. godine. Vrlo visoka kontaminacija utvrđena je u 3,4 % uzoraka, najviše u trgovačkim centrima i domovima socijalne skrbi. Najveći udio pozitivnih nalaza bio je u temperaturnom rasponu 32 – 50 °C, dok pri temperaturama > 60 °C *Legionella* nije detektirana. U prijašnjem razdoblju pozitivni nalazi bili su povezani s nižim vrijednostima klora, a u novijem se razdoblju pojavljuju i pri povišenim koncentracijama. Identificirano je šest serotipova (ST), s dominacijom ST1317. Intracelularni rast u amebama rezultirao je značajnim porastom termičke otpornosti izolata ($p < 0,01$), pri čemu alelni profili nisu pokazali promjene. TEM analizom otkrivena su tipična toplinska oštećenja, uključujući narušavanje stanične stijenke i gubitak apendiksa.

Zaključak: Unutarstanični rast u amebama značajno povećava termičku otpornost *L. pneumophila*, smanjujući učinkovitost pasterizacije i otežavajući kontrolu rizika u sustavima s vodom. Iako alelni profili ostaju stabilni, fenotipske promjene potvrđuju ključnu ulogu protozoa u stvaranju stresno otpornijih oblika bakterije. Uključivanje molekularnih metoda u rutinski nadzor nužno je za preciznu procjenu rizika i optimizaciju preventivnih mjera.

Ključne riječi: *Acanthamoeba castellanii*; nadzor nad zaštitom okoliša; *Legionella* spp.; fenotip; tipizacija sekvenciranjem; mikrobiologija vode

SUMMARY

Objective: *Legionella* is an environmental pathogen that persists in engineered water systems under favourable temperature conditions, in the presence of biofilm and through interactions with amoebae. This study aimed to determine the prevalence and degree of *Legionella* spp. colonization in various water systems in Primorje-Gorski Kotar County, with emphasis on priority facilities, and to examine the impact of intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* on the phenotype, genotype and thermal resistance of *L. pneumophila*.

Materials and methods: A total of 4473 water samples were analysed from hot and cold water systems in healthcare facilities, hotels, campsites, wellness centres, swimming pools, rehabilitation centres, cooling towers and ships (1932 samples in 2013–2019; 2541 samples in 2019–2024). *Legionella* spp. were detected by culture according to HRN EN ISO 11731:2017 with accompanying physicochemical measurements. Environmental *L. pneumophila* isolates were typed using SBT (*engl.* Sequence-Based Typing), and phenotypes assessed by TEM. Thermal resistance to pasteurization (50–63.5 °C) was evaluated before and after intracellular growth in amoebae.

Results: The prevalence of *Legionella* spp. increased from 8.9% (2013–2019) to 19.8% (2019–2024), with higher contamination levels in 2023–2024. Very high contamination occurred in 3.4% of samples, mainly in shopping centres and long-term care facilities. Most positive samples were detected at 32–50 °C, while temperatures >60 °C eliminated detection. Earlier detections correlated with low chlorine levels, whereas recent cases also appeared at higher concentrations. Six SBT types were identified, with ST1317 predominant. Intracellular growth significantly increased thermal resistance ($p < 0.01$) without altering allelic profiles. TEM revealed typical heat-induced damage, including compromised cell walls and loss of appendages.

Conclusion: Intracellular growth in amoebae substantially increases the thermal resistance of *L. pneumophila*, reducing the effectiveness of pasteurization and complicating risk management in water systems. Although allelic profiles remained stable, phenotypic alterations underline the key role of protozoa in generating more stress-resistant bacterial forms. Integration of molecular methods into routine surveillance is essential for accurate risk assessment and improved preventive strategies.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*; *Legionella*; pasteurization treatment; SBT sequence analysis; water microbiology.

SADRŽAJ:

1	UVOD	1
1.1	Povijest istraživanja	1
1.2	Putovi prijenosa i okolišni rezervoari legionela.....	3
1.3	Kliničke manifestacije infekcija uzrokovanih legionelama	4
1.3.1	Legionarska bolest	5
1.3.2	Pontijačna groznica	5
1.3.3	Ekstrapulmonalne manifestacije	6
1.4	Osnovna mikrobiološka obilježja roda <i>Legionella</i>	6
1.5	Razmnožavanje i preživljavanje legionela u okolišu.....	8
1.6	Životni ciklus u okolišu i uloga ameba	8
1.6.1	Replikativna i transmisivna faza	9
1.6.2	Abiotički čimbenici u ekologiji <i>Legionella</i> spp.	9
1.6.3	Biotički čimbenici: uloga ameba.....	9
1.7	Patogeneza u čovjeku i molekularni mehanizmi virulencije	10
1.7.1	Intracelularni mehanizmi infekcije	10
1.7.2	Amebe kao okolišni domaćini i rezervoar <i>Legionella</i>	11
1.8	Utjecaj klimatskih promjena na proliferaciju legionela	11
1.9	Regulatorni okvir i smjernice za upravljanje rizikom od legionela	12
1.9.1	Smjernice Svjetske zdravstvene organizacije (WHO)	13
1.9.2	Zakonski okvir i stručne smjernice EU-a.....	14
1.9.3	Hrvatska regulativa i smjernice.....	15
1.10	Elementi nadzora sustava vode	17
1.10.1	Fizikalni parametri	18
1.10.2	Mikrobiološki parametri	18
1.10.3	Fizikalno-kemijski parametri	19
1.10.4	Tehnička inspekcija.....	19
1.11	Upravljanje rizikom od <i>Legionella</i> spp.	20
1.11.1	Preventivni postupci.....	20
1.11.2	Nadzorni postupci	21
1.11.3	Korektivni postupci.....	21
1.12	Molekularna epidemiologija i genomika <i>Legionella</i> spp.....	23
1.12.1	Metoda sekvencijske tipizacije (SBT)	23
1.12.2	MLVA, PFGE i druge genotipizacijske metode	23
1.12.3	Cjelogenomsko sekvenciranje (WGS)	24
1.12.4	Metagenomika i nekultivirajući pristupi	25
1.12.5	Integracija molekularnih podataka u upravljanje rizikom.....	25
1.13	Iskustvo NZZJZ PGŽ-a	26
2	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	28
3	MATERIJAL I METODE	29
3.1	Prikupljanje uzoraka	29
3.1.1	Razdoblje istraživanja od 2013. – 2019.	29
3.1.2	Razdoblje istraživanja od 2019. – 2024.	30
3.2	Standardne mikrobiološke metode	30
3.2.1	Utvrđivanje i kvantifikacija <i>Legionella</i> spp. u uzorcima vode	30
3.2.2	Određivanje ukupnog broja bakterija (UBB).....	31
3.3	Fizikalno-kemijski parametri.....	32
3.3.1	Temperatura vode.....	32

3.3.2	pH vrijednost.....	32
3.3.3	Električna vodljivost	32
3.3.4	Slobodni rezidualni klor.....	33
3.4	Metode s amebama u eksperimentalnom modelu	34
3.4.1	Infekcija amebe s <i>L. pneumophila</i> i priprema bakterijskih suspenzija	34
3.4.2	Tretman pasterizacijom.....	34
3.4.3	Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM).....	34
3.4.4	Metoda sekvencijske tipizacije (SBT)	34
3.4.5	Tipizacija monoklonskim protutijelima	35
3.5	Statistička analiza.....	36
4	REZULTATI.....	37
4.1	Istraživanje pojavnosti <i>Legionella</i> spp. 2013. – 2019.	37
4.1.1	Pojavnost <i>Legionella</i> spp. u različitim vodoopskrbnim sustavima.....	37
4.1.2	Povezanost ukupnog broja bakterija i pojavnosti <i>Legionella</i> spp. u vodi.....	39
4.1.3	Utjecaj fizikalnih i kemijskih čimbenika na preživljavanje <i>Legionella</i>	40
4.2	Istraživanje pojavnosti <i>Legionella</i> spp. 2019. – 2024.	43
4.2.1	Broj uzoraka: prioritetni vs. ostali objekti.....	43
4.2.2	Udio pozitivnih uzoraka.....	45
4.2.3	Razine kontaminacije.....	47
4.2.4	Različiti sustavi potrošne vode	50
4.2.5	Bolničke ustanove	52
4.2.6	Godišnja distribucija	53
4.2.7	Vrste i sojevi.....	56
4.2.8	Utjecaj klora.....	57
4.2.9	Utjecaj temperature	58
4.3	Tipizacija i fenotipska analiza <i>Legionella</i> spp. metodom SBT-a.....	59
4.4	Rast <i>Legionella</i> u amebi <i>A. castellani</i>	60
4.5	Pasterizacija <i>Legionella</i> izolata nakon rasta na agaru i u amebama	61
4.6	Morfologija stanica	63
5	RASPRAVA	65
6	ZAKLJUČCI.....	78
7	LITERATURA.....	80

1 UVOD

Legionela je specifičan okolišni patogen čija sposobnost kolonizacije vodnih sustava proizlazi iz složene interakcije mikrobioloških mehanizama, fizikalno-kemijskih uvjeta i tehničkih karakteristika instalacija. Biološka prilagodljivost, sposobnost intracelularnog preživljavanja u amebama te zaštitna funkcija biofilma omogućuju dugotrajnu perzistenciju legionela u sustavima tople i hladne vode [1-3]. Povijesni razvoj istraživanja legionela pokazuje da je upravo epidemija u Philadelphiji 1976. bila ključan poticaj za razvoj suvremenih pristupa procjeni rizika, optimizaciju dizajna vodoopskrbnih sustava i oblikovanju međunarodnih smjernica [4, 5]. Unatoč znatnom napretku u nadzoru i prevenciji, pojavnost legioneloze u Europi i svijetu posljednjih godina neprekidno raste, što se povezuje sa zastarjelom infrastrukturom, ubrzanom urbanizacijom, klimatskim promjenama i porastom broja skupina s povećanom osjetljivošću [6, 7]. Obalne regije s visokim turističkim opterećenjem imaju posebno izražen javnozdravstveni značaj jer sezonska fluktuacija potrošnje vode, hidraulička nestabilnost i kompleksnost mreže stvaraju uvjete pogodne za kolonizaciju i sekundarno širenje bakterija [8, 9]. Razumijevanje okolišne ekologije i čimbenika rizika ključan su preduvjet za pravilno tumačenje nalaza i oblikovanje održivih strategija kontrole *Legionella* u sustavima vodoopskrbe.

Među ekološkim čimbenicima najvažniji su temperatura, pH, dostupnost hranjivih tvari, prisutnost metala i interakcije s protozoama, posebno amebama roda *Acanthamoeba* koje djeluju kao „biološki inkubator“ te značajno povećavaju rezistenciju bakterija na dezinfekciju [10-12]. Sve to pokazuje složenost okolišne ekologije legionele i potrebu za sustavnim pristupom razumijevanju čimbenika koji određuju njezinu prisutnost u različitim vodnim sustavima.

1.1 Povijest istraživanja

Povijest istraživanja legionele započela je nakon epidemije u Philadelphiji 1976., koja je potaknula globalne promjene u dizajnu vodovodnih instalacija, procjeni rizika i razvoju standarda za kontrolu kvalitete vode [4, 5]. Taj je događaj označio početak sustavnog proučavanja ekologije, patogeneze i putova prijenosa bakterija roda *Legionella*, ali i međunarodne suradnje u nadzoru legioneloze koja je poslije dovela do stvaranja europskih mreža za nadzor legionarske bolesti poput EWGLI-ja (*engl.* The European Working Group for Legionella Infections) i ECDC ELDSNet-a (*engl.* European Legionnaires' Disease Surveillance Network), ključnih za praćenje slučajeva povezanih s putovanjima.

Nakon inicijalne identifikacije patogena, istraživanja tijekom 1980-ih i 1990-ih usmjerila su se na ekologiju i okolišnu biologiju legionele i njezine sposobnosti preživljavanja u vodnim sustavima. Ubrzo je potvrđeno da su legionele prirodno prisutne u različitim slatkovodnim ekosustavima gdje obitavaju unutar složenih mikrobni zajednica i ostvaruju višestruke interakcije s drugim organizmima. Njihova sposobnost opstanka u širokom rasponu ekoloških niša, od površinskih i podzemnih voda do taloga, sedimenta i biofilma, objašnjava globalnu rasprostranjenost i često podcijenjenju prisutnost u okolišu [2, 13, 14]. Razvoj biofilma u prirodnim i antropogenim sustavima prepoznat je kao ključan okolišni mehanizam koji omogućuje dugotrajno preživljavanje bakterija, razmjenu genetskog materijala i otpornost na dezinfekciju.

Prekretnica su u razumijevanju ekologije legionele otkrića koja su upozorila na važnu ulogu slobodnoživućih ameba i drugih protozoa kao okolišnih domaćina i rezervoara. Rowbotham je već 1980. opisao intracelularni ciklus unutar ameba, što je poslije potvrđeno i dodatno prošireno radovima koji su pokazali da taj odnos povećava termičku otpornost, virulentnost i sposobnost infekcije makrofaga [12, 15, 16]. Amebe tako djeluju kao „ekološki inkubatori“ u kojima legionele prolaze fenotipske i genetske prilagodbe te se u okoliš oslobađaju u iznimno otpornim oblicima, uključujući one inkorporirane u ciste.

Razvojem tehnoloških i analitičkih alata 1990-ih i 2000-ih, uključujući lančanu reakciju polimerazom (*engl.* polymerase chain reaction, PCR), molekularnu tipizaciju (*engl.* molecular typing), sekvenciranje gena (*engl.* gene sequencing) i sekvenciranje cijeloga genoma (*engl.* whole-genome sequencing, WGS), znatno je unaprijeđeno razumijevanje filogenetskih odnosa među sojevima i prepoznavanje uzročnih sojeva tijekom izbijanja, što je omogućilo preciznije epidemiološko povezivanje okolišnih izvora i slučajeva [17, 18]. Ta su saznanja izravno utjecala na razvoj smjernica i nadzornih programa, uključujući sustave za praćenje slučajeva povezanih s putovanjima i standardizirane protokole istraživanja izbijanja.

Vjerojatnost infekcije ovisi o infektivnoj dozi, ali i o individualnim karakteristikama domaćina. Prepoznati čimbenici rizika uključuju muški spol, stariju životnu dob, pušenje, kronične bolesti, imunosupresiju i oštećenu plućnu funkciju [19, 20]. Iako se prijenos s čovjeka na čovjeka tradicionalno smatra iznimno rijetkim, izvješće iz 2016. upozorilo je na mogućnost takva prijenosa, ali bez značajnijeg epidemiološkog utjecaja [19, 21].

U posljednjim se desetljećima porast učestalosti legioneloze u Europi i svijetu povezuje s urbanizacijom, zastarjelom infrastrukturom, klimatskim promjenama i sve većim brojem

sustava koji generiraju aerosol, što je rezultiralo snažnim regulatornim odgovorom i razvojem integriranih sustava upravljanja rizikom u vodovodnim instalacijama [5, 22]. Ta kombinacija povijesnih, ekoloških, tehnoloških i regulatornih spoznaja oblikovala je suvremeno razumijevanje legionele kao kompleksnog okolišnog patogena i stvorila temelje za sustavni nadzor i prevenciju u objektima javnozdravstvenog značaja.

1.2 Putovi prijenosa i okolišni rezervoari legionela

Legionele su prirodno prisutne u različitim slatkovodnim ekosustavima gdje obitavaju u složenim mikrobnim zajednicama i ostvaruju višestruke interakcije s drugim organizmima. Njihova sposobnost opstanka u različitim ekološkim nišama, od površinskih i podzemnih voda do taloga, sedimenta i biofilma, objašnjava globalnu rasprostranjenost i često podcijenjenu prisutnost u okolišu [2, 12, 15]. U tim sustavima bakterije mogu postojati u slobodnom planktonskom obliku, ali i kao intracelularni endosimbionti različitih protozoa, što im omogućuje povećanu otpornost na stresne uvjete, uključujući temperaturne oscilacije i izloženost dezinficijensima koji bi uobičajeno inaktivirali većinu bakterijskih vrsta [23].

Legionele se na ljude najčešće prenose inhalacijom respirabilnog aerosola koji nastaje u sustavima u kojima voda cirkulira pod tlakom ili se raspršuje u obliku sitnih kapljica. Takvi se uvjeti javljaju u brojnim tehničkim instalacijama, uključujući sustave tople i hladne vode, rashladne tornjeve, ovlaživače zraka, klimatizacijske jedinice, spa-bazene, hidromasažne kade i dekorativne fontane. Zajedničko je obilježje svih tih izvora stvaranje sitnih kapljica i čestica aerosola (respirabilna frakcija, $< 5 \mu\text{m}$) koje mogu dospjeti u donje dišne putove, sve do alveola, gdje započinje ključni dio patogeneze [3, 5, 24, 25].

Osim inhalacije, sporadično su opisani slučajevi aspiracije kontaminirane vode, osobito u bolesnika s neurološkim poremećajima, oslabljenim gutanjem ili sniženim zaštitnim respiratornim refleksima. U takvim okolnostima čak i mala infektivna doza može biti dovoljna za razvoj bolesti [19, 26]. Iako su zabilježeni pojedinačni slučajevi mogućeg prijenosa s čovjeka na čovjeka, epidemiološki su marginalni i ne smatraju se relevantnim mehanizmom širenja legioneloze u populaciji [19, 26].

Vjerojatnost infekcije ovisi o infektivnoj dozi, ali i o individualnim karakteristikama izložene osobe. Starija životna dob, muški spol, kronične bolesti, pušenje i imunosupresivna stanja te prethodno oštećena plućna funkcija prepoznati su kao ključni čimbenici rizika za razvoj težih kliničkih oblika bolesti [17, 27]. Značajnu ulogu, uz to, ima i virulentni potencijal pojedinog soja, koji ovisi o njegovu sekvencijskom tipu, prisutnosti specifičnih virulentnih čimbenika i

prethodnoj proliferaciji unutar protozoa gdje bakterije stječu fenotipske značajke koje povećavaju sposobnost infekcije ljudskih makrofaga [28-30].

U sustavima s vodom biofilm je najvažniji okolišni rezervoar legionele. Riječ je o kompleksnoj, višeslojnoj strukturi koju čine mikroorganizmi i polisaharidi te organske i anorganske čestice, a koja legionele štiti od mehaničkog smicanja, hidrodinamičkih stresova, temperaturnih oscilacija, oksidativnog stresa i djelovanja kemijskih dezinficijensa. Difuzijske barijere unutar biofilma stvaraju mikroniše s trajno niskim koncentracijama biocida, a razgradni produkti drugih mikroorganizama služe kao izvor hranjivih tvari. Biofilm istodobno stvara mikrookoliš pogodan za interakciju s protozoama, čiji fagocitni mehanizmi omogućuju intracelularnu proliferaciju legionele i potiču razvoj fenotipskih obilježja povezanih s povećanom virulentnošću i otpornošću na dezinfekciju [30-36].

Na dinamiku preživljavanja legionela utječu brojni fizikalni i kemijski čimbenici, uključujući temperaturu, pH, koncentraciju hranjivih tvari, razinu klora ili drugih dezinficijensa, prisutnost metala i organskih tvari te hidrauličke karakteristike sustava, poput stagnacije i nepravilne cirkulacije. Sustavi u kojima voda stagnira ili se kreće vrlo sporim tokom posebno pogoduju rastu mikroorganizama jer omogućuju stvaranje toplinskih zona, taloga i stabilnih slojeva biofilma, čimbenika koji potiču kolonizaciju. Takvi uvjeti objašnjavaju zašto i tehnički ispravni sustavi, ako se ne održavaju pravilno, mogu u kratkom vremenu postati rezervoari legionele [5, 34, 37].

Umjetni vodni sustavi osobito su rizični jer kombiniraju toplinu, hranjive tvari, površine pogodne za razvoj biofilma, složenu mrežu cijevi te potencijalna razdoblja stagnacije. Takvi uvjeti često se javljaju u objektima javne namjene, hotelskim instalacijama, zdravstvenim ustanovama, domovima za starije osobe i sličnim okruženjima u kojima je populacija korisnika posebno osjetljiva na respiratorne infekcije uzrokovane legionelama. Zbog toga se antropogeni sustavi s vodom smatraju ključnim čimbenicima rizika, a razumijevanje njihove strukture i dinamike temelj je za učinkovitu prevenciju, kontrolu i nadzor bolesti [5, 27, 37].

1.3 Kliničke manifestacije infekcija uzrokovanih legionelama

Infekcije uzrokovane bakterijama roda *Legionella* obuhvaćaju širok i heterogen spektar kliničkih manifestacija koje se kreću od blagih, samoograničavajućih febrilnih sindroma do teških, potencijalno fatalnih pneumonija. Raznolikost kliničkih oblika proizlazi iz kombinacije čimbenika, uključujući virulentnost određenog soja, infektivnu dozu i okolišne uvjete izlaganja te individualne predispozicije domaćina. Klinički entiteti legioneloze tradicionalno se

svrstavaju u tri glavne kategorije: legionarska bolest, pontijačka groznica i ekstrapulmonalne manifestacije, pri čemu svaki oblik odražava specifične patofiziološke mehanizme i različite interakcije patogena s domaćinskim tkivima. Iako se obje primarne kliničke slike razvijaju nakon izlaganja istim okolišnim rezervoarima, njihova klinička dinamika, tijek bolesti i dijagnostičko-terapijske implikacije značajno se razlikuju, što ističe potrebu za pravodobnim prepoznavanjem i diferencijacijom [17, 27, 38].

1.3.1 Legionarska bolest

Legionarska bolest najteži je oblik legioneloze i svrstava se među atipične pneumonije visoka morbiditeta. Najčešće ju uzrokuje *L. pneumophila* serogrupa 1 [17, 18, 39], iako se klinički slučajevi uzrokovani drugim serogrupama i vrstama ne mogu zanemariti. Bolest obično započinje nespecifičnim simptomima poput povišene temperature, zimice, suhog kašlja, mijalgija i glavobolje, zbog čega se u ranim fazama često pogrešno pripisuje drugim infektivnim uzročnicima. Gastrointestinalni simptomi, uključujući proljev, mučninu i abdominalne tegobe, mogu biti izraženiji nego kod drugih pneumonija te je važna diferencijalno-dijagnostička smjernica.

Inkubacija najčešće traje od dva do deset dana, ali se dulja inkubacija bilježi kod osoba oslabljena imuniteta ili onih izloženih vrlo visokim koncentracijama bakterija [5, 40]. Radiološki se često nalaze multifokalni infiltrati, segmentalne sjene ili brza progresija zahvaćenosti pluća. Laboratorijski nalazi mogu uključivati hiponatrijemiju, povišen CRP, leukocitozu, povišene jetrene enzime i znakove sistemskog upalnog odgovora. Kod određenog broja bolesnika javljaju se i neurološke manifestacije, poput zbunjenosti, delirija ili psihotičnih simptoma, što odražava multisistemski karakter bolesti.

U težim slučajevima zabilježene su komplikacije poput akutnoga respiratornog distresnog sindroma, akutnoga bubrežnog zatajenja ili poremećaja jetrene funkcije [41, 42]. Mortalitet je znatno viši kod nozokomijalno stečenih infekcija, osobito u imunokompromitiranih pacijenata, dok se u zajednici stečeni slučajevi uz pravodobnu i adekvatnu terapiju povezuju s boljim ishodima [43, 44].

1.3.2 Pontijačka groznica

Pontijačka groznica blaži je, kratkotrajan i samoograničavajući oblik infekcije koji zahvaća veći broj izloženih osoba, osobito tijekom izbijanja povezanih s tehnološkim sustavima koji generiraju aerosol. Za razliku od legionarske bolesti, taj sindrom ne uključuje pneumoniju niti

radiološke promjene, što otežava detekciju u odsutnosti jasnog epidemiološkog konteksta. Klinička slika karakterizirana je naglim početkom povišene temperature, glavoboljom, mijalgijama, općim umorom i blagim respiratornim tegobama. Oporavak je brz, najčešće unutar dva do pet dana, a specifična antimikrobna terapija nije potrebna [39, 45, 46].

Zbog nespecifičnosti simptoma i kratka trajanja, većina slučajeva ostaje neprijavljena, što dovodi do podcjenjivanja stvarnog opsega epidemija koje uključuju pontijačku groznicu. Mehanizmi koji određuju hoće li pojedinac razviti pontijačku groznicu ili pneumoniju nisu potpuno razjašnjeni, ali se pretpostavlja da važnu ulogu ima imunološki odgovor domaćina, virulentnost soja i karakteristike inhaliranog inokuluma [26].

1.3.3 Ekstrapulmonalne manifestacije

Ekstrapulmonalne manifestacije legioneloze javljaju se rijetko, ali su klinički značajne jer gotovo uvijek ukazuju na kompromitiran imunološki status ili izrazito virulentne sojeve. Infekcija može zahvatiti srčani mišić i perikard, što rezultira miokarditisom ili perikarditisom; gastrointestinalni trakt, s mogućim hepatitisom; koštanu srž; bubrege, pri čemu može dovesti do intersticijskog nefritisa; različite dijelove središnjega živčanog sustava [17, 47, 48].

Neurološke komplikacije, iako iznimno rijetke, mogu uključivati encefalomijelitis i druge oblike neuroinfekcija, najčešće kao posljedicu hematogene diseminacije. Klinička slika tih manifestacija obično je nespecifična, što otežava dijagnosticiranje bez ciljne mikrobiološke obrade. Važnost prepoznavanja ekstrapulmonalnih manifestacija leži u potrebi za pravodobnom primjenom terapije koja učinkovito djeluje intracelularno s obzirom na to da su legionele intracelularni patogeni s izraženom sposobnošću izbjegavanja imunološke eliminacije.

1.4 Osnovna mikrobiološka obilježja roda *Legionella*

Rod *Legionella* obuhvaća gram-negativne, aerobne i nesporogene bakterije koje su filogenetski svrstane u porodicu *Legionellaceae*, red *Legionellales* i klasu *Gammaproteobacteria*. Zbog relativno skromnih nutritivnih zahtjeva i iznimne prilagodljivosti različitim vodenim okolišima, ove bakterije imaju visoku sposobnost preživljavanja i širenja u prirodnim i umjetnim sustavima. Do danas je opisano više od šezdeset vrsta roda *Legionella*, no samo je manji dio klinički značajan, pri čemu je *L. pneumophila* najčešće izolirana vrsta u slučajevima legionarske bolesti u Europi i Sjedinjenim Američkim Državama [6, 49, 50].

Serotipizacija unutar vrste *L. pneumophila* temelji se na razlikama u lipopolisaharidnim antigenima stanične stijenke, a do sada je identificirano 16 serogrupa. Najznačajnija je serogrupa 1 (SG1), koja je odgovorna za najveći udio kliničkih bolesti i često povezana s visokim virulentnim potencijalom. Unutar SG1 postoje brojne podskupine, uključujući Philadelphia, Knoxville i OLDA, koje su prepoznate kao dominantne u određenim geografskim područjima ili specifičnim okolišnim nišama [51].

Morfološki, legionele pokazuju izražen pleomorfizam. U optimalnim uvjetima rasta pojavljuju se kao kokobacilarni oblici dužine 2 – 5 µm, a u stresnim uvjetima, poput smanjene hranjivosti ili izloženosti dezinfekcijskim sredstvima, prelaze u izdužene filamentozne oblike dužine i iznad 20 µm. Takve morfološke prilagodbe omogućuju bolje preživljavanje u uvjetima okolišnog stresa te olakšavaju integraciju u strukturu biofilma. Pokretljivost im osigurava polarno smješten bič, a površinske strukture poput pili i membranskih proteina olakšavaju prijanjanje na površine i interakciju s protozoama.

Najvažnije je obilježje roda *Legionella* sposobnost intracelularnog života i razmnožavanja unutar slobodnoživućih protozoa, osobito rodova *Acanthamoeba*, *Hartmannella* i *Naegleria*. Amebe bakterijama osiguravaju mikrookoliš koji ih štiti od nepovoljnih uvjeta – povišene temperature, niskih razina hranjivih tvari, dezinfekcijskih sredstava i mehaničkih oštećenja [11, 12]. U tom se okruženju legionele razmnožavaju intracelularno, što je posredovano Dot/Icm sustavom sekrecije tipa IV, koji sprječava fuziju fagosoma i lizosoma te omogućuje stvaranje stabilne replikativne vakuole [52-54].

Intracelularni ciklus značajno pridonosi virulentnosti jer priprema bakterije za infekciju makrofaga u ljudskim plućima i povećava njihovu otpornost na biocidne tretmane. U nepovoljnim uvjetima protozoe prelaze u oblik cista, unutar kojih *Legionella* ostaje zaštićena i dugotrajno održiva u slojevima biofilma, što je ključni mehanizam preživljavanja u vodnim sustavima [55].

Takva sposobnost opstanka u različitim mikrookolišima dodatno ističe adaptivni potencijal legionele. Jedinstvena kombinacija fizioloških, morfoloških i genetskih obilježja čini legionele iznimno uspješnim okolišnim patogenima, sposobnima za dugotrajnu kolonizaciju različitih tipova vodnih sustava. Razumijevanje njihovih temeljnih mikrobioloških svojstava ključno je za ispravnu interpretaciju okolišnih analiza i epidemioloških nalaza te za razvoj učinkovitih strategija upravljanja rizikom u vodnim sustavima.

1.5 Razmnožavanje i preživljavanje legionela u okolišu

Legionele su izrazito prilagodljivi okolišni patogeni čije je preživljavanje i umnažanje u vodnim ekosustavima rezultat kompleksne interakcije fizikalnih, kemijskih i bioloških čimbenika. Bakterije se u prirodnim i antropogenim sustavima nalaze u slobodnoj planktonskoj formi ili kao sastavni dio biofilma, gdje ostvaruju intenzivne interakcije s drugim mikroorganizmima. Takva višerazinska ekologija omogućuje im dugotrajno preživljavanje u hidraulički dinamičnim sustavima, ali i u mikrookolišima u kojima bi mnogi drugi patogeni teško opstali.

Legionele posjeduju niz metaboličkih i fizioloških prilagodbi koje omogućuju rast u temperaturnom rasponu od približno 20 do 40 °C, s optimalnim vrijednostima oko 35 °C. Temperature iznad 40 °C inhibiraju rast, iznad 45 °C dolazi do brzog smanjenja održivosti, a izloženost temperaturama višim od 60 °C rezultira relativno brzom inaktivacijom stanica. Unatoč tome, brojna istraživanja pokazala su da legionele mogu preživjeti i izrazito niske temperature, uključujući smrznute vodne sustave, pri čemu održavaju minimalnu metaboličku aktivnost sve dok se ponovno ne stvore uvjeti pogodniji za rast [56-59]. U hrvatskim vodoopskrbnim sustavima, osobito u Primorsko-goranskoj i Splitsko-dalmatinskoj županiji, utvrđeno je da temperature tople vode između 44 °C i 54 °C često omogućuju održavanje kolonizacije, osobito u zonama stagnacije [8, 9].

Uz temperaturu, kemijske karakteristike vode imaju ključnu ulogu u ekologiji legionela. Koncentracije hranjivih tvari, pH vrijednost, sadržaj teških metala, organsko opterećenje i električna vodljivost značajno utječu na brzinu rasta i sposobnost preživljavanja [57, 58]. I materijal cjevovoda utječe na kolonizaciju. Plastični materijali mogu otpuštati organske spojeve koji pogoduju razvoju biofilma, a korozijski produkti metalnih površina mogu služiti kao izvor nutrijenata [60].

1.6 Životni ciklus u okolišu i uloga ameba

Životni ciklus bakterija roda *Legionella* temelji se na izmjeni dviju funkcionalno različitih faza: replikativne i transmisivne. Te faze omogućuju prilagodbu promjenjivim uvjetima u vodnim sustavima. Dinamika ciklusa usko je povezana s okolišnim čimbenicima, osobito temperaturom, dostupnošću hranjivih tvari i hidrauličkim karakteristikama sustava. Razumijevanje ovih procesa ključno je za tumačenje ponašanja legionela u prirodnim

ekosustavima, ali i u složenim antropogenim instalacijama, uključujući sustave tople i hladne vode, rashladne tornjeve i brodske vodovodne sustave.

1.6.1 Replikativna i transmisivna faza

U povoljnim uvjetima, osobito unutar protozoa, legionele ulaze u replikativnu fazu tijekom koje se aktivno dijele i iskorištavaju metaboličke resurse domaćina. Tu fazu obilježavaju intenzivna metabolička aktivnost i smanjena pokretljivost bakterija. Kada se uvjeti pogoršaju, primjerice zbog smanjene dostupnosti hranjivih tvari ili drugih okolišnih stresova, bakterije prelaze u transmisivnu fazu, odnosno fazu prilagođenu širenju i preživljavanju izvan stanice domaćina. Transmisivnu fazu karakteriziraju povećana pokretljivost, otpornost na nepovoljne okolišne uvjete i sposobnost preživljavanja izvan stanice domaćina, što omogućuje kolonizaciju novih okolišnih niša i reinfekciju protozoa [55, 61].

1.6.2 Abiotički čimbenici u ekologiji *Legionella* spp.

Abiotički čimbenici, osobito temperatura, dostupnost hranjivih tvari i hidraulički uvjeti, utječu na prijelaz između replikativne i transmisivne faze bakterija roda *Legionella* [57, 59, 62]. Povoljni uvjeti potiču intracelularnu replikaciju, a okolišni stresovi, poput ograničene dostupnosti hranjivih tvari ili promjene temperature, potiču razvoj transmisivnog fenotipa [55, 62]. Detaljniji utjecaj pojedinih abiotičkih čimbenika na preživljavanje legionela u okolišu prikazan je u prethodnom poglavlju. Ovdje se naglasak stavlja na njihovu ulogu u regulaciji životnog ciklusa bakterije.

1.6.3 Biotički čimbenici: uloga ameba

Protozoe imaju ključnu ulogu u životnom ciklusu bakterija roda *Legionella*. Intracelularna replikacija unutar ameba ne samo da omogućuje proliferaciju bakterije nego dovodi i do fenotipskih promjena koje povećavaju njezinu otpornost na okolišne stresove te utječu na virulentni potencijal. Taj je proces ključan za razvoj transmisivnog fenotipa, povećanje otpornosti na stresne čimbenike i razvoj fenotipskih obilježja povezanih s povećanim virulentnim potencijalom bakterije [10].

Ekološki kontekst ovih interakcija posebno je važan. Amebe rodova *Acanthamoeba*, *Hartmannella* i *Naegleria* česte su u prirodnim i umjetnim vodnim sustavima, uključujući sustave tople vode, rashladne tornjeve i bolničke instalacije. U takvim okruženjima one djeluju kao prirodni rezervoari omogućujući legionelama preživljavanje u nepovoljnim uvjetima i održavanje populacije, čak i kada su slobodne bakterijske stanice izložene stresu [12, 63].

Otpornost na dezinfekciju dodatno naglašava javnozdravstveni značaj interakcije između legionela i ameba. Tijekom okolišnog stresa amebe prelaze u oblik cista unutar kojih legionele ostaju zaštićene od većine dostupnih dezinfekcijskih sredstava, uključujući klor. Studije su pokazale da legionele mogu preživjeti tjednima u cistama, što znatno produljuje njihovu održivost u sustavima s vodom i povećava rizik od kolonizacije [11, 64, 65].

1.7 Patogeneza u čovjeku i molekularni mehanizmi virulencije

Dot/Icm sekrecijski sustav tipa IV. (*engl.* defect for organelle trafficking / intracellular multiplication) ključni je molekularni mehanizam koji omogućuje intracelularno preživljavanje *Legionella* spp. Ovaj sustav omogućuje bakteriji manipulaciju staničnim procesima domaćina sprječavanjem fuzije fagosoma s lizosomima i stvaranjem zaštićene vakuole pogodne za njezinu replikaciju. Mehanizam razvijen tijekom intracelularnog života u amebama jedan je od ključnih čimbenika virulencije *L. pneumophila* koji omogućuje učinkovitu infekciju alveolarnih makrofaga čovjeka [16, 66].

Patogeneza legioneloze temelji se na sposobnosti bakterija roda *Legionella* da uspješno koloniziraju respiratorni sustav domaćina i razmnožavaju se unutar stanica imunološkog sustava, prvenstveno alveolarnih makrofaga. Nakon inhalacije kontaminiranog aerosola ili aspiracije vode koja sadrži bakterije, patogen dospijeva u distalni dio respiratornog trakta gdje započinje interakcija s epitelnim stanicama i stanicama fagocitnog sustava. Za razliku od mnogih drugih bakterijskih uzročnika pneumonija, *L. pneumophila* posjeduje sofisticirane mehanizme koji joj omogućuju izbjegavanje ranih obrambenih reakcija domaćina, što je jedan od temeljnih razloga težine kliničke slike.

1.7.1 Intracelularni mehanizmi infekcije

Prvi korak u invaziji uključuje adheziju bakterije na površinu makrofaga putem specifičnih proteina i površinskih struktura, nakon čega slijedi njezina internalizacija fagocitozom. Za razliku od klasičnog tijeka fagocitoze, *Legionella* uspijeva preusmjeriti unutarstanični put fagosoma sprječavajući njegovo spajanje s lizosomima. Taj ključni proces omogućuje sustav Dot/Icm tipa IV sekrecije [67, 68], čiji brojni efektorski proteini moduliraju funkcije citoskeleta, membranski promet i signalne putove domaćina, stvarajući vakuolu koja sadrži legionele (*engl.* *Legionella-containing vacuole*, LCV), unutar koje se bakterija može nesmetano razmnožavati. LCV postupno poprima obilježja endoplazmatskog retikuluma, čime se dodatno izbjegava aktivacija antimikrobnih mehanizama stanice domaćina [69].

Nakon završetka replikativne faze, tijekom koje se bakterije dijele u pogodnim uvjetima vakuole, legionele prelaze u transmisivni fenotip [70] obilježen povećanom pokretljivošću, produkcijom toksina i većom sposobnošću preživljavanja u vanjskom okolišu. U tom stadiju dolazi do lize stanice domaćina ili njezina programiranog odumiranja, pri čemu se oslobađaju novonastale bakterije koje mogu inficirati susjedne makrofage ili dospjeti u krvotok. Takav način intracelularnog preživljavanja i širenja bakterije pridonosi razvoju težih kliničkih oblika legionarske bolesti te mogućim multisistemskim manifestacijama.

Usporedno s intracelularnim razmnožavanjem, tijelo domaćina pokreće intenzivan upalni odgovor. Aktivacija citokina, infiltracija neutrofila i lokalno oštećenje plućnog parenhima odgovorni su za tipične radiološke nalaze segmentalnih ili multilobarnih infiltrata. Unatoč snažnoj upalnoj aktivnosti, klasični antimikrobni mehanizmi često su nedostatni jer se bakterija nalazi u zaštićenom intracelularnom okruženju. To objašnjava i kliničku učinkovitost antibiotika koji dobro penetriraju u makrofage, poput makrolida i fluorokinolona, u odnosu na druge skupine antimikrobnih lijekova.

1.7.2 Amebe kao okolišni domaćini i rezervoar *Legionella*

Mehanizmi intracelularnog preživljavanja koje *Legionella* koristi u amebama u velikoj su mjeri očuvani tijekom infekcije alveolarnih makrofaga čovjeka [71, 72]. Zbog toga se amebe smatraju važnim okolišnim rezervoarom i evolucijskim modelom za razvoj čimbenika virulencije ove bakterije. Intracelularni rast u protozoama povećava otpornost bakterije na nepovoljne okolišne uvjete te može pridonijeti njezinoj većoj infektivnosti nakon ulaska u ljudski organizam.

1.8 Utjecaj klimatskih promjena na proliferaciju legionela

Klimatske su promjene jedan od ključnih okolišnih čimbenika koji sve snažnije utječu na pojavnost, ekologiju i epidemiologiju legionela [73]. Porast globalnih i regionalnih temperatura, učestaliji toplinski valovi, promjene u režimima oborina te sve češći ekstremni meteorološki događaji mijenjaju uvjete u prirodnim i tehničkim sustavima s vodom te povećavaju rizik od kolonizacije i prijenosa ovih bakterija.

Posebno su osjetljivi sustavi tople vode, rashladni tornjevi, ventilacijski sustavi, ovlaživači zraka i druge instalacije koje stvaraju aerosole. Povišenje temperature produljuje razdoblja tijekom kojih takvi sustavi ostaju u temperaturnom rasponu pogodnom za proliferaciju legionela, dok toplinski valovi povećavaju njihovo opterećenje i intenzitet stvaranja aerosola.

Epidemiološki podaci iz više europskih zemalja potvrđuju porast incidencije legioneloze u toplijim mjesecima te nakon razdoblja izrazito visokih temperatura [71, 72, 74].

Klimatske promjene dodatno utječu na funkcioniranje vodoopskrbnih sustava. Dugotrajna sušna razdoblja i smanjena potrošnja vode povećavaju vrijeme zadržavanja vode u instalacijama, dok ekstremne oborine i poplave mogu promijeniti fizikalno-kemijska svojstva vode i povećati opterećenje organskom tvari. Istodobno, energetske učinkovite zgrade, projektirane za smanjenje toplinskih gubitaka, nerijetko rade pri nižim temperaturama vode, što može otežati održavanje preporučenih temperaturnih režima za kontrolu legionela i povećati rizik njihove proliferacije [5, 7, 73].

Klimatske promjene utječu i na biološke čimbenike važne za ekologiju legionele. Povišene temperature pogoduju rastu ameba i drugih protozoa [75] koje su prirodni domaćini bakterije te omogućuju njezinu intracelularnu replikaciju i dugotrajnije preživljavanje. Time se povećava mogućnost nastanka stabilnih okolišnih niša u kojima legionela može opstati unatoč primijenjenim mjerama dezinfekcije.

Poseban su javnozdravstveni izazov turistički objekti, hoteli, kampovi i putnički brodovi, u kojima sezonske promjene opterećenja sustava, razdoblja smanjenog korištenja te visoke ljetne temperature mogu povećati rizik od kolonizacije upravo u vrijeme najveće izloženosti korisnika. To je osobito važno za priobalna područja poput hrvatskoga Jadrana gdje klimatske promjene produljuju turističku sezonu i razdoblje povećanog epidemiološkog rizika.

Klimatske su promjene stoga važan čimbenik koji zahtijeva prilagodbu postojećih strategija upravljanja rizikom. Integracija klimatskih pokazatelja u procjenu rizika, učestaliji monitoring i sezonski prilagođene mjere održavanja sustava s vodom postaju sve važniji elementi prevencije legioneloze u objektima od javnog i turističkog značaja.

1.9 Regulatorni okvir i smjernice za upravljanje rizikom od legionela

Regulatorni okvir za upravljanje rizikom od *Legionella* spp. posljednjih se desetljeća značajno razvijao usporedno s rastućim epidemiološkim spoznajama i povećanjem broja prijavljenih slučajeva legioneloze u Europi i svijetu. Zbog složene ekologije legionele i činjenice da se kontaminacija najčešće razvija u širokom spektru tehničkih sustava koji generiraju aerosol, međunarodne i nacionalne institucije oblikovale su skup smjernica, normi i zakonskih obveza usmjerenih na prevenciju, nadzor i kontrolu ovih bakterija [5, 22, 76, 77]. Regulatorna obuhvaća

tehničke preporuke, zahtjeve za kvalitetu vode, protokole uzorkovanja, kriterije prihvatljivosti i obvezne postupke u slučaju prekoračenja mikrobioloških parametara.

U kontekstu suvremenih principa upravljanja rizikom, međunarodne smjernice sve češće uključuju i koncepte kvantitativne procjene mikrobiološkog rizika (*engl.* Quantitative Microbial Risk Assessment, QMRA) koji omogućuju integraciju okolišnih, tehničkih i epidemioloških podataka u procjenu opasnosti povezanih sa sustavima s vodom [78, 79]. Ipak, primjena QMRA modela prelazi opseg ovog istraživanja koje je usmjereno na okolišnu prevalenciju i fenotipsku otpornost bakterija.

1.9.1 Smjernice Svjetske zdravstvene organizacije (WHO)

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) među prvim je međunarodnim autoritetima koji su istaknuli važnost procjene rizika i preventivnog pristupa u upravljanju legionelama. Prema dokumentima *Guidelines for Drinking-water Quality* i *Legionella and the Prevention of Legionellosis*, upravljanje rizicima temelji se na integriranom Planu sigurnosti vode (*engl.* Water Safety Plan, WSP), pristupu koji obuhvaća identifikaciju opasnosti, procjenu rizika i definiciju kontrolnih mjera te stalnu provjeru učinkovitosti [5, 26].

WHO naglašava važnost prepoznavanja kritičnih kontrolnih točaka, uključujući dijelove sustava u kojima temperatura ulazi u zone povoljne za rast legionele, kao i sekcije s usporenim protokom ili mjestima koja generiraju aerosol, pri čemu je rizik od rasta i širenja *Legionella* spp. najveći. Ključni čimbenici rizika uključuju biofilm, temperaturni režim, materijale cjevovoda i interakciju legionela s protozoama. Pritom fizikalno-kemijski uvjeti sustava imaju jednako važnu ulogu kao i mikrobiološki.

Za razliku od regulatornih sustava koji propisuju granične vrijednosti, WHO ne definira jedinstven dopušteni broj kolonija u sustavima tople vode. Umjesto toga preporučuje državama da same postave pragove u skladu s infrastrukturu, epidemiološkom situacijom i mogućnostima nadzora. Smjernice WHO-a bile su polazište za razvoj europskog i hrvatskog regulatornog okvira i temelj su suvremenih pristupa upravljanju rizicima u sustavima s vodom.

1.9.2 Zakonski okvir i stručne smjernice EU-a

Europska unija regulira područje legionela skupom međusobno nadopunjujućih zakonodavnih i tehničkih dokumenata koji obuhvaćaju vodoopskrbu, nadzor bolesti, upravljanje rizicima u zgradama i na brodovima te standardizaciju analitičkih metoda.

Nova Direktiva o vodi za ljudsku potrošnju [76] prvi put izričito uvodi *Legionella* spp. kao obvezni parametar za praćenje u sustavima vodoopskrbe, s naglaskom na procjenu rizika i ciljano uzorkovanje na kritičnim točkama. Direktiva zahtijeva da države članice implementiraju nacionalne programe nadzora koji obuhvaćaju objekte s povećanim rizikom, uključujući zdravstvene ustanove, javne zgrade i turističke kapacitete.

Protokoli ECDC ELDSNet-a dodatno standardiziraju postupke istraživanja slučajeva legioneloze povezanih s putovanjima (*engl.* Travel-Associated Legionnaires' Disease, TALD) [22]. Ovi dokumenti definiraju kriterije za prijavu, klasifikaciju i laboratorijsku potvrdu slučajeva, kao i zahtjeve za pravodobnu komunikaciju između zemalja članica. ELDSNet pruža ujednačenu metodologiju za identifikaciju izvora infekcije, posebice u hotelima i drugim objektima koje posjećuju međunarodni putnici, čime omogućuje usporedivost podataka između država i učinkovitu prekograničnu suradnju.

Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (*engl.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) krovna je stručna organizacija na europskoj razini u sklopu koje djeluje Radna skupina za legionarske bolesti (*engl.* ESCMID Study Group for *Legionella* Infections, ESGLI), specijalizirana za izradu tehničkih smjernica, laboratorijskih protokola i epidemioloških preporuka povezanih s *Legionella* spp.

Tehničke smjernice ESGLI/ESCMID grupe [80] donose detaljno operacionalizirane preporuke za upravljanje sustavima, strategije uzorkovanja i provedbu sanacijskih mjera te protokole za epidemiološka istraživanja i kontrolu izbijanja bolesti. Smjernice uključuju praktične algoritme za donošenje odluka, definicije visokorizičnih sustava, preporuke za interpretaciju laboratorijskih nalaza te kriterije za izbor najprimjerenijih intervencija. Time pružaju ključan most između regulatornih zahtjeva i njihove operativne primjene u različitim institucionalnim okruženjima, od zdravstvenih ustanova do turističkih objekata.

U području pomorskog sektora, Europski priručnik za higijenske standarde i nadzor zaraznih bolesti na putničkim brodovima (EU SHIPSAN ACT Manual) [81] definira zahtjeve za

upravljanje vodnim sustavima, uzorkovanje i sanaciju na putničkim brodovima. Priručnik obuhvaća specifične rizike vezane uz brodske sustave, uključujući ograničenja prostora, varijabilnost hidrauličkih uvjeta i složene distribucijske mreže. Osim procedura za rutinsku kontrolu i odgovore na izbijanja legioneloze, dokument pruža standardizirane protokole koji omogućavaju usklađenost među državama članicama te sigurnu primjenu sanitarnih mjera u međunarodnoj plovidbi.

Europske tehničke norme (EN 806, EN 1717, EN 10088 i EN ISO 11731) definiraju projektiranje instalacija, kontrolu povratnog toka, kompatibilnost materijala i mikrobiološke metode ispitivanja.

- EN 806 [82] obuhvaća zahtjeve za projektiranje, ugradnju, održavanje i kontrolu unutarnjih vodovodnih sustava, s naglaskom na toplinsko upravljanje, hidrauličku stabilnost i sprječavanje stagnacijskih zona pogodnih za rast legionele.
- EN 1717 [83] određuje principe zaštite od povratnog toka i kontaminacije mreže pitke vode, propisujući odgovarajuće zaštitne uređaje i kategorije rizika, osobito važne u sustavima u kojima se križaju topla i hladna voda.
- EN 10088 [84] definira tehničke karakteristike različitih vrsta nehrđajućeg čelika u kontaktu s vodom i ističe da izbor materijala utječe na razvoj biofilma i kemijsku stabilnost instalacija.
- EN ISO 11731 [85] standardizira laboratorijske postupke za izolaciju i kvantifikaciju *Legionella* spp. iz uzoraka vode, čime se osigurava usporedivost laboratorijskih rezultata i konzistentnost nadzornih programa.

1.9.3 Hrvatska regulativa i smjernice

Države članice Europske unije razvijaju vlastite smjernice u skladu s europskim zahtjevima, uz prilagodbu lokalnim epidemiološkim specifičnostima i tehničkom stanju infrastrukture. U Hrvatskoj je područje legionela uređeno kombinacijom zakonskih propisa, pravilnika i stručnih preporuka Ministarstva zdravstva, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i regionalnih zavoda za javno zdravstvo. Hrvatska regulativa usklađena je s Direktivom (EU) 2020/2184 [76] o kvaliteti vode namijenjene za ljudsku potrošnju, koja uvodi obvezu procjene rizika i mikrobiološkog nadzora u sustavima vodoopskrbe, uključujući unutarnje instalacije.

Temeljni je dokument u tom kontekstu Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analiza i monitorinzima vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/2023) [86]. Tim se pravilnikom propisuju parametri zdravstvene ispravnosti vode, metode uzorkovanja i analize te minimalni zahtjevi za praćenje kvalitete vode, čime se osigurava usklađenost s europskim standardima. Posebno je značajno da pravilnik prvi put definira referentnu vrijednost $< 1\,000$ CFU/1000 mL (CFU – *engl.* colony forming unit) za *Legionella* spp. u kućnoj vodoopskrbnoj mreži i službenim kontrolama. Na taj se način uspostavlja jedinstven i standardiziran okvir za praćenje i analizu, pri čemu je važno istaknuti da pravilnik ne definira obveznu graničnu vrijednost kao kriterij zdravstvene ispravnosti, već referentni prag koji aktivira epidemiološko postupanje i provedbu korektivnih mjera.

Dodatnu razradu donosi Pravilnik o kontroli parametara kućne vodoopskrbne mreže potrošača i drugih sustava od javnozdravstvenog značaja te o planu i programu edukacije svih dionika (NN 43/2024) [87]. U sklopu novoga zakonodavnog okvira uveden je i koncept „prioritetnih objekata“ (PO) koji obuhvaćaju velike objekte izvan kućanstava s većim brojem korisnika potencijalno izloženih rizicima povezanim s vodom, osobito objekte javne namjene. U tu skupinu ubrajaju se bolnice, lječilišta, objekti socijalne skrbi za korisnike na smještaju, škole i vrtići, hoteli i kampovi, učenički i studentski domovi, sportske dvorane, trgovački centri, kaznene ustanove i vojarne te određena pomorska plovila. Za takve je objekte propisana obvezna interna kontrola i procjena rizika te periodički monitoring *Legionella* spp. u kućnoj vodoopskrbnoj mreži, čime se dodatno naglašava njihov javnozdravstveni značaj [86-88]. Pravilnik NN 43/2024 detaljno uređuje monitoring parametara *Legionella* spp. i olova u kućnim instalacijama, učestalost uzorkovanja, minimalni broj uzoraka te preventivne i korektivne mjere. Posebno je važno što definira kategorije kontaminacije koje omogućuju postupanje prema razinama rizika:

- Zanemariva kontaminacija: < 100 CFU/1000 mL
- Srednja kontaminacija: $100 - 1000$ CFU/1000 mL
- Visoka kontaminacija: $1001 - 10\,000$ CFU/1000 mL
- Jako visoka kontaminacija: $> 10\,000$ CFU/1000 mL

Svaka kategorija povezana je s jasno definiranim postupcima, od preventivnih mjera (npr. kontrola temperature, ispiranje sustava) do zabrane korištenja sustava u slučaju jako visoke kontaminacije, uz obvezno provođenje korektivnih mjera i ponovnog uzorkovanja. Time se nacionalni okvir ne ograničava na pasivno praćenje, već uvodi proaktivni pristup upravljanju

rizikom, uključujući integraciju molekularnih metoda kao što su PCR i SBT, u skladu s preporukama ECDC-a i ELDSNet-a.

Ministarstvo zdravstva i Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ) objavljuju dodatne stručne preporuke koje operacionaliziraju zahtjeve nacionalnog i europskog zakonodavstva te pružaju praktične smjernice za različite tipove objekata. Dokument *Procjena rizika: Legionella u vodi za ljudsku potrošnju*, koji je izradilo Stručno povjerenstvo za vodu pri Ministarstvu zdravstva, definira metodološki okvir za procjenu opasnosti, prijedlog maksimalno dopuštene koncentracije (MDK), kriterije za tumačenje nalaza i pripadajuće korektivne mjere

Dokument *Preventivne mjere za smanjenje rizika od legionarske bolesti u hotelima, kampovima i marinama* [89] definira obveze turističkih objekata, uključujući upravljanje toplinskim režimima, čišćenje i dezinfekciju sustava, kontrolu rizika tijekom sezonskog otvaranja i zatvaranja te procedure uzorkovanja vode. *Smjernice za nadzor sustava tople vode u zdravstvenim ustanovama* usmjerene su na objekte s posebno osjetljivom populacijom i opisuju protokole nadzora, tumačenje nalaza i praćenje visokorizičnih točaka te usklađivanje sanitarnih i tehničkih mjera. *Preporuke za postupanje u slučaju pozitivnih nalaza Legionella spp.* definiraju korake koji se primjenjuju nakon detekcije bakterije, uključujući obvezne korektivne mjere, ponovna uzorkovanja i, prema potrebi, privremeno ograničenje uporabe određenih dijelova sustava.

U laboratorijskoj praksi, hrvatski laboratoriji primjenjuju normu HRN EN ISO 11731 za izolaciju i identifikaciju legionele [90], a molekularne metode koriste se prema preporukama operativnih protokola ECDC-a i ELDSNet-a [22]. Sustavi brodova i turističkih objekata često su predmet inspeksijskog nadzora, a u PGŽ-u posebno važnu ulogu ima Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije (NZZJZ PGŽ) koji provodi terenske obilaske, uzorkovanja, procjene rizika i edukaciju korisnika.

1.10 Elementi nadzora sustava vode

Kolonizacija sustava tople i hladne vode rezultat je kombinacije fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških čimbenika, zbog čega je nadzor tih parametara središnji element procjene rizika. Sustavi vode funkcioniraju kao kompleksne ekološke niše u kojima *L. pneumophila* može preživjeti, razmnožavati se i ulaziti u povoljnu interakciju s protozoama i biofilmom [17, 91]. Nadzor stoga obuhvaća praćenje fizikalnih, kemijskih, mikrobioloških i infrastrukturnih pokazatelja koji određuju uvjete za rast i kolonizaciju te omogućuje pravodobnu identifikaciju

odstupanja i rizičnih zona, što je temelj za donošenje učinkovitih preventivnih, korektivnih i protuepidemijskih mjera.

1.10.1 Fizikalni parametri

Fizikalni uvjeti u sustavu ključni su za rast *Legionella* spp., čiji se optimalni raspon rasta kreće između 25 i 45 °C [57, 92]. Osim temperature, na rast i perzistenciju utječe i niz drugih fizikalnih parametara sustava, od protočnih i hidrauličkih uvjeta do učinkovitosti dezinfekcije, zbog čega se ti čimbenici rutinski prate u procjeni rizika.

- Temperatura vode: temperatura iznad 50 °C inhibira rast, dok vrijednosti iznad 60 °C dovode do brze inaktivacije [5]. Europske smjernice [80] preporučuju održavanje toplih sustava iznad 55 – 60 °C i hladnih ispod 20 °C.
- Protok i hidraulički uvjeti: stagnacija vode pogoduje oslobađanju nutrijenata iz biofilma te povećava rizik od kolonizacije [93].
- Koncentracija i stabilnost dezinfekcijskog sredstva: stabilnost i koncentracija dezinfekcijskog sredstva važni su prediktori kolonizacije jer biofilm i protozoe mogu smanjiti učinkovitost dezinficijensa [94].

1.10.2 Mikrobiološki parametri

Mikrobiološki nadzor omogućuje izravnu procjenu prisutnosti *Legionella* spp. i posredno procjenjuje higijensko stanje instalacija. Osim same detekcije *Legionella* spp., mikrobiološki nadzor obuhvaća i pomoćne pokazatelje te molekularne metode tipizacije, koji zajedno omogućuju procjenu razine kontaminacije i epidemiološko povezivanje izvora i slučajeva.

- Prisutnost *Legionella* spp.: rutinsko ispitivanje provodi se u skladu s procjenom rizika i zahtjevima nacionalne regulative [86, 87], uz primjenu standardizirane laboratorijske metodologije [90] i stručnih europskih smjernica [80].
- Pomoćni mikrobiološki pokazatelji: povišene vrijednosti broja heterotrofnih bakterija (odnosno ukupan broj bakterija, UBB) (*engl.* Heterotrophic Plate Count, HPC), prisutnost *Pseudomonas* spp. i ostalih bakterija mogu ukazivati na nepovoljno mikrobno opterećenje sustava [95, 96].
- Tipizacija izolata: SBT omogućuje povezivanje okolišnih i kliničkih izolata tijekom epidemioloških istraga [97]. Naknadna nadogradnja SBT sheme uključivanjem gena

neuA dodatno je povećala diskriminacijsku moć tipizacije i time poboljšala identifikaciju izvora infekcije, osobito kod serogrupe 1 [98].

1.10.3 Fizikalno-kemijski parametri

Fizikalno-kemijski parametri oblikuju mikrookoliš unutar vodoopskrbnih sustava i izravno utječu na razvoj biofilma, stabilnost dezinfekcijskih sredstava i interakcije između mikroorganizama i materijala instalacija, te su ključan element procjene rizika za *Legionella* spp.

- pH: optimalni pH za djelotvornost klora < 7.5 ; više vrijednosti smanjuju učinkovitost dezinfekcije [95].
- Električna vodljivost: povećana vodljivost, kao pokazatelj veće mineralizacije i koncentracije otopljenih iona (Ca, Mg, metali u tragovima), može posredno pogodovati taloženju kamenca i razvoju biofilma. Nekoliko studija pokazalo je povezanost između mineralnog sastava, tvrdokornih naslaga i kolonizacije *Legionella* spp. u sustavima tople vode [9, 99-102], iako se električna vodljivost ne smatra samostalnim prediktorom rizika, nego se tumači u kombinaciji s drugim parametrima.
- Koncentracija metala i hranjivih tvari: željezo, mangan i fosfati potiču mikrobní rast i interakcije s amebama [103, 104].

Odabir parametara i učestalost praćenja moraju biti usklađeni s Direktivom (EU) 2020/2184 [76] i Pravilnikom (NN 64/2023) [86], uz dodatne ciljne pokazatelje definirane lokalnom procjenom rizika.

1.10.4 Tehnička inspekcija

Tehnička inspekcija obuhvaća sustavnu procjenu infrastrukturnih i hidrauličkih značajki vodoopskrbnog sustava, koje mogu pogodovati stagnaciji, razvoju biofilma i smanjenoj učinkovitosti dezinfekcije, te su ključan element procjene rizika za kolonizaciju *Legionella* spp.

- Mrtvi krakovi i zone stagnacije: najviši su infrastrukturni rizik i zahtijevaju uklanjanje ili rekonstrukciju [80].
- Naslage kamenca i korozije: kamenac štiti biofilm i smanjuje učinkovitost dezinfekcije, a korozija oslobađa željezo koje pogoduje rastu legionela [14].

- Biofilm: biofilm je primarno stanište *Legionella* spp. i protozoa [28]. Amebe poput *Acanthamoeba castellanii* mogu štiti bakterije od dezinfekcijskih sredstava i istodobno povećavati njihovu invazivnost [12, 61].

Integrirani pristup nadzoru omogućuje rano prepoznavanje odstupanja, ciljanu intervenciju i smanjenje rizika.

1.11 Upravljanje rizikom od *Legionella* spp.

Svi međunarodni i nacionalni regulatorni sustavi, uključujući WHO, Europsku uniju i Republiku Hrvatsku, ističu zajedničko načelo: upravljanje legionelama temelji se na procjeni rizika [76, 77, 86], a ne isključivo na mikrobiološkom uzorkovanju. Taj pristup utjelovljen je u metodologiji planova sigurnosti vode (Water Safety Plan, WSP) koju preporučuje WHO, te u obvezama koje propisuje Direktiva o vodi za piće EU-a (engl. *Drinking Water Directive* – EU DWD), čime se regulativa preusmjerava iz reaktivnog u preventivni model upravljanja.

Upravljanje rizikom od *Legionella* spp. temelji se na integriranom sustavu preventivnih, nadzornih, korektivnih i protuepidemijskih postupaka koji se provode na temelju nalaza tehničkog i mikrobiološkog nadzora, u skladu s načelima upravljanja rizikom definiranim smjernicama WHO-a [77]. Taj pristup omogućuje održavanje higijenske stabilnosti sustava vode, sprječavanje kolonizacije te pravodobno djelovanje u slučaju pozitivnih nalaza ili pojave klastera infekcija.

1.11.1 Preventivni postupci

Preventivne mjere usmjerene su na ograničavanje uvjeta pogodnih za rast *Legionella* spp. te dugoročno održavanje sustava u niskorizičnom stanju [80]. U praksi obuhvaćaju sljedeće postupke:

- Održavanje stabilnih temperatura (topla voda $\geq 55 - 60$ °C, hladna < 20 °C).
- Redovito ispiranje slabo korištenih izljevniha mjesta radi izbjegavanja stagnacije.
- Uklanjanje mrtvih krakova i hidraulička optimizacija sustava.
- Redovito čišćenje, uklanjanje naslaga i održavanje uređaja koji stvaraju aerosol.
- Konstrukcijske mjere: pravilna izolacija cjevovoda, sprječavanje miješanja vode iz sustava tople i sustava hladne vode te umanjeanje korozije i taloženja.

1.11.2 Nadzorni postupci

Nadzorni postupci obuhvaćaju sve aktivnosti kojima se provjerava učinkovitost mjera upravljanja rizikom. U okviru metodologije WSP-a (*engl. Water Safety Plan* – Plan sigurnosti vode) razlikuju se dvije razine nadzora: operativni i verifikacijski nadzor. Operativni nadzor provodi se kontinuirano kako bi se pravodobno otkrila odstupanja i slabosti u sustavu, a verifikacijski se nadzor provodi periodično radi potvrde da sustav u cjelini ispunjava ciljeve sigurnosti [105]. Operativni nadzor uključuje sljedeće aktivnosti:

- Praćenje temperature na svim ključnim točkama sustava.
- Kontrola ostatka dezinfekcijskog sredstva (slobodni klor, klor-dioksid, monokloramin).
- Fizikalno-kemijski nadzor (pH, vodljivost, sadržaj metala, mutnoća).
- Mikrobiološko uzorkovanje prema procjeni rizika.
- Pregled stanja instalacija, taloženja, korozije, zona stagnacije i izolacije.

1.11.3 Korektivni postupci

Korektivni postupci skup su ciljanih intervencija koje se provode kada nadzor upozori na povišen rizik, odstupanja od sigurnosnih parametara ili pozitivan nalaz *Legionella* spp., a usmjereni su na smanjenje kolonizacije, uklanjanje uzroka i vraćanje sustava u stabilno i kontrolirano stanje. U praksi obuhvaćaju sljedeće mjere:

- Termička dezinfekcija: primjena toplinskog šoka ($> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$) uz ispiranje svih izljevniha mjesta jedan je od najstarijih i najčešće korištenih postupaka, no njegova je učinkovitost ograničena u sustavima s razvijenim biofilmom i složenom hidrauličkom konfiguracijom, u kojima bakterije mogu preživjeti unutar zaštitnih mikrookoliša [106].
- Kemijska dezinfekcija: obuhvaća primjenu klora, klor-dioksida, monokloramina, ozona i drugih sredstava [94, 107]. Monokloramin je pokazao osobitu učinkovitost u dugotrajnoj kontroli kolonizacije [108].
- Mehaničko uklanjanje biofilma: mehaničko čišćenje površina i unutrašnjosti instalacija obvezan je prvi korak prije provedbe kemijske dezinfekcije jer povećava penetraciju biocida i uklanjanje zaštitne slojeve u kojima se *Legionella* spp. i protozoe zadržavaju [96, 109]. U praksi obuhvaća postupke poput čišćenja i dezinfekcije perlatorskih mrežica i raspršivača, ispiranja cjevovoda visokim protokom, termičkog i hidrauličkog ispiranja

visokim brzinama (*engl.* thermal i hydraulic scouring), uklanjanja kamenca te fizičkog čišćenja spremnika i bojlera.

- Strukturni nedostaci (mrtvi kutovi, hidraulika): uklanjanje mrtvih krakova, rekonstrukcija oštećenih dijelova i optimizacija cirkulacije osiguravaju dugoročnu stabilnost sustava [80, 100, 110].

1.11.3.1 Protuepidemijski postupci

Protuepidemijski postupci obuhvaćaju skup hitnih, koordiniranih aktivnosti koje se provode u situacijama povećanog rizika, primjerice pri pojavi klastera, epidemiološki povezanih slučajeva ili potvrđene kontaminacije u sustavima visokog rizika. Cilj je ovih postupaka brza identifikacija izvora, prekid prijenosa i sprječavanje daljnjeg širenja legioneloze. U praksi obuhvaćaju sljedeće mjere:

- Hitne epidemiološke i terenske istrage prema protokolima ECDC ELDSNet-a [22].
- Ciljano uzorkovanje potencijalnih izvora, osobito mjesta koja stvaraju aerosol [106].
- Hitne sanacijske mjere (termičke, kemijske ili kombinirane) [80].
- Operativna komunikacija s korisnicima i nadležnim tijelima [43].
- Aktivacije ELDSNet-a u slučaju putnički povezanih infekcija radi brze međunarodne identifikacije izvora [111].

1.11.3.2 Kombinirani dezinfekcijski postupci

Kombinirani postupci primjenjuju se u situacijama u kojima se pojedinačnim metodama ne postiže zadovoljavajući učinak, osobito u sustavima s dugotrajnom kolonizacijom i dobro razvijenim biofilmom. Ovi postupci obuhvaćaju sukcesivnu primjenu mehaničkih, termičkih i kemijskih mjera, čime se istodobno djeluje na više razina mikrookoliša i povećava vjerojatnost trajnog uklanjanja kolonizacije [108]. U praksi najčešće uključuju:

- mehaničko uklanjanje biofilma,
- termički šok,
- kemijska dezinfekcija (klor-dioksid, monokloramin).

Kombinirani pristupi imaju sinergijski učinak, jer mehaničke i termičke mjere destabiliziraju biofilm te povećavaju penetraciju kemijskih sredstava, što dovodi do učinkovitije inaktivacije bakterija [28, 103, 107]. Ovakvi postupci osobito se preporučuju u sustavima s ponavljajućim pozitivnim nalazima, uključujući bolnice, domove za starije, hotele i brodove.

1.12 Molekularna epidemiologija i genomika *Legionella* spp.

Razvoj molekularnih metoda u posljednja dva desetljeća temeljito je unaprijedio razumijevanje ekologije, virulencije i puta prijenosa bakterija roda *Legionella*. Klasične fenotipske metode i kultivacija i dalje čine osnovu laboratorijske dijagnostike, no njihova ograničena osjetljivost i sporost te nemogućnost detekcije bakterija u živom, ali nekultivabilnom stanju (*engl.* viable but non-culturable, VBNC) potaknule su primjenu naprednih molekularnih pristupa.

Ove tehnike omogućile su finiju razinu diskriminacije izolata, praćenje populacijske dinamike, identifikaciju izvora infekcije i razumijevanje evolucijskih obrazaca unutar okolišnih i kliničkih populacija [18].

1.12.1 Metoda sekvencijske tipizacije (SBT)

Sequence-Based Typing (SBT), razvijen unutar EWGLI-ja, a poslije integriran u sustav ELDSNet-a, međunarodno je prihvaćen standard za molekularnu tipizaciju *L. pneumophila*. Metoda je standardizirana definiranjem sedam genskih lokusa i uspostavom globalne baze podataka koja omogućuje međunarodnu usporedivost rezultata [98, 112].

Primjena SBT-a omogućila je značajan napredak u molekularnoj epidemiologiji, uključujući:

- identifikaciju sekvencijskih tipova (ST) i pouzdanu globalnu usporedbu izolata,
- razlikovanje putničkih (TALD) i lokalnih epidemija,
- povezivanje kliničkih i okolišnih izolata putem sustava ranog upozoravanja i protokola ELDSNet-a [22].

U europskom kontekstu najčešći su ST-ovi ST1, ST23, ST36/37 i ST62 [113]. Iako su dostupni podaci u Hrvatskoj ograničeni, u nekim manjim studijama zabilježen je ST1, no ne može se sa sigurnošću tvrditi da je dominantan na nacionalnoj razini.

1.12.2 MLVA, PFGE i druge genotipizacijske metode

Prije široka prihvaćanja SBT-a, elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (*engl.* pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) bila je zlatni standard za tipizaciju *L. pneumophila* i jedan od ključnih alata u epidemiološkim istragama izbijanja legioneloze [104]. Iako je metoda tehnički zahtjevnija i teško usporediva između laboratorija, pružala je visoku diskriminacijsku moć u usporedbi s tada dostupnim tehnikama.

MLVA (višelokusna analiza broja tandemski ponovljenih jedinica, *engl.* multi-locus variable-number tandem repeat analysis) uvedena je kao metoda koja omogućuje finiju diskriminaciju

sojeva, osobito u okolišnim populacijama s izraženom genetskom heterogenošću [114]. U opsežnim okolišnim istraživanjima MLVA često otkriva varijabilnost unutar istog sekvencijskog tipa koju SBT ne može registrirati, što omogućuje preciznije praćenje dugotrajne kolonizacije, reinfekcija i ponavljajućih izvora kontaminacije.

Unatoč dominaciji WGS-a u suvremenim molekularnim pristupima, metode PFGE i MLVA i dalje su važne u radu nacionalnih referentnih laboratorija. Njihova je primjena osobito opravdana kada sekvenciranje cijeloga genoma nije dostupno, kada je potrebno brzo usporediti izolirane sojeve s ranijim nacionalnim zbirkama ili kada se želi osigurati kontinuitet s povijesnim tipizacijskim podacima.

1.12.3 Cjelogenomsko sekvenciranje (WGS)

Zahvaljujući mogućnosti istodobne analize tisuća genskih lokusa, jednonukleotidnih polimorfizama (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP) i širih genomsko-populacijskih obrazaca, cjelogenomsko sekvenciranje (*engl.* Whole Genome Sequencing, WGS) posljednjih je godina postalo najmoćniji alat molekularne epidemiologije roda *Legionella* [18]. U usporedbi s klasičnim tipizacijskim metodama, WGS pruža superiornu razinu diskriminacije i omogućuje rekonstrukciju evolucijskih i epidemioloških odnosa s visokom razinom pouzdanosti. WGS omogućuje:

- preciznu identifikaciju izvora i razdvajanje kompleksnih epidemijskih klastera,
- razlikovanje epidemiološki nepovezanih izolata unutar istoga ST-a,
- analizu virulentnih, adaptivnih i mobilnih genskih elemenata,
- modeliranje transmisijских putova u gotovo realnom vremenu, osobito u kombinaciji s Bayesovskim pristupima i filodinamičkim pristupima temeljenim na SNP-u, koji omogućuju statističku rekonstrukciju evolucijskih i transmisijских obrazaca na temelju genomske varijabilnosti [115].

Primjena WGS-a u Europi već je imala ključnu ulogu u razrješavanju epidemijskih događaja u Njemačkoj, Ujedinjenom Kraljevstvu, Italiji i Kanadi, stvarajući poveznicu između kliničkih slučajeva i specifičnih rashladnih tornjeva, spa-objekata ili bolničkih instalacija, često u slučajevima kada tradicionalne metode nisu mogle dati odlučujući odgovor.

1.12.4 Metagenomika i nekultivirajući pristupi

Zbog činjenice da se značajan dio populacije *Legionella* spp. nalazi u VBNC stanju, klasične kultivacijske metode često podcjenjuju stvarnu razinu kontaminacije [116]. Metagenomski i ostali nekultivirajući pristupi stoga omogućuju detekciju, kvantifikaciju i analizu legionela koje se ne mogu uzgojiti standardnim laboratorijskim postupcima [117]. Metagenomske tehnike, uključujući *shotgun* metagenomiku i sekvenciranje 16S rRNA, pružaju uvid u:

- interakcije legionela i protozoa, osobito ameba koje djeluju kao okolišni rezervoari,
- mikroekološke niše unutar biofilma u kojima legionele preživljavaju i prolaze adaptivne promjene,
- strukturu i dinamiku mikrobnih zajednica koje mogu modulirati rast i virulentnost *Legionella* spp.

Uz metagenomiku, kvantitativni PCR (qPCR) (*engl.* Polymerase Chain Reaction – lančana reakcija polimerazom) i digitalni PCR (dPCR) sve se češće primjenjuju kao dopunske metode u procjeni rizika, osobito u zdravstvenim ustanovama i brodskim sustavima u kojima je pravodobna i osjetljiva detekcija ključna za upravljanje rizikom [80].

1.12.5 Integracija molekularnih podataka u upravljanje rizikom

Integracija molekularnih podataka postala je ključan element suvremenog upravljanja rizikom od legioneloze. Napredne molekularne metode, uključujući SBT, MLVA i WGS, omogućuju detaljnije razumijevanje cirkulacije sojeva, putova prijenosa i ekoloških uvjeta koji pogoduju kolonizaciji te time značajno nadopunjuju informacije dobivene klasičnim mikrobiološkim pristupima. Primjena tih metoda omogućuje:

- povezivanje okolišnih i kliničkih izolata, što je temelj epidemioloških istraga i identifikacije izvora infekcije [111, 112],
- identifikaciju sojeva povećane virulentnosti i praćenje njihova širenja u okolišu, [32]
- razlikovanje epidemioloških klastera, osobito onih unutar istog ST-a, gdje klasične metode nemaju dovoljnu razlučivost [98],
- optimizaciju preventivnih i dezinfekcijskih mjera zahvaljujući uvidu u filogenetske odnose, adaptivne gene i transmisijske putove [18, 115, 118],
- razumijevanje ekoloških obrazaca kolonizacije i reinfekcije, osobito u sustavima u kojima biofilm i protozoe omogućuju dugotrajnu perzistenciju [80].

1.13 Iskustvo NZZJZ PGŽ-a

Iskustva Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije (NZZJZ PGŽ) u nadzoru i kontroli legionela temelje se na dugogodišnjem sustavnom mikrobiološkom praćenju različitih tipova objekata, uključujući zdravstvene ustanove, hotele, turističke komplekse i sportske objekte te brodove i trajekte. Aktivnosti se provode redovnim sanitarno-mikrobiološkim nadzorima NZZJZ PGŽ-a i znanstveno-istraživačkim projektima Sveučilišta u Rijeci, čime je uspostavljen integrirani okvir koji omogućuje prikupljanje velike količine podataka iz široka spektra vodoopskrbnih sustava.

U posljednjem desetljeću zabilježena je značajna varijabilnost učestalosti detekcije *Legionella* spp., uz izraženu sezonalnost i veći udio pozitivnih nalaza u toplijem dijelu godine. Ovi obrasci u skladu su s prije objavljenim podacima za Primorsko-goransku županiju, koji pokazuju porast mikrobiološkog opterećenja i veću kontaminaciju okolišnih uzoraka tijekom ljetnih i jesenskih mjeseci [119, 120]. Lokalne analize dodatno ističu razlike među objektima te utjecaj hidrauličkih karakteristika, starosti i izvedbe instalacija na stabilnost i kolonizaciju sustava.

Posebno je vrijedan doprinos razumijevanju dinamike legionela istraživanje provedeno na vodoopskrbnim sustavima brodova i trajekata na Jadranu. U suradnji NZZJZ PGŽ-a i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci utvrđeno je da je *Legionella* spp. prisutna u 29 % uzoraka vode, uz pozitivne nalaze na 74 % ispitivanih plovila [119]. Najčešće je detektirana *L. pneumophila* SG 2-14 (74 % svih izolata), dok je ponavljajuća kontaminacija zabilježena na 26 % brodova, s najvećim intenzitetom u riječkom akvatoriju. Ti nalazi potvrđuju da su brodske sustavi izrazito kompleksni, skloni stvaranju biofilma i osjetljivi na promjene hidrauličkih i fizikalno-kemijskih uvjeta.

U dodatnim istraživanjima koje NZZJZ PGŽ-a provodi u suradnji s Medicinskim fakultetom, uz mikrobiološke parametre, prate se i fizikalno-kemijski pokazatelji (pH, vodljivost, mutnoća, rezidualni klor, koncentracije metala) koji mogu pridonijeti razvoju i održavanju kolonizacije. Integracija tih podataka omogućuje precizniju procjenu lokalnih čimbenika rizika, identifikaciju kritičnih točaka i definiranje ciljanih preventivnih i korektivnih mjera.

Tijekom višegodišnje prakse razvijeni su standardizirani protokoli procjene rizika, uključujući preporuke za preventivne postupke, redovito ispiranje instalacija, temperaturnu kontrolu i uklanjanje biofilma te primjenu termičke i kemijske dezinfekcije. Sustavno povezivanje laboratorijskih nalaza, tehničkog pregleda sustava i praćenja učinkovitosti provedenih mjera znatno je unaprijedilo upravljanje rizikom od *Legionella* spp. u Primorsko-goranskoj županiji.

Prikupljeni podaci važna su znanstvena i operativna osnova za buduća istraživanja o rasprostranjenosti i ekološkoj dinamici legionela u specifičnim uvjetima PGŽ-a, pridonoseći time razvoju učinkovitijih strategija nadzora u skladu s europskim i nacionalnim standardima.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj

Opći cilj ovog istraživanja bio je utvrditi pojavnost i razinu kolonizacije *L. pneumophila* u različitim sustavima s vodom na području Primorsko-goranske županije i ispitati utjecaj intracelularnog rasta u amebama na fenotipska i genotipska obilježja te otpornost bakterije na postupak pasterizacije.

Specifični ciljevi

U svrhu ostvarenja općeg cilja postavljene su sljedeći specifični ciljevi:

- utvrditi učestalost i razinu kolonizacije *L. pneumophila* u različitim vrstama sustava s vodom na području Primorsko-goranske županije;
- usporediti pojavnost i razine kontaminacije između dvaju istraživačkih razdoblja (2013. – 2019. i 2019. – 2024.) i procijeniti trendove kolonizacije i javnozdravstvenog rizika;
- ispitati povezanost pojavnosti *L. pneumophila* s fizikalno-kemijskim parametrima vode i učinkovitošću primijenjenih mjera kontrole;
- odrediti SBT tipove i fenotipska obilježja okolišnih izolata *L. pneumophila*;
- ispitati utjecaj intracelularnog rasta u amebama na otpornost *L. pneumophila* prema postupku pasterizacije te na eventualne promjene fenotipskih i genotipskih obilježja bakterije.

Polazište istraživanja bilo je da se pojavnost *L. pneumophila* razlikuje među vrstama sustava s vodom te da intracelularni rast u amebama povećava otpornost bakterije na toplinski stres, bez značajnih promjena njezina SBT profila.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Prikupljanje uzoraka

Uzorkovanje je obuhvatilo objekte raspoređene u cijeloj Primorsko-goranskoj županiji – priobalno područje, otoci i Gorski kotar, čime je osigurana prostorna zastupljenost različitih dijelova županije. Ispitivanjem su obuhvaćeni objekti različite namjene: zdravstvene ustanove, domovi socijalne skrbi, turistički objekti (hoteli, kampovi, apartmani i *wellness*-centri), bazeni, rehabilitacijski centri, rashladni tornjevi, brodove i drugi objekti. Odabir objekata provodio se u skladu s važećim programima monitoringa i procjenom javnozdravstvenog rizika. Istraživanje je provedeno u dva vremenska razdoblja (2013. – 2019. i 2019. – 2024.), a struktura uzorka prema vrsti objekata prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Struktura uzorka vode prema vrsti objekata tijekom istraživanja

Vrsta objekta	2013. – 2019. N (%)	2019. – 2024. N (%)
Bazeni	1091 (56,5)	–
Hoteli	333 (17,2)	536 (21,1)
Kampovi	331 (17,1)	900 (35,4)
Bolnice	–	153 (6,0)
Domovi socijalne skrbi	–	92 (3,6)
Škole	–	183 (7,2)
Vrtići	–	200 (7,9)
Sportski objekti	–	125 (4,9)
Trgovački centri	–	101 (4,0)
Učenički i studentski domovi	–	20 (0,8)
Lječilišta	24 (1,2)*	14 (0,6)
Brodovi / trajekti	68 (3,5)	96 (3,8)
Rashladni tornjevi	59 (3,1)	–
Apartmani	26 (1,3)	–
Nekategorizirani i ostali objekti	–	115 (4,5)
Ukupno	1932 (100)	2541 (100)

Razlike u zastupljenosti pojedinih vrsta objekata između dvaju istraživačkih razdoblja posljedica su proširenja programa monitoringa i uključivanja dodatnih skupina prioriternih objekata od javnozdravstvenog značaja tijekom drugog razdoblja istraživanja.

3.1.1 Razdoblje istraživanja od 2013. – 2019.

Ukupno su uzeta 1932 uzorka vode iz bazena (javnih i lječilišnih), sustava distribucije vode za piće (hoteli, apartmani, kampovi, rehabilitacijski centri, trajekti) i rashladnih tornjeva na području Primorsko-goranske županije. Uzorci su prikupljeni prije ispiranja, bez puštanja vode

i bez sterilizacije izlazne točke paljenjem (radi utvrđivanja bakterijske kolonizacije na određenoj izlaznoj točki). Uzorci su prikupljeni u sterilne boce od 1 litre, s dodatkom natrijeva tiosulfata (1 mL/L, 10 %) radi neutralizacije klora ili drugih biocida na bazi halogena. Uzorci su bili zaštićeni i transportirani u laboratorij u odgovarajućim rashlađenim spremnicima, na temperaturi od 2 do 8 °C, i ispitani na prisutnost *Legionella* spp. unutar 24 sata. Nakon detekcije u okolišnim uzorcima vode, *Legionella* spp. uzgajana je na puferiranom agaru s kvašćevim ekstraktom i aktivnim ugljenom – BCYE (*engl.* Buffered Charcoal Yeast Extract; OXOID, Basingstoke, UK).

3.1.2 Razdoblje istraživanja od 2019. – 2024.

U istraživanju provedenom od 2019. do 2024. godine prikupljen je 2541 uzorak vode iz različitih vrsta objekata na području Primorsko-goranske županije, uključujući zdravstvene i socijalne ustanove, obrazovne institucije, turističke objekte, sportske centre i brodove. Od ukupno 668 procijenjenih subjekata, odnosno pravnih osoba koje upravljaju objektima iz kategorije „prioritetni objekti“, do završetka istraživanja 2024. godine obuhvaćeno ih je 270, odnosno 40,4 % procijenjenog ukupnog broja.

Uzorci su uzimani s distribucijskih mjesta tople vode prije ispiranja, bez puštanja vode i bez sterilizacije izlazne točke (u svrhu ocjene stvarne kolonizacije točke izlaza). Uzorci su prikupljeni u sterilne polietilenske boce volumena 1 litre s dodatkom natrijeva tiosulfata (1 mL/L, 10 %) radi neutralizacije ostatnog klora i srodnih dezinfekcijskih sredstava. Transportirani su u rashlađenim kutijama na temperaturi od 2 do 8 °C, a mikrobiološka analiza provedena je unutar 24 sata od uzorkovanja. Detekcija *Legionella* spp. provedena je metodom kultivacije na BCYE podlozi.

3.2 Standardne mikrobiološke metode

3.2.1 Utvrđivanje i kvantifikacija *Legionella* spp. u uzorcima vode

Od 2013. do 2016. godine analiza je provedena u skladu s tada važećom normom ISO 11731:1998, a od 2017. primjenjuje se revidirana norma HRN EN ISO 11731:2017 [90]. Iako je došlo do formalne izmjene standarda, praktična provedba laboratorijske metode ostala je tehnički nepromijenjena. Uzorci su prethodno koncentrirani metodom membranske filtracije, pri čemu se 1 litra vode filtrirala kroz polikarbonatni filter veličine pora 0,2 µm i promjera 47 mm (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan, SAD). Nakon filtracije membrana se prenosi u sterilnu bočicu s navojnim poklopcem, koja sadrži 10 mL destilirane vode. Filter se potom

izreže sterilnim škarama radi učinkovitijeg ispiranja bakterija s filtra, a bočica se snažno tresе najmanje dvije minute kako bi se mikroorganizmi oslobodili s površine membrane.

Dobiveni koncentrat u volumenu manjem ili jednakom 5 mL prenosi se u drugu sterilnu posudu i podvrgava toplinskoj obradi u vodenoj kupelji pri temperaturi 50 ± 1 °C tijekom 30 ± 2 minute. Nakon toga, 0,1 mL termički obrađenog uzorka nanosi se na selektivni GVPC agar (glicin-vankomicin-polimiksin B-cikloheksimid; OXOID, Basingstoke, UK). Inokulirane podloge inkubiraju se do deset dana na temperaturi 36 ± 1 °C u atmosferi s povećanom vlagom i 2,5 % CO₂. Ploče se pregledavaju svaka dva do tri dana.

Kolonije koje izgledom upućuju na legionelu prenose se na puferirani ugljeni kvaščani ekstrakt agar – BCYE agar i na BCYE agar bez cisteina (BCYE-Cys; OXOID, Basingstoke, UK), kao i, prema potrebi, na druge nutritivne podloge poput krvnog agara. Inkubacija se provodi na 36 ± 1 °C tijekom manje od 48 sati. Kolonije koje rastu na BCYE agaru, ali ne i na BCYE-Cys, smatraju se potencijalnim legionelama. Njihova identifikacija potvrđuje se primjenom komercijalnog aglutinacijskog testa (DrySpot *Legionella* Latex Test, Oxoid), kojim se razlikuju *Legionella pneumophila* serogrupa 1 (SG1) i serogrupe 2-14 (SG2-14). Najniža koncentracija bakterija koju opisana metoda izolacije može detektirati iznosi 100 CFU/L.

3.2.2 Određivanje ukupnog broja bakterija (UBB)

Ukupan broj heterotrofnih bakterija (Heterotrophic Plate Count – HPC) određen je na dva načina: (1) prema normi HRN EN ISO 6222:2000 [121] koja se rutinski koristi u mikrobiologiji vode pomoću hranjive podloge s ekstraktom kvasca (Yeast Extract Agar – YEA, Biolife, Italija), uz inkubaciju na 36 ± 2 °C tijekom 44 ± 4 sata i na 22 ± 2 °C tijekom 68 ± 4 sata, i (2) korištenjem krvnog agara s ovčjom krvlju (KA) (Blood Agar – BA, Liofilchem, Italija), uz inkubaciju na 36 ± 2 °C tijekom 44 ± 4 sata i 96 ± 4 sata.

U oba slučaja 1 mL (ili odgovarajuće razrjeđenje) uzorka vode nanesen je metodom izlijevanja u Petrijevu ploču. Po završetku inkubacije kolonije porasle na agaru se izbroje, a rezultat izražava kao broj kolonija u jedinici volumena ispitivanog uzorka – CFU/mL (engl. colony-forming units). Ako se na ploči s nerazrijeđenim uzorkom kolonije ne uoče, rezultat se prikazuje kao „nije detektirano u 1 mL“. U slučajevima kada broj kolonija na ploči s najvećim korištenim razrjeđenjem premašuje 300, rezultat se navodi kao > 300 ili se procjenjuje približna vrijednost.

3.3 Fizikalno-kemijski parametri

3.3.1 Temperatura vode

Mjerenje temperature vode provodilo se tijekom cijelog razdoblja istraživanja (2013. – 2024.) u skladu sa smjernicama iz priručnika *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, poglavlje 2550 B. Metoda je posljednji put revidirana 2017. godine i prenesena bez izmjena u 24. izdanje priručnika iz 2023. [122] s obzirom na to da tehničke izmjene u postupku mjerenja nisu uvedene. Temperatura je mjerena umjerenim alkoholnim termometrom (raspon 1 – 90 °C, podjela 0,1 °C), a postupak je proveden u skladu s preporučenim standardom stabilizacije i očitavanja temperature vode na mjestu uzorkovanja.

3.3.2 pH vrijednost

pH vrijednost vode mjera je kiselosti ili lužnatosti otopine i odražava koncentraciju vodikovih iona. Vrijednosti ispod 7 označavaju kiselu, iznad 7 lužnatu, a pH 7 neutralnu reakciju. Budući da utječe na kemijsku ravnotežu, topljivost tvari, korozivnost i biološku aktivnost, kontrola pH važna je u ocjeni kakvoće vode i praćenju mogućeg zagađenja ili promjena u okolišnim i tehnološkim procesima.

Mjerenje pH vrijednosti provodilo se višekanalnim modularnim instrumentom *SevenExcellence S47* (Mettler Toledo, Njemačka), prema normi HRN EN ISO 10523:2012 [123]. Elektrometrijsko određivanje temelji se na potenciometrijskome mjerenju aktivnosti vodikovih iona pomoću kombinirane staklene elektrode.

Zbog osjetljivosti pH vrijednosti na kemijske, fizikalne i biološke promjene, preporučuje se da se mjerenje provede što je prije moguće, idealno unutar šest sati nakon uzorkovanja. Ako se analiza ne može odmah obaviti, uzorci se prikupljaju u staklene boce od 500 mL koje se prethodno ispiru uzorkom, pune do prelijevanja kako bi se uklonili zračni mjehurići te hermetički zatvaraju i čuvaju u kontroliranim uvjetima do analize.

3.3.3 Električna vodljivost

Električna vodljivost je mjera sposobnosti vodenih otopina da provode električnu struju, a ovisi o prisutnosti i koncentraciji otopljenih iona, njihovoj mobilnosti, valenciji i temperaturi. Visoke vrijednosti vodljivosti mogu upućivati na povećanu koncentraciju otopljenih soli, minerala ili drugih kontaminanata te su korisne u procjeni kemijske kvalitete vode. Promjene u vodljivosti omogućuju i uvid u moguće onečišćenje ili poremećaje u tehnološkim i prirodnim sustavima. Jedinica mjere je mikroSiemens po centimetru ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

Tijekom istraživanja (2013. – 2024.) električna vodljivost određivana je u skladu s normom HRN EN 27888:2008, koja odgovara međunarodnoj normi ISO 7888:1985, s obzirom na to da nije bilo promjena u metodologiji tijekom promatranog razdoblja. Električna vodljivost određivana je pomoću višekanalnoga modularnog instrumenta *SevenExcellence S47* (Mettler Toledo, Njemačka), u skladu s normom HRN EN 27888:2008 [124]. Instrument omogućuje mjerenje u rasponu od 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ do 10 mS/cm , s granicom kvantifikacije od 9 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Uzorci su do vrha prikupljeni u staklene boce koje su odmah zatvorene kako bi se spriječila izmjena plinova (npr. CO_2 , NH_3) s atmosferom.

Mjerenje se provodi što je prije moguće, a najkasnije unutar 24 sata od uzorkovanja. U slučaju potrebe, uzorci se do analize čuvaju u rashlađenim uvjetima. Prije mjerenja temperiraju se na sobnu temperaturu, nakon čega se isprana elektroda uranja u uzorak. Rezultati se očitavaju izravno na zaslonu instrumenta i izražavaju kao cijeli brojevi.

3.3.4 Slobodni rezidualni klor

Mjerenje slobodnoga rezidualnog klora provodilo se tijekom cijelog razdoblja istraživanja (2013. – 2024.) primjenom DPD metode i prijenosnog kolorimetra *Pocket Colorimeter™ II* (Hach, Colorado, SAD). Od 2018. mjerenje je u skladu s normom HRN EN ISO 7393-2:2018 [125] koja je u laboratorijskoj praksi zamijenila prijašnje verzije bez značajnijih tehničkih izmjena u samoj metodi. Granica kvantifikacije iznosila je 0,02 $\text{mg Cl}_2/\text{L}$.

Analiza se temelji na reakciji N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) sa slobodnim klorom pri pH vrijednosti 6,2 – 6,5, pri čemu nastaje ružičasto obojenje, a intenzitet boje mjeri se spektrometrijski. DPD reagens dostupan je u obliku praha, tableta ili tekućine, ovisno o proizvođaču. Za analizu se koriste komercijalno dostupni HACH reagensi: *DPD Free Chlorine Reagent* za slobodni klor i *DPD Total Chlorine Reagent* za ukupni klor.

Slobodni rezidualni klor udio je aktivnog klora prisutnog u vodi, koji je spreman za dezinfekcijsko djelovanje, a obuhvaća hipokloritnu kiselinu (HOCl) i hipokloritni ion (OCl^-), pri čemu je u inaktivaciji mikroorganizama HOCl znatno učinkovitija, i 80 do 100 puta. Ukupni klor uključuje zbroj slobodnog i vezanog oblika, uključujući kloramine.

Mjerenje se najčešće obavlja izravno tijekom uzorkovanja, a u iznimnim slučajevima u laboratoriju. Pri uzorkovanju je potrebno izbjeći izloženost jakom svjetlu, toplini, vibracijama i vlazi. Dva uzorka po 10 mL istodobno se pipetiraju u dvjema kivetama; jedna služi kao slijepa proba, a u drugu se dodaje DPD reagens. Ako koncentracija slobodnog klora premašuje 2,20

mg/L ili ukupnog klora 5,00 mg/L, rezultat se prikazuje kao $> 2,20$ odnosno $> 5,00$ mg/L Cl_2 , a u slučaju potrebe uzorak se razrjeđuje. Ako mjerenje nije moguće zbog zamućenosti ili izražene boje uzorka, bilježi se: „Nije moguće odrediti.“

3.4 Metode s amebama u eksperimentalnom modelu

3.4.1 Infekcija amebe s *L. pneumophila* i priprema bakterijskih suspenzija

Broj *A. castellanii* odredio se u Neubauerovoj komorici i inficirao s *L. pneumophila* AA 100 (kontrolni soj) i *L. pneumophila*, izoliranih iz uzoraka u omjeru 1 : 100 (MOI, *engl.* multiplicity of infection). U određenim vremenskim točkama nakon infekcije, stanice ameba su tretirane s 0,1 % Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, SAD) tijekom 10 min. Broj bakterija odredio se CFU metodom na BCYE agaru. Bakterije izolirane iz ameba i kontrolni soj *L. pneumophila* AA100 koristio se za ispitivanje učinka pasterizacije. Za pripremu bakterijskih suspenzija kontrolni soj *L. pneumophila* AA100 uzgojen je na BCYE agaru, a ispitivani izolati prethodno su uzgojeni u *A. castellanii* tijekom 96 sati i potom izolirani za daljnja ispitivanja.

3.4.2 Tretman pasterizacijom

L. pneumophila uzgojena na BCYE agaru i/ili u *A. castellanii* koristio se za izlaganje tretmanu pasterizacije. Suspenzije koncentracije 10^6 CFU/ml izložili su se pasterizaciji na različitim temperaturama. Broj bakterija nakon tretmana pasterizacije odredio se CFU metodom.

3.4.3 Transmisijaska elektronska mikroskopija (TEM)

Morfološke i strukturne promjene bakterija nakon uzgoja u amebama te nakon postupka pasterizacije pri 55 i 63,5 °C tijekom 10 minuta, praćene su transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM). Suspenzija se nanijela na bakrom presvučene mrežice (*engl.* carbon-coated copper grids; SPI Supplies, SAD) i kontrastirala s 2 %-tnom volframovom kiselinom. Uzorci su analizirani na TEM-u (Zeiss 902A i Philips Morgagni) u triplicatu, pri čemu je pregledano najmanje 10 vidnih polja.

3.4.4 Metoda sekvencijske tipizacije (SBT)

Deoksiribonukleinska kiselina *L. pneumophila* ekstrahirana je korištenjem Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Amplifikacija osam gena (*flaA*, *mompS*, *proA*, *asd*, *mip*, *pilE*, *neuA*, *neuAh*) provedena je korištenjem početnica (*engl.* primer) koje su ciljale osam specifičnih genskih lokusa. Iste početnice korištene su za amplifikaciju i sekvenciranje svih ciljnih sekvenci, osim za *mompS* gen gdje je početnica *mompS*-1015R upotrijebljena umjesto *mompS*-1116R za obrnutu reakciju sekvenciranja.

PCR amplifikacija provedena je u volumenima od 50 μ L. Svaka reakcijska smjesa sadržavala je 25 mM $MgCl_2$, 10 mM svakog deoksinukleotida (Applied Biosystems), 10 μ M svake početnice (Invitrogen, Life Technologies) i 5 U/ μ L AmpliTaq Gold DNK polimeraze (Applied Biosystems). Nakon inicijalne denaturacije od 5 min na 95 °C, reakcijska smjesa podvrgnuta je 35 ciklusa amplifikacije u GeneAmp PCR System 9700 termocikleru (Applied Biosystems). Svaki ciklus trajao je 30 s na 95 °C za denaturaciju, 30 s na 55 °C za hibridizaciju i 45 s na 72 °C za elongaciju. Zadnji ciklus praćen je finalnom ekstenzijom na 72 °C tijekom 10 min. Amplificirani produkti podvrgnuti su elektroforezi u 2 % agaroznom gelu i zatim pročišćeni za PCR.

Enzimsko čišćenje PCR produkta provedeno je u volumenima od 6,5 μ L korištenjem 20 U/ μ L egzonukleaze I (Thermo Scientific) i 1 U/ μ L FastAP termosenzitivne alkalne fosfataze (Thermo Scientific). Smjesa je inkubirana na 37 °C tijekom 15 min, a enzimi su inaktivirani na 80 °C tijekom 15 min. PCR analiza provedena je s uzlaznim i silaznim početnicama korištenjem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), prema uputama dostavljenim od proizvođača. Nakon inicijalne faze od 1 min na 96 °C, reakcijska smjesa podvrgnuta je 25 ciklusa amplifikacije: 10 s na 96 °C, 5 s na 50 °C i 4 min na 60 °C. Pročišćavanje produkata PCR reakcije provedeno je korištenjem BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) prema uputama dostavljenim od proizvođača.

ABI DNK sekvencer model 310 (Applied Biosystems) korišten je za analizu produkata. Analiza sekvenci provedena je korištenjem CLC Main Workbench verzije 6.2. Za sve analize podaci dobiveni s uzlaznim i silaznim početnicama kombinirani su i ručno poravnati kako bi se dobila konsenzusna sekvenca. Konsenzusne sekvence su zatim uspoređene sa sekvencama u bazi podataka EWGLI SBT-a kako bi se dodijelili brojevi alela. Za svaki je izolat kombinacija alela na svakog od osam lokusa definirana kao sekvencijski tip (SBT) ili alelni profil.

3.4.5 Tipizacija monoklonskim protutijelima

Specifičnost serogrupe *Legionella pneumophila* određena je strukturom lipopolisaharida. Neke se serogrupe mogu dalje podijeliti na MAb podgrupe korištenjem monoklonskih protutijela (MAb) koja se sastoje od šest MAb (Mab 3/1, Mab 10/6, Mab 3, Mab 8/4, Mab 20/1, Mab 26/1). Analiza je slijedila uspostavljeni algoritam koji je odobrio EWGLI, a koji svrstava *L. pneumophila* SG1 u jednu od devet podgrupa: Knoxville, Philadelphia, France/Allentown, Benidorm, OLDA, Oxford, Heysham, Camperdown i Bellingham.

Bakterijske suspenzije pripremljene su u natrijevom azidu i prilagođene na McFarlandovu skalu od 1. Na svako stakalce dodano je 15 µl bakterijskih suspenzija i sušeno na sobnoj temperaturi. Uzorci su fiksirani u acetonu tijekom 15 minuta i sušeni na sobnoj temperaturi. Na svaki uzorak dodano je 15 µl primarnog protutijela (Mab 3/1) i inkubirano tijekom 30 minuta na 37 °C. Zatim su pločice isprane dva puta PBS-om i jednom destiliranom vodom. Pločice su inkubirane sa sekundarnim protutijelima konjugiranim fluorescein-5-izotiocijanatom (FITC) tijekom 30 minuta na 37 °C i isprane dva puta puta PBS-om, jednom destiliranom vodom. Pozitivna reakcija očitovala se zelenom fluorescencijom na fluorescentnom mikroskopu.

3.5 Statistička analiza

Deskriptivna statistika prikazana je kroz relativnu učestalost, srednju vrijednost (SV), medijan, standardnu devijaciju (SD), standardnu pogrešku (SP), interkvartilni raspon (IQR, *engl.* interquartile range) i ukupni raspon. Normalnost distribucije podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Podaci su normalizirani logaritamskom transformacijom. Za skupove podataka koji nisu slijedili normalnu distribuciju primijenjeni su neparametrijski testovi: Spearmanova korelacija i Mann-Whitneyev U test (M-W U), nakon čega je primijenjen odgovarajući *post-hoc* test za višestruke nezavisne uzorke (*engl.* Comparing multiple independent samples). U eksperimentalnom dijelu istraživanja razlike prije i nakon intracelularnog rasta analizirane su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) uz Scheffeov *post-hoc* test.

Statistička analiza provedena je korištenjem softverskog paketa TIBCO Statistica 14.0.1.25 [126] uz prag statističke značajnosti postavljen na razinu od 0,05.

4 REZULTATI

4.1 Istraživanje pojavnosti *Legionella* spp. 2013. – 2019.

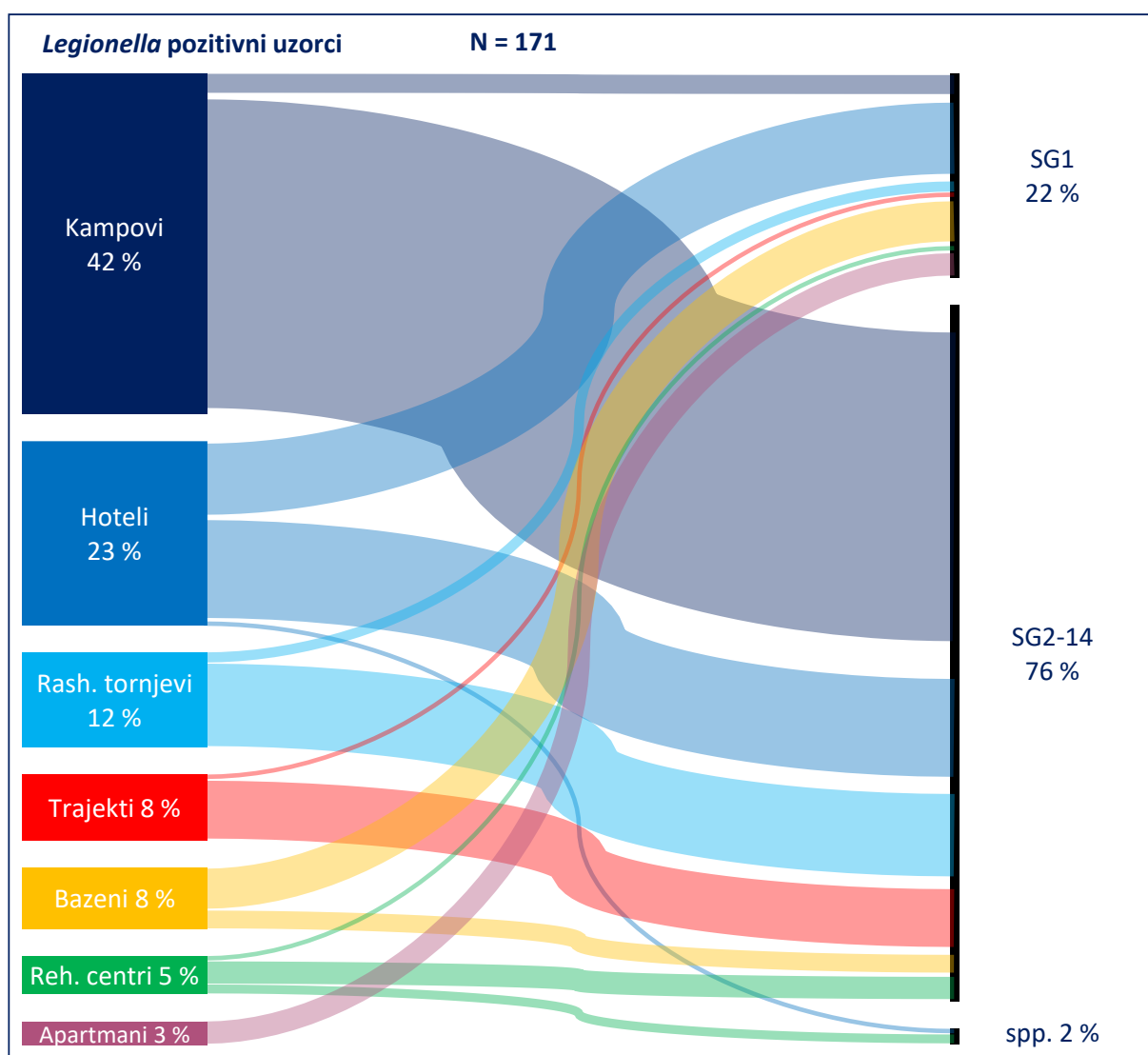
4.1.1 Pojavnost *Legionella* spp. u različitim vodoopskrbnim sustavima

Istraživana je raširenost *Legionella* spp. u sustavima za distribuciju vode na području Primorsko-goranske županije u razdoblju od 2013. do 2019. godine. Broj analiziranih uzoraka vode kretao se u rasponu od 93 u 2014. do 511 u 2019. godini. Prve tri godine istraživanja (2013. – 2015.) *Legionella* spp. nije bila utvrđena u ispitanim uzorcima. U razdoblju 2016. – 2019. prosječan udio *Legionella* spp.-pozitivnih uzoraka iznosio je 12,0 %, s najvećom zabilježenom vrijednošću od 14,6 % u 2018. godini (tablica 2.).

Tablica 2. Ukupan broj ispitanih uzoraka, broj i udio *L. pneumophila*-pozitivnih uzoraka

Godina	N	N <i>Legionella</i> -pozitivnih uzoraka	% <i>Legionella</i> -pozitivnih uzoraka
2013	333	0	0
2014	93	0	0
2015	96	0	0
2016	185	17	9,2
2017	302	42	13,9
2018	412	60	14,6
2019	511	52	10,2
Ukupno	1932	171	

Od ukupno 1932 analizirana uzorka, u 171 (8,9 %) dokazana je prisutnost *Legionella*. Uzorci su najčešće uzimani iz sljedećih objekata: bazena (N = 1091), hotela (N = 333), kampova (N = 331), trajekata (N = 68), rashladnih tornjeva (N = 59), apartmana (N = 26) i rehabilitacijskih centara (N = 24). Promatrajući udio pozitivnih uzoraka unutar pojedine vrste objekta, *Legionella* je najčešće potvrđena u rashladnim tornjevima (33,9 %) i rehabilitacijskim centrima (33,3 %), u manjem udjelu u kampovima, brodovima i apartmanima (između 19,2 % i 21,8 %), zatim u hotelima (11,7 %), a najmanje u bazenima (1,2 %). Slika 1. prikazuje relativnu zastupljenost pojedine vrste objekta unutar ukupnog broja pozitivnih uzoraka, tj. od 171 pozitivnog uzorka, najveći udio dolazi iz kampova (42 %), zatim hotela (23 %), dok, primjerice, rashladni tornjevi čine 12 % svih pozitivnih nalaza. Ti postoci razlikuju se od udjela pozitivnih uzoraka u svakom objektu i odnose se isključivo na sastav pozitivnih nalaza.

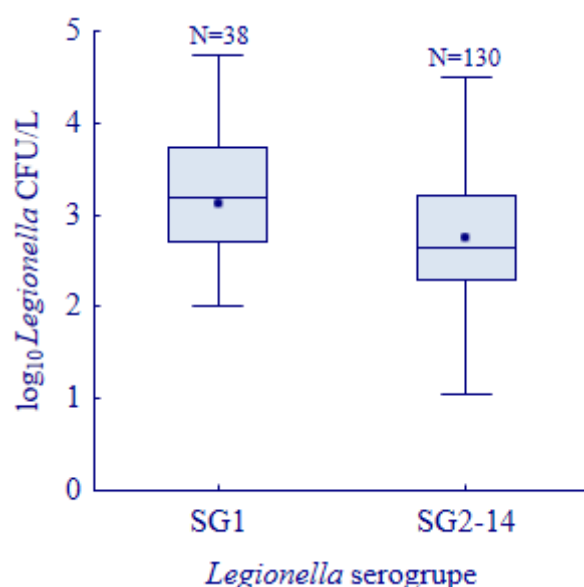


Slika 1. Raspodjela *L. pneumophila* i *Legionella* spp.-pozitivnih uzoraka prema vrstama objekata i udio serogrupa *L. pneumophila* SG1 i SG2-4 u svakom objektu. Debljina i boja vrpce koje povezuju objekte s pojedinim serogrupama proporcionalne su udjelu objekta u ukupnom broju *Legionella*-pozitivnih uzoraka (N = 171). Napomena: Prikazani postoci ne odražavaju učestalost pozitivnih nalaza u pojedinim vrstama objekata, već njihov doprinos ukupnom broju pozitivnih nalaza.

Najveći udio pozitivnih uzoraka (76,0 %; 130/171) pripadao je *L. pneumophila* SG2-14. Serogrupa (SG1) zabilježena je u 22,2 % uzoraka (38/171), dok je *Legionella* spp. bila najmanje zastupljena, s udjelom od 1,8 % (3/171). Distribucija SG1 prema vrstama objekata bila je sljedeća: u hotelima je zabilježeno 16 slučajeva (42,1 %), u bazenima 9 (23,7 %), u apartmanima 5 (13,2 %), u kampovima 4 (10,5 %), a u rashladnim tornjevima 2 slučaja (5,3 %). Po jedan slučaj (2,6 %) SG1 zabilježen je u rehabilitacijskim centrima i na trajektima. Najviši postotak *L. pneumophila* SG1 pronađen je u apartmanima (5/5; 100 %) i bazenima

(9/13; 69,2 %). S druge strane, *L. pneumophila* SG2-14 najviše je bila prisutna u kampovima (68/72; 94,4 %), trajektima (13/14; 92,9 %), rashladnim tornjevima (18/20; 90,0 %) i hotelima (22/39; 56,4 %).

Analiza je pokazala statistički značajnu razliku u razinama kontaminacije različitih serogrupa *L. pneumophila* među ispitivanim vrstama vodnih sustava (M-W U test, $Z = -2.88$; $p = 0,003$). *L. pneumophila* SG1 zabilježena je u koncentracijama od 1,0 do 4,7 log CFU/L (medijan 3,2 log CFU/L), dok su uzorci vode s *L. pneumophila* SG2-14 imali koncentracije u rasponu od 0,8 do 4,9 log CFU/L, s medijanom od 2,7 log CFU/L (slika 2.).



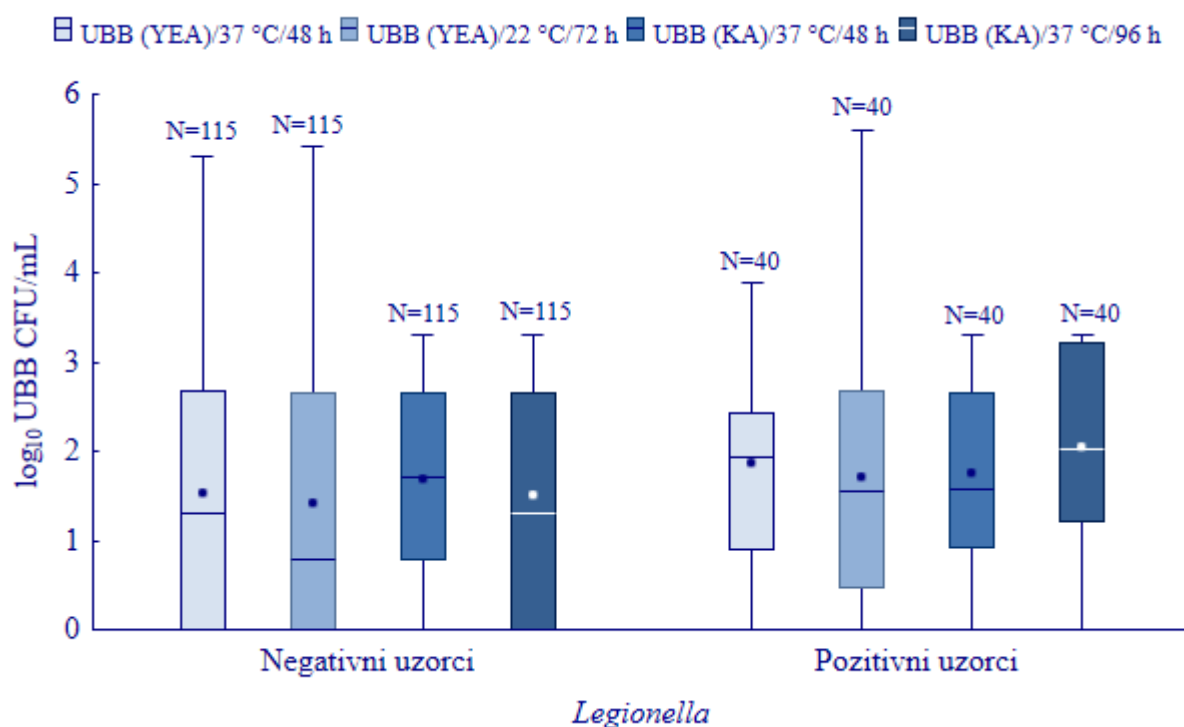
Slika 2. Usporedba koncentracija *Legionella pneumophila* u uzorcima vode prema serogrupama. Box-plotovi prikazuju logaritamske vrijednosti koncentracije (log CFU/L), pri čemu su označeni: medijan (vodoravna linija unutar okvira), srednja vrijednost (točka), kvartili (box) i interkvartilni raspon (brkovi, whiskers).

4.1.2 Povezanost ukupnog broja bakterija i pojavnosti *Legionella* spp. u vodi

Dodatno je istražena i potencijalna povezanost UBB-a s pojavom *Legionella* spp., u svrhu njegove moguće primjene kao indirektnog pokazatelja kontaminacije legionelama. Navedeni parametar obično se koristi kao indikator ukupne kvalitete vode te za procjenu učinkovitosti postupka dezinfekcije. Rutinsko mikrobiološko testiranje kvalitete vode provodi se na kvašćevom hranjivom agaru (*engl.* Yeast Extract Agar, YEA). YEA je medij bogat hranjivim tvarima, pogodan za rast širokog spektra bakterija. Osim kvašćeva agara, za određivanje UBB-a koristi se i krvni ovčji agar (KA) koji je također bogat hranjivi medij čija svojstva simuliraju

fiziološka svojstva ljudskog organizma. Stoga omogućava rast većine patogenih bakterija za čovjeka, koje mogu biti prisutne u vodenim medijima [127, 128].

Statistički značajna razlika u vrijednostima UBB-a između *Legionella*-pozitivnih i *Legionella*-negativnih uzoraka utvrđena je pri inkubaciji na krvnom agaru (KA) na $36 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 96 ± 4 sata (M-W U test, $Z = -2,30$; $p = 0,02$) (slika 3.). U istim uvjetima zabilježena je i pozitivna korelacija između UBB-a i koncentracije *Legionella* ($r_s = 2,0$; $p < 0,05$). Suprotno tome, pri inkubaciji na KA tijekom 44 sata te pri korištenju YEA medija (bez obzira na uvjete inkubacije) nije utvrđena statistički značajna povezanost UBB-a s prisutnošću ili koncentracijom *Legionella* (slika 3.).



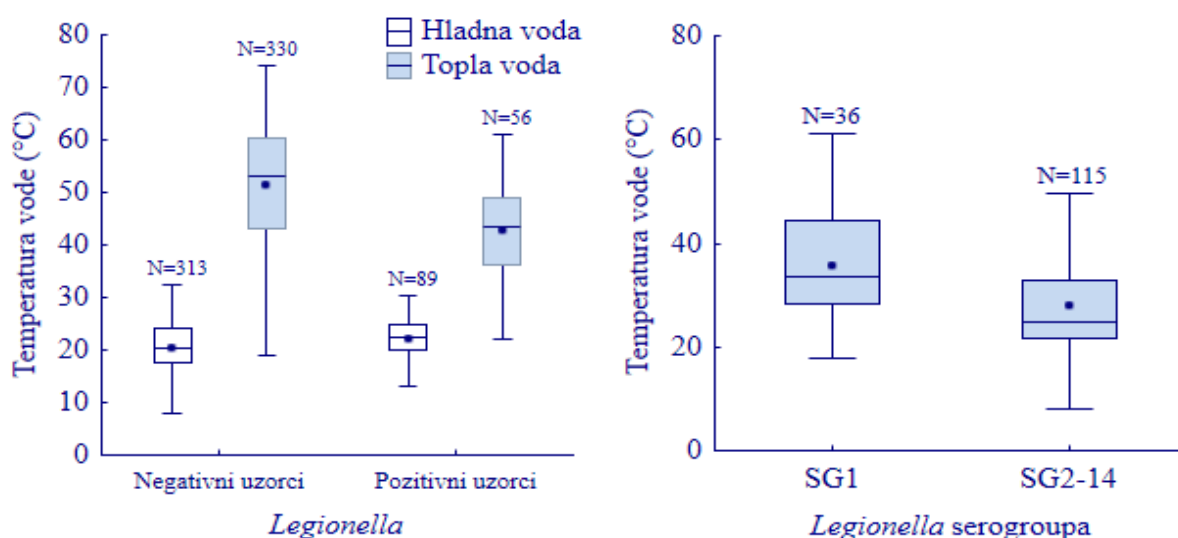
Slika 3. Ukupan broj bakterija (UBB) određivan korištenjem različitih agara i u različitim uvjetima inkubacije. *Box-plotovi* prikazuju vrijednosti medijana (vodoravna linija unutar okvira), srednjih vrijednosti (točka), kvartila (*box*) i interkvartilni raspon (brkovi, *whiskers*)

4.1.3 Utjecaj fizikalnih i kemijskih čimbenika na preživljavanje *Legionella*

Rezultati istraživanja upućuju na prisutnost *Legionella* u sustavima s hladnom vodom unutar temperaturnog raspona od $8,0$ do $35,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Istodobno, iz sustava s toplom vodom *Legionella* je izolirana pri temperaturama između $22,0$ i $61,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Mann-Whitneyevim U testom potvrđena je statistički značajna razlika u medijanima izmjerenih temperatura između *Legionella*-pozitivnih

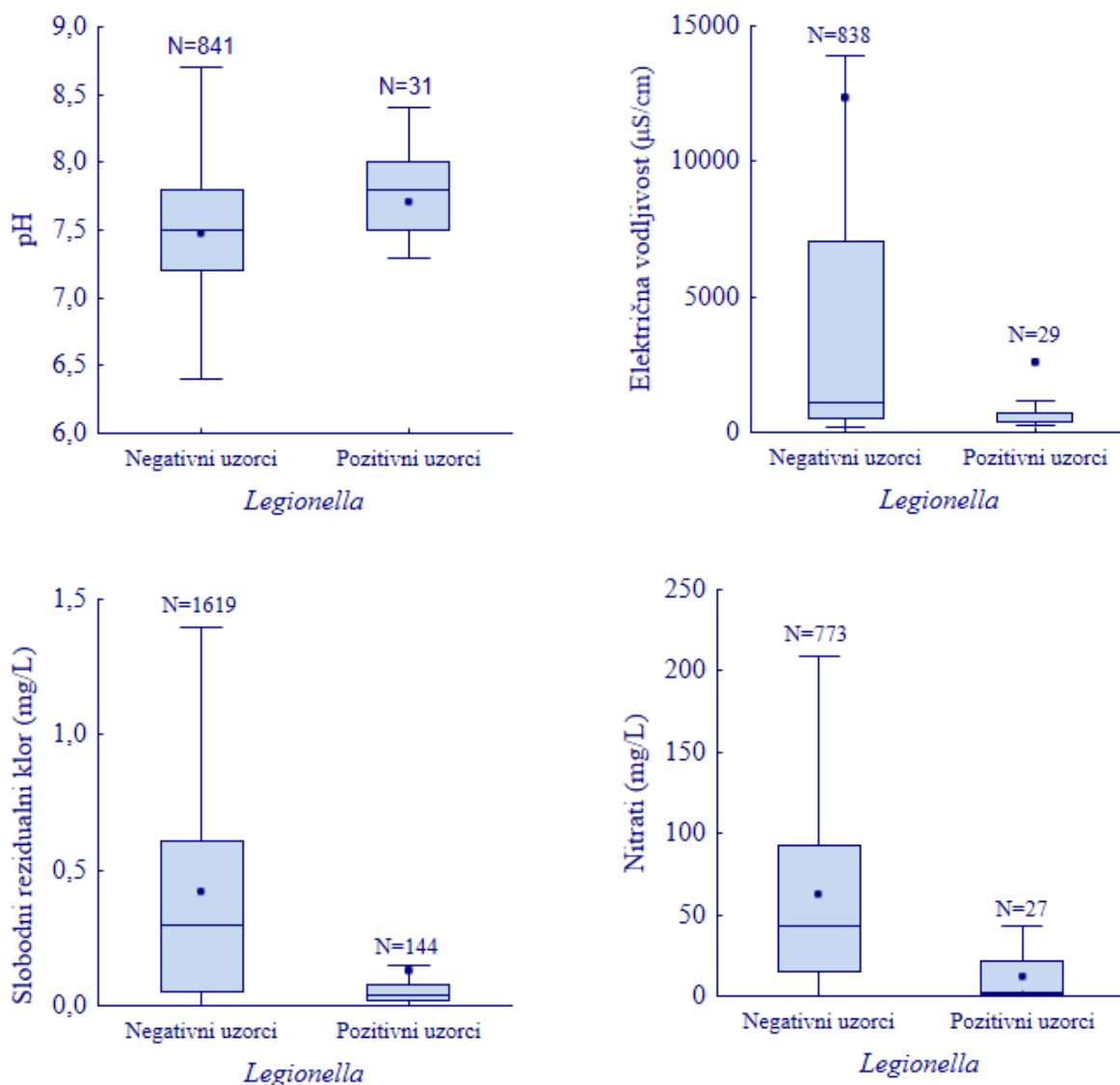
i *Legionella*-negativnih uzoraka u sustavima s hladnom ($Z = 3,30$; $p < 0,0001$) i u sustavima s toplom vodom ($Z = -5,31$; $p < 0,0001$). U sustavima s hladnom vodom medijan temperature u pozitivnim uzorcima bio je za $1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ viši u usporedbi s negativnima. Suprotno tomu, u sustavima s toplom vodom *Legionella*-pozitivni uzorci imali su medijan temperature za $9,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ niži u odnosu na *Legionella*-negativne uzorke (slika 4a).

Promatramo li prevalenciju *L. pneumophila* serogrupa u odnosu na temperaturu vode, uočavamo da je medijan vrijednosti temperature vode u uzorcima s potvrđenim sojem *L. pneumophila* SG1 za $8,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ viši u usporedbi s uzorcima pozitivnim na serogrupe 2-14 (M-W U, $Z = -3,70$, $p < 0,0002$) (slika 4.b).



Slika 4. Temperatura vode u odnosu na: (a) prisutnost *Legionella* (b) vrste *Legionella* (SG1 vs. SG2-14). *Box-plotovi* prikazuju medijane (linija), srednje vrijednosti (točka), kvartile (*box*) interkvartilni raspon (brkovi, *whiskers*).

U usporedbi s *Legionella*-negativnim uzorcima, pH vrijednosti bile su statistički značajno više u pozitivnim uzorcima (M-W U; $Z = 3,42$, $p = 0,0006$) (slika 5.a). Suprotno tome, električna vodljivost (slika 5.b; M-W U; $Z = -4,3$, $p < 0,0001$), koncentracija slobodnog rezidualnog klora (slika 5.c; M-W U; $Z = -10,00$, $p < 0,0001$) i koncentracija nitrata (slika 5.d; M-W U; $Z = -5,74$, $p < 0,0001$) imale su statistički značajno niže vrijednosti u *Legionella*-pozitivnim uzorcima u odnosu na negativne.



Slika 5. Prisutnost *Legionella* u odnosu na (a) pH vrijednost (b) električnu vodljivost (c) koncentraciju slobodnog rezidualnog klora, (d) koncentraciju nitrata. *Box-plotovi* prikazuju medijane (linija), srednje vrijednosti (točka), kvartile (*box*) interkvartilni raspon (brkovi, *whiskers*).

Rezultati pokazuju značajno više pH vrijednosti u *Legionella*-pozitivnim uzorcima (M-W U, $Z = 3,41$, $p = 0,006$), pri čemu se raspon pH kretao od 5,2 do 8,4. S druge strane, *Legionella*-negativni uzorci pokazali su širi raspon pH vrijednosti, od 3,1 do 9,0 (slika 5.a). Korelacijska analiza ukazala je na pozitivnu povezanost između broja kolonija *Legionella* spp. i pH vrijednosti vode. Rezultati sugeriraju i da niže vrijednosti električne vodljivosti pogoduju preživljavanju legionela.

Uzorci pozitivni na *L. pneumophila* imali su značajno nižu koncentraciju slobodnog rezidualnog klora (slika 5.c). U jednoj trećini pozitivnih uzoraka (48/144), koncentracija slobodnog klora bila je na donjoj granici detekcije ili ispod nje ($\leq 0,02$ mg/L). Najveći udio uzoraka (63,2 %; 91/144) imao je nisku koncentraciju klora u rasponu od 0,03 do 0,1 mg/L. U svega 4,9 % uzoraka (7/144) vrijednosti su se kretale između 0,2 i 0,5 mg/L, dok su više koncentracije od 0,5 mg/L zabilježene u 7,6 % uzoraka (11/144). Ipak, korelacijska analiza pokazala je negativnu povezanost između koncentracije slobodnog klora i pojavnosti *Legionella* u vodi ($r_s = -0,24$; $p < 0,05$). Rezultati pokazuju da su medijani koncentracije nitrita statistički niži u uzorcima u kojima je detektirana *Legionella* (slika 5.d).

4.2 Istraživanje pojavnosti *Legionella* spp. 2019. – 2024.

4.2.1 Broj uzoraka: prioritetni vs. ostali objekti

U okviru istraživanja prikupljen je ukupno 2541 uzorak vode za mikrobiološku analizu na prisutnost *Legionella* spp. Broj kolonija po uzorku varirao je od 0 do 360.000, pri čemu je medijan broja kolonija iznosio 0, uz interkvartilni raspon također od 0 do 0, što upućuje na to da u većini uzoraka nije dokazana prisutnost legionele. Naime, u 2039 uzoraka (80,2 %) *Legionella* nije dokazana, dok su 502 uzorka (19,8 %) bila pozitivna. Aritmetička sredina broja kolonija iznosila je 1874,15, uz visoku standardnu devijaciju od 14.499, što pokazuje znatnu varijabilnost među pozitivnim uzorcima. Istraživanje je provedeno u 270 objekata razvrstanih u 14 kategorija.

Prema važećem Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju [88], prioritetni objekti definirani su unutar 12 službenih kategorija. U ovom istraživanju analizirani su uzorci vode iz 11 kategorija, pri čemu nije bilo uzoraka iz kategorije „Vojarne“. Osim službeno definiranih prioritetnih objekata, obuhvaćene su i dodatne kategorije koje nisu izričito navedene u Zakonu [88], ali su prepoznate kao prioritetne u Pravilniku NN 43/2024 [87]. I u tim su objektima provedena ispitivanja na prisutnost legionela.

Budući da se monitoring na legionelu odnosi i na pomorska putnička plovila, u okviru istraživanja definirana je dodatna kategorija „Brodovi“ u koju su uključeni podaci o nalazima s putničkih, teretnih i drugih vrsta plovila.

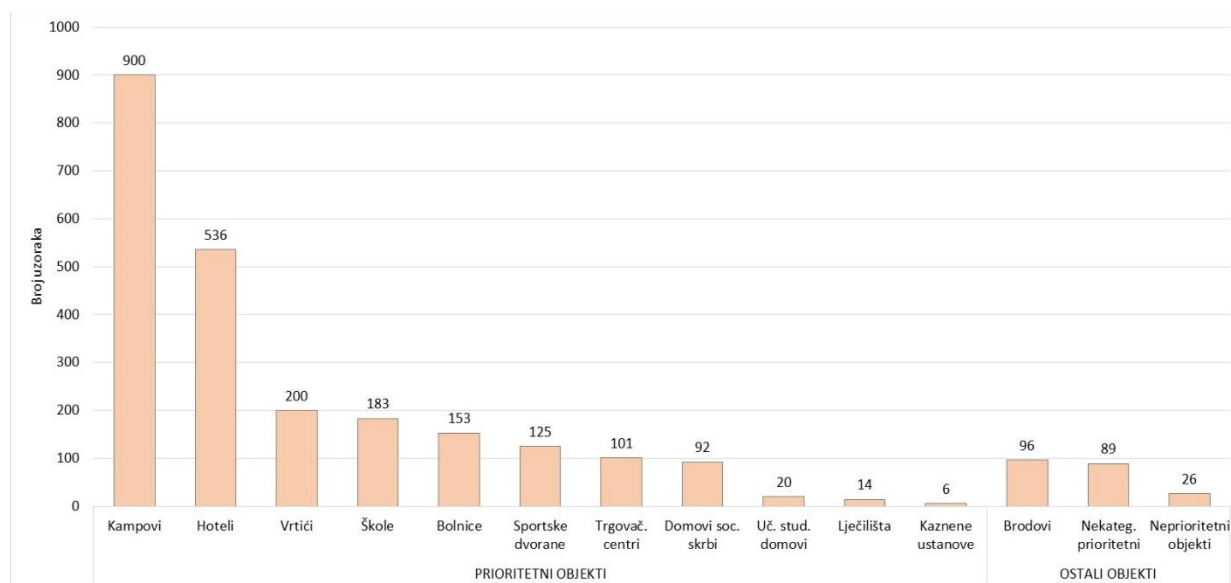
U okviru istraživanja definirana je i dodatna kategorija „Nekategorizirani prioritetni objekti“ koja obuhvaća objekte u kojima su provedene analize uzoraka vode na legionele, ali koji nisu jasno obuhvaćeni jednom od 12 službenih kategorija prioritetnih objekata. Iako formalno nisu svrstani u postojeće kategorije, ti objekti zbog svoje djelatnosti, tehničkih karakteristika i

epidemiološkog rizika od legioneloze pokazuju sličnosti s prioritetnim objektima. U ovu skupinu ubrajaju se, primjerice, zdravstvene i rehabilitacijske ustanove, stacionari i sportski objekti.

Kategorija „Neprioritetni objekti“ obuhvaća podatke o nalazima analize vode na legionele u objektima koji, u skladu s važećim propisima i javnozdravstvenim kriterijima, a na temelju procijenjenoga nižeg epidemiološkog rizika za pojavu legioneloze, nisu razvrstani ni u jednu od službenih kategorija prioritetnih objekata, kao ni u kategorije „Brodovi“ ili „Nekategorizirani prioritetni objekti“. U ovu skupinu svrstani su, primjerice, ugostiteljski i turistički objekti s kapacitetom smještaja za manje od 20 osoba ili bez smještaja, javni prostori i objekti bez stalnih korisnika te samostojeći hidranti na javnim površinama.

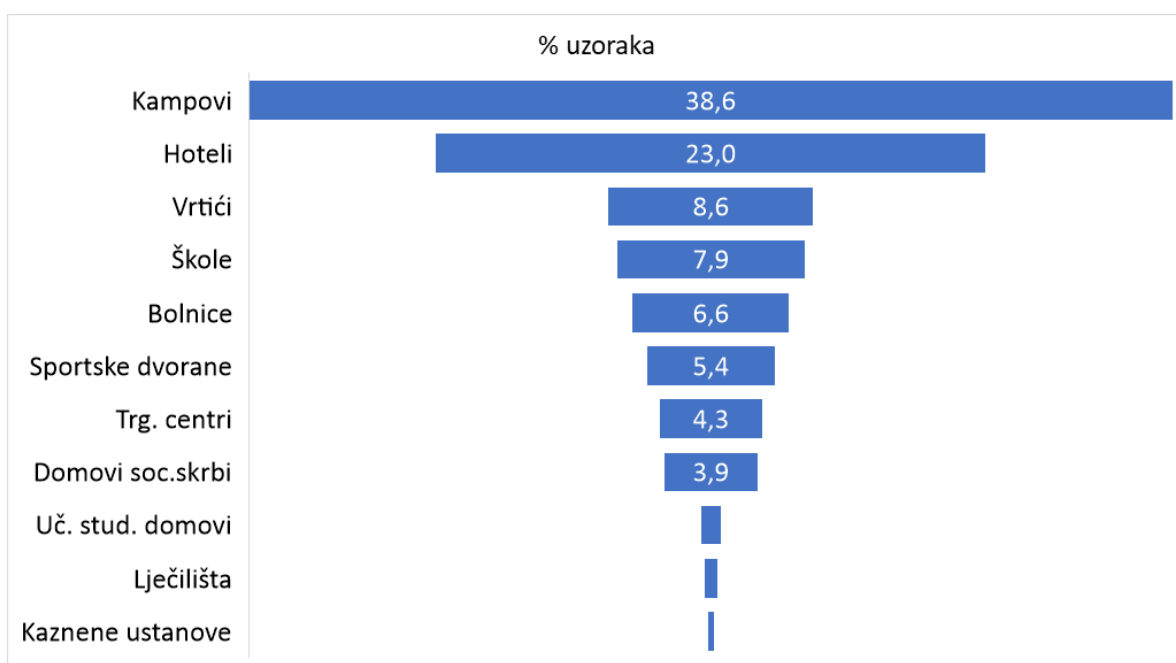
Podaci o nalazima vode u ovom istraživanju obuhvaćaju sve uzorke uzete iz tehničkih sustava spojenih na kućnu vodoopskrbnu mrežu (KVM) u pojedinom objektu iz određene kategorije. To znači da rezultati uključuju sve sustave povezane na KVM, neovisno o vrsti vode, bilo da je riječ o sustavu hladne, tople, hidrantske ili tehničke vode u okviru danog objekta.

Slika 6. prikazuje broj uzoraka prikupljenih tijekom ispitivanog razdoblja (2019. – 2024.) iz različitih kategorija objekata, podijeljenih na prioritetne i ostale objekte. Među prioritetnim objektima najviše je uzoraka uzeto iz kampova (900) i hotela (536), a značajan broj uzoraka zabilježen je i u vrtićima (200), školama (183) i bolnicama (153). Kod ostalih kategorija objekata umjeren broj uzoraka uzet je s brodova (96) i iz nekategoriziranih prioritetnih objekata (89). Najmanji broj uzoraka zabilježen je u kaznenim ustanovama (6) i učeničkim domovima (20).



Slika 6. Prikaz broja uzetih uzoraka iz različitih vrsta prioriternih i ostalih objekata

Raspodjela uzoraka unutar skupine prioriternih objekata prema pojedinom tipu objekta prikazana je na slici 7. Najveći udio uzoraka prikupljen je iz kampova, koji čine gotovo 40 % ukupnog broja. Hotelima pripada nešto više od 20 %, što zajedno s kampovima čini više od polovice svih uzoraka u prioriternoj skupini. Vrtići, škole i bolnice zauzimaju srednju poziciju s udjelima između 5 i 10 %. Ostali tipovi objekata, uključujući sportske dvorane, trgovačke centre, domove socijalne skrbi, učeničke domove, lječilišta i kaznene ustanove, imaju manje udjele. Kaznene ustanove imaju najmanji broj prikupljenih uzoraka.

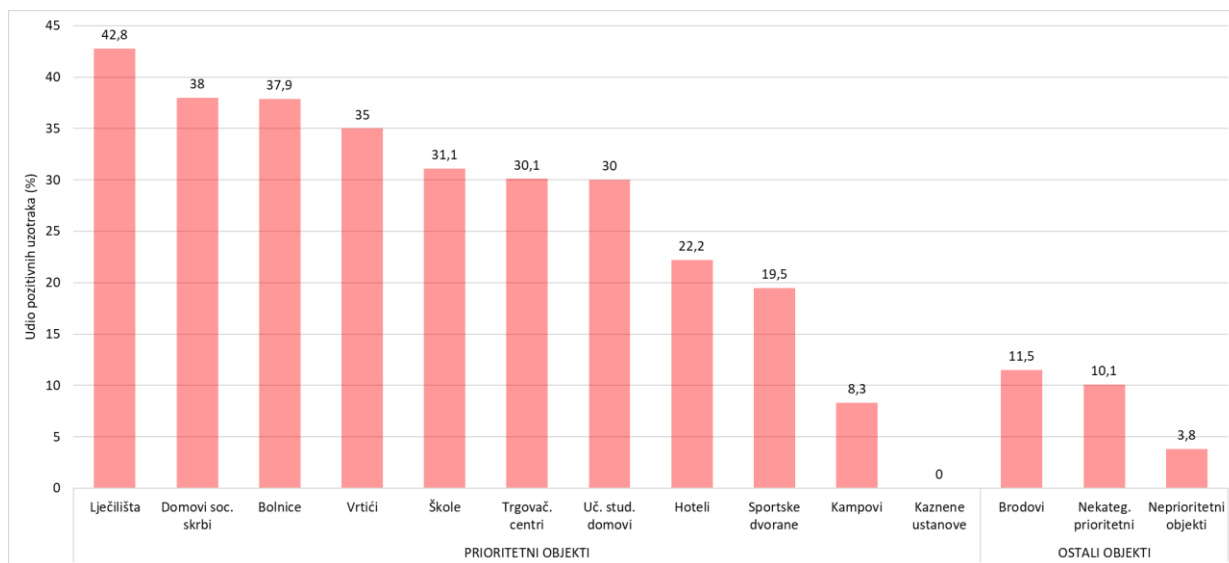


Slika 7. Udio uzoraka uzetih prema pojedinom tipu objekta u skupini prioriternih objekata

4.2.2 Udio pozitivnih uzoraka

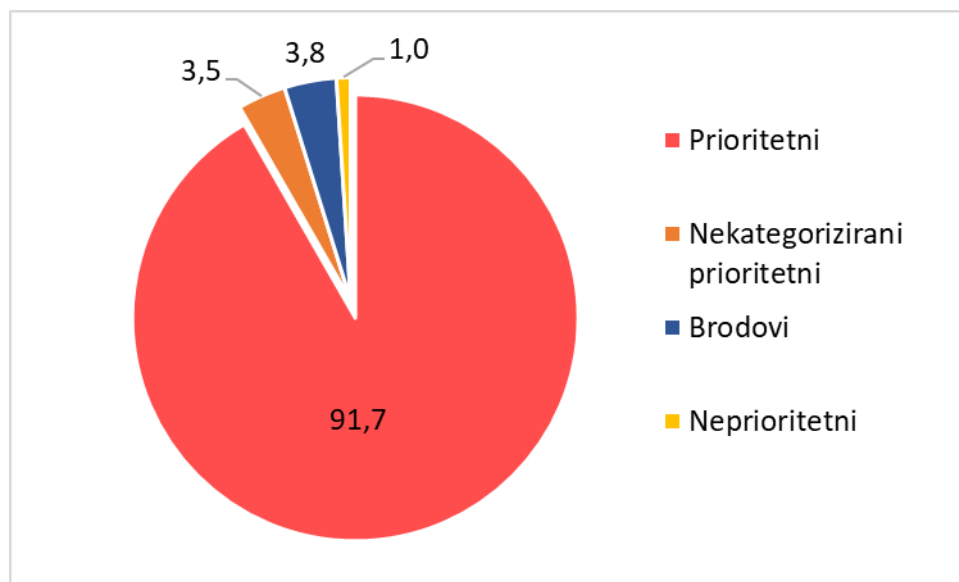
Slika 8. prikazuje udio *Legionella*-pozitivnih uzoraka prema vrsti objekta. Najviši udio kontaminiranih uzoraka zabilježen je u lječilištima (42,8 %), domovima socijalne skrbi (38,0 %), bolnicama (37,9 %) i vrtićima (35,0 %). Udio iznad 30 % zabilježen je i u školama, trgovačkim centrima i učeničkim domovima. Hoteli i sportske dvorane imali su umjeren udio pozitivnih uzoraka (oko 20 %). Kampovi su, unatoč najvećem broju analiziranih uzoraka, imali relativno nizak udio kontaminiranih uzoraka (8,3 %), a u kaznenim ustanovama nisu zabilježeni pozitivni uzorci. Među ostalim objektima, brodovi (11,5 %) i nekategorizirani

prioritetni objekti (10,1 %) bilježe umjeren rizik, dok je u neprioritetnim objektima udio bio najniži, 3,8 %.



Slika 8. Udio pozitivnih uzoraka iz različitih vrsta prioritetnih i ostalih objekata

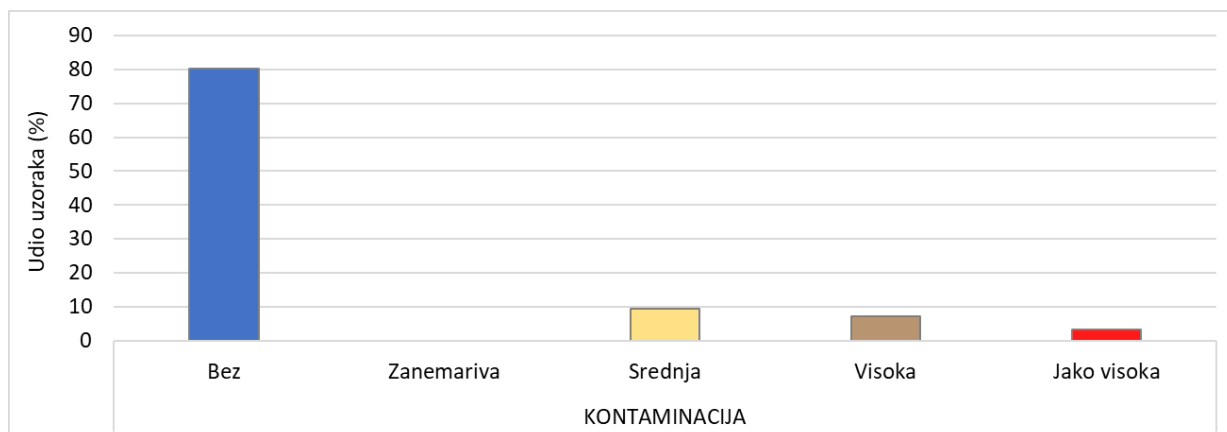
Slika 9. prikazuje raspodjelu 502 uzorka pozitivna na *Legionella* spp. između prioritetnih i ostalih objekata. Najveći udio pozitivnih nalaza (91,7 %) zabilježen je u prioritetnim objektima. Ostale kategorije objekata čine znatno manji udio (8,3 %).



Slika 9 Udio pozitivnih uzoraka na *Legionella* spp. prema prioritetu objekta

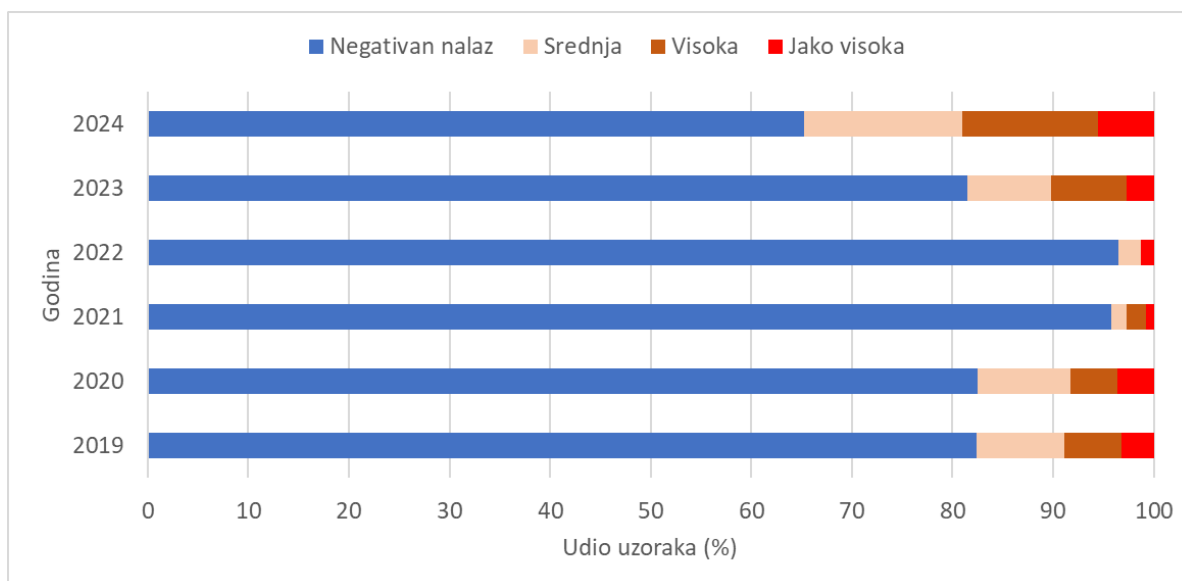
4.2.3 Razine kontaminacije

Broj uzoraka u pojedinoj kategoriji razine kontaminacije prikazan je na slici 10., pri čemu je 80,2 % uzoraka (> 2000) zabilježeno u kategoriji bez kontaminacije. Srednja i visoka razina kontaminacije pojavljuju se u znatno manjem (7,1 – 9,3 %), ali usporedivom broju uzoraka, dok je jako visoka razina prisutna u najmanjem udjelu (3,4 %). Kategorija zanemarive kontaminacije nije evidentirana.



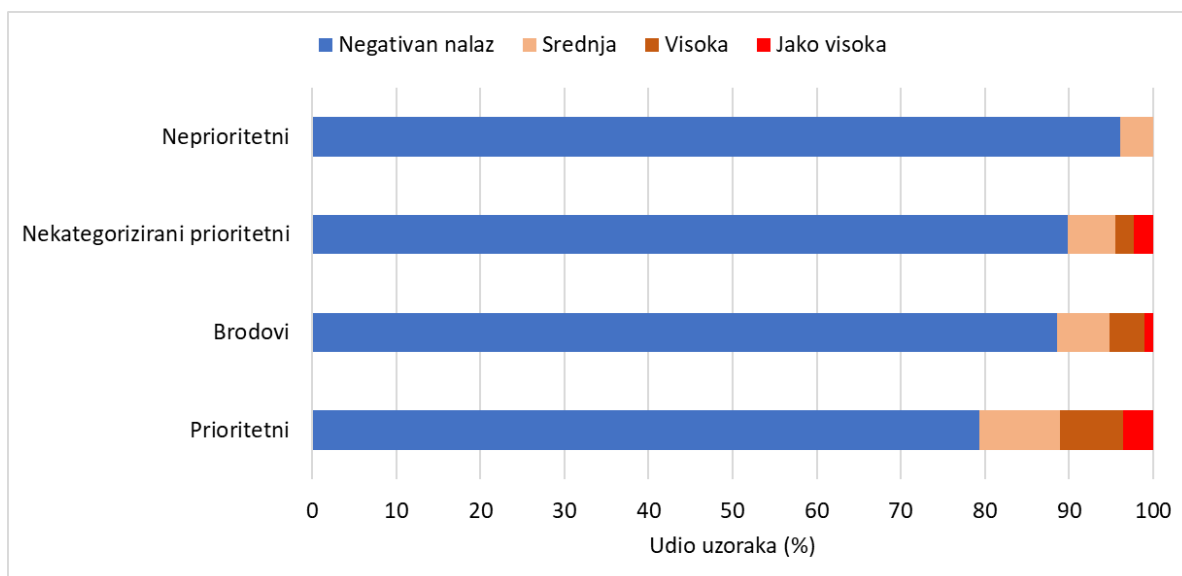
Slikan 10. Broj uzoraka u pojedinoj kategoriji razine kontaminacije

Na slici 11. prikazana je godišnja distribucija udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji razine kontaminacije u razdoblju od 2019. do 2024. godine. Vidljivo je da su 2021. i 2022. zabilježeni najviši udjeli uzoraka s negativnim nalazom (više od 95 %), dok je u 2024. godini udio negativnih uzoraka osjetno opao, a udio uzoraka s visokom kontaminacijom dosegao maksimum (5,6 %). Istodobno je zabilježen porast udjela uzoraka u kategorijama srednje, visoke i jako visoke razine kontaminacije.



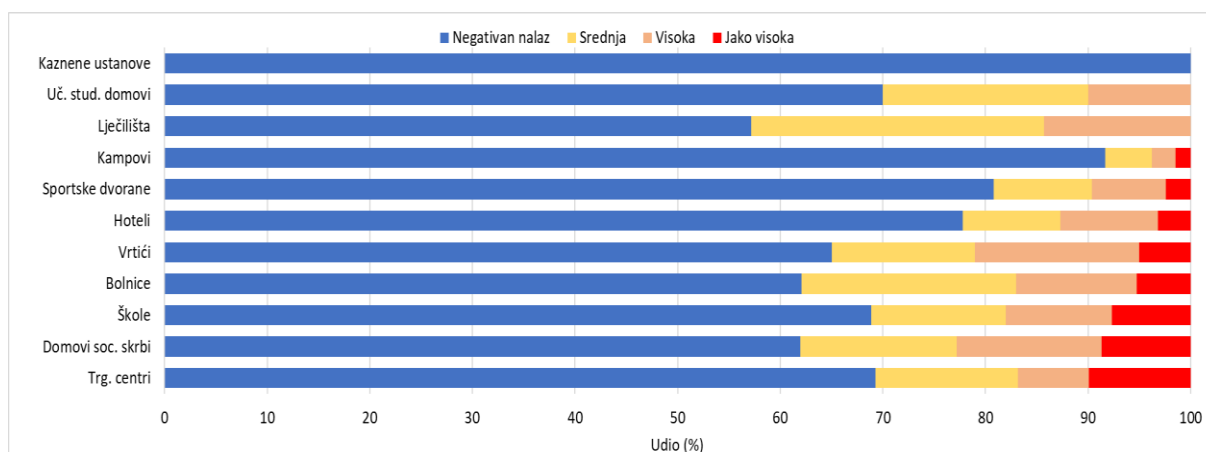
Slika 11. Godišnja distribucija udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji razine kontaminacije u razdoblju 2019. – 2024.

U istraživanju je promatran udio uzoraka prema razini kontaminacije, raspoređenih prema kategoriji objekata (slika 12.). U svim skupinama objekata najzastupljeniji su *Legionella*-negativni uzorci, ali su razlike u udjelu kontaminiranih uzoraka ovisno o vrsti objekta vidljive. Najpovoljnija slika zabilježena je u neprioritetnim objektima (96,2 % *Legionella*-negativnih uzoraka), dok je u prioritetnim objektima uočljiv značajno veći udio uzoraka s kontaminacijom, uključujući srednju (9,6 %), visoku (7,5 %) i jako visoku (3,6 %) razinu. I nekategorizirani prioritetni objekti i brodovi pokazuju prisutnost kontaminiranih uzoraka, ali u manjoj mjeri u odnosu na prioritetne objekte. U neprioritetnim objektima nema zabilježenih uzoraka s visokom i jako visokom kontaminacijom, tek je manji udio uzoraka sa srednjom kontaminacijom (3,8 %).



Slika 12. Usporedba udjela uzoraka prema razini kontaminacije za različite kategorije objekata

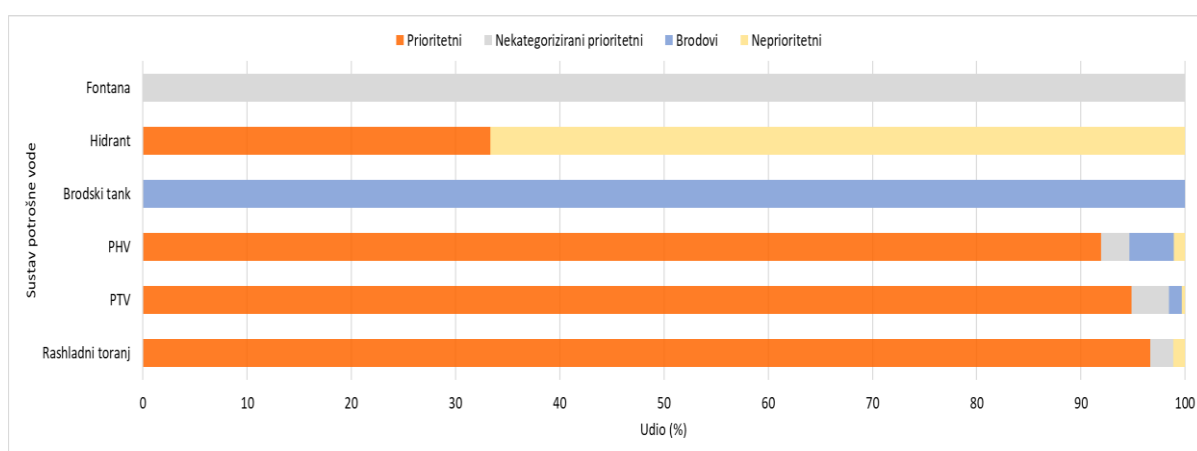
Slika 13. prikazuje udio uzoraka prema razinama kontaminacije (negativan nalaz, srednja, visoka, jako visoka) za pojedine tipove objekata unutar skupine prioritetnih objekata. Najviši udio jako visoke kontaminacije zabilježen je u trgovačkim centrima (9,9 %), domovima socijalne skrbi (8,7 %) i školama (7,7 %), dok bolnice bilježe 5,2 %. U vrtićima, hotelima, sportskim dvoranama i kampovima taj se udio kreće između 1,4 % i 5,0 %. U lječilištima, učeničkim domovima i kaznenim ustanovama jako visoka kontaminacija nije uopće utvrđena.



Slika 13. Usporedba udjela uzoraka prema razinama kontaminacije za pojedine tipove objekata unutar skupine prioritetnih objekata

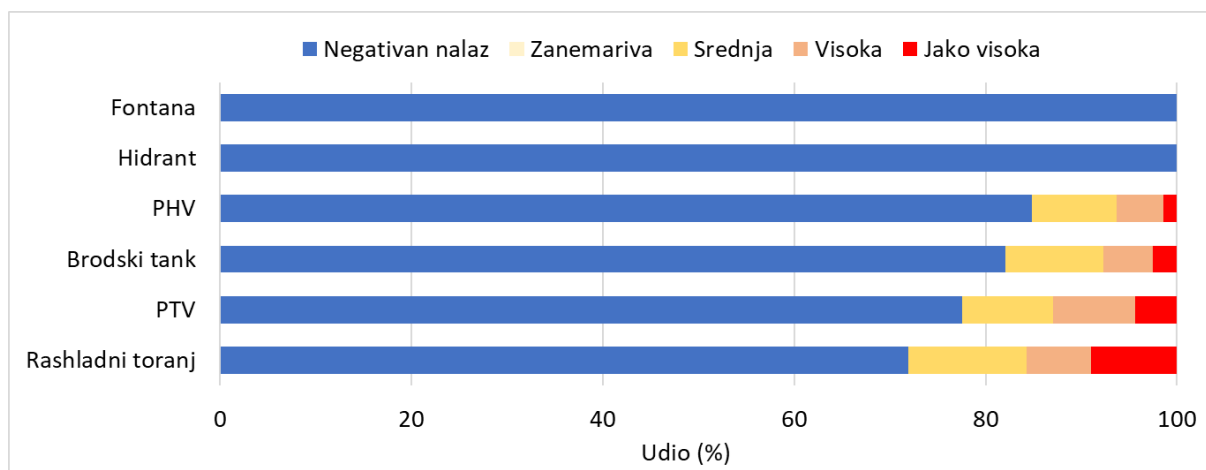
4.2.4 Različiti sustavi potrošne vode

Slika 14. prikazuje udio uzoraka iz različitih sustava potrošne vode, razvrstanih prema kategoriji objekata: prioritetni, nekategorizirani prioritetni, brodovi i neprioritetni. Najveći udio uzoraka iz prioritetnih objekata uzet je iz sustava rashladnih tornjeva – 96,6 %, iz sustava PTV-a (potrošna topla voda) – 94,8 % i sustava PHV-a (potrošna hladna voda) – 91,9 %. Brodski tankovi čine isključivo uzorke iz kategorije brodova, a hidranti i fontane većinom su svrstani u neprioritetne ili nekategorizirane prioritetne objekte. Posebno je zanimljivo primijetiti da su svi uzorci iz sustava fontana pripadali kategoriji nekategoriziranih prioritetnih objekata, dok hidranti sadrže uzorke iz neprioritetnih i prioritetnih objekata.



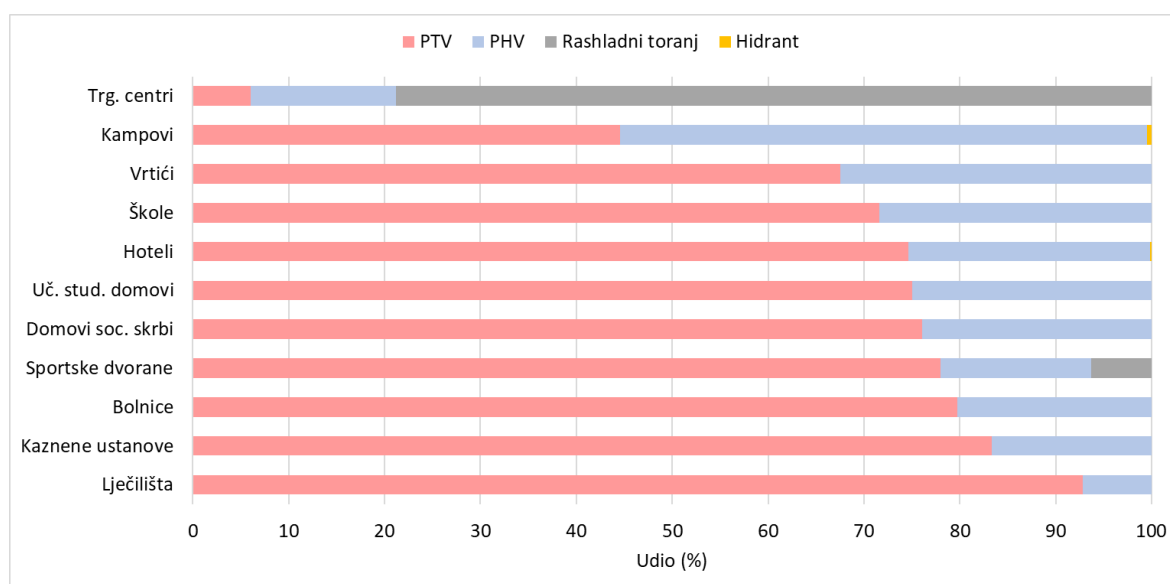
Slika 14. Udio uzoraka prema vrsti sustava potrošne vode i pripadnosti prioritetnoj skupini objekata (PTV – potrošna topla voda; PHV – potrošna hladna voda)

Slika 15. prikazuje udio *Legionella*-negativnih uzoraka i različitim razinama kontaminacije u šest tipova sustava potrošne vode. Fontane i hidranti pokazuju isključivo negativne nalaze. Nasuprot tome, rashladni tornjevi, sustavi PTV-a (potrošna topla voda) i sustavi PHV-a (potrošna hladna voda) te brodski tankovi bilježe određeni udio kontaminiranih uzoraka. Najveći udio kontaminacije (28,1 %), uključujući i jako visoku razinu (9,0 %), uočen je u rashladnim tornjevima. Sustavi PTV-a, brodski tankovi i sustavi PHV-a također pokazuju različite stupnjeve kontaminacije, s udjelom pozitivnih uzoraka od 15,1 % do 22,4 % i udjelom jako visokokontaminiranih uzoraka od 1,4 % (za PHV), 2,6 % (za brodski tank) i 4,3 % za PTV.



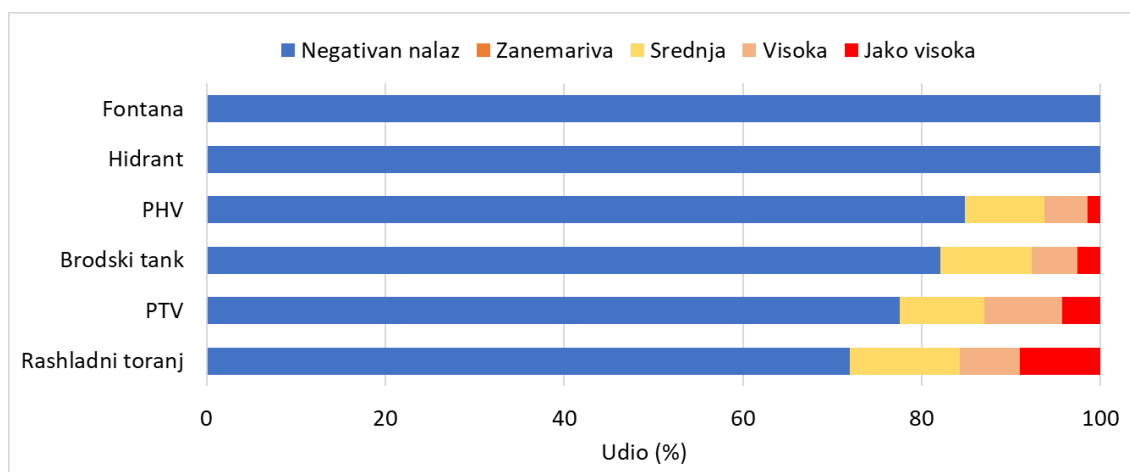
Slika 15. Udio uzoraka prema razini kontaminacije u različitim sustavima potrošne vode

Slika 16. prikazuje 11 kategorija prioritetnih objekata s udjelima uzoraka uzetih iz sljedećih sustava: PTV, PHV, rashladni tornjevi i hidranti. Najveći udio uzoraka PTV-a bilježi se u lječilištima (92,9 %), kaznenim ustanovama (83,3 %) i bolnicama (79,7 %). U sportskim dvoranama, domovima socijalne skrbi, učeničkim domovima, hotelima, školama i vrtićima također dominira PTV, iako u malo manjem udjelu. Nasuprot tome, u trgovačkim centrima veći broj uzoraka uzet je iz sustava PHV-a (15,2 %), u odnosu na sustav PTV-a (6,1 %), a najveći udio uzoraka pripada rashladnim tornjevima (78,8 %). Rashladni tornjevi uzorkovani su u manjem broju vrsta objekata, specifično u trgovačkim centrima (78,8 %) i sportskim dvoranama (6,3 %), kao i hidranti koji su uzorkovani u kampovima (0,4 %) i hotelima (0,2 %).



Slika 16. Udio uzoraka iz pojedinih sustava (PTV – potrošna topla voda, PHV – potrošna hladna voda, rashladni tornjevi i hidranti) u različitim vrstama objekata

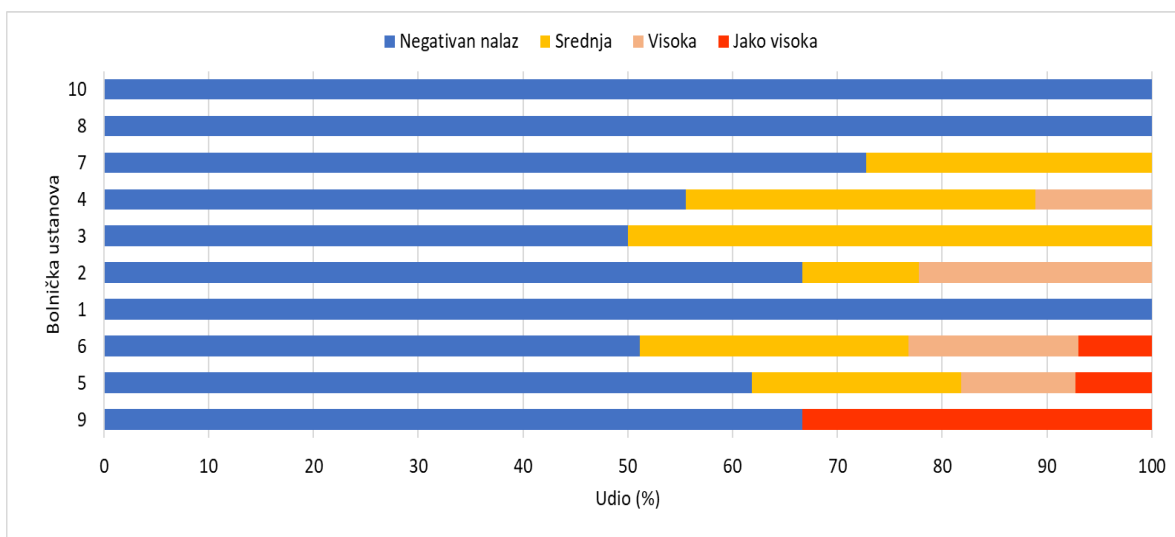
Slika 17. prikazuje udio *Legionella*-negativnih i *Legionella*-pozitivnih nalaza za distribucijske sustave vode u različitim vrstama objekata i s različitom razinom kontaminacije (zanemariva, srednja, visoka i jako visoka). Niti u jednom uzorku iz fontana i hidrantskih mreža nije utvrđena prisutnost *Legionella*. Kod potrošne hladne vode rezultati su većinom negativni, no zabilježeno je 1,4 % *Legionella*-pozitivnih uzoraka, pri čemu se manji dio odnosi na srednju i višu razinu kontaminacije. U uzorcima prikupljenih s broda nalazi su nešto nepovoljniji (18 % pozitivnih uzoraka), uključujući i udio u kategoriji jako visoka kontaminacija (2,6 %). Potrošna topla voda pokazuje veći udio pozitivnih nalaza (4,3 %), s izraženijim udjelom u srednjem (9,5 %) i visokom stupnju kontaminacije (8,6 %). Najveći udio pozitivnih nalaza zabilježen je u rashladnim tornjevima u kojima 9 % uzoraka pripada kategoriji jako visoka kontaminacija, a dodatni postotak i ostalim stupnjevima kontaminacije (19,1 %).



Slika 17. Učestalost pozitivnih nalaza i razina rizika prema vrsti vodnog sustava

4.2.5 Bolničke ustanove

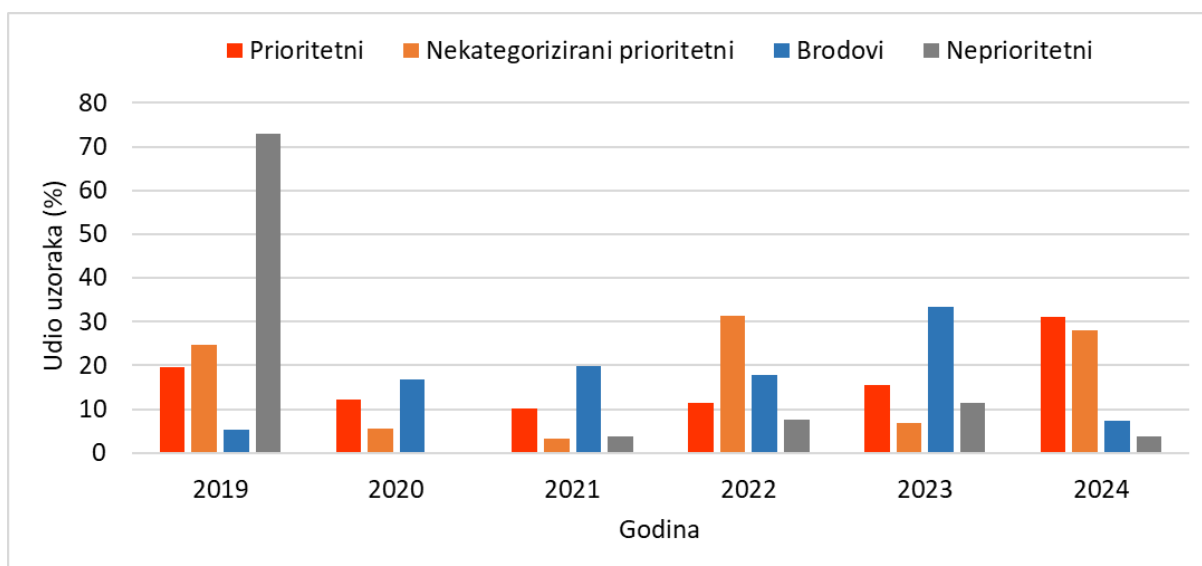
Raspodjela udjela uzoraka prema razinama kontaminacije u deset različitih bolničkih ustanova (označenim brojevima 1–10) vidljiva je na slici 18. Može se uočiti da većina ustanova bilježi visoke udjele *Legionella*-negativnih uzoraka, no u nekoliko ustanova pojavljuju se značajniji udjeli kontaminiranih uzoraka. Posebno se ističu bolničke ustanove označene brojevima 5, 6 i 9, u kojima je zabilježen povećan udio visoko i jako visoko kontaminiranih uzoraka. Najizraženiji je primjer ustanove 9, s čak 33,3 % uzoraka u kategoriji jako visoke kontaminacije, dok su ustanove 5 i 6 zabilježile udjele od 7,0 % i 7,3 % u istoj kategoriji.



Slika 18. Udio uzoraka prema razini kontaminacije u pojedinim bolničkim ustanovama (označenim brojevima od 1 do 10)

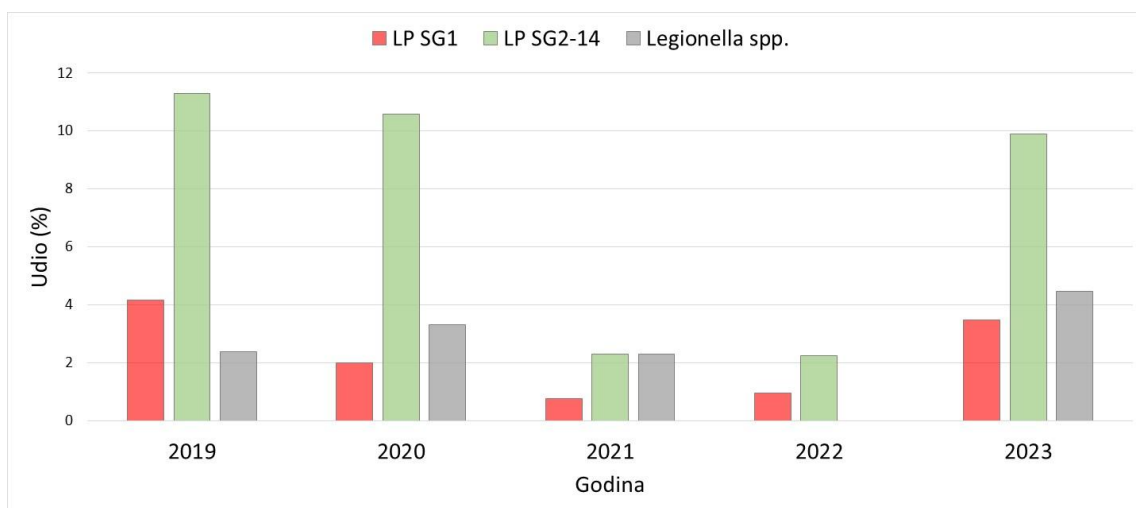
4.2.6 Godišnja distribucija

Godišnja distribucija uzoraka vode prema vrsti objekta u razdoblju od 2019. do 2024. godine prikazana je na slici 19. Najveći udio neprioritetnih objekata zabilježen je 2019. godine (73,1 %), dok u kasnijim godinama prevladavaju uzorci s brodova (7,3 – 33,0 %) i prioritetnih objekata (12,1 – 31,0 %). U 2022. godini prevladavaju uzorci iz nekategoriziranih prioritetnih objekata (31,5 %). U 2024. godini vidljiv je porast udjela uzoraka iz prioritetnih objekata i pad udjela iz kategorije brodova.



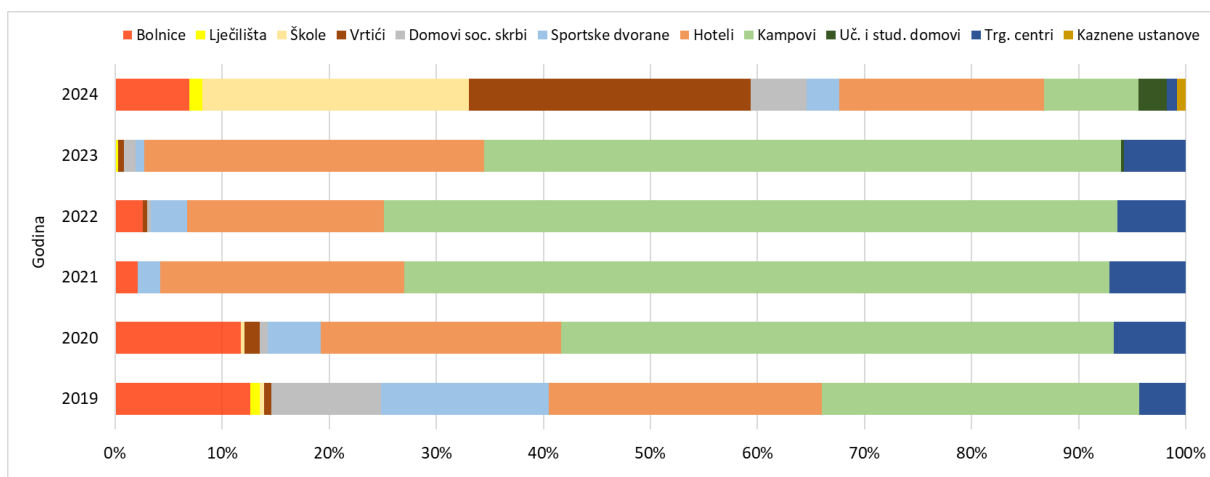
Slika 19. Udio uzoraka prema vrsti objekta i godini uzorkovanja

Slika 20. prikazuje godišnju raspodjelu izolata bakterija roda *Legionella* u analiziranim uzorcima vode. U promatranome petogodišnjem razdoblju (2019 – 2023.) udio *L. pneumophila* SG1 varirao je u rasponu od 0,8 do 4,2 %. Najviša vrijednost zabilježena je 2019. godine (4,2 %), dok su najniži udjeli (ispod 1,2 %) uočeni tijekom 2021. i 2022. godine. U 2023. godini zabilježen je ponovni porast na 3,5 %. Udio *L. pneumophila* SG2-14 varirao je od 2,3 do 11,3 %, s najvišim udjelom također 2019. godine (11,3 %). Najniže vrijednosti zabilježene su 2021. i 2022. godine (2,3 %), a 2023. udio je porastao na 9,9 %. Ostale vrste roda *Legionella* spp. bile su izolirane u rasponu od 2,3 do 4,4 %. Najviša vrijednost zabilježena je u 2023. godini (4,4 %), dok su prethodnih godina (2019. – 2021.) udjeli bili stabilni (2,3 – 3,3 %). Godine 2022. nije detektiran nijedan uzorak s ovom skupinom, a 2024. serotipizacija je izostala zbog tehničkih ograničenja.



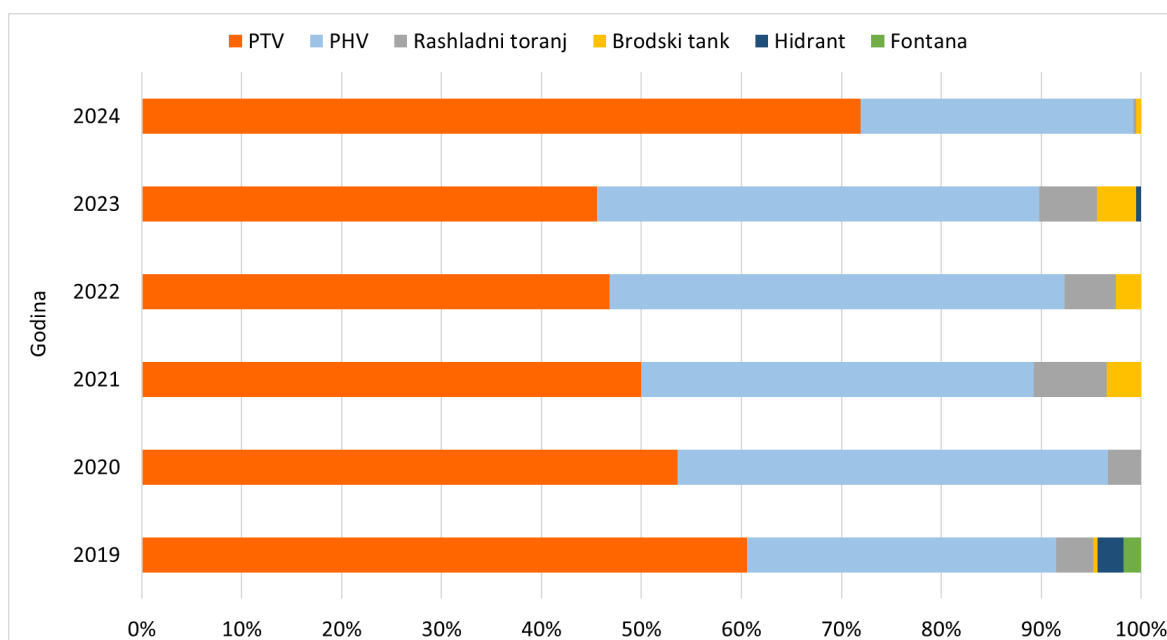
Slika 20. Udio (%) izoliranih *Legionella* spp. u uzorcima vode u razdoblju od 2019. do 2023. U 2024. godini serotipizacija nije provedena zbog tehničkih ograničenja.

Godišnja distribucija (2019. – 2024.) udjela uzoraka prema vrstama objekata prikazana je na slici 21. Najveći udio tijekom razdoblja istraživanja zauzimaju hoteli i kampovi. U razdoblju od 2019. do 2023. prevladavali su uzorci prikupljeni u kampovima (29,6 – 68,5 %), a 2024. u vrtićima (26,3 %). U godini 2024. uzorci su uzeti iz svih 11 kategorija objekata, 2019. iz devet kategorija, a u ostalim godinama iz manjeg broja kategorija objekata.



Slika 21. Raspodjela uzoraka prema vrstama objekata i godinama uzorkovanja

Godišnja distribucija (2019. – 2024.) udjela uzoraka prema vrstama sustava prikazana je na slici 22. Najveći udio tijekom svih godina zauzimaju uzorci iz PTV (45,5 – 72,0 %) i sustava PHV-a (27,0 – 43,0 %). Uzorci iz rashladnih tornjeva, brodskih tankova, hidranta i fontana činili su manji, ali značajan udio, posebice u 2021. – 2022. godine. Jedino su 2019. svi navedeni sustavi bili zastupljeni.

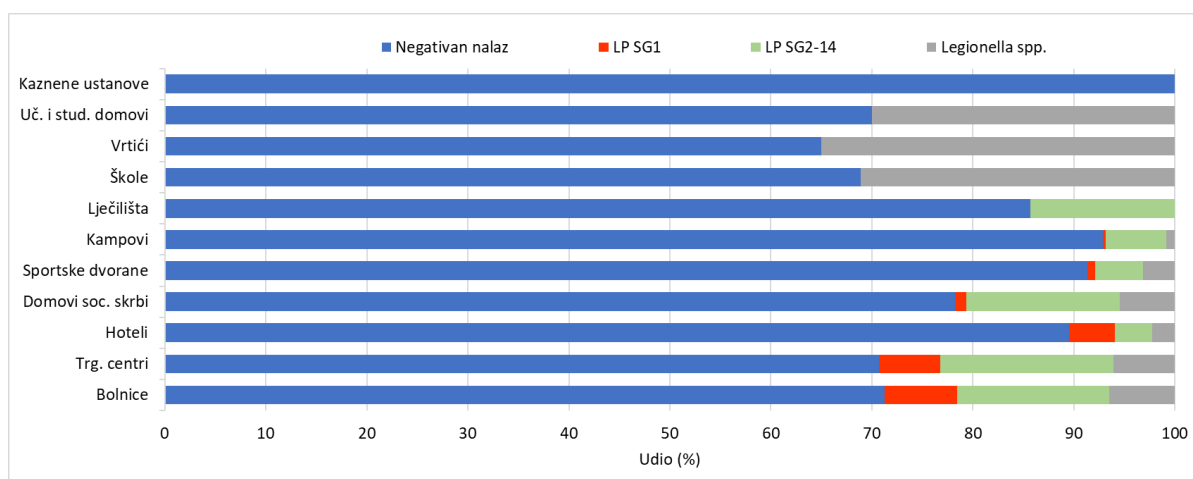


Slika 22. Godišnja distribucija uzoraka prema vrstama sustava (2019. – 2024.)

Korelacijskom analizom nije utvrđena značajna korelacija između broja legionela i temperature vode i zraka te koncentracije slobodnog rezidualnog klora.

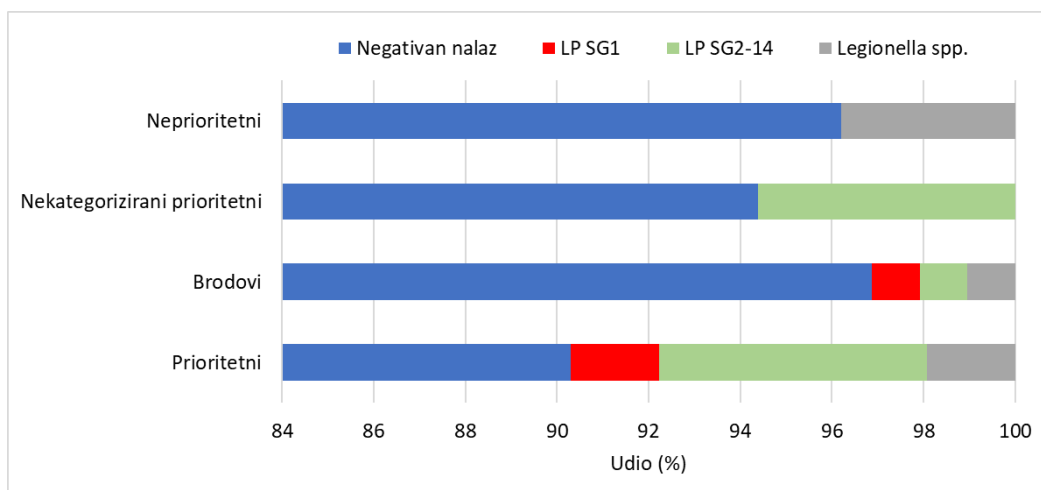
4.2.7 Vrste i sojevi

Slika 23. prikazuje distribuciju uzoraka prema vrsti objekta i prisutnosti *Legionella* spp. te *L. pneumophila* SG1 i SG2-14. Najveći udio ukupno pozitivnih nalaza utvrđen je u trgovačkim centrima (29,4 %) i bolnicama (28,7 %). Specifični soj *L. pneumophila* SG1 najčešće je izoliran u bolnicama (7,2 %), zatim u trgovačkim centrima (6,1 %) i hotelima (4,5 %). Serogrupe (SG2-14) također su češće detektirane u trgovačkim centrima (17,2 %), bolnicama (15,0 %), domovima socijalne skrbi (15,2 %) i lječilištima (14,3 %). U školama i vrtićima te učeničkim i studentskim domovima nisu utvrđeni SG1 ni SG2-14, s obzirom na to da su uzorci iz navedenim objekata uzimani većinom 2024. godini kada se serotipizacija nije provodila. U kaznenim ustanovama pozitivni uzorci nisu evidentirani.



Slika 23. Distribucija negativnih i pozitivnih uzoraka na *Legionella* spp. te *L. pneumophila* SG1 i SG2-14 prema vrstama objekata

Udio *Legionella* spp. te *L. pneumophila* (SG1 i SG2-14) pozitivnih i negativnih uzoraka u četiri kategorije objekata (prioritetni, brodovi, neprioritetni i nekategorizirani prioritetni objekti) prikazan je na slici 24. Najveći udio LP SG1 (1,9 %) i LP SG2-14 (5,8 %) te *Legionella* spp. (1,9 %) uočen je u prioritetnim objektima. U neprioritetnim objektima prisutnost *Legionella* dokazana je samo u jednom uzorku. U nekategoriziranim prioritetnim objektima utvrđena je prisutnost LP SG2-14 s udjelom od 5,6 %, kao i LP SG1 (1,0 %), LP SG2-14 (1,0 %) i *Legionella* spp. (1,0 %) na brodovima.

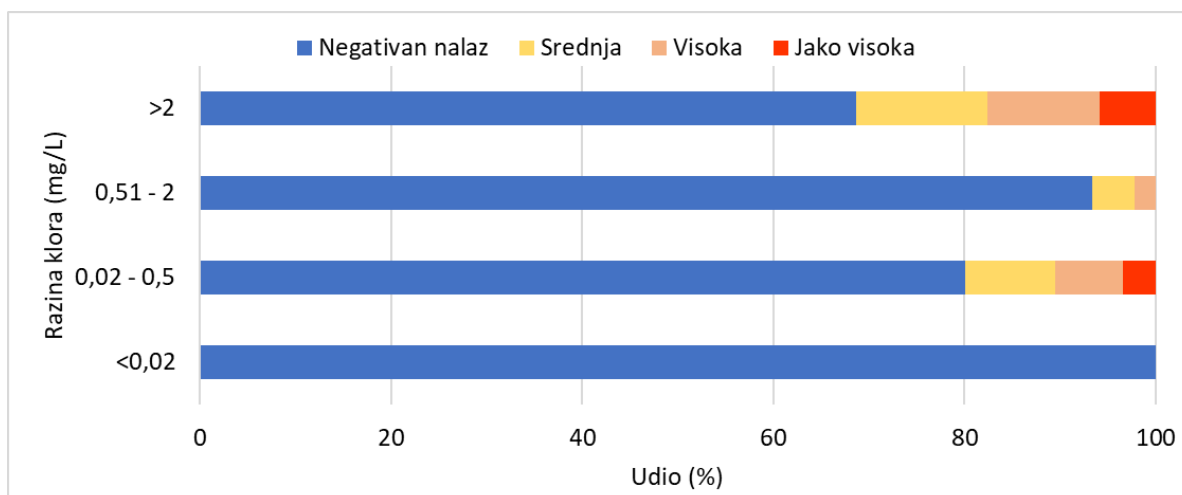


Slika 24. Distribucija negativnih i pozitivnih uzoraka na *Legionella* spp. te *L. pneumophila* SG1 i SG2-14 prema prioritetu objekta

4.2.8 Utjecaj klora

Povezanost udjela uzoraka s različitim razinama kontaminacije i koncentracije klora u vodi vidljiva je na slici 25. Pri koncentraciji klora ispod 0,02 mg/L, pozitivnih nalaza nije bilo. Porastom koncentracije klora 0,02 – 0,5 mg/L uočava se povećanje udjela uzoraka sa srednjom, visokom i jako visokom kontaminacijom, a u rasponu 0,51 – 2 mg/L vidljiv je smanjeni udio kontaminiranih uzoraka u odnosu na prethodni raspon, ali kontaminacija nije potpuno isključena. Najveći udio kontaminiranih uzoraka prisutan je u skupini s koncentracijom klora većom od 2 mg/L, pri čemu je uočljivo povećanje svih razina kontaminacije, uključujući i jako visoku.

Jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u kontaminiranosti legionelom ovisno o koncentraciji slobodnog rezidualnog klora ($F(3;2537) = 3,56$; $P = 0,014$). *Post-hoc* analizom utvrđeno je da kategorija klora > 2 mg/L ima značajno veću kontaminiranost od kategorije klora 0,51 – 2,0 ($p < 0,05$).

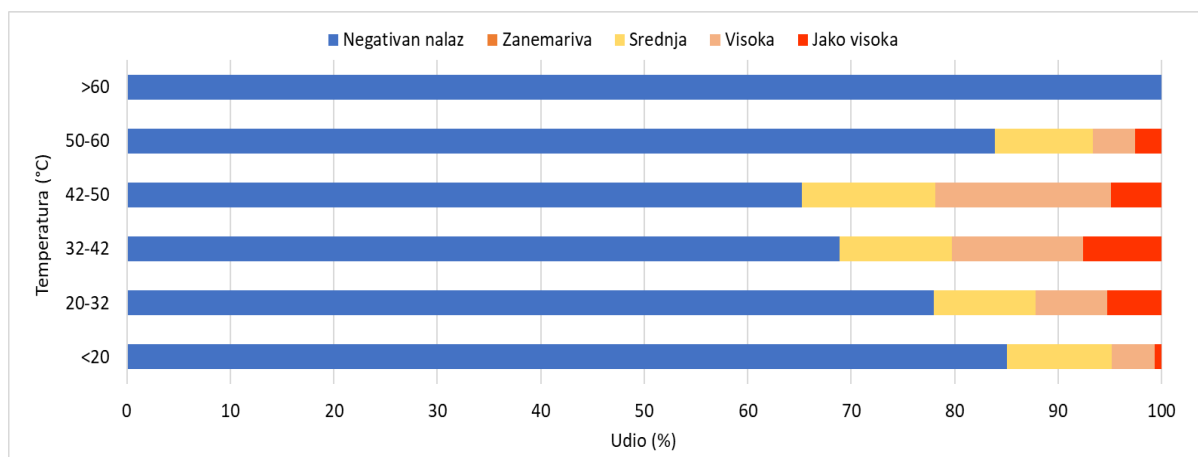


Slika 25. Udio uzoraka prema razini kontaminacije u odnosu na koncentraciju klora

4.2.9 Utjecaj temperature

Slika 26. prikazuje distribuciju uzoraka s različitim razinama kontaminacije u ovisnosti o temperaturi vode. Najpovoljnija slika vidljiva je na temperaturama iznad 60 °C, pri kojima su gotovo svi uzorci bili *Legionella*-negativni. S padom temperature na raspon 50 – 60 °C zabilježen je blagi porast kontaminiranih uzoraka, a u rasponima 42 – 50 °C i 32 – 42 °C dolazi do značajnog povećanja udjela uzoraka sa srednjom (10,9 – 12,9 %), visokom (12,7 – 17,0 %) i jako visokom kontaminacijom (4,9 – 7,6 %). U rasponima nižih temperatura (20 – 32 °C i < 20 °C) udio kontaminiranih uzoraka malo se smanjuje, ali je kontaminacija i dalje prisutna. Posebno se ističe 5,2 % uzoraka s jako visokom kontaminacijom u kategoriji temperature 20 – 32 °C.

Jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u kontaminiranosti legionelom ovisno o stupnju temperature vode ($F(5;2535) = 32,89$; $p < 0,001$). *Post-hoc* analizom utvrđeno je da se sve kategorije temperature vode statistički značajno međusobno razlikuju prema kontaminiranosti (svi $p < 0,05$), osim kategorije < 20 °C i kategorije > 60 °C, koje imaju podjednaku kontaminiranost legionelom, te kategorije > 30 – 42 °C i > 42 – 50 °C gdje je kontaminiranost legionelom također podjednaka (svi $p > 0,05$). Najveća je kontaminiranost zabilježena od 20 do 50 °C, dok je ispod ili iznad te temperature zabilježen pad u kontaminiranosti.



Slika 26. Udio uzoraka prema razini kontaminacije u odnosu na temperaturu vode

4.3 Tipizacija i fenotipska analiza *Legionella* spp. metodom SBT-a

Jedan od ciljeva studije bio je metodom analiza sekvenci istražiti prisutnost ST tipova legionela koje najčešće cirkuliraju u vodnim sustavima na području Primorsko-goranske županije. Ukupno je tipizirano jedanaest uzoraka *L. pneumophila*, od kojih je devet izvornih okolišnih izolata, a dva su analizirana nakon eksperimentalnog tretmana radi procjene mogućih promjena alelnog profila i fenotipa. Određen je i profil sedam alela (*flaA*, *mompS*, *proS*, *asd*, *mip*, *pilE*, i *neuA*) gena za svaki od izolata. Utvrđena je prisutnost šest različitih profila alela i definirano postojanje šest sekvencijskih tipova, a najrašireniji sekvencijski tip je ST1317 koji prikazuje profil alela „16,21,12,19,31,21,215“ (tablica 3.).

Tablica 3. Serogrupe, ST-ovi, alelni profili i fenotipovi *L. pneumophila* izolata iz okolišnih uzoraka u Primorsko-goranskoj županiji (Hrvatska)

Uzorak	Vrsta izvora vode / Dezinfekcijsko sredstvo	<i>L. pneumophila</i>	Lp SG	ST	Alelni profil	Fenotip
Hotel	podzemna voda/ClO ₂ ; površinska voda	izolirano iz vode	1	82	5,1,22,10,6,10,6	Allentown
Apartman	podzemna voda/ClO ₂ ; površinska voda	izolirano iz vode	1	62	8,10,3,15,18,1,6	Knoxville
Kampovi, hladna voda	površinska voda/ClO ₂ + NaClO	izolirano iz vode	7	1317	16,21,12,19,31,21,215	Chicago 8
Kampovi, topla voda	površinska voda/ClO ₂ + NaClO	izolirano iz vode	7	1317	16,21,12,19,31,21,215	Chicago 8
Trajekt 1	podzemna voda/Cl ₂	izolirano iz vode	7	1317	16,21,12,19,31,21,215	Chicago 8

Rashladni toranj	podzemna voda/ClO ₂	izolirano iz vode	10	1365	1,4,3,28,1,1207	Leiden 1
Trajekt 2	podzemna voda/NaOCl	izolirano iz vode	1	986	1,14,16,16,13,2	Oxford/Olda
Wellness	podzemna voda/Cl ₂	izolirano iz vode	1	1	1,4,3,1,1,1	Oxford/Olda
Rehabilit. centar	podzemna voda/ClO ₂	izolirano iz vode	1	62	8,10,3,15,18,1,6	Oxford/Olda
Hotel, 53 °C/10 min	podzemna voda/ClO ₂	izolirano iz vode – toplinski tretirano	1	82	5,1,22,10,6,10,6	Allentown/France
Hotel – Lp uzgojen u amebi	podzemna voda/ClO ₂	izolirano iz vode – uzgojeno u amebi	1	82	5,1,22,10,6,10,6	Allentown/France

U našoj smo studiji također istraživali dolazi li do promjena u profilu alela i/ili fenotipu legionela nakon postupka pasterizacije na 53 °C u vremenu od 10 minuta ili nakon kultivacije u amebi *A. castellanii*. Izolati legionela s potvrđenim profilom alela testirani su postupkom pasterizacije kao i kultivacijom u amebama, nakon čega je ponovno utvrđivan njihov fenotip. Da bi se utvrdilo dolazi li do promjena analiziranih alelnih profila, izolati legionela iz hotelskih uzoraka koji su prošli postupak pasterizacije ili su kultivirani u amebi ispitivani su dalje metodom genetskog sekvencioniranja. Naši rezultati pokazuju da postupak pasterizacije i kultivacije u amebi ne utječe na bakterijski profil alela i fenotip (tablica 3.).

4.4 Rast *Legionella* u amebi *A. castellanii*

Reprezentativni uzorci *L. pneumophila* koji su izolirani iz različitih vodoopskrbnih sustava dalje su testirani u stanicama ameba. Stanice *A. castellanii* su inficirane s *L. pneumophila* (MOI 100) i inkubirane na temperaturi od 27 °C u razdoblju od deset dana. Nultog, drugog, četvrtog, šestog, osmog i desetog dana nakon infekcije stanica amebe, utvrđivan je intracelularni broj bakterija *L. pneumophila*.

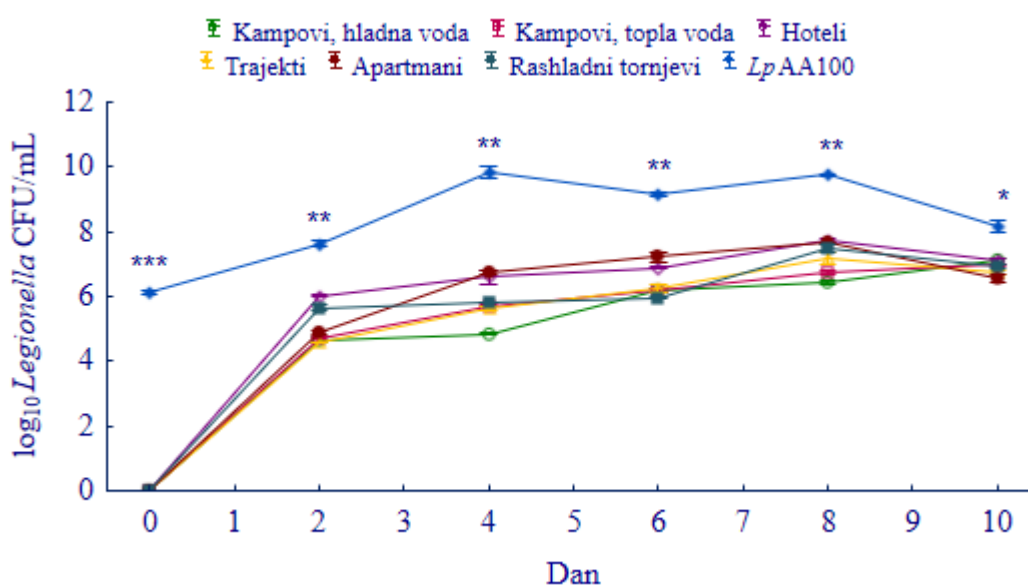
Rezultati pokazuju da se na nultom danu amebne infekcije *L. pneumophila* iz okoliša nije razmnožavala unutar *A. castellanii*. Nasuprot tome, *L. pneumophila* AA100 započela je razmnožavanje te je broj bakterija iznosio 10⁶ CFU/ml u nultom danu infekcije (slika 27., Studentov t-test, $p < 0,001$).

Rast *L. pneumophila* iz okoliša u *A. castellanii* započeo je drugog dana nakon infekcije i povećavao se do osmog dana, nakon čega je započeo njegov pad. Broj *L. pneumophila* iz okoliša apartmana unutar stanice amebe drugog je dana iznosio 8,3 × 10⁴ CFU/ml, 5,5 × 10⁶

CFU/mL (4 dana), $2,0 \times 10^7$ CFU/mL (6 dana), $4,7 \times 10^7$ CFU/mL (8 dana) i $4,0 \times 10^6$ CFU/mL (10 dana) nakon infekcije (slika 27.).

Taj rast pokazuje značajnu razliku u usporedbi s kontrolnim uzorcima (*L. pneumophila* AA100, Studentov t-test, $p < 0,01$ ili $p < 0,05$) kod kojih je broj bakterija pokazivao rast tijekom svih dana promatranog razdoblja infekcije ameba: $4,4 \times 10^7$ CFU/mL (2 dana), $7,5 \times 10^9$ CFU/mL (4 dana), $1,5 \times 10^9$ CFU/mL (6 dana), $5,7 \times 10^9$ CFU/mL (8 dana) i $1,7 \times 10^8$ CFU/mL (10 dana).

L. pneumophila iz okoliša pokazala je sporiji ulazak i rast unutar amebe u promatranome desetodnevnom razdoblju inkubacije u odnosu na kontrolni bakterijski uzorak.



Slika 27. Kinetika-dinamika rasta *L. pneumophila* unutar *A. castellanii* tijekom desetodnevnog razdoblja promatranja. *L. pneumophila* AA100 korištena je kao kontrola. Studentov t-test na razinama vjerojatnosti * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ korišten je za utvrđivanje značajnosti razlike u odnosu na kontrolni uzorak.

4.5 Pasterizacija *Legionella* izolata nakon rasta na agaru i u amebama

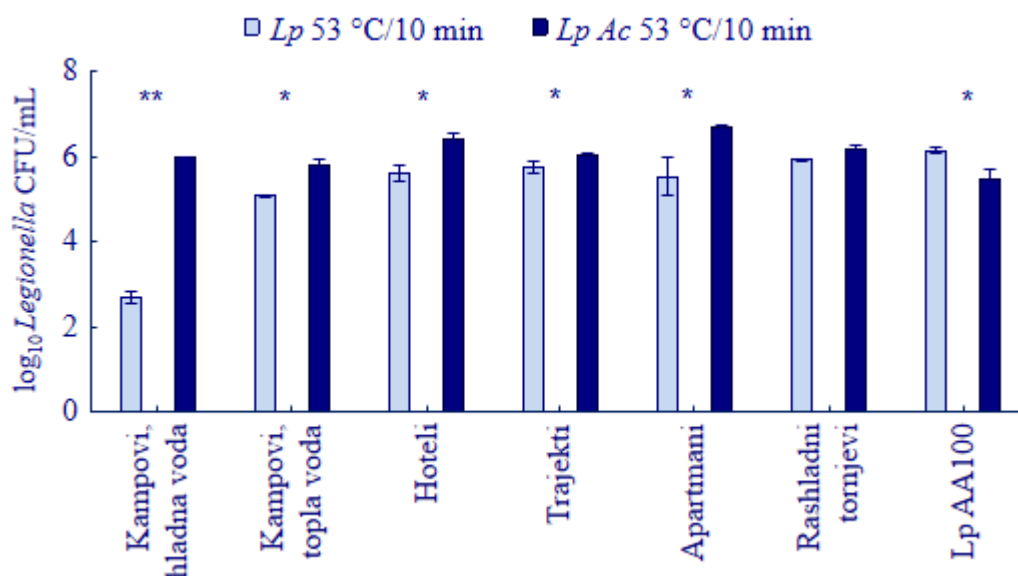
L. pneumophila pokazuje sposobnost preživljavanja u različitim vodnim sustavima, bez obzira na provođenje mjera rutinske dezinfekcije. Utvrđena je i najviša temperatura na kojoj su uzeti uzorci legionele mogli preživljavati u različitim vodnim sustavima na području Primorsko-goranske županije.

Uzorci vode za piće iz vodovoda inokulirani su sa šest izolata legionela u koncentraciji od 10^6 CFU/mL za ispitivanje učinaka pasterizacije. Postupci pasterizacije na 63,5 i 55 °C u trajanju od 10 minuta rezultirali su bakterijskom smrću.

Najviša temperatura na kojoj su izolati *Legionela* iz okolišnih uzoraka preživljavali u našoj studiji iznosila je 53 °C kada je postupak pasterizacije trajao 10 minuta. Sve su bakterije preživjele postupak ako temperatura nije prelazila 50 °C u trajanju od 10 minuta, samo su dvije od šest testiranih *L. pneumophila* (u hladnoj i toploj vodi autokampa) bile uništene nakon postupka pasterizacije na temperaturi od 50 °C i u trajanju postupka od 30 minuta.

Nadovezujući se na to, ispitivali smo broj bakterija naraslih na agaru i unutar stanica ameba nakon toplinskog tretmana na 53 °C u trajanju od 10 minuta; *L. pneumophila* AA100 korištena je kao kontrola. Nakon toplinskog tretiranja na 53 °C u trajanju od 10 minuta, broj *L. pneumophila* poraslih na agaru iznosio je $5,3 \times 10^2$ CFU/mL u hladnoj vodi autokampa, $1,2 \times 10^5$ CFU/mL u toploj vodi autokampa, $4,7 \times 10^5$ CFU/mL u vodi iz hotela, $5,9 \times 10^5$ CFU/mL u vodi iz tankova trajekata, $7,7 \times 10^5$ CFU/mL u vodi iz apartmana, i $8,2 \times 10^5$ CFU/mL iz uzoraka vode iz rashladnih tornjeva (slika 28.). Broj bakterija iz izolata naraslih unutar ameba nakon postupka pasterizacije bio je značajno viši (Studentov t-test, $p < 0,01$ ili $p < 0,05$) u usporedbi s brojem bakterija uzgojenih na agaru: hladna voda iz autokampova $9,2 \times 10^5$ CFU/mL, topla voda iz autokampova $6,8 \times 10^5$ CFU/mL, hotelska voda $2,8 \times 10^6$ CFU/mL, trajekti $1,1 \times 10^6$ CFU/mL, apartmana $4,9 \times 10^6$ CFU/mL i iz rashladnih tornjeva $1,5 \times 10^6$ CFU/mL.

Nasuprot prije spomenutim rezultatima, *L. pneumophila* AA100 koja je narasla unutar ameba bila je u većoj mjeri osjetljiva na razgradnju postupkom pasterizacije u usporedbi s bakterijama koje su bile uzgojene na agaru. Broj AA100 bakterija naraslih unutar ameba nakon postupka pasterizacije iznosio je $4,3 \times 10^5$ CFU/mL, a broj bakterija naraslih na agaru iznosio $1,4 \times 10^6$ CFU/mL (slika 28., Studentov t-test, $p < 0,05$). Jedino bakterije iz različitih okolišnih uzoraka, nakon prilagodbe u svojim vodnim okolišnim ambijentima, kao i *A. castellanii*, postaju otpornije na destrukciju visokom temperaturom.

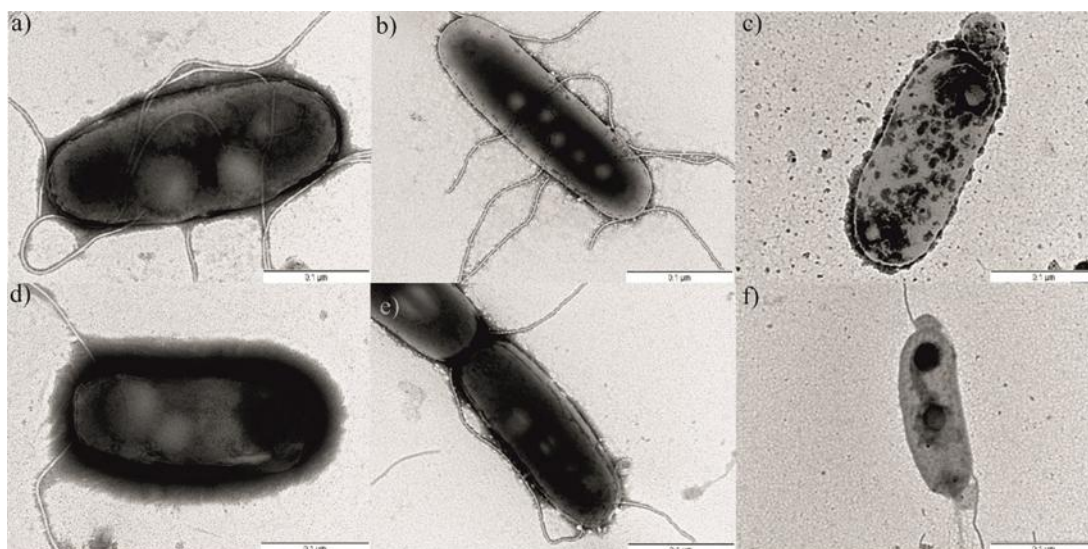


Slika 28. UBB Legionela – *L. pneumophila* uzgojena na agaru (Lp) i *L. pneumophila* uzgojena u *A. castellanii* (Lp AC) – uzorci nakon provedenog postupka pasterizacije na 53 °C u trajanju od 10 minuta. *L. pneumophila* AA100 korištena je kao kontrolni uzorak. Studentov t-test na razinama vjerojatnosti * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ korišten je za utvrđivanje značajnosti razlike u odnosu na kontrolni uzorak.

4.6 Morfologija stanica

Uz pomoć transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM) praćena je morfologija *L. pneumophila* uzgojenih na agaru i u amebi te tretiranih postupkom pasterizacije kako bi se mogle pratiti promjene u strukturi citoplazme i staničnog zida te postojanje bakterijskih organela kao što su bičevi i pili (slika 29.).

L. pneumophila je štapičasta bakterija. Većina bakterija imala je između jedne do tri polarne ili lateralne flagele. Na površini je *L. pneumophila* imala pile različite dužine. Vezano uz to stanice se prikazuju s očuvanom staničnom stijenkom i kompaktnom citoplazmom visoke elektronske gustoće (slika 29.a, 29.d). Usporedno sa stanicama poraslim na agaru, stanice legionele koje su rasle unutar *A. castellanii* nisu pokazale značajne razlike u staničnoj morfologiji (slika 29.b, 29.e).



Slika 29. Slike iz TEMA-a: *L. pneumophila* izoliranih s trajekata: (a) netretirana, (b) uzgojena u *A. castellanii* i (c) uzgojena u *A. castellanii* i pasterizirana na 53 °C u trajanju od 10 min; *L. pneumophila* izolirana iz hotela: (d) netretirana, (e) uzgojena u *A. castellanii*, (f) uzgojena u *A. castellanii* i pasterizirana na 53 °C u trajanju od 10 minuta.

Međutim, postupak pasterizacije na 53 °C u trajanju od 10 min izazvao je promjene u morfologiji bakterijskih stanica (slika 29.c, 29.f). Promjene se prikazuju kao oštećenja stanične stijenke i odvajanje citoplazme od stanične stijenke u približno 70 % bakterija (Studentov t-test, $p < 0,001$). Morfologija citoplazme mijenjala se od citoplazme visoke elektroničke gustoće do srednje elektroničke gustoće.

Dezorganizacija citoplazme također je pokazivala tendenciju zgrušavanja u 67 % pasteriziranih bakterijskih stanica, u usporedbi sa stanicama koje nisu prošle pasterizacijski postupak (Studentov t-test, $p < 0,001$). Na staničnim površinama nedostajali su pili, a broj bičeva se na njima drastično smanjio (slika 29.c, 29.f), Studentov t-test, $p < 0,01$).

Pregled *L. pneumophila* uz pomoć transmisiojske elektronske mikroskopije pokazao je da rast bakterijskih stanica u amebi ne utječe značajnije na promjene u staničnoj morfologiji. Za razliku od toga, pasterizacijski je postupak utjecao na značajnije promjene na morfologiji bakterijskih stanica u odnosu na stanice koje nisu prošle pasterizacijski postupak.

5 RASPRAVA

Ovo istraživanje donosi objedinjenu analizu i interpretaciju podataka o prisutnosti bakterija roda *Legionella* u vodi iz različitih objekata i tehničkih sustava u dva vremenska razdoblja: 2013. – 2019., na temelju prethodno objavljenih rezultata [8], te 2019. – 2024., na temelju proširenog nadzora i novih ispitivanja. Analizirani su pokazatelji učestalosti pozitivnih uzoraka, razine kontaminacije, raspodjela po vrstama objekata, kao i okolišni čimbenici poput temperature vode i koncentracije slobodnog rezidualnog klora. Posebna pažnja posvećena je objektima s ranjivom populacijom, kao i promjenama u regulatornim okvirima koje su utjecale na dizajn i provedbu monitoringa. Usporedbom dvaju razdoblja omogućeno je sagledavanje dugoročnih trendova i identificiranje prioriteta u upravljanju rizicima povezanim s pojavom *Legionella* spp.

Analiza ukupnog broja prikupljenih uzoraka tijekom ispitivanog razdoblja (2019. – 2024.) pokazuje da je ukupno 2541 uzorak vode analiziran na prisutnost *Legionella* spp., pri čemu je više od 70 % uzoraka prikupljeno u kampovima i hotelima, što odražava intenzivan monitoring u turističkom sektoru. Značajan broj uzoraka zabilježen je i u vrtićima, školama i bolnicama, što potvrđuje usmjerenost ispitivanja na objekte od posebnog značaja za zdravlje osjetljivih skupina, poput djece, starijih osoba i pacijenata. Najmanje uzoraka zabilježeno je u kaznenim ustanovama i učeničkim domovima, što može upućivati na manji broj takvih objekata kao i njihovu nižu razinu prioriteta u provedbi ispitivanja. Ova distribucija jasno odražava fokus monitoringa na objekte s povećanim rizikom za izloženost većem broju ljudi, osobito u turističkim područjima i ustanovama koje skrbe za ranjive skupine. Tijekom prethodnog istraživačkog razdoblja (2013. – 2019.) analizirana su ukupno 1932 uzorka vode, od čega više od 90 % prikupljenih iz bazena, hotela i kampova [8], što upućuje na dugotrajan i kontinuiran nadzor nad turističkim sektorom. U novijem razdoblju, iako turizam i dalje dominira, povećan je broj uzoraka iz objekata s osjetljivom populacijom, što se može prije svega pripisati promjeni regulatornih zahtjeva.

Sličan obrazac vidljiv je i u istraživanju provedenom u Italiji gdje je u razdoblju od 2004. do 2019. značajan broj prijavljenih slučajeva legionarske bolesti bio povezan s boravkom u hotelima i drugim turističkim objektima, a manjim dijelom i u zdravstvenim ustanovama, što potvrđuje fokus nacionalnog nadzora upravo nad objektima s povećanim rizikom za veći broj korisnika [129]. Na europskoj razini, višegodišnja analiza putnički povezanih slučajeva pokazala je da su upravo veliki smještajni kapaciteti i prethodni slučajevi bolesti najvažniji

prediktori ponovnog pojavljivanja *Legionella*, čime se dodatno opravdava intenziviran nadzor nad turističkim sektorom [130]. Prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije, nadzor treba biti usmjeren na tzv. objekte visokog rizika, uključujući bolnice, domove za starije, škole i hotele, s naglaskom na sustavno uzorkovanje i procjenu rizika [WHO5].

U okviru istraživanja ukupno je ispitan 2541 uzorak, od toga su 502 (19,8 %) bila pozitivna na prisutnost bakterija roda *Legionella* spp. [8], a u preostalih 2039 (80,2 %) uzoraka prisutnost nije dokazana. Udio pozitivnih uzoraka znatno je varirao među kategorijama objekata. Najviši udio kontaminiranih uzoraka zabilježen je u lječilištima (42,8 %) te u domovima socijalne skrbi, bolnicama i vrtićima (35,0 – 38 %), što ukazuje na visoko mikrobiološko opterećenje u objektima s ranjivim korisnicima. Udjeli iznad 30 % uočeni su i u školama, trgovačkim centrima i učeničkim domovima. Nasuprot tome, hoteli (22,2 %) i kampovi (8,3 %) bilježe relativno nižu učestalost kontaminacije, iako su bili najčešće uzorkovani, što može upućivati na učinkovitost preventivnih mjera i redovitog održavanja u turističkim objektima.

Tijekom prethodnog razdoblja (2013. – 2019.) analizirana su 1932 uzorka, pri čemu je 171 (8,9 %) bio pozitivan na *Legionella* spp. [8]. Najviši udio pozitivnih uzoraka zabilježen je u rashladnim tornjevima (33,9 %), rehabilitacijskim centrima (33,3 %), kampovima (21,8 %) i brodovima (20,6 %). S druge strane, u bazenima je zabilježen nizak udio pozitivnih uzoraka (1,2 %). Ovi nalazi upućuju na dugoročnu stabilnost u obrascima kontaminacije u pojedinim kategorijama objekata, osobito u turističkom sektoru gdje se prisutnost patogena drži pod nadzorom.

Usporedba dvaju razdoblja pokazuje opći porast udjela pozitivnih uzoraka u novijem razdoblju (s 8,9 % na 19,8 %), što se može pripisati poboljšanoj osjetljivosti metoda, proširenju nadzora nad dodatnim kategorijama objekata, kao i regulatornim izmjenama koje su definirale prioritete uzorkovanja. Pritom se potvrđuje i zadržavanje visokoga mikrobiološkog rizika u zdravstvenim ustanovama i domovima za starije, čiji sustavi vodoopskrbe ostaju posebno ranjivi na kolonizaciju bakterijama roda *Legionella*, osobito u kontekstu stagnacije vode, stvaranja biofilma i nedostatne termičke dezinfekcije [131, 132].

Među ostalim objektima, brodovi (11,5 %) i nekategoriirani prioritetni objekti (10,1 %) bilježe umjeren rizik, dok je u neprioritetnim objektima zabilježeno 3,8 % pozitivnih uzoraka. Ovi nalazi upućuju na potrebu za uključivanjem tehnički specifičnih sustava (brodski tankovi, hidrantske mreže, fontane) u program praćenja, osobito ako sadrže uvjete pogodne za rast *Legionella* spp. S druge strane, nizak udio pozitivnih nalaza u neprioritetnim objektima

potvrđuje opravdanost njihove niže kategorizacije u kontekstu javnozdravstvenog rizika. Time se dodatno podupire pristup utemeljen na procjeni rizika, pri čemu intenzitet nadzora treba biti razmjeran epidemiološkom značaju pojedine kategorije objekta [WHO5, 133].

Analiza razina kontaminacije pozitivnih uzoraka dodatno diferencira objekte prema javnozdravstvenom riziku. U više od 80 % uzoraka *Legionella* spp. nije detektirana, što potvrđuje zadovoljavajuću mikrobiološku kvalitetu u većini objekata. Međutim, udio srednje i visoke (16,4 %) te jako visoke kontaminacije (3,4 %) upućuje na postojanje specifičnih žarišta, posebno u trgovačkim centrima, domovima za starije, školama, bolnicama, vrtićima, hotelima, sportskim dvoranama i kampovima, gdje su zabilježene sve kategorije kontaminacije, uključujući i one koje prema smjernicama zahtijevaju hitnu intervenciju.

U prethodnom istraživanju provedenom u Primorsko-goranskoj županiji (2013. – 2019.) utvrđeno je da je 53,9 % pozitivnih uzoraka imalo srednju kontaminaciju, 35,4 % visoku, a 10,7 % jako visoku kontaminaciju [120]. Iako je ukupna prevalencija pozitivnih nalaza u tom razdoblju bila niža, kontaminirani uzorci pokazivali su visoku razinu opterećenja. To potvrđuje da visoke koncentracije kolonija nisu iznimka, već redovito prate žarišta kolonizacije, osobito u objektima sa složenim vodoopskrbnim sustavima i/ili nedostatnim preventivnim mjerama.

Referentne razine kontaminacije definirane su u skladu s preporukama njemačke agencije za okoliš [UBA134] i britanskog vodiča HSG274 [HSE135], koje definiraju pragove od 100, 1000 i 10.000 CFU/L za kategorizaciju rizika i odgovarajuće postupanje [WHO5, 7]. Ovakva kategorizacija omogućuje jasnu procjenu ozbiljnosti kontaminacije i definira potrebne mjere, od rutinskog nadzora do hitnih sanacijskih zahvata.

Godišnja analiza u ovom istraživanju pokazuje trend porasta svih stupnjeva kontaminacije tijekom 2023., a osobito 2024. godine kada je zabilježen maksimalni udio jako visoko kontaminiranih uzoraka (5,6 %). Taj uzlazni trend vjerojatno je povezan s regulatornim promjenama, intenzivnijim uzorkovanjem prioriternih objekata te mogućim posljedicama pandemije bolesti COVID-19, tijekom koje su brojni objekti bili djelomično ili potpuno zatvoreni. Ponovno stavljanje takvih sustava u upotrebu bez odgovarajuće prethodne dezinfekcije moglo je pogodovati razvoju biofilma i porastu kolonizacije. Iako su 2023. i 2024. godina vremenski udaljene od akutne faze pandemije, moguće je da su dugoročne posljedice produljene stagnacije vode, nepotpune obnove režima održavanja i sekundarna kolonizacija sustava i dalje pridonosile povišenim razinama kontaminacije.

Slični nalazi zabilježeni su i u drugim studijama koje izvještavaju o porastu aktivnosti bakterije *Legionella* spp. nakon pandemijskog zatvaranja, što se uglavnom povezuje s produženom stagnacijom vode u instalacijama [136, 137]. U radu iz 2023. godine, provedenom u regiji Campania (Italija), iako je zabilježen blagi pad stope pozitivnih uzoraka s 54,3 % (2019.) na 52,4 % (2022.), udio kontaminiranih objekata značajno je porastao, s 41,1 % (2019.) na 54,5 % (2021.). To sugerira veće širenje kontaminacije među ustanovama u postpandemijskom razdoblju i mogući dugotrajan učinak COVID-19 zatvaranja na sigurnost vodoopskrbnih sustava [138].

Najviši udio jako visoke kontaminacije utvrđen je u trgovačkim centrima (9,9 %), domovima socijalne skrbi (8,7 %), školama (7,7 %) i bolnicama (5,2 %), što potvrđuje potrebu za sustavnim nadzorom upravo nad ustanovama s ranjivim korisnicima [WHO5]. U vrtićima, hotelima, sportskim dvoranama i kampovima udio jako visoke kontaminacije kreće se od 1,4 do 5,0 %, ali u lječilištima, učeničkim domovima i kaznenim ustanovama nije detektirana. Takva distribucija sugerira da rizik ne proizlazi samo iz tipologije objekta, već i iz specifičnih tehničkih karakteristika vodoopskrbnih sustava i obrasca korištenja te provođenja preventivnih mjera. U tom je kontekstu nužan individualizirani pristup planiranju monitoringa i određivanju prioriteta, osobito kada je riječ o ustanovama koje skrbe za osjetljive skupine.

Najveći udio uzoraka iz prioriternih objekata uzet je iz sustava rashladnih tornjeva te iz sustava PTV-a i PHV-a, zajedno s uzorcima s brodova. S obzirom na stupanj jako visoke kontaminacije, na prvom su mjestu rashladni tornjevi (9,0 %), kod sustava PTV-a taj je udio znatno niži (4,3 %), a kod brodskih tankova i PHV je još niži (1,4 – 2,6 %). Ovi nalazi podupiru podatke iz literature koji ukazuju na posebno visok rizik u sustavima koji uključuju zagrijavanje vode i/ili stvaranje aerosola, poput rashladnih tornjeva i sustava potrošne tople vode [WHO5]. Naši podaci pokazuju da su rashladni tornjevi (28,1 %) i sustavi PTV-a (22,4 %) najzastupljeniji među uzorcima koji su pokazali srednju, visoku ili jako visoku razinu kontaminacije, što dodatno potvrđuje njihovu važnost kao visokorizičnih sustava.

Slični obrasci bili su prisutni i u prethodnom razdoblju (2013 .– 2019.) kada su rashladni tornjevi pokazivali najviši udio pozitivnih nalaza (33,9 %), uz čest nalaz vrlo visoke kontaminacije [8]. I sustavi potrošne tople vode bili su značajan izvor kontaminacije, osobito u bolnicama i domovima za starije, u kojima su tehničke karakteristike sustava, uključujući složene mreže cijevi, slabu cirkulaciju i niže temperature vode, pogodovale stvaranju biofilma i rastu *Legionella* spp. Uz to, tadašnji nalazi upućivali su na to da su sustavi potrošne hladne

vode i miješani sustavi pokazivali veću varijabilnost u rezultatima, ovisno o održavanju i frekvenciji korištenja.

S druge strane, hidrantske mreže i ukrasne fontane, koje su svrstane među nekategorizirane objekte, u većini slučajeva pokazuju negativne nalaze, što upućuje na stabilnu mikrobiološku kvalitetu vode u tim sustavima. U oba razdoblja hidrantske mreže nisu imale nijedan pozitivan nalaz, a fontane su u 2019. – 2024. imale samo pojedinačne pozitivne uzorke s niskom koncentracijom. Međutim, dostupna literatura upozorava da i takvi sustavi, iako rjeđe, mogu biti potencijalna žarišta kolonizacije *Legionella* spp., osobito u uvjetima stagnacije vode, povišenih temperatura, stvaranja aerosola i nedostatna održavanja.

U studiji provedenoj u Grčkoj, Chatziprodromidou et al. [139] utvrdili su kontaminaciju *Legionella* spp. u svih petnaest analiziranih javnih fontana tijekom sušne sezone i u 80 % njih u mokroj sezoni, a kvantitativna procjena mikrobiološkog rizika (QMRA) upozorila je na mogućnost značajne izloženosti aerosolima. Slično tomu, Lau and Harte [140] identificirali su prisutnost *Legionella* DNA u pet od sedam ukrasnih fontana u javnim prostorima Novog Zelanda iako bakterije nisu bile izolirane tehnikom kultivacije. Dekorativna fontana smještena u predvorju bolnice u Wisconsinu bila je izvor epidemijskog izbijanja legioneloze 2010., što je potvrđeno mikrobiološkom analizom okolišnih uzoraka i njihovom podudarnošću s kliničkim izolatima [141]. Ovi primjeri ističu potrebu za nadzorom estetskih vodovodnih instalacija, osobito u objektima s ranjivom populacijom.

Većina uzoraka uzetih iz bolnica pokazuje negativan nalaz na *Legionella* spp. U nekoliko su ustanova, međutim, zabilježeni značajni udjeli pozitivnih nalaza, uključujući i visok stupanj kontaminacije. Posebno se ističu bolnice označene brojevima 5, 6 i 9, u kojima je prisutna visoka ili jako visoka kontaminacija, u bolnici 9 čak je 33,3 % uzoraka klasificirano kao jako visoko kontaminirano, a ustanove 5 i 6 zabilježile su udjele iznad 7 % u istoj kategoriji.

Uočena heterogenost rezultata unutar iste vrste objekata pokazuje da rizik nije ravnomjerno raspoređen, već ovisi o specifičnim tehničkim i operativnim značajkama sustava. U slučaju bolnica, koje zbrinjavaju imunokompromitirane pacijente i imaju kompleksne vodovodne sustave s brojnim izvorima aerosola (tuševi, slavine, medicinska oprema), visoki udjeli kontaminacije dodatno ističu potrebu za sustavnim i prilagođenim mjerama upravljanja rizikom. U prethodnom razdoblju (2013. – 2019.) nisu ispitivani uzorci iz bolnica, već isključivo 24 uzorka iz rehabilitacijskih centara [8], što upućuje na ograničen obuhvat zdravstvenih ustanova u tadašnjem monitoringu.

Iskustva iz dugogodišnjeg monitoringa u Italiji pokazuju da se *Legionella* spp. može zadržati unatoč primjeni kontrolnih mjera, s izraženim varijacijama unutar različitih dijelova bolničke mreže [142, 143]. Dodatno, neujednačena prostorna distribucija kontaminacije unutar istog objekta potvrđena je u više epidemija, primjerice u Sjedinjenim Američkim Državama gdje je izbijanje legioneloze povezano s dekorativnom fontanom u bolničkom predvorju, a podudarnost kliničkih i okolišnih izolata potvrdila je izvor infekcije [141].

Rezultati ovog istraživanja jasno potvrđuju važnost usmjeravanja pažnje na bolničke sustave s višim udjelima kontaminacije i nužnost pojačanog uzorkovanja u objektima s dokazanom prisutnošću *Legionella* spp. Time se omogućuje pravodobna identifikacija izvora, provođenje sanacijskih mjera i smanjenje rizika izloženosti pacijenata. Posebno je važno imati na umu da se kontaminacija ne mora ravnomjerno širiti unutar objekta, već može biti ograničena na pojedine segmente tehničkih dijelova sustava, što dodatno naglašava potrebu za ciljanim uzorkovanjem na precizno odabranim lokacijama unutar bolničke vodovodne mreže.

Godišnja analiza uzoraka prema vrsti objekata i sustava te prisutnosti izolata roda *Legionella* u razdoblju 2019. – 2024. ukazuje na određene oscilacije u intenzitetu monitoringa i promjene u obrascima uzorkovanja. Najveći udio neprioritetnih uzoraka zabilježen je 2019. godine, dok su u kasnijim godinama dominirali uzorci s brodova i iz prioritetnih objekata, što sugerira primjenu izmijenjenih kriterija kategorizacije objekata u okviru nacionalnih smjernica. U skladu s takvim pristupom, i u Italiji su razvijeni validirani modeli za određivanje nadzora prema razini rizika, uzimajući u obzir strukturne, tehničke i upravljačke karakteristike objekata [144].

Godišnja raspodjela pozitivnih uzoraka pokazuje da su najviši udjeli *L. pneumophila* serogrupe 1 (4,2 %) i serogrupe 2-14 (11,3 %) zabilježeni upravo 2019. godine. U 2020. slijedi blagi pad, a tijekom 2021. i 2022. detekcije su bile znatno niže. Zatim se 2023. godine bilježi ponovni porast pozitivnosti. Taj uzlazni trend u kasnijim godinama može se povezati s pojačanom primjenom zahtjeva iz novih zakonskih propisa, kao i s obnovljenim monitoringom u objektima koji su tijekom pandemije bolesti COVID-19 bili privremeno zatvoreni ili slabije korišteni. U studiji provedenoj u južnoj Italiji na 73 hotela, udio pozitivnih uzoraka u sustavima tople vode porastao je s 6,7 % (2019.) na 14 % (2020.) nakon zatvaranja duljih od tri mjeseca, što potvrđuje važnost praćenja objekata nakon ponovne aktivacije sustava [145].

Godišnja distribucija iz prethodnog razdoblja (2013. – 2019.) pokazivala je rastući trend u udjelu pozitivnih nalaza. U prve tri godine (2013. – 2015.) *Legionella* spp. nije detektirana ni

u jednom uzorku, što se vjerojatno može pripisati metodološkim ograničenjima i tehničkim poteškoćama u ranim fazama implementacije laboratorijske metode. Prvi pozitivni nalazi zabilježeni su 2016., a otad tada se udio pozitivnih uzoraka postupno povećavao, s najvećom vrijednošću u 2018. godini (14,6 %). Taj se porast može djelomično objasniti proširenjem monitoringa na veći broj objekata, uključujući rashladne tornjeve i bolničke sustave, ali i provedbom ciljane procjene rizika nakon pojedinačnih slučajeva legionarske bolesti. U tom je razdoblju provedena i serotipizacija izolata, pri čemu je dominantno bio zastupljen serotip SG2-14 (80 %), dok je SG1 činio 20 %, što ima važne implikacije za kliničku interpretaciju nalaza i praćenje potencijalnih izvora zaraze [8].

Analiza distribucije prema vrstama objekata pokazuje da su kampovi i hoteli u razdoblju istraživanja najčešće uzorkovani, što je u skladu s naglaskom na turistički sektor. Takav fokus dodatno opravdava činjenica da je *Legionella* spp. otkrivena u 65,4 % turističkih objekata na Balearskim otocima u Španjolskoj, pri čemu je legionarska bolest često povezana upravo s hotelskim smještajem i putovanjima [146]. U 2024. godini zabilježen je značajan porast broja uzoraka iz vrtića (26,3 %), a monitoring je proširen na sve kategorije objekata, što odražava širenje preventivnih aktivnosti. Paralelno s time, vidljivo je i povećanje broja uzoraka iz sustava potrošne tople (PTV) i hladne vode (PHV), dok su rashladni tornjevi i hidranti bili najčešće uzorkovani u 2021. i 2022. godini.

Ovakva raspodjela ukazuje na važnost kontinuiteta ispitivanja i potrebu da se godišnje varijacije tumače u širem kontekstu, uzimajući u obzir regulatorne zahtjeve, promjene u korištenju objekata i sezonalnost, kao i tehnička ograničenja, primjerice nedostatak serotipizacije u 2024. godini, kako bi se osigurala reprezentativnost i usporedivost podataka tijekom više godina.

Distribucijski obrasci pozitivnih uzoraka u ovom istraživanju ukazuju na izraženu povezanost virulentnijih serotipova *L. pneumophila* s kompleksnim objektima i prioritetnim sustavima. Najveći udio pozitivnih izolata zabilježen je u trgovačkim centrima (29,1 %) i bolnicama (28,7 %). Posebnu pozornost zahtijevaju bolnice u kojima je utvrđena i najveća učestalost SG1 izolata (7,2 %) koji su izravno povezani s težim oblicima legionarske bolesti i češće su uzrok kliničkih infekcija. U domovima socijalne skrbi (15,2 %) i lječilištima (14,3 %) dominirali su SG2-14 sojevi, što upućuje na potrebu za kontinuiranim nadzorom nad ustanovama koje skrbe o ranjivim skupinama.

Naši nalazi u skladu su s dosadašnjim znanstvenim spoznajama. Najnoviji podaci Europskog centra za sprječavanje i kontrolu bolesti [ECDC39] potvrđuju da je SG1 zabilježena u 82 % nalaza kulture kod potvrđenih slučajeva bolesti u 2021. godini, dok je kod slučajeva povezanih s putovanjima taj udio dosezao čak 93 %. Istodobno, okolišni uzorci često pokazuju dominaciju SG2-14, osobito u zdravstvenim i socijalnim ustanovama.

Slična distribucija utvrđena je i u prethodnom razdoblju (2013. – 2019.) u kojemu je od ukupno 168 *L. pneumophila* izolata 76 % pripadalo SG2-14, a preostalih 22,2 % SG1 [8]. SG2-14 sojevi tada su najčešće izolirani iz kampova, brodova i rashladnih tornjeva, a SG1 izolati bili karakteristični za turističke objekte. Ti nalazi potvrđuju obrasce okolišne distribucije pojedinih serotipova i upućuju na mogućnost povezanosti između tipa objekta, karakteristika sustava i dominantne serogrupe.

Važno je istaknuti da test antigena u urinu (*engl.* urinary anigen test – UAT), kao najčešće rabljena brza dijagnostička metoda, detektira isključivo SG1, što otvara mogućnost podcjenjivanja kliničkog značaja ostalih serotipova unatoč njihovoj potvrđenoj prisutnosti u okolišu [147]. Time okolišna detekcija serotipova SG2-14, premda klinički manje evidentna, može biti važan indikator postojanja infekcijskog rizika koji prolazi ispod radara u rutinskoj dijagnostici.

U našem istraživanju izostanak pozitivnih nalaza SG1 i SG2-14 u školama i sličnim objektima tijekom 2024. godine ne ukazuje nužno na odsutnost rizika, već najvjerojatnije proizlazi iz metodološkog ograničenja, serotipizacija u toj godini nije provedena. To dodatno naglašava potrebu za kontinuiranim i cjelovitim laboratorijskim ispitivanjem, uključujući serotipizaciju, kako bi se osigurala reprezentativna procjena mikrobiološkog rizika i izbjegla podcijenjena izloženost.

Analiza distribucije u oba razdoblja pokazala je i da su serotipovi SG1 i SG2-14 gotovo isključivo potvrđeni u uzorcima iz prioritetnih objekata, dok njihova prisutnost nije utvrđena u neprioritetnim i nekategoriziranim objektima. U uzorcima s brodova ti su serotipovi potvrđeni u svega 1,0 % slučajeva, što je u skladu s tehničkim karakteristikama zatvorenih sustava s povremenim punjenjem i ispuštanjem. Izbijanje legioneloze u bolničkom odjelu u Alabami, gdje je SG1 izoliran u 90 % uzoraka, dodatno potvrđuje da su složeni vodovodni sustavi u prioritetnim objektima povoljno okruženje za kolonizaciju visokovirulentnim serotipovima [148].

Dobiveni rezultati upućuju na složen odnos između koncentracije slobodnog rezidualnog klora i razine kontaminacije *Legionella* spp. U uzorcima s koncentracijom klora ispod 0,2 mg/L nisu zabilježeni pozitivni nalazi. Nasuprot tome, u uzorcima s višim koncentracijama klora (0,2 – 0,5 mg/L) zabilježeni su slučajevi srednje, visoke i jako visoke kontaminacije, a udio pozitivnih nalaza dodatno raste u uzorcima s koncentracijama većim od 2 mg/L. Takvi rezultati mogu ukazivati na to da je povećanje koncentracije klora u nekim slučajevima provedeno reaktivno, kao mjera nakon već utvrđene kontaminacije, a ne kao preventivna zaštita.

Analiza rezultata iz razdoblja 2013. – 2019., objavljena u radu Knežević i sur. [8], pokazala je da su u trećini uzoraka koji su bili pozitivni na *L. pneumophila* vrijednosti koncentracije slobodnog klora bile su ispod ili na granici detekcije korištene metode ($\leq 0,02$ mg/L). U većini pozitivnih uzoraka (63,2 %) koncentracije klora bile su niske, u rasponu 0,03 – 0,1 mg/L, a samo je manji udio (4,9 %) imao vrijednosti između 0,2 i 0,5 mg/L. Taj uzorak distribucije sugerira da je kolonizacija najizraženija u uvjetima niskog ili odsutnog rezidualnog klora, ali i da visoke koncentracije same po sebi nisu jamstvo dekontaminacije.

Takvo tumačenje podupire i višegodišnje istraživanje provedeno u starim bolničkim objektima u Italiji gdje su visoke koncentracije klora (> 2 mg/L) najčešće korištene kao korektivna mjera u uvjetima neadekvatne infrastrukture i odsutnosti recirkulacije tople vode. Autori su zaključili da je kontinuirano održavanje razine slobodnog klora između 0,5 i 1,0 mg/L dugoročno djelotvorna opcija za smanjenje kolonizacije *Legionella* iako može negativno utjecati na senzorska i kemijska svojstva vode [149].

Prethodno istraživanje iz razdoblja 2013. – 2019. ukazivalo je na sličan obrazac, i tada su pozitivni nalazi najčešće zabilježeni u uzorcima s niskim koncentracijama klora, dok je u uzorcima s kontinuirano povišenim koncentracijama prisutnost bakterija bila rijetka. Ipak, autori su istaknuli da učinkovitost klora značajno opada u prisutnosti biofilma, korozije i niskih protoka, što ograničava njegovu ulogu kao samostalnog sredstva prevencije [8].

Dodatna studija pokazala je da *L. pneumophila*, posebno unutar biofilma, može preživjeti i nakon izlaganja vrlo visokim koncentracijama klora (do 200 mg/L), što dodatno potvrđuje ograničenja oslanjajući se na klor bez sustavnog održavanja i tehničke optimizacije sustava [150]. U tom kontekstu, da bi se osigurala stvarna zaštita krajnjih korisnika, monitoring koncentracije slobodnog klora treba biti praćen analizom učinkovitosti sustava distribucije, prisutnosti biofilma i ukupne fizikalno-kemijske ravnoteže vode.

Temperatura vode ključni je okolišni čimbenik koji određuje rizik od kolonizacije vodovodnih sustava bakterijama roda *Legionella*. Brojna istraživanja potvrđuju da je optimalan raspon za rast *L. pneumophila* između 35 i 45 °C, s najintenzivnijim rastom u rasponu od 37 do 42 °C, dok rast u pravilu ne započinje ispod 25 °C, a prestaje iznad 50 °C [100, 120, 151, 152]. Naši rezultati dodatno potvrđuju ove nalaze; najveći udio jako visoke kontaminacije (7,6 %) zabilježen je upravo unutar temperaturnog raspona 32 – 42 °C, dok je pri temperaturama iznad 60 °C zabilježena potpuna odsutnost pozitivnih uzoraka. To je u skladu s izvješćima o 90 % inaktivacije unutar dvije minute na 60 °C, dok temperature iznad 70 °C dovode do gotovo trenutačne eliminacije bakterije [NASEM153]. Slični nalazi zabilježeni su i u istraživanju Glažar Ivče i sur. [120], u kojem je utvrđeno da je broj pozitivnih uzoraka bio veći tijekom toplijeg dijela godine (srpanj-prosinac), dok je veći broj kolonija zabilježen pri nižim temperaturama tople vode, uglavnom ispod preporučenih 50 – 55 °C.

U našem istraživanju statistički niža temperatura u pozitivnim uzorcima tople vode (42,3 °C) u odnosu na negativne (51,3 °C) snažno sugerira da sustavi koji ne dosežu preporučene temperaturne pragove predstavljaju povećan rizik za razvoj *L. pneumophila*. Iako minimalna (20,0 vs. 19,9 °C), razlika u temperaturi hladne vode bila je statistički značajna, što podupire tezu o mogućoj kolonizaciji i u hladnovodnim sustavima [120]. Slični rezultati zabilježeni su i u istraživanjima iz Grčke i Irana, u kojima je utvrđeno da i hladna voda može sadržavati *Legionella* ako temperatura prijeđe 20 °C [131, 154, 155].

Iako se na temperaturama ispod 20 °C učestalost pozitivnih uzoraka smanjuje, kontaminacija je i dalje prisutna. To potvrđuje sposobnost bakterije da preživi u hladnijim uvjetima, osobito u stagnirajućim dijelovima sustava te unutar biofilma koji joj pruža zaštitu od fizikalnih i kemijskih stresora. Važno je istaknuti i mogućnost prisutnosti drugih vrsta roda *Legionella* sa specifičnim temperaturnim zahtjevima. Primjerice, novootkrivena vrsta *Legionella sheltonii* sp. nov., izolirana iz hladnovodnoga broskog sustava, pokazuje optimalan rast pri 34 – 36 °C te toleranciju na temperaturni raspon od 32 – 38 °C [156], što dodatno potvrđuje ekološku prilagodljivost i raznolikost ovog roda.

Dodatno, rezultati iz razdoblja 2013. – 2019. ukazuju na prisutnost *Legionella* spp. i u sustavima s hladnom vodom pri temperaturama u rasponu od 8,0 do 35,1 °C, što potvrđuje sposobnost preživljavanja bakterije i u uvjetima ispod optimalnoga temperaturnog raspona. Statistički su utvrđene razlike u temperaturama između pozitivnih i negativnih uzoraka i u sustavima s hladnom i toplom vodom; u hladnoj vodi pozitivni su uzorci imali višu medijan

vrijednost za 1,8 °C, a u toploj vodi *Legionella*-pozitivni uzorci imali su medijan temperature za 9,8 °C niži u odnosu na negativne. Posebno se ističu razlike među serogrupama: u uzorcima s potvrđenim sojevima *L. pneumophila* SG1, medijan temperature bio je čak 8,8 °C viši u usporedbi s uzorcima pozitivnima na SG2-14. S obzirom na kliničku važnost SG1, ovi nalazi dodatno potvrđuju potrebu za održavanjem preporučenih toplinskih režima kako bi se smanjio rizik od kolonizacije najvirulentnijim sojevima. Također podupiru preporuke za održavanje temperature tople vode iznad 55 – 60 °C kao osnovne preventivne mjere za sprječavanje širenja *Legionella* spp., osobito u ustanovama s povećanim rizikom od izloženosti aerosolima, poput bolnica, vrtića, domova za starije i sportskih centara. Uz optimalnu temperaturu, nužno je i održavanje učinkovitih razina rezidualnog slobodnog klora te redovito tehničko održavanje sustava, čime se dodatno smanjuje rizik od kolonizacije.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da prolazak kroz *Acanthamoeba castellanii* povećava preživljavanje *L. pneumophila* nakon pasterizacije, bez promjene alelnog profila bakterije ili fenotipa. Međutim, transmisijском elektronskom mikroskopijom otkrila su se izražena ultrastrukturalna oštećenja u pasteriziranim stanicama, ali ne i u stanicama uzgojenim u amebama. Ti nalazi podržavaju i proširuju prethodna zapažanja da amebe mogu djelovati kao skloništa u okolišu i domaćinu koji podstiču stres za bakterije roda *Legionella*, s važnim implikacijama za strategije termičke kontrole u vodnim sustavima [8, 157]. Nekoliko međusobno neisključivih mehanizama može objasniti zašto su *L. pneumophila* uzgojene u amebama otpornije na toplinsku inaktivaciju. Prvo, unutarstanični ciklus inducira fiziološku diferencijaciju kod *Legionella*, prebacujući se između replikativnog i transmisivnog/stres-tolerantnog stanja i pojačavajući sustave odgovora na stres (šaperoni toplinskog šoka, proteaze) koji mogu poboljšati kratkoročno preživljavanje tijekom izlaganja toplini [157]. Drugo, amebe (posebno ciste) pružaju fizičko utočište koje smanjuje izravnu izloženost dezinficijensima i toplini; bakterije oslobođene iz ameba stoga se mogu prekondicionirati ili osloboditi u robusnijim oblicima, uključujući agregate, ili unutar amebnih ostataka, što pruža dodatnu zaštitu [158]. Treće, mikrobne interakcije i endosimbionti povezani s amebama mogu modulirati fiziologiju *Legionella* i ekspresiju gena virulencije, neizravno utječući na toleranciju na okoliš [159]. Konačno, eksperimentalne studije evolucije kod *L. pneumophila* pokazuju da selekcija mutacija u sustavima toplinskog šoka i šaperona (npr. dnaJ/dnaK/clpB/htpG/clpX) može proizvesti nasljedno povećanje tolerancije na toplinu, što upućuje na to da su moguće i prolazna fiziološka prilagodba i selekcija termotolerantnih subpopulacija [160]. TEM je u našem radu otkrio jasna ultrastrukturalna oštećenja pasteriziranih *Legionella*, promjene

membrane i citoplazme u skladu s toplinskim izlaganjem, dok su stanice uzgojene u amebama zadržale normalnu morfologiju. To sugerira da prolaz ameba ne proizvodi isto neposredno oštećenje ovojnice kao pasterizacija, već umjesto toga može pripremiti stanice ili zaštititi subpopulacije na načine koji nisu vidljivi morfologijom. Nedostatak morfoloških promjena nakon rasta u amebama suprotan je nalazima za druge patogene, primjerice *Francisella novicida* kod koje su zabilježena oštećenja stanične stijenke i propuštanje citoplazme nakon rasta u amebama [161]. Takve razlike naglašavaju da su interakcije domaćina i mikroba specifične za vrstu: rast ameba može izazvati različite fiziološke i strukturne ishode ovisno o bakterijama i prirodi unutarstaničnih interakcija. SBT analiza provedena je kako bi se provjerilo dolazi li nakon intracelularnog rasta u amebama i toplinske obrade do promjena analiziranih alelnih profila te kako bi se ispitala genetska stabilnost istraživanih izolata. Budući da je analiza provedena na ograničenom broju okolišnih izolata, dobivene rezultate treba promatrati kao pokazatelj stabilnosti analiziranih SBT profila u ispitanim uvjetima, a ne kao konačnu potvrdu izostanka genetskih promjena. Prolazak kroz *A. castellanii* povećava preživljavanje *L. pneumophila* nakon termičke obrade bez promjene detektabilnog alelnog profila ili fenotipa, dok pasterizacija proizvodi jasna ultrastrukturalna oštećenja u preživjelim stanicama.

Rezultate ovog istraživanja potrebno je interpretirati uzimajući u obzir nekoliko ograničenja. Istraživanje je provedeno na području Primorsko-goranske županije, zbog čega dobiveni rezultati odražavaju specifičnosti lokalnih vodoopskrbnih sustava i organizacije monitoringa te ih treba oprezno generalizirati na druga geografska područja. Iako je dio istraživanja koji se odnosio na pojavnost legionela obuhvatio velik broj uzoraka prikupljenih tijekom jedanaestogodišnjeg razdoblja, eksperimentalni dio proveden je na ograničenom broju okolišnih izolata odabranih kao reprezentativni za detaljniju analizu utjecaja intracelularnog rasta u amebama. U istraživanju provedenom od 2019. do 2024. godine, od ukupno 668 procijenjenih subjekata koji upravljaju prioritetnim objektima na području Primorsko-goranske županije, uzorci vode prikupljeni su kod 270 subjekata (40,4 %). Navedeni obuhvat predstavlja ograničenje koje treba uzeti u obzir pri interpretaciji i generalizaciji dobivenih rezultata. SBT tipizacija korištena je za procjenu očuvanja alelnih profila nakon intracelularnog rasta u amebama i toplinske obrade. Budući da je analiza provedena na manjem broju izolata, dobivene rezultate o očuvanju SBT profila treba tumačiti kao pokazatelj njihove genetske stabilnosti u ispitanim uvjetima, a ne kao konačnu potvrdu izostanka genetskih promjena. Stoga oni predstavljaju vrijedan doprinos razumijevanju opaženih mehanizama, no njihovu je valjanost

potrebno potvrditi na većem broju izolata različitoga genetskog podrijetla. U istraživanju je korišten jedan model okolišnog domaćina, *Acanthamoeba castellanii*, kao dobro prihvaćen eksperimentalni model za proučavanje interakcija između legionela i protozoa. Međutim, u prirodnim sustavima legionela ostvaruje interakcije s različitim vrstama ameba i drugih protozoa, što može utjecati na intenzitet intracelularnog rasta i otpornost bakterije na okolišne stresove.

Unatoč navedenim ograničenjima, dugogodišnje praćenje velikog broja uzoraka, molekularna karakterizacija okolišnih izolata i eksperimentalno ispitivanje utjecaja intracelularnog rasta u amebama omogućilo je cjelovitiji uvid u ekologiju, perzistenciju i čimbenike virulencije vrste *L. pneumophila* te pruža čvrstu osnovu za buduća istraživanja i unaprjeđenje mjera upravljanja rizikom.

6 ZAKLJUČCI

- 1) *L. pneumophila* je potvrđena u različitim sustavima s vodom na području Primorsko-goranske županije, pri čemu je u razdoblju 2019. – 2024. zabilježen porast pozitivnih nalaza i razina kontaminacije u odnosu na razdoblje 2013. – 2019. Najveći javnozdravstveni rizik utvrđen je u prioritetnim objektima, osobito bolnicama, domovima socijalne skrbi i trgovačkim centrima.
- 2) Pojavnost *L. pneumophila* bila je povezana s fizikalno-kemijskim karakteristikama vode. Temperature vode iznad 60 °C učinkovito su sprječavale kolonizaciju, dok su temperature od 32 do 50 °C pogodovale njezinu rastu. Povećane vrijednosti ukupnog broja bakterija te niske koncentracije slobodnog klora bile su povezane s većom vjerojatnošću kolonizacije, potvrđujući važnost kontinuiranog praćenja fizikalno-kemijskih parametara u procjeni rizika.
- 3) Molekularna i fenotipska karakterizacija okolišnih izolata omogućila je određivanje dominantnih serogrupa i sekvencijskih tipova *L. pneumophila*, potvrđujući vrijednost serotipizacije i SBT tipizacije u epidemiološkom praćenju, utvrđivanju izvora kontaminacije i procjeni rizika.
- 4) Rezultati potvrđuju da je interakcija *L. pneumophila* s amebama važan čimbenik njezine perzistencije u sustavima s vodom. Intracelularni rast u amebama povećava sposobnost preživljavanja bakterije u nepovoljnim okolišnim uvjetima te može smanjiti učinkovitost mjera dezinfekcije, što treba uzeti u obzir pri procjeni rizika i planiranju mjera kontrole.
- 5) Intracelularni rast *L. pneumophila* u *Acanthamoeba castellanii* povećao je otpornost bakterije na toplinsku dezinfekciju i ublažio ultrastrukturna oštećenja nakon pasterizacije, no nije uzrokovao promjene SBT profila niti fenotipskih obilježja izolata. Dobiveni rezultati upućuju na to da je povećana otpornost posljedica fiziološke prilagodbe bakterije tijekom intracelularnog rasta, a ne trajnih genotipskih promjena.
- 6) Provedeno istraživanje prvi put je na okolišnim izolatima iz Republike Hrvatske povezalo dugogodišnje epidemiološko praćenje kolonizacije *L. pneumophila* u sustavima s vodom s eksperimentalnim ispitivanjem utjecaja intracelularnog rasta u amebama na otpornost bakterije prema toplinskoj dezinfekciji. Dobiveni rezultati izvoran su znanstveni doprinos razumijevanju perzistencije *L. pneumophila* u vodnim

sustavima te imaju praktičnu vrijednost za unaprjeđenje monitoringa i upravljanja rizikom u objektima od javnozdravstvenog značaja.

7 LITERATURA

1. 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.
2. Luo ZQ. Striking a balance: modulation of host cell death pathways by *Legionella pneumophila*. Front Microbiol 2011;2:36.
3. Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med 1994;154(21):2417-22.
4. 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.
5. WHO, Bartram J, Chartier Y, Lee J, Pond K, Surman-Lee S. *Legionella* and the prevention of legionellosis. Geneva, Switzerland; 2007.
6. Beauté J. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. Euro Surveill 2017;22(27).
7. Van Kenhove E, Dinne K, Janssens A, Laverge J. Overview and comparison of *Legionella* regulations worldwide. Am J Infect Control 2019;47(8):968-78.
8. 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):1099.
9. Rakic A, Stambuk-Giljanovic 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.
10. Hoffmann C, Harrison CF, Hilbi H. The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. Cell Microbiol 2014;16(1):15-26.
11. Kilvington S, Price J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. J Appl Bacteriol 1990;68 519-25.
12. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol 1980;33(12):1179-83.
13. 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 2001;147(Pt 11):3121-6.
14. 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.
15. Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Lévi Y. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. J Appl Microbiol 2004;97(5):950-63.
16. Wang Y, Jiang L, Zhou F, Zhang Y, Fine RD, Li M. The hidden dancers in water: the symbiotic mystery of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. Front Microbiol 2025;16:1634806.
17. Fields B, Benson R, Besser R. *Legionella* and Legionnaire's disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002;15(3):506-26.
18. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clin Microbiol Rev 2015;28(1):95-133.
19. CDC. Clinical overview of Legionnaires' disease: Centers for Disease Control and Prevention; 2025 [Available from: <https://www.cdc.gov/legionella/hcp/clinical-overview/index.html>] [Accessed 30.1.2026].

20. Cooley LA, Pondo T, Francois Watkins LK, Shah P, Schrag S. Population-Based Assessment of Clinical Risk Factors for Legionnaires' Disease. *Clin Infect Dis* 2020;70(11):2428-31.
21. Correia AM, Ferreira JS, Borges V i sur. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N Engl J Med* 2016;374(5):497-8.
22. ECDC ELDSNet. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) – Operating procedures for the surveillance of travel-associated Legionnaires' disease in the EU/EEA. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2017. Available from: <https://doi.org/10.2900/485245>.
23. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(1):20-8.
24. Heyder J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1(4):315-20.
25. Prussin AJ, Schwake DO, Marr LC. Ten questions concerning the aerosolization and transmission of *Legionella* in the built environment. *Build Environ* 2017;123:684-95.
26. WHO. Legionellosis Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2022 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis> [Accessed 2.12.2025]].
27. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T i sur. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis* 2014;14(10):1011-21.
28. Berk SG, Faulkner G, Garduño E, Joy MC, Ortiz-Jimenez MA, Garduño 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.
29. Graham CI, Gierys AJ, MacMartin TL i sur. Transcription factors DksA and PsrA are synergistic contributors to *Legionella pneumophila* virulence in *Acanthamoeba castellanii* protozoa. *Microbiology* 2025;171(4).
30. Yang J-L, Li D, Zhan X-Y. Concept about the Virulence Factor of *Legionella*. *Microorganisms* 2023;11(1):74.
31. Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, Guyard C. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *Int J Mol Sci* 2013;14(11):21660-75.
32. Amaro F, Shuman HA. Selection of *Legionella* virulence-related traits by environmental protozoa. *Legionella*. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer, 2019; str. 61–74.
33. Amer A, Abu Khweek A. Biofilm, a Cozy Structure for *Legionella pneumophila* Growth and Persistence in the Environment. U: Dincer S, Sumengen Ozdenefe M, Arkut A, ur. *Bacterial Biofilms*. London: IntechOpen, 2019.
34. Lau HY, Ashbolt NJ. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol* 2009;107(2):368-78.
35. 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.
36. Taylor M, Ross K, Bentham R. *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* 2009;58(3):538-47.
37. Falkinham JO, Pruden A, Edwards M. Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Increasingly Important Pathogens in Drinking Water. 2015;4(2):373-86.
38. Cunha BA. Legionnaires' disease: clinical differentiation from typical and other atypical pneumonias. *Infect Dis Clin North Am* 2010;24(1):73-105.
39. ECDC. Legionnaires' disease. Annual Epidemiological Report for 2021. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2023. Available from:

40. Gupta SK, Imperiale TF, Sarosi GA. Evaluation of the Winthrop-University Hospital criteria to identify *Legionella pneumoniae*. Chest 2001;120(4):1064-71.
41. Macfarlane JT, Miller AC, Roderick Smith WH, Morris AH, Rose DH. Comparative radiographic features of community acquired Legionnaires' disease, pneumococcal pneumonia, mycoplasma pneumonia, and psittacosis. Thorax 1984;39(1):28-33.
42. 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.
43. Benin AL, Benson RF, Besser RE. Trends in Legionnaires Disease, 1980–1998: Declining Mortality and New Patterns of Diagnosis. Clin Infect Dis 2002;35(9):1039-46.
44. Fernández-Sabé N, Rosón B, Carratalà J, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Clinical Diagnosis of *Legionella* Pneumonia Revisited: Evaluation of the Community-Based Pneumonia Incidence Study Group Scoring System. Clinical Infectious Diseases 2003;37(4):483-9.
45. Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin Infect Dis 2003;36(1):64-9.
46. 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.
47. Nelson DP, Rensimer ER, Raffin TA. *Legionella pneumophila* Pericarditis Without Pneumonia. Arch Intern Med 1985;145(5):926.
48. Svendsen JH, Jønsson V, Niebuhr U. Combined pericarditis and pneumonia caused by *Legionella* infection. Br Heart J 1987;58(6):663-4.
49. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti C. Comparison of BCYE α +AB agar and MWY agar for detection and enumeration of *Legionella* spp. in hospital water samples. BMC Microbiol 2021;21:48.
50. 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.
51. Quero S, Párraga-Niño N, Barrabeig I i sur. Population structure of Environmental and Clinical *Legionella pneumophila* isolates in Catalonia. Sci Rep 2018;8(1):6241.
52. 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.
53. Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. Infect Immun 2002;70(11):6273-83.
54. 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.
55. Hoffmann C, Finsel I, Otto A i sur. Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified Legionella-containing vacuoles from macrophages. Cell Microbiol 2014;16(7):1034-52.
56. Katz SM, Hammel JM. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. Ann Clin Lab Sci 1987;17(3):150-6.
57. Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. Appl Environ Microbiol 2003;69(5):2540-7.

58. Ozanic M, Marecic V, Knezevic M i sur. The Important Role of Metal Ions for Survival of *Francisella* in Water within Amoeba Environment. Biomed Res Int 2021.
59. Yee RB, Wadowsky RM. Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water. Appl Environ Microbiol 1982;43(6):1330-4.
60. Anand CM, Skinner AR, Malic A, Kurtz JB. Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). J Hyg (Lond) 1983;91(2):167-78.
61. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. Infect Immun 1994;62(8):3254-61.
62. Wadowsky RM, Yee RB. Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. Appl Environ Microbiol 1983;46(6):1447-9.
63. Nisar MA, Hayward C, Ross KE, Brown MH, Bentham R, Whiley H. Efficacy of physical and chemical disinfection against clinically relevant free-living amoebae isolated from drinking water and plumbing biofilms. Front Microbiol 2025;16:1654984.
64. Hanford HE, Von Dwingelo J, Abu Kwaik Y. Bacterial nucleomodulins: A coevolutionary adaptation to the eukaryotic command center. PLOS Pathogens 2021;17(1):e1009184.
65. Vaughn B, Voth K, Price CT i sur. An Indispensable Role for the MavE Effector of *Legionella pneumophila* in Lysosomal Evasion. mBio 2021;12(1).
66. 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.
67. Gomez-Valero L, Chiner-Oms A, Comas I, Buchrieser C. Evolutionary Dissection of the Dot/Icm System Based on Comparative Genomics of 58 *Legionella* Species. Genome Biol Evol 2019;11(9):2619-32.
68. Schroeder GN. The Toolbox for Uncovering the Functions of *Legionella* Dot/Icm Type IVb Secretion System Effectors: Current State and Future Directions. Front Cell Infect Microbiol 2017;7:528.
69. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. Virulence 2021;12(1):1122-44.
70. Newton Hayley J, Ang Desmond KY, van Driel Ian R, Hartland Elizabeth L. Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*. Clinical Microbiology Reviews 2010;23(2):274-98.
71. 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.
72. Messi P, Bargellini A, Anacarso I, Marchesi I, de Niederhäusern S, Bondi M. Protozoa and human macrophages infection by *Legionella pneumophila* environmental strains belonging to different serogroups. Arch Microbiol 2013;195(2):89-96.
73. Hammes F, Gabrielli M, Cavallaro A i sur. Foresight 2035: a perspective on the next decade of research on the management of *Legionella* spp. in engineered aquatic environments. FEMS Microbiol Rev 2025;49.
74. Han XY. Effects of climate changes and road exposure on the rapidly rising legionellosis incidence rates in the United States. PLoS One 2021;16(4):e0250364.
75. Simmering J, Polgreen L, Hornick D, Sewell D, Polgreen P. Weather-Dependent Risk for Legionnaires' Disease, United States. Emerg Infect Dis 2017;23(11):1843.
76. EU DWD 2020/2184. Directive (EU) 2020/2184 on the quality of water intended for human consumption. Brussels: European Parliament and the Council of the European Union; 2020.
77. WHO. Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first and second addenda. World Health Organization. Geneva; 2022.

78. Haas CN, Rose JB, Gerba CP. Quantitative Microbial Risk Assessment. Hoboken, NJ: Wiley; 2014. str.
79. WHO. Quantitative Microbial Risk Assessment: Application for Water Safety Management. Geneva: WHO Press; 2016. str.
80. ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation of Infections Caused by *Legionella* species. Brussels: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2017.
81. EU SHIPSAN ACT. European Manual for Hygiene Standards and Communicable Diseases Surveillance on Passenger Ships. Larissa, Greece: European Commission Directorate-General for Health and Food Safety; 2016. str.
82. EN 806. EN 806: Specifications for installations inside buildings conveying water for human consumption. Brussels: European Committee for Standardization; 2021.
83. EN 1717. EN 1717: Protection against pollution of potable water in water installations and general requirements of devices to prevent pollution by backflow. Brussels: European Committee for Standardization; 2021.
84. EN 10088. EN 10088: Stainless steels – Part 1–3: Technical delivery conditions for sheets, plates and strips for general purposes. Brussels: European Committee for Standardization; 2014.
85. EN ISO 11731. EN ISO 11731: Water quality – Enumeration of *Legionella*. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
86. NN 64/2023. Pravilnik o parametrima sukladnosti i metodama analize vode za ljudsku potrošnju. Zagreb, Hrvatska: Narodne novine, Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske; 2023.
87. 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.
88. NN 30/2023. Zakon o vodi za ljudsku potrošnju. Zagreb, Hrvatska: Narodne novine; 2023.
89. HZJZ. Hrvatski zdravstveno statistički ljetopis. Tablica 5/I. Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2021.
90. HRN EN ISO 11731:2017. Kvaliteta vode - Brojenje *Legionella* (ISO 11731:2017; EN ISO 11731:2017). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2017.
91. Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. Environ Microbiol 2010;12(3):557-66.
92. Wadowsky RM, Wolford R, McNamara AM, Yee RB. Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. Appl Environ Microbiol 1985;49(5):1197-205.
93. Berry D, Xi C, Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems. Curr Opin Biotechnol 2006;17(3):297-302.
94. Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. Water Res 2002;36(18):4433-44.
95. LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. Appl Environ Microbiol 1988;54(3):649-54.
96. Wingender J, Flemming HC. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. Int J Hyg Environ Health 2011;214(6):417-23.
97. Gaia V, Fry Norman K, Harrison Timothy G, Peduzzi R. Sequence-Based Typing of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Offers the Potential for True Portability in Legionellosis Outbreak Investigation. J Clin Microbiol 2003;41(7):2932-9.

98. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl 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.
99. 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.
100. Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V i sur. *Legionella* infection risk from domestic hot water. Emerg Infect Dis 2004;10(3):457-64.
101. Kyritsi MA, Mouchtouri VA, Katsioulis A i sur. *Legionella* Colonization of Hotel Water Systems in Touristic Places of Greece: Association with System Characteristics and Physicochemical Parameters. Int J Environ Res Public Health 2018;15(12):2707.
102. Li X, Xu J, Wu J, Weir MH, Xi C. Prevalence of *Legionella* in a Public Building Water Plumbing System During COVID-19 Lockdown. Environ Health (Wash) 2023;1(5):352-9.
103. 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.
104. Moffat JF, Tompkins LS. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. Infect Immun 1992;60(1):296-301.
105. WHO. Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition. Geneva: World Health Organization; 2011.
106. Stout J, Yu V. Legionellosis. N Engl J Med 1997;337:682-7.
107. Lin YS, Stout JE, Yu VL, Vidic RD. Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. Semin Respir Infect 1998;13(2):147-59.
108. Flannery B, Gelling LB, Vugia DJ i sur. Reducing *Legionella* colonization in water systems with monochloramine. Emerg Infect Dis 2006;12(4):588-96.
109. LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Inactivation of biofilm bacteria. Appl Environ Microbiol 1988;54(10):2492-9.
110. ASHRAE. ANSI/ASHRAE Standard 188-2021: Legionellosis: Risk Management for Building Water Systems. Atlanta, GA: American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers; 2021.
111. van Heijnsbergen E, Schalk JA, Euser SM, Brandsema PS, den Boer JW, de Roda Husman AM. Confirmed and Potential Sources of *Legionella* Reviewed. Environ Sci Technol 2015;49(8):4797-815.
112. 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.
113. 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.
114. Pourcel C, Visca P, Afshar B, D'Arezzo S, Vergnaud G, Fry NK. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. J Clin Microbiol 2007;45(4):1190-9.
115. Sánchez-Busó L, Comas I, Jorques G, González-Candelas F. Recombination drives genome evolution in outbreak-related *Legionella pneumophila* isolates. Nat Genet 2014;46(11):1205-11.
116. Nisar MA, Ross KE, Brown MH, Bentham R, Best G, Whiley H. Detection and quantification of viable but non-culturable *Legionella pneumophila* from water samples using flow cytometry-cell sorting and quantitative PCR. Front Microbiol 2023;14:1094877.

117. Schwake DO, Garner E, Strom OR, Pruden A, Edwards MA. *Legionella* DNA Markers in Tap Water Coincident with a Spike in Legionnaires' Disease in Flint, MI. *Environ Sci Technol Lett* 2016;3(9):311-5.
118. Burstein D, Amaro F, Zusman T i sur. Genomic analysis of 38 *Legionella* species identifies large and diverse effector repertoires. *Nat Genet* 2016;48(2):167-75.
119. Glažar Ivče D. Kontaminacija legionelama u sustavu distribucije vode na trajektima i brodovima te njihova molekularna karakterizacija. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet; 2025.
120. 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.
121. HR EN ISO 6222:1999. Kakvoća vode - Brojenje uzgojenih mikroorganizama - Broj kolonija naciepljivanjem na hranjivi agar (ISO 6222:1999; EN ISO 6222:1999). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2000.
122. APHA Method 2550 B. Temperature of Water. Standard Methods for the examination of water and waste water, 23rd edition. Washington, D.C., USA: Amer Public Health Assn (APHA). 2017.
123. 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.
124. HRN ISO 7888:2001. Kakvoća vode - Određivanje električne vodljivosti (ISO 7888:1985). Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za norme (HZN); 2021.
125. 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.
126. TIBCO Software Inc. TIBCO Statistica® 14.0.1.25: Product Documentation. Palo Alto, CA: TIBCO Software Inc.; 2022.
127. Allen MJ, Edberg SC, Reasoner DJ. Heterotrophic plate count bacteria--what is their significance in drinking water? *Int J Food Microbiol* 2004;92(3):265-74.
128. Carter JT, Rice EW, Buchberger SG, Lee Y. Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system. *Water Res* 2000;34(5):1495-502.
129. Riccò M, Peruzzi S, Ranzieri S, Giuri PG. Epidemiology of Legionnaires' Disease in Italy, 2004-2019: A Summary of Available Evidence. *Microorganisms* 2021;9(11).
130. Beauté J, Sandin S, de Jong B i sur. Factors associated with Legionnaires' disease recurrence in hotel and holiday rental accommodation sites. *Euro Surveill* 2019;24(20).
131. 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).
132. Loreto D'Alò G, 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. *Biomed Prev* 2018;2(181).
133. WHO. Water safety in buildings Geneva: World Health Organization. ISBN: 978-92-4-154810-6; 2011 [Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326873>] [Accessed
134. Umweltbundesamt (UBA). Systemische Untersuchungen von TrinkwasserInstallationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung - Probennahme, Untersuchungsgang und Angabe des Ergebnisses Deutschland: Umweltbundesamt; 2018 [Available from: https://www.stuttgart.de/medien/ibs/Systemische-Untersuchung-von-Trinkwasser-Installationen-auf-UBA-Empfehlung-Legionellenuntersuchung_-2018.pdf?utm_source=chatgpt.com] [Accessed

135. Health and Safety Executive (HSE). Legionnaires' disease: Technical guidance. Part 2: The control of *Legionella* bacteria in hot and cold water systems (HSG274 Part 2). ISBN: 9780717665827: HSE Books, United Kingdom; 2014 [Available from: <https://www.hse.gov.uk/pubns/priced/hsg274part2.pdf>] [Accessed
136. Sreenath K, Arghya D, Chaudhry R. Resurgence of *Legionella*: A Post-COVID-19 Concern. ACS ES&T Water 2024;4(6):2324-9.
137. Nemčić-Jurec J, Vukić Lušić D, Ljubas D. Preventivne mjere kontrole *Legionella* u vodoopskrbnim sustavima tijekom epidemije. Hrvatske vode 2022;30(121):201–6.
138. Mirella DD, Santulli M, Pagano M i sur. 4-Year Study in Monitoring the Presence of *Legionella* in the Campania Region's Healthcare Facilities. Hygiene 2025;5(2):16.
139. Chatziprodromidou IP, Savoglidou I, Stavrou V, Vantarakis G, Vantarakis A. Surveillance of *Legionella* spp. in Open Fountains: Does It Pose a Risk? Microorganisms 2022;10(12).
140. Lau R, Harte D. The Presence of *Legionella* Bacteria in Public Water Features. Environ Health 2007;7(2):45-51.
141. Haupt TE, Heffernan RT, Kazmierczak JJ i sur. An outbreak of Legionnaires disease associated with a decorative water wall fountain in a hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2012;33(2):185-91.
142. 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.
143. Laganà P, Facciola A, Palermo R, Delia S. Environmental Surveillance of Legionellosis within an Italian University Hospital-Results of 15 Years of Analysis. Int J Environ Res Public Health 2019;16(7).
144. De Giglio O, Napoli C, Diella G i sur. Integrated approach for legionellosis risk analysis in touristic-recreational facilities. Environ Res 2021;202:111649.
145. Molina JJ, Bennassar M, Palacio E, Crespi S. Impact of prolonged hotel closures during the COVID-19 pandemic on *Legionella* infection risks. Front Microbiol 2023;14:1136668.
146. Doménech-Sánchez A, Laso E, Berrocal CI, Albertí S. Environmental surveillance of *Legionella* in tourist facilities of the Balearic Islands, Spain, 2006 to 2010 and 2015 to 2018. Euro Surveill 2022;27(21).
147. Soda EA, Barskey AE, Shah PP i sur. Vital Signs: Health Care-Associated Legionnaires' Disease Surveillance Data From 20 States and a Large Metropolitan Area-United States, 2015. Am J Transplant 2017;17(8):2215-20.
148. Francois Watkins LK, Toews KE, Harris AM i sur. Lessons From an Outbreak of Legionnaires' Disease on a Hematology-Oncology Unit. Infect Control Hosp Epidemiol 2017;38(3):306-13.
149. Orsi GB, Vitali M, Marinelli L i sur. *Legionella* control in the water system of antiquated hospital buildings by shock and continuous hyperchlorination: 5 years experience. BMC Infect Dis, 2014;14(394).
150. Assaidi A, Ellouali M, Latrache H, Zahir H, Karoumi A, Mliji EM. Chlorine disinfection against *Legionella pneumophila* biofilms. J Water Sanit Hyg Dev 2020;10(4):885-93.
151. 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.
152. Tuovinen OH, Voss L, Mair DM, Bakaletz A, Rheins MS. Survival of *Legionella pneumophila* under different disinfectant and physical conditions. FEMS Microbiol Lett 1986;33(1):9-13.

153. National Academies of Sciences Engineering and Medicine (NASEM). Management of Legionella in Water Systems. Washington, DC: The National Academies Press; 2020. str.
154. Dimitriadi D, Velonakis E. Detection of *Legionella* spp. from Domestic Water in the Prefecture of Arta, Greece. J Pathog 2014;2014:407385.
155. 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.
156. Sauerborn Klobucar R, Kovačević M, Svetlicic E i sur. *Legionella sheltonii* sp. nov., a novel species isolated on a cruise ship during routine monitoring. Int J Syst Evol Microbiol 2025;75(7).
157. Whiley H, Bentham R, Brown MH. *Legionella* Persistence in Manufactured Water Systems: Pasteurization Potentially Selecting for Thermal Tolerance. Front Microbiol 2017;8:1330.
158. Steinert M, Hentschel U, Hacker J. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. FEMS Microbiol Rev 2002;26(2):149-62.
159. König L, Wentrup C, Schulz F i sur. Symbiont-Mediated Defense against *Legionella pneumophila* in Amoebae. mBio 2019;10(3).
160. Liang J, Cameron G, Faucher SP. Development of heat-shock resistance in *Legionella pneumophila* modeled by experimental evolution. Appl Environ Microbiol 2023;89(9).
161. Knežević M, Marečić V, Ožanić M i sur. Increased Sensitivity of Amoeba-Grown *Francisella* Species to Disinfectants. Microorganisms 2020;20(9):1260.

POPIS SLIKA

- Slika 1. Raspodjela *L. pneumophila* i *Legionella* spp.-pozitivnih uzoraka po vrstama objekata te udio serogrupa *L. pneumophila* SG1 i SG2-14 u svakom objektu. Debljina i boja vrpce koje povezuju objekte s pojedinim serogrupama proporcionalne su udjelu objekta u ukupnom broju *Legionella*-pozitivnih uzoraka ($N = 171$). Napomena: Prikazani postoci ne odražavaju učestalost pozitivnih nalaza u pojedinim vrstama objekata, već njihov doprinos ukupnom broju pozitivnih nalaza.
- Slika 2. Usporedba koncentracija *Legionella pneumophila* u vodenim uzorcima prema serogrupama. *Box-plotovi* prikazuju logaritamske vrijednosti koncentracije (log CFU/L), pri čemu su označeni: medijan (vodoravna linija unutar okvira), srednja vrijednost (točka), kvartili (*box*) i interkvartilni raspon (brkovi, *whiskers*).
- Slika 3. Ukupan broj bakterija (UBB) koji je određivan korištenjem različitih agara i u različitim uvjetima inkubacije. *Box-plotovi* prikazuju vrijednosti medijana (vodoravna linija unutar okvira), srednjih vrijednosti (točka), kvartila (*box*) i interkvartilni raspon (brkovi, *whiskers*).
- Slika 4. Temperatura vode u odnosu na: (a) prisutnost *Legionella*, (b) vrste *Legionella* (SG1 vs. SG2-14). *Box-plotovi* prikazuju medijane (linija), srednje vrijednosti (točka), kvartile (*box*) i interkvartilni raspon (brkovi, „*whiskers*“).
- Slika 5. Prisutnost *Legionella* u odnosu na (a) pH vrijednost, (b) električnu vodljivost, (c) koncentraciju slobodnog rezidualnog klora, (d) koncentraciju nitrata. *Box-plotovi* prikazuju medijane (linija), srednje vrijednosti (točka), kvartile (*box*) i interkvartilni raspon (brkovi, *whiskers*).
- Slika 6. Prikaz broja uzetih uzoraka iz različitih vrsta prioritetnih i ostalih objekata
- Slika 7. Udio uzoraka uzetih prema pojedinom tipu objekta u skupini prioritetnih objekata
- Slika 8. Udio pozitivnih uzoraka iz različitih vrsta prioritetnih i ostalih objekata
- Slika 9. Udio pozitivnih uzoraka na *Legionella* spp. prema prioritetu objekta
- Slika 10. Broj uzoraka u pojedinoj kategoriji razine kontaminacije
- Slika 11. Godišnja distribucija udjela uzoraka u pojedinoj kategoriji razine kontaminacije u razdoblju 2019. – 2024.
- Slika 12. Usporedba udjela uzoraka prema razini kontaminacije za različite kategorije objekata
- Slika 13. Usporedba udjela uzoraka prema razinama kontaminacije za pojedine tipove objekata unutar skupine prioritetnih objekata

- Slika 14. Udio uzoraka prema vrsti sustava potrošne vode i pripadnosti prioritetnoj skupini objekata (PTV – potrošna topla voda; PHV – potrošna hladna voda)
- Slika 15. Udio uzoraka prema razini kontaminacije u različitim sustavima potrošne vode
- Slika 16. Udio uzoraka iz pojedinih sustava (PTV – potrošna topla voda, PHV – potrošna hladna voda, rashladni tornjevi i hidranti) u različitim vrstama objekata
- Slika 17. Učestalost pozitivnih nalaza i razina rizika prema vrsti vodnog sustava
- Slika 18. Udio uzoraka prema razini kontaminacije u pojedinim bolničkim ustanovama (označenim brojevima od 1 do 10)
- Slika 19. Udio uzoraka prema vrsti objekta i godini uzorkovanja
- Slika 20. Udio (%) izoliranih *Legionella* spp. u uzorcima vode u razdoblju od 2019. do 2023. U 2024. godini serotipizacija nije provedena zbog tehničkih ograničenja.
- Slika 21. Raspodjela uzoraka prema vrstama objekata i godinama uzorkovanja
- Slika 22. Godišnja distribucija uzoraka prema vrstama sustava (2019. – 2024.)
- Slika 23. Distribucija negativnih i pozitivnih uzoraka na *Legionella* spp. te *L. pneumophila* SG1 i SG2-14 prema vrstama objekata
- Slika 24. Distribucija negativnih i pozitivnih uzoraka na *Legionella* spp. te *L. pneumophila* SG1 i SG2-14 prema prioritetu objekta
- Slika 25. Udio uzoraka prema razini kontaminacije u odnosu na koncentraciju klora
- Slika 26. Udio uzoraka prema razini kontaminacije u odnosu na temperaturu vode
- Slika 27. Kinetika-dinamika rasta *L. pneumophila* unutar *A. castellanii* tijekom desetodnevnog razdoblja promatranja. *L. pneumophila* AA100 korištena je kao kontrola. Studentov t-test, na razinama vjerojatnosti $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ korišten je za utvrđivanje značajnosti razlike u odnosu na kontrolni uzorak.
- Slika 28. UBB Legionela – *L. pneumophila* uzgojena na agaru (Lp) i *L. pneumophila* uzgojena u *A. castellanii* (Lp AC) uzorci nakon postupka pasterizacije na 53 °C u trajanju od 10 minuta. *L. pneumophila* AA100 korištena je kao kontrolni uzorak. Studentov t-test na razinama vjerojatnosti $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ korišten je za utvrđivanje značajnosti razlike u odnosu na kontrolni uzorak.
- Slika 29. Slike iz TEM-a: *L. pneumophila* izoliranih s trajekata: (a) netretirana, (b) uzgojena u *A. castellanii* i (c) uzgojena u *A. castellanii* i pasterizirana na 53 °C u trajanju od 10 min; *L. pneumophila* izolirana iz hotela: (d) netretirana, (e) uzgojena u *A. castellanii*, (f) uzgojena u *A. castellanii* i pasterizirana na 53 °C u trajanju od 10 minuta.

POPIS TABLICA

Tablica 1. Struktura uzorka vode prema vrsti objekata tijekom istraživanja

Tablica 2. Ukupan broj ispitanih uzoraka, broj i udio *L. pneumophila*-pozitivnih uzoraka

Tablica 3. Serogrupe, ST-ovi, alelni profili i fenotipovi *L. pneumophila* izolata iz okolišnih uzoraka u Primorsko-goranskoj županiji (Hrvatska)

POPIS POKRATA

- BCYE** – puferirani agar s aktivnim ugljenom i ekstraktom kvasca (*engl.* Buffered Charcoal Yeast Extract)
- CFU** – broj izraslih kolonija (*engl.* Colony Forming Units)
- dPCR** – digitalni PCR (*engl.* digital polymerase chain reaction)
- ELDSNet** – Europska mreža za nadzor legionarske bolesti (*engl.* European Legionnaires' Disease Surveillance Network)
- ESCMID** – Europsko društvo za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (*engl.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)
- ESGLI** – Radna skupina ESCMID-a za infekcije uzrokovane bakterijama roda *Legionella* (*engl.* ESCMID Study Group for *Legionella* Infections)
- EWGLI** – Europska radna skupina za infekcije legionelom (*engl.* European Working Group for *Legionella* Infections)
- IQR** – interkvartilni raspon (*engl.* interquartile range)
- LCV** – vakuola koja sadrži *Legionella* (*engl.* *Legionella*-containing vacuole)
- MLVA** – višelokusna analiza broja tandemske ponovljenih jedinica (*engl.* multi-locus variable-number tandem repeat analysis)
- MOI** – omjer infekcije (*engl.* multiplicity of infection)
- PFGE** – pulsirajuća elektroforeza u gelu (*engl.* pulsed-field gel electrophoresis)
- QMRA** – kvantitativna procjena mikrobiološkog rizika (*engl.* Quantitative Microbial Risk Assessment)
- qPCR** – kvantitativni PCR (*engl.* quantitative polymerase chain reaction)
- SBT** – sekvencijski utemeljeno tipiziranje (*engl.* Sequence-Based Typing)
- SNP** – jednonukleotidni polimorfizmi (*engl.* single nucleotide polymorphism)
- TALD** – legioneloza povezana s putovanjima (*engl.* Travel-Associated Legionnaires' Disease)
- TEM** – transmisijaska elektronska mikroskopija (*engl.* Transmission Electron Microscopy)
- UBB** – heterotrofni broj bakterija (*engl.* Heterotrophic Plate Count, HPC)
- VBNC** – vijabilne, ali nekulturable bakterije (*engl.* Viable But Non-Culturable bacteria)
- WGS** – cjelogenomsko sekvenciranje (*engl.* Whole Genome Sequencing)
- WHO** – Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization)
- WSP** – Plan sigurnosti vode (*engl.* Water Safety Plan)
- YEA** – kvašćev hranjivi agar (*engl.* Yeast Extract Agar)

ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Dobrica Rončević

Adresa: 51000 Rijeka, Hrvatska

Telefon: 091 132 04 13

E-mail (poslovni): dobrica.roncevic@zzjzpgz.hr

E-mail (akademski): dobrica.roncevic@uniri.hr

Datum rođenja: 17. 3. 1967.

Državljanstvo: hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

2024. – danas: v.d. pomoćnika ravnatelja

Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka

2019. – 2023.: voditelj Epidemiološkog odjela NZZJZ PGŽ-a

2009. – 2018.: voditelj Odsjeka za operativnu epidemiologiju i zamjenik voditeljice odjela NZZJZ PGŽ-a

2006. – danas: specijalist epidemiologije NZZJZ PGŽ-a

2006. – 2009: voditelj Ispostave Delnice NZZJZ PGŽ-a

2003 – danas: liječnik u javnom zdravstvu NZZJZ PGŽ-a

Prethodno radno iskustvo:

- liječnik i rukovoditelj u MUP-u (specijalna i kriminalistička policija)
- područja: medicina rada, epidemiologija, ronilačka medicina, sanitetska zaštita
- savjetnik u Centru za dobrovoljno HIV savjetovanje i testiranje

1991 – 1995.: sudionik Domovinskog rata

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

Doktorski studij Biomedicina

Medicinski fakultet Rijeka (doktorand – obranjena tema)

2011: Magistar javnog zdravstva, Medicinski fakultet Zagreb

2006: Specijalizacija iz epidemiologije

2020: Uža specijalizacija iz zdravstvene ekologije

1994: Doktor medicine, Medicinski fakultet Rijeka

Dodatne edukacije i usavršavanja:

- WHO Rapid Risk Assessment of Acute Public Health Events (Kopenhagen, 2013.)
 - WHO RePrep – pripravnost za zoonoze (Zagreb, 2022.)
 - Tečaj prevencije bolničkih infekcija
 - Upravljanje rizicima u financijama (2014.)
 - Ronilačka medicina (ovlašteni liječnik HRS)
 - HIV savjetovanje i testiranje (od 2004.)
-

OSOBNOSTNE VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici:

- engleski – aktivno znanje

Komunikacijske vještine:

- dugogodišnje iskustvo u edukaciji, javnim nastupima i savjetovanju
- predavač na stručnim i znanstvenim skupovima

Organizacijske / voditeljske vještine:

- vođenje odjela i velikih sustava javnog zdravstva
- upravljanje kriznim situacijama (epidemije, javnozdravstveni rizici)
- rad u nacionalnim i međunarodnim stručnim tijelima

Digitalne vještine:

- napredno korištenje računala i uredskih alata
-

DODATNE INFORMACIJE

Stručne i javne funkcije:

- član Povjerenstva za bolničke infekcije Ministarstva zdravstva RH (od 2015.)
- član Stožera za zarazne bolesti PGŽ-a
- član Stožera civilne zaštite PGŽ-a
- član radnih skupina Ministarstva zdravstva RH
- sudjelovanje u zakonodavnim aktivnostima (zdravstveni turizam i javno zdravstvo)

Akademski rad:

- suvoditelj i predavač na Fakultetu zdravstvenih studija Rijeka
- autor i suautor znanstvenih i stručnih radova
- suautor priručnika i udžbenika

Stručna članstva:

- Hrvatski liječnički zbor
- Hrvatsko epidemiološko društvo
- Hrvatsko društvo za biosigurnost i biozaštitu
- Hrvatsko katoličko liječničko društvo

Ostale funkcije:

- član Nadzornog odbora ACI d.d. (2016. – 2023.)
- vijećnik Gradskog vijeća Rijeke (2017. – 2021.)
- član Gradskog društva Crvenog križa Rijeka

Nagrade:

- Zahvalnica Hrvatskoga liječničkog zbora (2022.)

Ostalo:

- vozačka dozvola A i B kategorije
- ronilac, planinar, nautičar, lovac

Znanstveni i/ili stručni radovi u međunarodnim indeksnim publikacijama

1. Bogdanic, M., Savic, V., Klobucar, A., Barbie, L., Sabadi, D., Tomljenovic, M., Madie, J., Hruskar, Z., Curman Posavec, M., Santini, M., Stevanovic, V., Petrinic, S., Antolasic, L., Milasincic, L., Al-Mufleh, M., Rončević, D., Vilibic-Cavlek, T.

The Re-Emergence of Neuroinvasive Flaviviruses in Croatia During the 2022 Transmission Season

(2024) *Microorganisms*, 12 (11), art. no. 2210

2. Vilibic-Cavlek, T., Krcmar, S., Bogdanic, M., Tomljenovic, M., Barbie, L., Rončević, D., Sabadi, D., Vucelja, M., Santini, M., Hunjak, B., Stevanovic, V., Boljetic, M., Bjedov, L., Masovic, V., Potocnik-Hunjadi, T., Lakoseljic, D., Al-Mufleh, M., Savic, V.

An Overview of Tick-Borne Encephalitis Epidemiology in Endemic Regions of Continental Croatia, 2017-2023

(2024) *Microorganisms*, 12 (2), art. no. 386

3. Tomljenovic, M., Lakoseljic, D., Knefovic, L., Bubonja-Sonje, M., Abram, M., Spicic, S., Zdelar-Tuk, M., Duvnjak, S., Reil, I., Valjin, O., Kramaric, M., Miskic, T., Jankovic, I.L., Rončević, D.

Coxiella burnetii (Q-fever) outbreak associated with non-occupational exposure in a semi-urban area of western Croatia in 2022

(2023) *Zoonoses and Public Health*, 70 (4), pp. 285-293.

4. Ristic, S., Milic, S., Tatalovic, T., Bilobrk, M., Rončević, D., Curko-Cofek, B., Barac-Latas, V., Cizmarevic, N.S.

The Influence of Hemochromatosis Gene (HFE) Mutations on SARS-CoV-2 Susceptibility and COVID- 19 Severity

(2023) *Balkan Medical Journal*, 40 (3), pp. 229-231.

5. Zidovec-Lepej, S., Vilibic-Cavlek, T., Ilic, M., Gorenec, L., Grgic, I., Bogdanic, M., Radmanic, L., Ferenc, T., Sabadi, D., Savic, V., Hruskar, Z., Svitek, L., Stevanovic, V., Perie, L., Lisnjic, D., Lakoseljic, D., Rončević, D., Barbie, L.

Quantification of Antiviral Cytokines in Serum, Cerebrospinal Fluid and Urine of Patients with Tick-Borne Encephalitis in Croatia

(2022) *Vaccines*, 10 (11), art. no. 1825

6. Cokaric Brdovcak, M., Materljan, J., Sustic, M., Ravlic, S., Ruzic, T., Lisnic, B., Miklic, K., Brizic, I., Pribanic Matesic, M., Juranic Lisnic, V., Halassy, B., Rončević, D., Knežević, Z., Stefan, L., Bertoglio, F., Schubert, M., Cicin-Sain, L., Markotic, A., Jonjic, S., Krmpotic, A.

ChAdOx1-S adenoviral vector vaccine applied intranasally elicits superior mucosal immunity compared to the intramuscular route of vaccination

(2022) *European Journal of Immunology*, 52 (6), pp. 936-945

7. Knežević, M., Rončević, D., Lusic, D.V., Mihelcic, M., Kogoj, R., Kese, D., Glad, M., Cenov, A., Ožanic, M., Ivce, D.G., Santic, M.

Decreasing Pasteurization Treatment Efficiency against Amoeba-Grown Legionella pneumophila - Recognized Public Health Risk Factor

(2022) *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19 (3), art. no. 1099

8. Glažar Ivče, D., Rončević, D., Santic, M., Cenov, A., Tomic Linsak, D., Micovic, V., Lusic, D., Glad, M., Ljubas, D., Vukic Lusic, D.

Is a proactive approach to controlling legionella in the environment justified?

(2021) *Food Technology and Biotechnology*, 59 (3), pp. 314-324.

9. Čizmarević, N.S., Kapovic, M., Rončević, D., Ristic, S.

Could the CCR5-A32 Mutation be Protective in SARS-CoV-2 Infection?

(2021) *Physiological Research*, 70, pp. S249-S252.

10. Ilic, M., Barbie, L., Bogdanic, M., Tabain, I., Savic, V., Kosanovic Licina, M.L., Kaic, B., Jungic, A., Vucelja, M., Angelov, V., Kovacevic, M., Rončević, D., Knezevic, S., Stevanovic, V., Slavuljica, I., Lakoseljic, D., Vickovic, N., Bubonja-Sonje, M., Hansen, L., Vilibic-Cavlek, T.

Tick-borne encephalitis outbreak following raw goat milk consumption in a new micro-location, Croatia, June 2019

(2020) *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11 (6), art. no. 101513

11. Knezevic, S., Slavuljica, I., Lakoseljic, D., Vickovic, N., Grbesa, 8.C., Gorup, L., Sonje, M.B., Rončević, D., Ilic, M., Bogdanic, M.

Tick-borne encephalitis due to consumption of raw goat milk, gorski kotar, 2019: Clinical case reports [Krpeljni meningoencefalitis povezan s konzumacijom nepasteriziranog kozjeg mlijeka, gorski kotar, 2019. Godine: prikaz klinickih slucajeva]

(2019) *Infektološki Glasnik*, 39 (3), pp. 93-97.

12. Glibotic Kresina, H., Kresina, S., Gasparovic Babic, S., Rončević, D., Dadic Hero. E., Ruzic, K., Sarilar. M.

Anxiety disorders in elderly in primary care of Primorsko-goranska County

(2013) *Periodicum Biologorum*, 115 (4), pp. 553-559.