

Prirodna fluorescencija kod bakterija roda Legionella

Trtanj, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:046143>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET

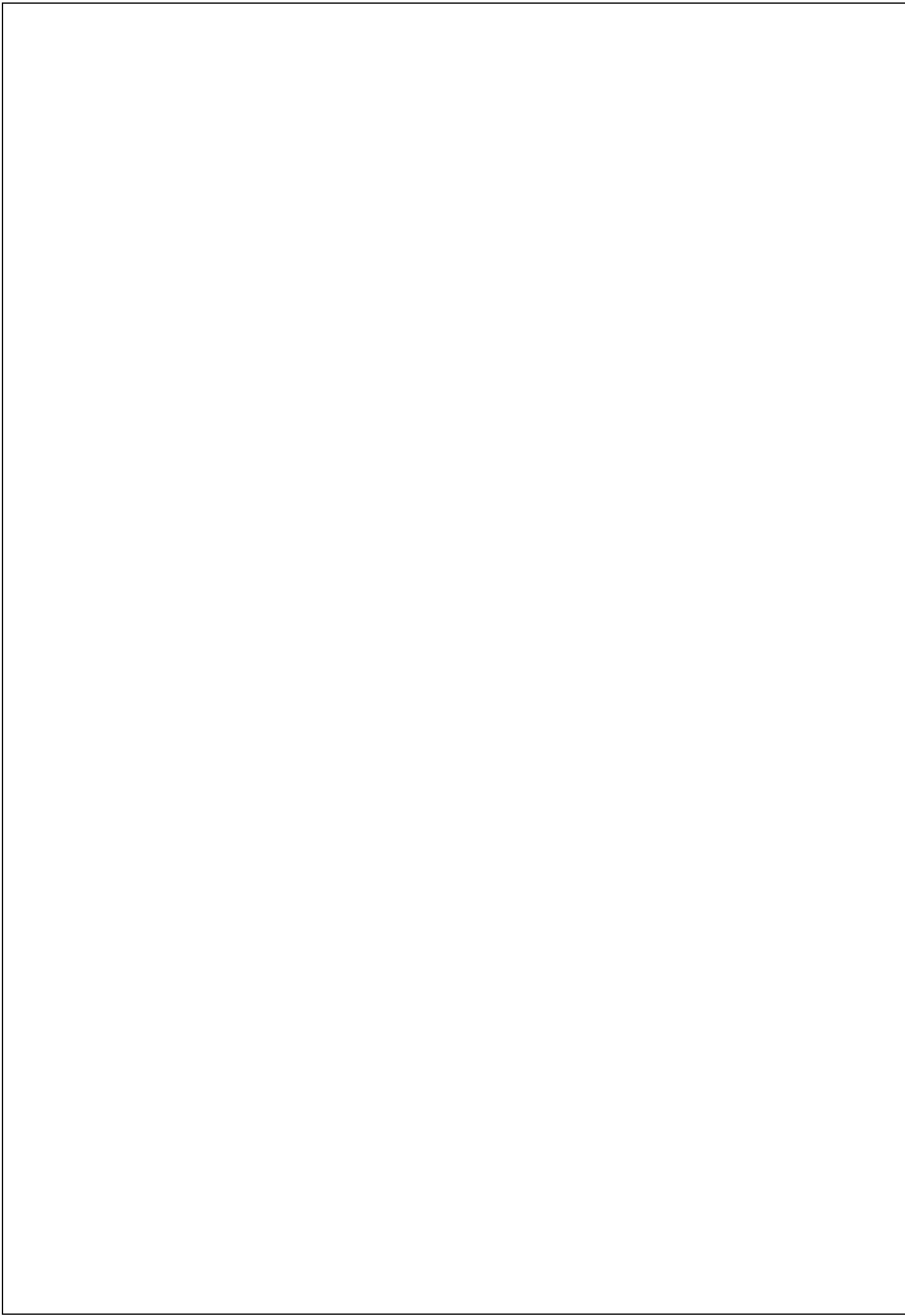
**PRIRODNA FLUORESCENCIJA KOD BAKTERIJA
RODA *Legionella***

ZAVRŠNI RAD

MIA TRTANJ

Matični broj: 351

Split, 2019.



SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ
KEMIJA

PRIRODNA FLUORESCENCIJA KOD BAKTERIJA
RODA *Legionella*

ZAVRŠNI RAD

Mia Trtanj
Matični broj : 351

Split, 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
ACADEMIC UNDERGRADUATE STUDY OF
CHEMISTRY

NATURAL FLUORESCENCE OF BACTERIA OF THE
GENUS *Legionella*

BACHELOR THESIS

Mia Trtanj
Parent number : 351

Split, 2019.

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada: je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu

Mentor: Doc. dr. sc. Mila Radan, Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu

Neposredni voditelj: Dr. sc. Roberta Sauerborn Klobučar, viši znanstveni suradnik (PathCon LaboratoriesEU), Zagreb

PRIRODNA FLUORESCENCIJA KOD BAKTERIJA RODA *Legionella*

Mia Trtanj, 351

Sažetak:

Završni rad predstavlja ispitivanje uzoraka vodovodne vode u koje su dodane ciljane koncentracije bakterijskog soja *Legionella bozemanii* (ATCC 33217 *Fluoribacter bozemaniae*).

Uzorkovanje je provedeno prema standardu BS 7592:2008 (odjeljak 2; rutinsko uzimanje uzoraka), a sama analiza vode prema normi HRN EN ISO/IEC 11731:2017.

Svaki uzorak procesiran je na dvije vrste selektivnih hranjivih podloga (BCYE i GVPC) i obrađen s 14 različitih procedura. Nakon 4 dana provedene inkubacije na 36 °C (uz 3% CO₂) obavljeno je prvo očitavanje/ pregled nasađenih uzoraka. *Legionella bozemanii*, kao i određeni ostali sojevi, pokazuju auto-fluorescenciju kada se promatraju ultraljubičastim svjetlom. Upravo ta karakteristika ispitivane bakterije omogućila je njezinu detekciju pomoću ručne fluorescentne lampe na hranjivim podlogama. Nakon detekcije fluorescentnih sojeva dodatna potvrda napravljena je nasađivanjem istih na BCYE hranjive podloge (uz ili bez dodataka aminokiseline cisteina.) Konačni rezultati nakon 10 dana inkubacije jasno su pokazali da je brojnost legionela na hranjivim podlogama sukladna dodanim koncentracijama *L. bozemanii*

Ključne riječi: fluorescencija, *Legionella bozemanii*, hranjive podloge, metoda kultivacije

Rad sadrži: 19 slika i 5 tablica

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Mila Radan
2. Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo
3. Prof. dr. sc. Tea Bilušić

Datum obrane: 20.09.2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ulica Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Academic Undergraduate Study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject: was approved by the Faculty Council of the Faculty of Chemistry and Technology in Split, session no. 19

Mentor: Mila Radan, PhD, Faculty of Chemistry and Technology Split

Technical assistance: Roberta Sauerborn Klobučar, PhD, Senior Research Associate (PathCon LaboratoriesEU), Zagreb

NATURAL FLUORESCENCE OF BACTERIA OF THE GENUS *Legionella*

Mia Trtanj, 351

Abstract:

The final study presents an examination of tap/potable water samples to which targeted concentrations of the bacterial strain *Legionella bozemanii* (ATCC 33217 Fluoribacter bozemaniae) were added.

Sampling was performed according to BS 7592; 2008 (Section 2; Routine sampling) and the water analysis was performed according to norm HRN EN ISO/ IEC 11731: 2017.

Each sample was processed on two types of selective nutrient media (BCYE and GVPC) and processed with 14 different procedures. After 4 days of incubation at 36 °C (with 3% CO₂), the first reading / examination of the specimens was performed. *Legionella bozemanii*, like certain other strains, exhibit auto-fluorescence when viewed with the ultraviolet light. It is the characteristic of the tested bacterium that enabled us to detect it with the help of a hand-held fluorescent lamp on prepared nutrient media. After detection of fluorescent strains, additional confirmation was made by inoculation on BCYE nutrient media (with or without the addition of the cysteine amino acid). The final results after 10 days of incubation period clearly showed that the abundance (CFU) of legionella on nutrient media was consistent with the added concentrations of *L. bozemanii*.

Keywords: fluorescence, *Legionella bozemanii*, growth medium, method of cultivation

Thesis contains: 19 pictures and 5 tables

Original in : Croatian

Defence committee:

1. Mila Radan, PhD
2. Olivera Politeo, PhD
3. Tea Bilušić, prof.

Defence date: 20.09.2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod
vodištvom doc. dr. sc. Mile Radan, te u PathCon LaboratoriesEU pod mentorstvom dr.sc.*

Roberte Sauerborn Klobučar u razdoblju od lipnja do rujna 2019. godine.

Zahvaljujem suvoditeljici doc. dr. sc. Mili Radan na podijeljenom znanju tijekom cijele godine.

Zahvaljujem se PathCon LaboratoriesEU u Zagrebu, svim zaposlenicima navedenog laboratorija na strpljenju i suradnji kod eksperimentalnog dijela rada, a posebno dr. sc. Roberti Sauerborn Klobučar na ukazanoj prilici i svom podijeljenom znanju i stručnosti, strpljenju tijekom ispravljanja rada, te na prijateljskoj i stručnoj potpori i predivnom iskustvu kojeg sam zahvaljujući njoj imala tijekom eksperimentalnog rada i teorijskog dijela završnog rada.

SAŽETAK:

Završni rad predstavlja ispitivanje uzoraka vodovodne vode u koju su dodane ciljane koncentracije bakterijskog soja *Legionella bozemanii* (ATCC 33217 *Fluoribacter bozemaniae*) metodom kultivacije.

Uzorkovanje je provedeno prema standardu BS 7592:2008 ¹ (odjeljak 2; rutinsko uzimanje uzoraka), a sama analiza vode prema normi HRN EN ISO/IEC 11731:2017. ²

Svaki uzorak procesiran je na dvije vrste selektivnih hranjivih podloga (BCYE i GVPC) i obrađen s 14 različitih procedura. Nakon 4 dana provedene inkubacije na 36 °C (uz 3% CO₂) obavljeno je prvo očitavanje/ pregled nasađenih uzoraka. *Legionella bozemanii*, kao i određeni ostali sojevi, pokazuju auto-fluorescenciju kada se promatraju ultraljubičastim svjetlom. Upravo ta karakteristika ispitivane bakterije omogućila je njezinu detekciju pomoću ručne fluorescentne lampe na hranjivim podlogama. Nakon detekcije fluorescentnih sojeva dodatna potvrda napravljena je nasađivanjem detektiranih kolonija na BCYE hranjive podloge (uz ili bez dodataka aminokiseline cisteina.) Konačni rezultati nakon 10 dana inkubacije jasno su pokazali da je brojnost legionela na hranjivim podlogama sukladna dodanim koncentracijama *L. bozemanii*.

Ključne riječi: fluorescencija, *Legionella bozemanii*, hranjive podloge, metoda kultivacije

SUMMARY:

The final study presents an examination of tap/potable water samples to which targeted concentrations of the bacterial strain *Legionella bozemanii* (ATCC 33217 Fluoribacter bozemaniae) were added.

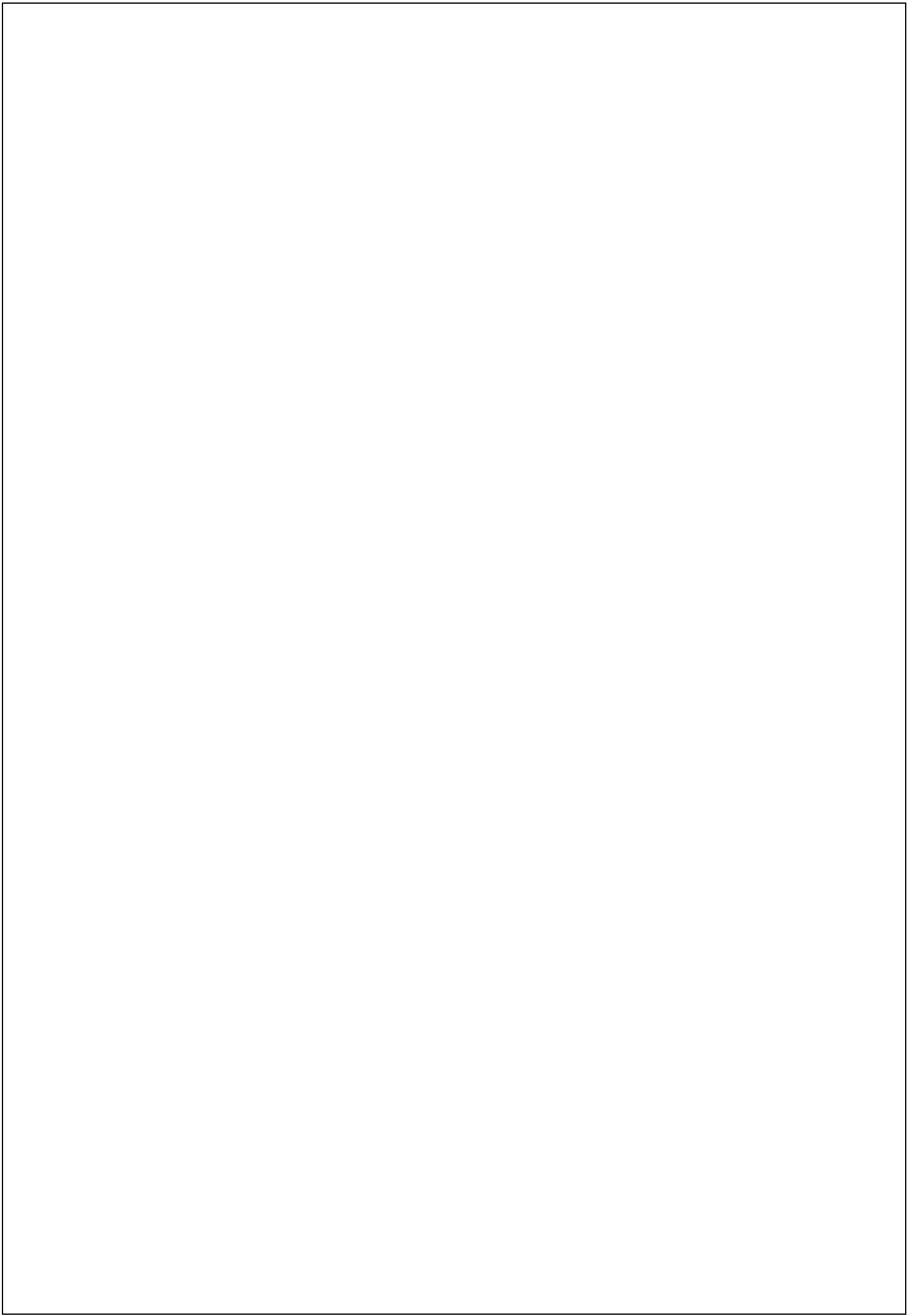
Sampling was performed according to BS 7592; 2008 (Section 2; Routine sampling) and the water analysis was performed according to norm HRN EN ISO/ IEC 11731: 2017.

Each sample was processed on two types of selective nutrient media (BCYE and GVPC) and processed with 14 different procedures. After 4 days of incubation at 36 °C (with 3% CO₂), the first reading / examination of the specimens was performed. *Legionella bozemanii*, like certain other strains, exhibit auto-fluorescence when viewed with the ultraviolet light. It is the characteristic of the tested bacterium that enabled us to detect it with the help of a hand-held fluorescent lamp on prepared nutrient media. After detection of fluorescent strains, additional confirmation was made by inoculation on BCYE nutrient media (with or without the addition of the cysteine amino acid). The final results after 10 days of incubation period clearly showed that the abundance (CFU) of legionella on nutrient media was consistent with the added concentrations of *L. bozemanii*.

Keywords: fluorescence, *Legionella bozemanii*, growth medium, method of cultivation

1 SADRŽAJ

UVOD	1
1 OPĆI DIO	3
1.1 FLUORESCENCIJA.....	4
1.1.1 Legionella.....	7
1.1.2 Legionarska bolest	9
1.2 HRANJIVE PODLOGE.....	13
1.2.1 BCYE hranjive podloge	14
1.2.2 GVPC hranjive podloge	15
2 EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
2.1 PRIPREMA UZORKA	21
2.2 FILTRACIJA	22
2.3 KULTIVACIJA	23
2.4 OČITAVANJE UZORAKA I DETERMINACIJA FLUORESCENTNIH <i>Legionella</i> 25	
3 REZULTATI.....	26
3.1 IZRAČUN KONCENTRACIJE	27
4 RASPRAVA	29
5 ZAKLJUČAK	32
6 LITERATURA.....	34



UVOD

Poznato je da neki sojevi bakterija fluoresciraju kada su izloženi UV-svjetlu i stoga se mogu detektirati pomoću tehnika spektroskopije. Spektroskopija je znanost koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i materije. Koristi se u mnogim granama prirodnih znanosti jer daje informacije o građi i sastavu tvari, njezinoj temperaturi i tlaku. Kao rezultat spektroskopskog istraživanja dobiva se spektar, odnosno slika ispitivanog uzorka. Fluorescentna spektroskopija jedna je od tehnika kojom se analizira fluorescencija uzorka, a čija su teorija i metodologija u velikoj mjeri rabljene za proučavanje molekularnih struktura, funkcija i detektiranja spojeva u kemiji, biokemiji te mikrobiologiji. Osvjetljenje tkiva/stanice/mikroorganizma ultraljubičastim spektrom dolazi do emitiranja svjetlosti niže energije - signala fluorescencije.³ Fokus ovog rada je auto-fluorescencija bakterije roda *Legionella* i praćenje fluorescencije pomoću ručnih fluorescentnih lampi emitirajućih valnih duljina 360 ± 20 nm.

Spektar signala ovisi o valnoj duljini pobude i sastavu izvora koji se pobuđuju i prikazuju.⁴ Odavno je poznato da djelovanje na tkiva ultraljubičastom i ljubičastom svjetlošću proizvodi signale fluorescencije s rasponom boja koje obuhvaćaju vidljivi dio spektra (od 380 do 760 nanometara).

Boja	Valna duljina [nm]
 Ljubičasta	390 - 455
 Plava	455 - 492
 Zelena	492 - 577
 Žuta	577 - 597
 Narančasta	597 - 622
 Crvena	622 - 780

Vidljivi dio spektra 1

Brojni biološki spojevi kao što su triptofan, nukleinske kiseline i koenzimi kod bakterija emitiraju fotone nakon pobude u području ultraljubičastog zračenja. Cilj ovog rada bio je detektirati fluorescenciju bakterije roda *Legionella bozemanii*, kod soja čije kolonije pokazuju auto-fluorescenciju kada se promatraju pod ultraljubičastim svjetlom.⁵

1 OPĆI DIO

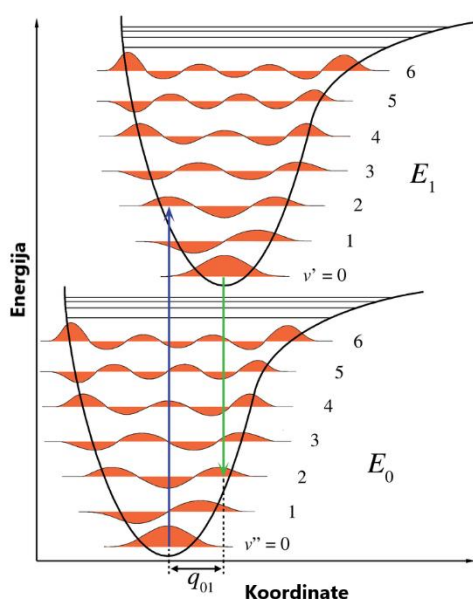
1.1 FLUORESCENCIJA

Fluorescencija (luminiscencija) je zračenje svjetlosti iz tvari koja ima mogućnost apsorpcije svjetlosti ili neke vrste ionizirajućeg zračenja (elektronsko, rendgensko ili ultraljubičasto). Ova pojava može se praktično primijeniti u području mineralogije, analitičke kemije, biologije, biokemije, medicine, agronomije ili forenzike. Fluorescencija može biti umjetno izazvana različitim bojama, ali se pojavljuje i u prirodi kod različitih skupina organizama i nekih vrsta minerala. Svuda oko nas možemo vidjeti primjenu fluorescencije kao npr. u osvjetljavanju (fluorescentna svijetla), signalizaciji (prometni znakovi), forenzici (otkrivanje otisaka prstiju i tragova krvi) ili strojarstvu (popravak i provjera rashladnih sustava).⁶ U svim slučajevima fluorescencije, tijelo zrači energiju na račun apsorbirane energije zračenja, pa su valovi koji se emitiraju pri luminiscenciji većinom većih valnih duljina od apsorbiranih valova koji izazivaju luminiscenciju. To se potpuno slaže s kvantnom teorijom svjetlosti, jer tijelo apsorbira kvant svjetlosti (foton) $h \cdot \nu$ pa može emitirati ili tu čitavu energiju ili samo dio te energije, a u tom slučaju mora frekvencija ν biti manja. Nevidljive ultraljubičaste zrake primjećujemo jer izazivaju fluorescenciju nekih tvari s nižom vidljivom frekvencijom.



Fluorescentne žarulje

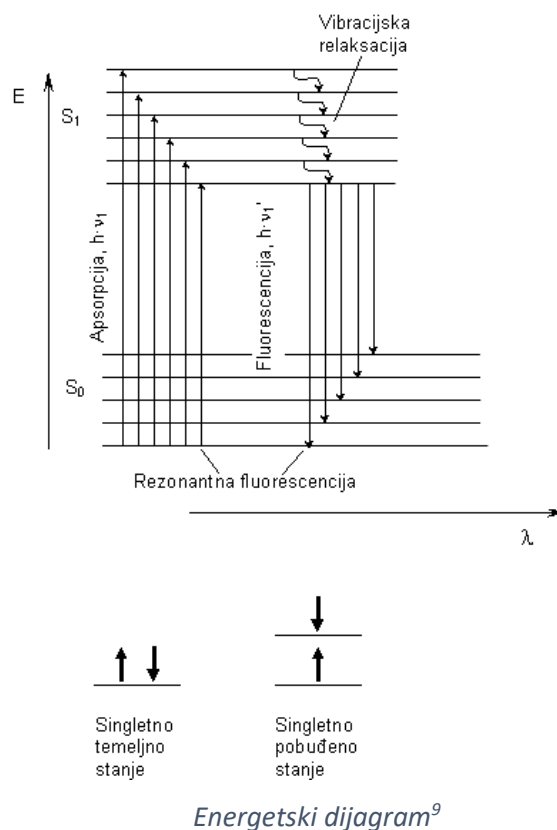
Fluorescencija nastaje kada foton upadnog zračenja pobudi elektron iz molekule u neko pobuđeno stanje. Kako svaka molekula pokazuje vibracije koje su kvantizirane, pobuđivanjem elektrona iz osnovnog stanja, molekula će se pobuditi u neko pobuđeno vibracijsko stanje pobuđenog elektronskog stanja. Koje će vibracijsko stanje biti najviše pobuđeno ovisi o preklapanju valnih funkcija osnovnog vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja i vibracijskih stanja pobuđenog elektronskog stanja, a opisuje se Franck-Condonovim principom.⁷



*Franck - Condonov dijagram*⁸

Molekule u pobuđenim vibracijskim stanjima se brzo (unutar nanosekunde) relaksiraju u osnovno stanje. Molekule u pobuđenom elektronskom stanju, koje se nađu u osnovnom vibracijskom stanju mogu emitiranjem fotona prijeći u osnovno elektronsko stanje. U koje će vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja molekula prijeći opet ovisi o preklapanju vibracijskih valnih funkcija. Molekula koja se nađe u osnovnom elektronskom stanju, opet prolazi neradijativnu relaksaciju vibracijskih stanja, dok se ne nađe u osnovnom vibracijskom stanju. Razlika u energijama fotona upadnog i emitiranog zračenja je posljedica vibracijskih relaksacija osnovnog i pobuđenog elektronskog stanja.

Apsorpcijom kvanta UV-svjetlosti molekula ili ion prelazi iz osnovnog singletnog stanja u pobuđeno singletno stanje gdje ostaje 10^{-8} s za koje vrijeme izvodi gibanja translacije i rotacije pa dio primljene energije potroši. Zbog toga emitirano svjetlo ima veću λ , a manju energiju od upadnog. To je Stokes-ovo pravilo (G.G. Stokes).



S_0 , S_1 - temeljno singletno i pobuđeno singletno stanje

Proces vibracijske relaksacije traje 10^{-10} s. Ako je molekula već prije izlaganja djelovanju UV-svjetla sadržavala veću energiju nego što odgovara osnovnom singletnom stanju, energija emitiranog zračenja veća od energije apsorbiranog zračenja⁹

1.1.1 Legionella

Legionella je identificirana kao uzrok izbijanja epidemije upale pluća u srpnju 1976. godine na američkoj konvenciji u Philadelphiji. U skladu s tim, imenovane su prethodno nepoznate bakterije i bolest koju je prouzročila, tzv. legionarska bolest. Ovaj rod čini pedeset vrsta bakterija s više od 70 podskupina. Poznato je da je otprilike 20 vrsta povezano s infekcijom kod ljudi. Monitoring/praćenje legionela važno je iz perspektive javnog zdravlja kako bi se utvrdili izvori okoliša koji mogu predstavljati mogućnost za legioneloze.

Legionellae su gram negativne patogene, štapičaste bakterije veličine $0,3 - 0,9 \times 2 - 20$ mikrometra (μm) koje se prirodno nalaze u vodi (jezerima, rijekama, toplim izvorima i vlažnom tlu). Mogu narasti na 2-6 mm *in vitro*, ali mogu oblikovati vlakna duljine 20 mm ili više. Sadrže masne kiseline razgranatog lanca, imaju nefermentacijski metabolizam i zahtijevaju L-cistein i željezove soli za rast. Za ljudsko zdravlje postaju opasne kad uđu u sustave vode za ljudsku potrošnju, do čega može doći oštećenjem vodovodnih cijevi, ulijevanjem površinskih voda te neispravnim spojem potrošne vode. Dok u prirodnom okolišu *Legionella* ne raste intenzivno, u sustavima koje je izgradio čovjek njeno se umnožavanje u visokim koncentracijama može javiti kada temperatura vode između 25 i 50 °C eliminira konkurentsku mikrobnu populaciju, te kada stagnacija vode omogući da se taloženjem organske tvari stvori biofilm u kojem se ova bakterija razmnožava.¹⁰

Stanična membrana im se sastoji od citoplazmatske membrane na unutarnjoj površini, tankog sloja peptidoglikana i vanjske membrane koja sadrži toplinski stabilne lipopolisaharide s raznim vrstama antigena.



*Legionella pneumophila 1*¹¹

Iako su gram negativne, legionele su zapravo slabo obojene u metodama bojanja po Gramu i drugim sličnim procedurama označavanja, posebno kod zaraženih tkiva.

Metoda bojanja po Gramu je empirijska metoda razlikovanja bakterija u dvije velike skupine (Gram-pozitivna bakterija i Gram-negativna bakterija) koja se osniva na kemijskim i fizičkim svojstvima njihove stanične stijenke. Gram-pozitivne bakterije imaju staničnu stijenku koju čine debeli višeslojni peptidoglikani (50-90 % stanične stijenke). Peptoglikani zadržavaju boju (kristalviolet) unutar stijenke i nakon ispiranja alkoholom. Gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana (10 % stanične stijenke), te se kristalviolet ispire alkoholom. Gram-negativne bakterije imaju i dodatnu vanjsku membranu koja sadrži lipide, a kod njih je i stanična stijenka odvojena od stanice periplazmatskim prostorom.



*Legionella pneumophila 2*¹²

1.1.2 Legionarska bolest

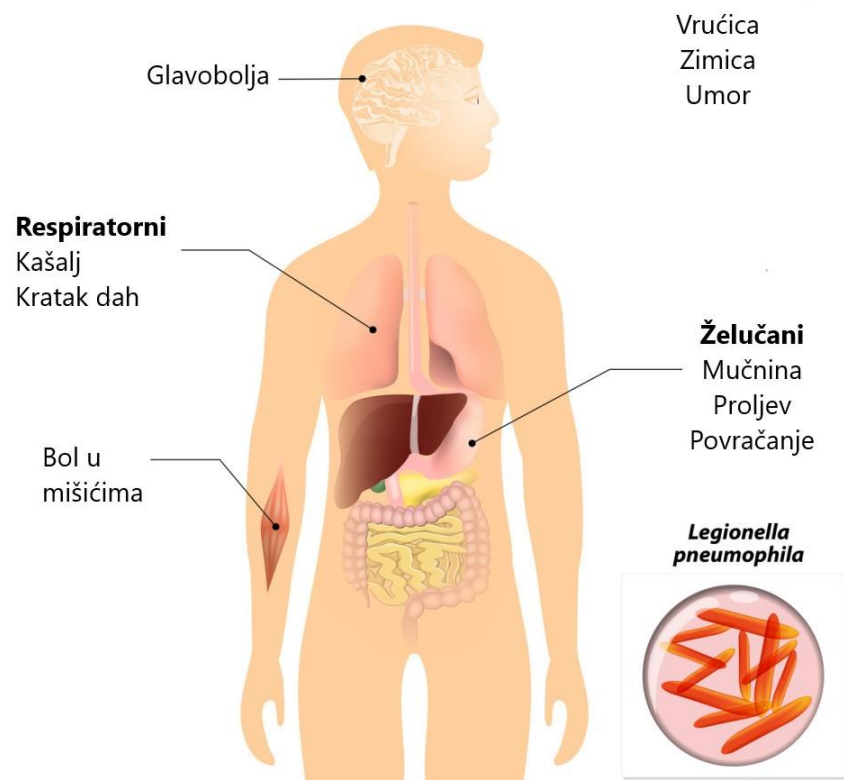
Legionarska bolest ozbiljna je infekcija uzrokovana vrstama *Legionella*, prvenstveno *L. pneumophila*, koja je odgovorna za 90% infekcija. Za ostalih 10% odgovorne su i neke od sljedećih fluorescentnih vrsta: *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. tucsonensis*, *L. erythra*, *L. rubrilucens* i dr. Svake se godine više od 1000 osoba zarazi navedenom bolešću.¹³ Smrtnost pacijenata iznosi 5 – 15 %.

Tablica 1. Fluorescentne vrste

VRSTA	UZROČNIK INFEKCIJE	FLUORESCENCIJA
<i>L. anisa</i>	DA	DA
<i>L. bozemanii</i>	DA	DA
<i>L. cherrii</i>	DA	DA
<i>L. dumoffii</i>	DA	DA
<i>L. erythra</i>	NE	DA
<i>L. gormanii</i>	DA	DA
<i>L. gratiana</i>	NE	DA
<i>L. parisiensis</i>	DA	DA
<i>L. rubrilucens</i>	DA	DA
<i>L. tucsonensis</i>	DA	DA

U rashladnim tornjevima i sustavima za distribuciju vode uobičajeno je pronaći razne vrste *Legionella*. Do danas je više od 58 vrsta legionele opisano u objavljenim člancima. *Legionella pneumophila 1* je najopasniji soj koji uzrokuje većinu infekcija. Preostale nepneumophila vrste (koje se nalaze u vodi i tlu) smatraju se nepatogenim sve dok se ne utvrdi da uzrokuju bolest.

Izloženost legioneli ne dovodi uvijek do oboljenja. Osobe oslabljenog imuniteta, pušači i osobe starije dobi izložene su većem riziku od zaraze tim bakterijama. Simptomi se obično počinju pojavljivati od dva do deset dana nakon inhalacije, a u rijetkim je slučajevima potrebno do tri tjedna da bi se oni razvili. Vrućica, zimica, glavobolja i bolovi u mišićima najčešći su simptomi bolesti. Nakon toga dolazi do pojave suhog kašlja i problema s disanjem koji se mogu razviti u tešku pneumoniju. U otprilike trećine bolesnika javlja se također proljev ili povraćanje, a u otprilike polovice zbunjenost ili delirij. Većini bolesnika potrebna je hospitalizacija i liječenje odgovarajućim antibioticima. Dijagnoza se postavlja na temelju određenih laboratorijskih pretraga.



Simptomi legionarske bolesti ¹⁴

Legioneloze se češće pojavljuju u ljetnim mjesecima. Razlog tome su povoljnije okolnosti za njeno razmnožavanje, te češća i intenzivnija izloženost ljudi vodenim aerosolima. Legionarska se bolest prenosi udisanjem/inhalacijom mikroskopskih kapljica vode (aerosola) koje sadrže legionele. Bakterije žive u vodi i razmnožavaju se u prikladnim uvjetima, npr. u vodi nakupljenoj u umjetnim vodnim sustavima pri temperaturi od 20 °C do 50 °C. Aerosoli u kojima su prisutne legionele mogu nastati, na primjer, pri puštanju vode iz slavine ili tuša, pri stvaranju mjehurića u vodi u hidromasažnim bazenima ili putem nekih klimatizacijskih sustava.

Rizik od zaraze postoji ondje gdje se stvaraju kapljice vode (aerosoli). Primjerice u tuševima i slavinama, hidromasažnim kadama, rashladnim tornjevima i evaporativnim kondenzatorima koji se upotrebljavaju za klimatizaciju zraka, ukrasnim fontanama, posebno unutarnjim, ovlaženim izlozima hrane i ostalim uređajima za ovlaživanje, vodnim sustavima crijeva za zalijevanje biljaka i dr.

Većina prijavljenih slučajeva legionarske bolesti uzrokovana je *Legionella pneumophila*, serogrupa 1.¹⁵

Procijenjeni udio slučajeva uzrokovanih vrstama je:

L. pneumophila (91.4%)

L. micdadei (2,8%)

L. longbeachae (2,2%)

L. dumoffii (1.5%)

L. bozemanii (1.3%)

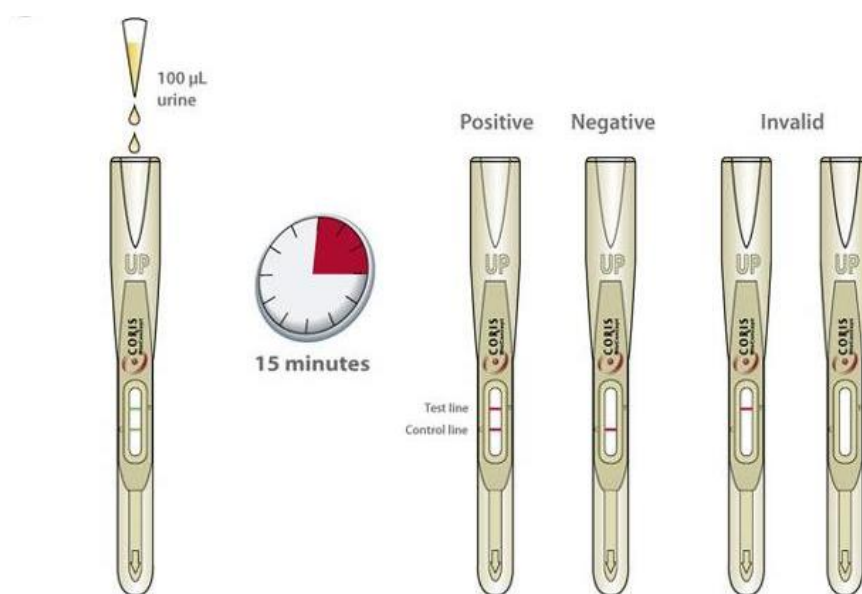


Legionella pneumophila 3¹⁶

Legionarska bolest se liječi antibioticima i simptomatski. Oporavak je dug, te su promjene na plućima vidljive i mjesec dana nakon početka bolesti. Trenutno ne postoji cjepivo za ovu bolest. Antimikrobna sredstva kao što su makrolidi i kinoloni djelotvorni su u liječenju infekcija legionelama, što uključuje: azitromicin, klaritromicin, roksitromicin, levofloksacin, ciprofloksacin, moksifloksacin, gemifloksacin i tetraciklin.

Pontiac groznica je blaži klinički oblik bolesti, odnosno akutna febrilna bolest slična gripi. Inkubacija traje od nekoliko sati do dva dana. Moguća je pojava suhog kašlja, no upala pluća se ne razvija. Terapija antibioticima nije potrebna. Za 2 do 7 dana dolazi do potpunog ozdravljenja.

U serumu je moguće detektirati antitijela na *Legionella pneumophila* u sva tri razreda (IgM, IgG, IgA). Uz antitijela, za brzu dijagnozu može poslužiti i određivanje antigena u urinu, tzv. urin antigen test.



Legionella urin antigen test ¹⁷

1.2 HRANJIVE PODLOGE

Bakteriološka podloga je hranjivi medij koji svojim sastavom omogućuje rast bakterija. Njihova osnovna namjena je uzgoj bakterija u laboratorijskim uvjetima, a radi upoznavanja biokemijskih osobina, dijagnosticiranja bolesti, izrade antigena, antibiograma i dr.

Tipovi hranjivih podloga:

1. Podjela prema podrijetlu i sastavu:

- prirodne hranjive podloge (točan sastav nije poznat; npr. krv, mlijeko)
- sintetičke hranjive podloge (poznatog sastava)
- polusintetičke hranjive podloge (kombinacija prirodnih i sintetičkih)

2. Podjela prema konzistenciji:

- tekuće hranjive podloge (bujoni)
- polutekuće (polukrute) hranjive podloge
- čvrste hranjive podloge (agari)

Čvrstoća podloge postiže se dodatkom agara. U čvrstim hranjivim podlogama koncentracija agara je od 1 do 5 %, a u polutekućim od 0.1 do 0.5 %

3. Podjela prema namjeni:

S obzirom na specifičnu namjenu varira i sastav podloge (npr. podloge opće namjene, selektivne i diferencijalne hranjive podloge)¹⁸

Za kultivaciju *Legionella* su potrebne selektivne hranjive podloge BCYE i GVPC.

1.2.1 BCYE hranjive podloge

Puferirana ugljen kvašćeva agar baza (BCYE engl. buffered charcoal yeast extract (BCYE) je selektivni medij koji se koristi za kultiviranje ili uzgoj određenih vrsta bakterija, posebno gram-negativnih vrsta *Legionella pneumophila*. BCYE bez cisteina se koristi zajedno s BCYE koji sadrži L-cistein za identifikaciju *Legionella* iz kliničkih i ekoloških izvora.

Navedene hranjive podloge se skladište na 2-8°C daleko od izravnog svjetla. Mediji se ne smiju koristiti ako na njima postoje znakovi oštećenja (skupljanje, pucanje ili promjena boje), onečišćenja ili ako je istekao rok trajanja. Podloge su osjetljive na svjetlo i temperaturu; potrebno ih je štiti od svjetlosti, prekomjerne topline, vlage i smrzavanja.

Ove podloge mogu sadržavati sastojke životinjskog podrijetla. Preporuča se da se podloge tretiraju kao potencijalno zarazne, te da se pridržava uobičajenih općih mjera opreza. Ne smije se gutati, udisati ili dopustiti da dođe u dodir s kožom.

Na selektivnim podlogama BCYE podlogama kolonije *Legionella pneumophila* izgledaju kao bijelo-sive do plavo-sive nakupine i fluoresciraju žuto-zeleno pod UV-svjetlom dugih valova. Kolonije *Legionella bozemanii* izgledaju bijelo-sive do plavo-sive i fluoresciraju plavo-bijelo pod UV-svjetlom dugih valova.¹⁹



L. pneumophila i *L. bozemanii* na istoj hranjivoj podlozi BCYE(buffered charcoal yeast extract)
– slika iz laboratorija

1.2.2 GVPC hranjive podloge

Glicin-Vancomycin-Polimiksinin-Cikloheksimide (GVPC, engl. Glycine-Vancomycin-Polymyxin-Cycloheximide) je selektivan medij za izolaciju vrsta *Legionelle* iz vode i drugih izvora okoliša.

Navedene hranjive podloge se skladište na tamnom mjestu na temperaturi od 2 do 8 °C, u njihovom originalnom omotu do trenutka prije korištenja. Potrebno je izbjegavati smrzavanje i pregrijavanje. Podloge se mogu inokulirati do isteka roka valjanosti i inkubirati tijekom preporučenih vremena inkubacije.

GVPC medij je samo djelomično selektivan. Materijali s velikim brojem kontaminirajućih organizama se prvo moraju dekontaminirati.

Dodatak GVPC može biti malo inhibitoran za određene vrste *Legionelle*, tako da je potrebno duže vrijeme inkubacije. Stoga, kada se koristi ovaj medij, treba uključiti neselektivne medije za *Legionellu*.²⁰



Pneumophila na GVPC (glycine-vancomycin-polymyxin-cycloheximide)²¹

U detekciji legionella bakterija upotrebljavaju se 3 tipa agara:

Sastojci za 1 L medija:

Tablica 2. BCYE Agar

BCYE Agar (eng. BUFFERED CHARCOAL YEAST EXTRACT)

Kvašćev ekstrakt	10 g
ACES pufer	10 g
Aktivirani ugljen u prahu	2 g
KOH	2.8 g
Alfa-ketoglutarat	1 g
L-Cistein	0.4 g
Fe-pirofosfat	0.25 g
Agar	12 g

Kvašćev ekstrakt osigurava proteine i druge hranjive tvari potrebne za rast.

ACES pufer se dodaje kako bi se održao odgovarajući pH za optimalni rast.

Aktivirani ugljen u prahu razgrađuje vodikov peroksid, metabolički proizvod koji je toksičan za vrste *Legionelle*, a može prikupljati i ugljični dioksid i modificirati površinsku napetost.

Alfa-ketoglutarat se dodaje kako bi stimulirao rast.

L-Cistein je esencijalna aminokiselina, ugrađena kako bi zadovoljila specifične prehrambene potrebe vrsta *Legionella*.

Fe-pirofosfat koristi se kao dodatak željezu; izvor željeza. ²²

Tablica 3. BCYE Agar bez cisteina

BCYE Agar bez cisteina

BCYE bez Cys priprema se na način da se u gornjoj formulaciji izostavi Cys (0.4 g), služi za potvrdu *Legionella* bakterija, na njemu legionele ne rastu.

Tablica 4. GVPC Agar

GVPC Agar (Glycin vancomycin polymixin B cycloheximide agar)

Visoko selektivan medij, priprema se na isti način kao i BCYE, uz dodatak glicina i 3 antibiotika.

Glicin	3 g
Polimiksin B sulfat	80000 IU
Vancomicin hidroklorid	0.001 g
Ciklohemid	0.08 g

2 EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio završnog rada odrađen je u Zagrebu, u akreditiranom laboratoriju PathCon Laboratories EU pod mentorstvom dr. sc. Roberta Sauerborn Klobučar.

Prije dobivanja pristupa laboratoriju potrebno je potpisati izjavu i držati se dolje navedenih smjernica.

Za rad i praksu u mikrobiološkom laboratoriju tvrtke PathCon Laboratories EU od kandidata se očekuje da sudjeluje u sljedećim aktivnostima laboratorija:

1. Prilikom dolaska – obilazak cijelog laboratorija(sve lab. prostorije, uključujući i skladište).
2. Provjera svih nadzornih (evidencijskih listova) – pri kraju mjeseca upozoriti odgovornog djelatnika na pripremu novih (temperaturne liste, nadzor rada sterilnog kabineta, kvaliteta vode, razina CO₂, autoklavi i ostalo)
3. Ukoliko kandidat uoči neki problem, odmah javiti odgovornom djelatniku!
4. Provjeriti količinu alkohola isopropanola u svim bočicama po radnim ploham, kao i količinu vode za rad kod pH metra.
5. Aktivno sudjelovanje u evidenciji repetibilnosti i linearnosti vaga te provjeri točnosti pipeta.
6. Dobro snalaženje u laboratorijskom prostoru; poznavanje skladištenja potrošnog materijala(rukavice, vijalice s crnim čepovima, epice za analizu, vrećice za inkubator, vrećice za sterilizaciju, nastavci...) te sudjelovanje u njihovoj evidenciji.
7. Vođenje evidencije broja bočica koje se šalju klijentima (od 125 i 250 mL) – sterilnih i nesterilnih, broja hranjivih podloga (BCYE, ENV-BCYE w/o CYS).
8. Sudjelovanje u pripremi sterilnih pinceta, čaša za filtraciju, vode, vijalica, sterilnih bočica s prezervacijom.
9. Analiza uzoraka:
 - a) Priprema radnih ploha za analizu (brisanje površina alkoholom)
 - b) Postavljanje hranjivih podloga na radne površine i njihovo obilježavanje (printanje naljepnica isključivo u dogovoru s odgovornim djelatnikom)

- c) Priprema sterilnih staklenih štapića za razmazivanje uzoraka, priprema nastavaka, kantica za otpad, staklenih čaša s isopropanolom, priprema sterilnog kabineta
 - d) Priprema staklenih vijalica iz hladnjaka i njihovo obilježavanje odlaganje kod filtracije)
 - e) Označavanje vrećica za inkubator s datumom i dodijeljenim PathCon brojem analize
 - f) Aktivno sudjelovanje u inokulaciji uzoraka (direktno nasađivanje, filtracija, rad s kiselim puferom)
 - g) Priprema obrazaca za očitavanje uzoraka (printanje u dogovoru s odgovornom osobom – obrasci 051-1 ili 052-1)
 - h) Priprema uzoraka iz inkubatora za očitavanje.
10. Dobro poznavanje skladišnog prostora:
- a) Skladištenje hranjivih podloga nakon analize
 - b) Razvrstavanje različitog laboratorijskog otpada i upisivanje njihovih količina prilikom zbrinjavanja (odvoza).

Kandidat se obvezuje da će ispravno rukovati i svakodnevno brinuti o svim uređajima koji se koriste prilikom analize uzoraka te da će, utvrdi li neku neispravnost, odmah obavijestiti odgovornu osobu ili voditelja ispitivanja.

Kandidat se obvezuje da će laboratorij držati urednim i neće raditi štetu.²³

Protočna citometrija (engl. flow cytometry (FC)) i direktno nasađivanje (engl. direct play (DP)) su tehnike koje se koriste za razvrstavanje i klasificiranje stanica pomoću fluorescentnih markera na hranjivim podlogama.

Analiza vode na prisutnost *Legionella bozemanii* (*Fluoribacter bozemanus* ; ATCC 33217) metodom kultivacije

2.1 PRIPREMA UZORKA

Uzimanje uzorka vodovodne vode iz sudopera koji se nalazi u laboratoriju, u posebno pripremljene sterilne i tretirane bočice.

Resuspendiranje koncentrirane suspenzije legionele (pomoću vortex uređaja) i dodavanje 1 i 100 μL pripremljene suspenzije *Legionelle bozemanii* u uzorkovanu vodu.

Ukupni pripremljeni volumen svakog uzorka iznosi 125 mL.



Priprema uzorka

2.2 FILTRACIJA

Priprema staklenih vijalica sa sterilnom vodom iz hladnjaka i njihovo obilježavanje.

Filtracija pripremljenog uzorka (100 mL) kroz membranu (0,2 μm) .

Nakon filtracije, membrana se sterilnom pincetom prenosi u vijalice sa sterilnom vodom te se vijalice stavljaju u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta. Ovako pripremljeni uzorak nazivamo FC i dalje ide u 7 različitih postupaka.

Ostatak uzorka koji nije bio na filtraciji ide na daljnju obradu (DP), također u 7 različitih postupaka.



Filtracija

2.3 KULTIVACIJA

Upotrijebljena su 2 tipa hranjivih podloga:

- BCYE
- GVPC

i svaki uzorak obrađen je s 14 različitih procedura (manipulacija). Postupak pripreme za analizu opisan je u sljedećim koracima:

- Priprema radnih površina za analizu (brisanje površina alkoholom).
- Postavljanje hranjivih podloga na radne površine i njihovo obilježavanje.
- Priprema sterilnih staklenih štapića za razmazivanje uzoraka, priprema nastavaka, kantica za otpad, staklenih čaša s isopropanolom, priprema sterilnog kabineta.
- Označavanje vrećica za inkubator s datumom i dodijeljenim brojem analize.
- DP = direktno nasađivanje FC = rad s filtratom



Kultivacija 1

Jednak postupak kultivacije za filtrirani i nefiltrirani dio uzorka:

1. 100 μL uzorka na jednu podlogu (BCYE), te 100 μL na drugu podlogu (GVPC) i razmazati sterilnim staklenim štapićem
2. DP 1:1 = 250 μL uzorka i 250 μL kiselog pufera
3. DP 1:2 = 250 μL uzorka i 500 μL kiselog pufera
4. Za tzv. 'heating' uzorka uzeto je 250 μL uzorka, pohranjen tijekom perioda od 30 min na 50 $^{\circ}\text{C}$, te jednakim postupkom razmazan

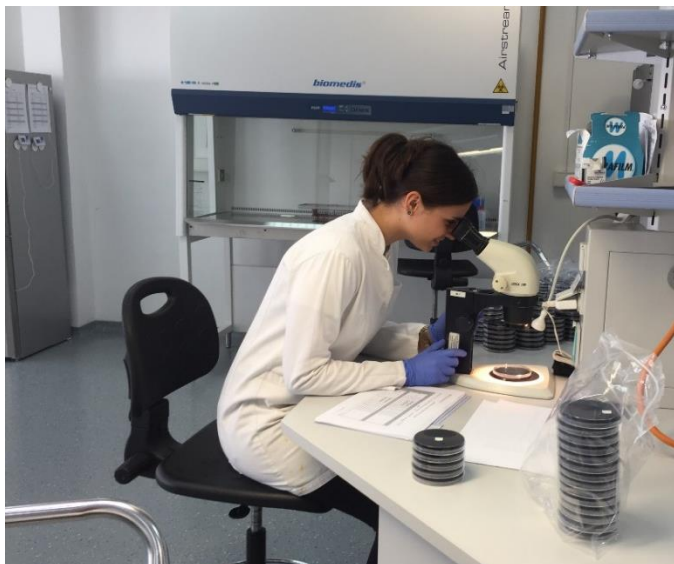
Odlaganje uzoraka u inkubator na 36 $^{\circ}\text{C}$ (uz 3% CO_2) do prvog očitavanja.



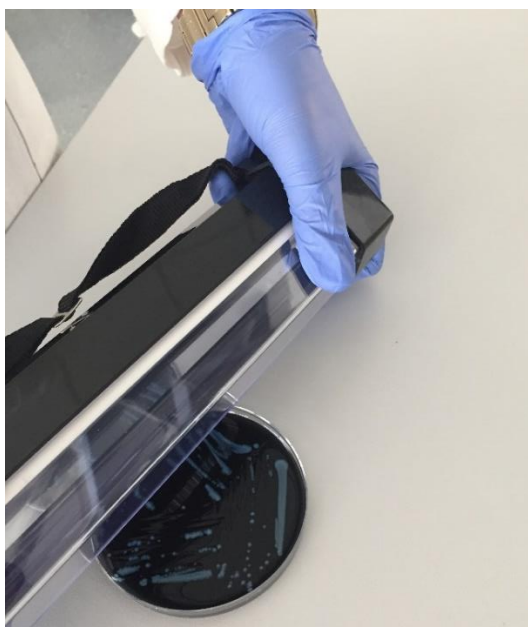
Kultivacija 2

2.4 OČITAVANJE UZORAKA I DETERMINACIJA FLUORESCENTNIH *LEGIONELLA*

Nakon 4. dana vrši se prvo očitavanje te upisivanje u pripremljene obrasce.
Ponovno očitavanje vrši se 10. dan od početka inkubacije.



Očitavanje uzoraka 1

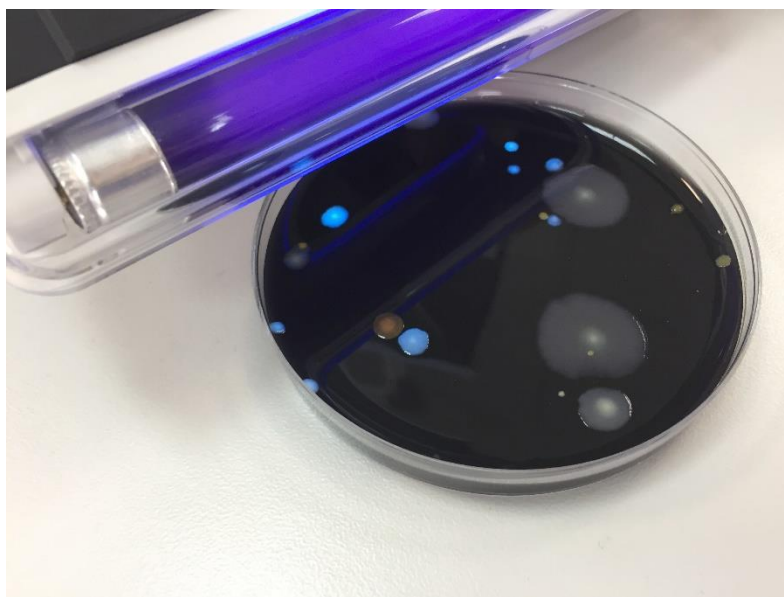


Očitavanje uzoraka 2

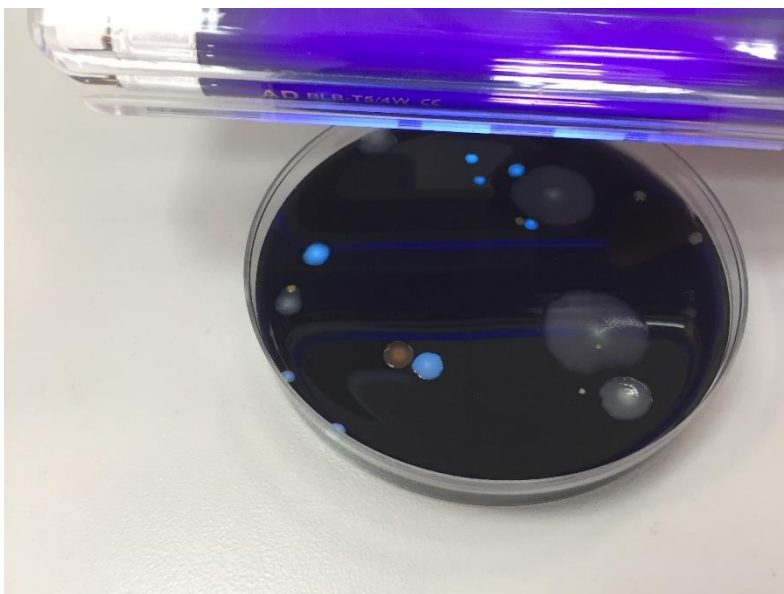
3 REZULTATI

3.1 IZRAČUN KONCENTRACIJE (CFU/mL)

Ovisno o broju detektiranih kolonija (CFU) po ploči, koncentracija bakterija računa se s obzirom na postupak u kojem je detektirana te se taj broj množi s faktorom razrjeđenja.



Detekcija kolonija 1



Detekcija kolonija 2

Broj detektiranih kolonija bio je sljedeći:

Tablica 5. Rezultati

Suspenzija	Negativna kontrola	1 μ L	100 μ L
Koncentracija (CFU)	Nije detektirano	8	Ne moguće izbrojati (engl. too numerous to count, TNTC)
Koncentracija (CFU/mL)	---	<1 CFU/mL	TNTC

4 RASPRAVA

Bakterije roda *Legionella* glavni su uzročnici različitih legioneloza, a nalazimo ih u slatkovodnom okruženju u uskoj povezanosti sa slobodno-živućim amebama te biofilmovima, što dovodi do postojanosti, širenja, otpornosti na biocide i povišene virulencije tih bakterija.

Pojavljivanje legioneloza uglavnom je posljedica sposobnosti ovih bakterija da koloniziraju i opstaju u vodnim sustavima, unatoč jakim fizičkim i kemijskim tretmanima.

Smrtnost nakon infekcija kreće se od 8-15 %²⁴, a može biti i veća kod imuno-kompromitiranih osoba. Između 60 vrsta opisanih *Legionella*, *L.pneumophila* SG 1 je vodeći uzročnik legioneloza (posebno legionarske bolesti), ali ni druge vrste ne smijemo zanemariti. Za još 26 sojeva zabilježeno je da uzrokuju infekcije kod ljudi.

Ove su bakterije 2016.godine bile na 4. mjestu svih kandidata kao potencijalno opasni organizmi.²⁵

U prirodnom slatkovodnom okolišu, bakterije roda *Legionella* su sveprisutni organizmi, i uglavnom se mogu naći kao paraziti različitih slobodno-živućih protozoa kao što su primjerice amebe, njihovi prirodni domaćini²⁶ koji imaju ključnu ulogu u njihovom životnom ciklusu. Amebe predstavljaju biološki štiti koji onda štiti unutarnje bakterije od štetnih utjecaja okoliša ili djelovanja biocida.

Nakon transfera iz prirodnog staništa u antropogene sustave (umjetne vodne sustave koje je stvorio čovjek) legionele koloniziraju već postojeće biofilme ili stvaraju nove. Koevolucija s različitim vrstama protozoa, rezultirala je razvojem mehanizama koji omogućavaju legionelama da okupiraju vrlo široki raspon domaćina.

Prijenos na čovjeka nastaje nakon udisanja kontaminiranih kapljica vode. Ukoliko dopru do alveolarne sluznice, zahvaljujuću sposobnosti da se odupru fagocitozi, množe se unutar makrofaga i dalje šire organizmom. Dodatno mogu napasti epitelne stanice pluća, u kojima se također mogu replicirati.

Biofilmovi i slobodno živeće amebe smatraju se glavnim okolišnim 'rezervoarima' za legionelle, te predstavljaju potencijalni izvor kontaminacije, što onda rezultira i mogućom opasnošću za zdravlje ljudi.

Budući da *L. pneumophila* uzrokuje 85-90% legioneloza, u ovom je radu fokus bio na načinu detekcije i izračunu koncentracije fluorescentnih bakterija iz ostalih roda *Legionella* odgovornih za uzorkovanje legioneloza.

Primjenom standarda ISO 11731:2017 Kvaliteta vode- Brojenje legionela, uspjelo se detektirati i odrediti koncentraciju ovih vrlo sitnih kolonija fluorescentnih bakterija.

Treba naglasiti da je kontinuirani monitoring i stalni nadzor antropogenih vodnih sustava od velike važnosti za detekciju i identifikaciju legionela jer se na taj način mogu spriječiti potencijalne infekcije legionellama i rizici od legioneloza.

5 ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitana je prisutnost *Legionella bozemanii* (*Fluoribacter bozemaniae*; ATCC 33217) u vodovodnoj vodi metodom kultivacije (nakon dodavanja dvije različite koncentracije bakterijske suspenzije). Prisutnost bakterije bilo je moguće ustvrditi zbog njezine fluorescirajuće prirode te upotrebom posebno pripremljenih selektivnih hranjivih podloga. Dodavanjem različitih volumena pripremljene suspenzije jasno je pokazano da se i koncentracija (broj kolonija na podlogama) mijenja u ovisnosti o dodanom volumenu (Tablica 5. Rezultati). Metoda kultivacije prema ISO 11731:2017 dobra je tehnika u detekciji legionela iz okolišnih uzoraka vode i svih drugih sustava koji sadrže vodu. Pravodobnim nadzorom svih vodenim sustava može se spriječiti pojava legionela, a time i opasnost od infekcije.

6 LITERATURA

-
- ¹ Sampling for Legionella bacteria in water systems – Code of practise, 2008.
- ² HRN EN ISO/IEC 11731:2017 Kvaliteta vode – brojenje Legionella (Water Quality Enumeration og Legionella)
- ³ Igel L., Helbig JH, Luck PC. : Isolation and characterization of a nonfluorescent strain of Legionella parisiensis. 2004.
- ⁴ Andersson-Engels S., af Klinteberg C., Svanberg K., Svanberg, S. : In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. Phys. Med. Biol. 1997.
- ⁵ Neil K, Berkelman R. : Increasing incidence of legionellosis in the United States, 1990-2005: changing epidemiological trends. *Clinical Infectious Diseases* 47
- ⁶ Josipović Ana, Markulj-Kulundžić Antonela, Matoša-Kočar Maja, Marković Monika: Fluorescencija; Osijek, Republika Hrvatska, 2016.
- ⁷ J.M. Luis, D.M. Bishop, B. Kirtman: *A different approach for calculating Franck–Condon factors including anharmonicity*. J. Chem. Phys., 2004.
- ⁸ Wikipedia, the free world encyclopedia ; Frack- Condon principle
- ⁹ Svjetlana Luterotti: Fotoluminiscencija, 2006.
- ¹⁰ Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Identifikacija Legionella iz uzoraka vode, 2018.
- ¹¹ Wikipedia, the free world encyclopedia ; Legionella pneumophila
- ¹² <http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1259>

¹³ Europski centar za sprečavanje i kontrolu bolesti, Legionarska bolest u Europi, 2014. Stockholm:ECDC, 2016. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-europe-2014.pdf>

¹⁴ Martina Bušić-Kutija ; Epidemija legionele, 2015.

¹⁵ Robert R. Victor L. Yu: Infection Due to Legionella Species Other Than L. pneumophila. , *Clinical Infectious Diseases*, 2002.

¹⁶ <https://fineartamerica.com/featured/legionella-pneumophila-tem-eye-of-science.html?product=greeting-card>

¹⁷ <https://www.slideshare.net/doctorrao/legionella-pneumophila-34817876>

¹⁸ Doc. dr. dc. Goran Palijan : Praktikum iz mikrobiologije:bakteriologija ; Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

¹⁹ <http://www legionella.org/>

²⁰ Glycine-Containing Selective Medium for Isolation of Legionellaceae from Environmental Specimens; Department of Microbiology, Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, 1981.

²¹ <https://www.mi-wea.org/docs/1. Dubois Shawn-Legiolert MI 18May2017.pdf>

²² Tankeshwar Acharya : Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar, 2013.

²³ Stručno osposobljavanje u mikrobiološkom laboratoriju; PathConLaboratoriesEU ; STATE-OF-THE-ART LEGIONELLA SOLUTIONS, Zagreb

²⁴ Jean-Marc Berjaud; Legionella Pneumophila: The paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the enviroment, 2016.

²⁵ USEPA, United States Enviromental Protection Agency

²⁶ Michael Steinert et al : Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*, 2006.