

Atipik Pnömoni Olgularında Legionella pneumophila'nın Direkt ve İndirekt Mikrobiyolojik Yöntemlerle Araştırılması(*)

Gülçin BABAĞLU(**), Derya AYDIN(**), Orhan ARSEVEN(***), Rahmiye BERKİTEN(**)

(*)9th International Congress on Infectious Diseases (Buenos Aires-Argentina, April 10-13, 2000)'de sunulmuştur.

(**) İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

(***)İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Klinik olarak atipik pnömoni tanısı konmuş 83 hastada Legionella pneumophila araştırılmıştır. Hastaların tümünde IFA ile anti-L. pneumophila antikorlar araştırılırken, 46'sında alt solunum yolu örneklerine (26 balgam, 17 bronkoalveoler lavaj sıvısı, 3 transtrakeal aspirat) DFA ve kültür yöntemleri uygulanmış ve idrarlarında ELISA ile anti-jen araştırılmıştır. Toplam 11 (%13.2) hastada lejyonelloz saptanmıştır. Bunların 10'unda serokonversiyon saptanmıştır. Tüm testlerin uygulandığı dokuz hastanın dördünde DFA ve serokonversiyon, üçünde sadece serokonversiyon, birinde sadece DFA ve birinde de tüm yöntemlerle pozitiflik saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Atipik pnömoni, Legionella pneumophila

SUMMARY

Investigation of Legionella pneumophila in Patients with Atypical Pneumonia by Direct and Indirect Microbiological Methods

In 83 patients who were diagnosed clinically as having atypical pneumonia, Legionella pneumophila was investigated. In all patients anti-L.pneumophila antibodies were investigated by IFA. In 46 patients; DFA, and culture methods were performed for lower respiratory tract specimens(26 sputum, 17 bronchoalveolar lavage fluid, 3 transtracheal aspirate) and urinary antigen was investigated by ELISA.

Totally in 11 (13.2%) patients legionellosis was detected. In 10 of these 11 patients seroconversion was detected. Amongst 9 patients for whom all tests were performed, diagnosis was made by DFA and seroconversion in 4 patients, by IFA in 3 patients, by DFA in 1 patient and by all tests in 1 patient.

Keywords: Atypical pneumonia, Legionella pneumophila

GİRİŞ

Legionella cinsi bakteriler doğadaki çeşitli su kaynaklarında, şehir su şebekelerinde ve buna bağlı klimatizasyon sistemlerinde bulunabilen ve dolayısıyla hastane su sistemlerine de az veya saptanamayacak sayılarda geçebilen bakterilerdir. Lejyonellaların bu sistemlerde çoğalmasını kolaylaştıran faktörler arasında uygun sıcaklık, düşük hızlı su akımı, tortu varlığı ve bakterinin hücre içi çoğalmasına izin veren bazı serbest yaşayan amiplerin varlığı sayılabilir (1).

Bu kontamine sularla karşılaşan insanda hastalık ge-

leşme olasılığı bakteri sayısı, karşılaşma biçimi ve kişinin sağlık durumu gibi faktörlere bağlıdır. Ciddi immünyetmezliği ve hematolojik maliniteleri bulunan hastalar lejyonelloz gelişmesi ve hastalığın ciddi seyretmesi açısından özellikle risk altındadırlar. Diğer maliniteler, diabetes mellitus, kronik akciğer hastalığı, sigara kullanımı ve yaşlılık da risk faktörleri arasındadır (1). Nadir olmakla birlikte çocuklarda da bildirimler yapılmıştır (2).

Bulaşma kontamine suların bulunduğu çeşitli gereç-

lerden (duş başlıkları, solunum terapi gereçleri ve oda nemlendiricileri gibi) kaynaklanan aerosollerin solunum yoluyla alınmasıyla gerçekleşir (1).

Hastalık asemptomatik infeksiyondan hızlı gelişen ciddi seyirli pnömoniye değişebilen klinik tablolar oluşturabilir. Klinik ve radyolojik bulgular diğer etkenlerle gelişebilecek pnömonilerden farklı değildir. Diğer patojenlerin saptanmış olmasının aynı zamanda lejyonella infeksiyonunun olmadığı anlamına gelmeyeceği de unutulmamalıdır.

Lejyonella pnömonisinin tanısında, dolayısıyla da tedavide geç kalınması prognozu etkileyen en önemli faktörlerdir. Tanı amacıyla çeşitli alt solunum yolu (ASY) örneklerinde kültür, DFA, serumda IFA veya idrarda ELISA gibi yöntemlerle bakteri, antijenleri veya spesifik antikorlar araştırılmaktadır. Son zamanlarda PCR gibi moleküler tanı yöntemleri de uygulanmaktadır. CDC (Centers for Control Diseases, ABD) infeksiyonun kesin tanısının pnömonisi olan hastaların ASY örneklerinde kültür veya DFA yöntemleriyle bakterinin saptanması, akut ve konvelesan dönem serumlar arasında dört kat veya daha fazla antikor titre artışı gösterilmesi veya üriner antijen saptanması durumunda konabileceğini bildirmiştir (3).

Çalışmamızda Legionella pneumophila'nın atipik pnömonili hastalarda bulunma sıklığının saptanması amaçlanmış ve bakteri kültür, DFA, IFA ve ELISA yöntemleriyle araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Bilim Dalı'na Eylül 1995-Mart 1997 tarihleri arasında çeşitli kliniklerdeki atipik pnömoni tanısı konmuş 83 hastadan alınarak yollanmış çeşitli klinik örneklerde L. pneumophila araştırılmıştır. ASY örneklerinde kültür ve DFA (Diagnostic Pasteur), serum örneklerinde IFA (MARDX Diagnostics Inc.) ve idrar örneklerinde de antijen araştırma amacıyla ELISA (BINAX Inc.) yöntemleri kullanılmıştır. 46 hastanın ASY (26'sı balgam, 17'si BAL, üçü TTA), serum ve idrar örnekleri incelenirken, 37 hastada sadece serum örnekleri incelenmiştir. ASY örneği olarak balgam, bronkoalveoler lavaj sıvısı veya transtrakeal aspirat incelenmiştir.

IFA ve ELISA deneyleri ile hemen çalışılmayan örnekler -20°C'a kaldırılmış, deneyin yapılacağı gün çözdürüldükten sonra çalışılmıştır.

Kültür: ASY örneklerinden Gram ve EZN boyamaları yapılmış ve %5 koyun kanlı agar, çikolatamsı agar, Mc Conkey agar ve Moraxella catarrhalis seçici besiyerlerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri %5 CO₂'li etüvde 35°C'da inkübe edilmiştir.

Legionella kültürü: BCYE, BMPA ve MWY besiyerleri kullanılmıştır. Kalite kontrol amacıyla L. pneumophila ATCC 33215 ve ATCC 33152 suşları kullanılmıştır. TTA örnekleri Mueller-Hinton buyyonda 1/5 oranında dilüe edildikten sonra, BAL 1 ml.den fazla örnek varsa santrifüj edildikten sonra ve balgam örnekleri direkt olarak ve asitle dekontaminasyon işlemlerinden sonra ekilmiştir. Her üç besiyeri de %5CO₂'li ortamda 14 güne kadar inkübe edilmiştir. Şüpheli üreme durumunda kolonilerden Gram boyama, BCYE agar ve kanlı agara ekimler yapılmıştır. BCYE agarda üreme olması ve kanlı agarda olmaması durumunda doğrulama amacıyla şüpheli kolonilere DFA uygulanmıştır.

DFA: Klinik örneklerde L. pneumophila serogrup 1-6 suşları araştırılmış ve boyama ve değerlendirme üretici firma önerilerine göre yapılmıştır.

IFA: Hastalardan başvurduklarında ve 2-3 hafta sonra alınan serum örneklerinde L. pneumophila serogrup 1-6'ya karşı antikorlar araştırılmıştır.

ELISA: Hasta idrarlarında L. pneumophila serogrup 1 antijenleri üretici firma önerileri doğrultusunda araştırılmıştır.

Pnömonisi olan ve ASY örneklerinde kültür veya DFA yöntemleriyle bakterinin saptandığı veya IFA ile en az dört kat antikor titre artışı gösterilen hastalar lejyonella pnömonisi olarak tanımlanmıştır.

BULGULAR

36'sı kadın 47'si erkek toplam 83 hastanın yaş ortalaması 33.62 olarak saptanmıştır.

Toplam 11 (%13.2) hastada lejyonelloz tanısı konmuştur.

11 hastanın beşinde sadece IFA, dördünde IFA ve DFA, birinde sadece DFA ve birinde de kültür, IFA ve DFA ile pozitiflik saptanmıştır.

Spesifik olmayan kültürlerde beş hastada Pseudomonas aeruginosa, üç hastada Streptococcus pneumoniae, iki hastada Candida albicans, bir hastada Moraxella catarrhalis, bir hastada Staphylococcus aureus, bir hastada Enterobacter cinsi, bir hastada Acinetobacter cinsi bakteri ve bir hastada da Aspergillus cinsi mantar üretilmiştir. Bunlardan sadece S. aureus üretilen hastada lejyonelloz tanısı konmuştur.

L. pneumophila enfeksiyonu tanısı konan hastalar ve uygulanan test sonuçları tabloda gösterilmiştir (Tablo 1)

PBÜ : Patogen bakteri üremedi
MRSA: Metisiline dirençli S. aureus
öa : Örnek alınmadı
* : İmmün sistemi herhangi bir nedenle baskılanmış hastalar
TTA : Transtrakeal aspirat
BAL : Bronkoalveolar lavaj

Tablo. Lejyonelloz tanısı konan hastalar ve test sonuçları

Hasta No	KÜLTÜR			DFA	IFA		İdrarda antijen	Risk* faktörü
	Örnek	L.pneumophila	Non-spesifik		1.örnek	2.örnek		
1	balgam	-	PBÜ	+	1/64	1/256	-	+
2	balgam	-	PBÜ	+	1/64	1/512	-	+
3	BAL	-	Steril kaldı	+	1/64	1/128	-	+
4	balgam	-	PBÜ	-	1/64	1/512	-	+
5	balgam	-	PBÜ	-	1/64	1/512	-	+
6	TTA	-	MRSA	+	1/64	1/512	-	-
7	balgam	+	PBÜ	+	1/64	1/256	+	+
8	BAL	-	PBÜ	+	1/64	1/512	-	+
9	balgam	-	PBÜ	-	1/128	1/1024	-	+
10		öa		-	1/128	1/1024	öa	+
11		öa		-	1/128	1/512	öa	+

TARTIŞMA

Farklı coğrafik bölgelerde değişik sıklıklar bildirilmekle birlikte L. pneumophila'nın toplumdan kazanılmış pnömoni etkenleri arasında ilk üç sırada yer aldığı bildirilmektedir. Bakteri atipik pnömonilerin de majör etkenlerindedir (1). Bakterinin tanımlanmasından bu yana çeşitli hastane kaynaklı lejyoner hastalığı salgınları bildirilmiştir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hastane kaynaklı pnömoni geliştiğinde özel istek olmasa da bakterinin rutin olarak araştırılması gerektiğini savunan araştırmacılar vardır (1, 4).

Lejyonella pnömonisinin tanısında, dolayısıyla da tedavisinde geç kalınması prognozu etkileyen en önemli faktörlerdir. Tanıda birden fazla yöntem ta-

nımlanmıştır. Bunların birbirini tamamlayan yöntemler olması nedeniyle, hastalıktan şüphelenilmesi durumunda birden fazla yöntemin kullanılması doğru tanı olasılığını artırır. Yöntemlerin hiçbirinin % 100 duyarlı olmaması nedeniyle testlerden bir veya birkaçının negatif olması hastalığın olmadığını göstermez. Varolan yöntemler içerisinde kesin tanı herhangi bir solunum yolu örneğinden yapılacak olan kültürde bakterinin üretilmesi ile konur (1).

Yurdumuzda L. pneumophila ile ilgili çeşitli klinik çalışmalar ve olgu bildirimleri yapılmıştır (5,6,7,8,9,10,11).

Çalışmamızda hastalarımızdan sadece birinde (7 no'lu hasta) uygulanan tüm yöntemlerle pozitiflik saptanmıştır. Balgam örneğinden yapılan Gram boya-

mada polimorf çekirdekli lökositler ve Gram negatif çomaklar görülen ve nonspesifik kültüründe patojen bakteri üremeyen hastanın spesifik kültüründe lejyonella şüpheli üreme olmuş ve bu kolonilerden yapılan DFA boyasında pozitiflik saptanmıştır. Hastanın balgamında DFA ve idrarında ELISA ile antijen saptanmış ve hastada serokonversiyon gelişmiştir. Romatoid artriti de olan hasta klaritromisin tedavisine yanıt vermiştir.

Atipik pnömoni ön tanısı ile enfeksiyon servisine yatırılan ve durumunun ağırlaşması nedeniyle yoğun bakım ünitesine alınan yedi yaşındaki hastamızın (6 no'lu hasta) Gram preparatında polimorf nüveli lökositler ve Gram pozitif koklar görülmüş, nonspesifik kültüründe MRSA üremiştir. TTA örneğinde DFA

yöntemi ile antijen saptanan ve serokonversiyon gelişen hastamız bu yaş grubunda *L. pneumophila* enfeksiyonlarının nadir görülmesi açısından ilginç bulunmuştur.

Lejyonelloz tanısı konan hastalarımızdan sadece birinde (üç no'lu hasta) serokonversiyon gösterilememiştir. Serokonversiyonun geç olduğu, hatta hiç oluşmadığı olgular bildirilmiştir (12).

Legionella pnömonilerinden korunmada iki önemli yaklaşım bulunmaktadır

Birinci yaklaşım su sistemlerinin *Legionella* pnömonisi saptanması durumunda araştırılmasıdır. İkinci yaklaşım ise özellikle risk altındaki insanların bulunduğu çeşitli birimlerin su sistemlerinde bakterinin rutin olarak araştırılmasıdır (1).

Tanı konan 11 hastamızın 10'unda risk faktörleri saptanmıştır. Bunlar altı (%54.5) hastada böbrek transplantasyonu ve birer (%9) hastada kronik böbrek yetmezliği, tüberküloz, kortikosteroid kullanımı ve sigara kullanma alışkanlığıdır. Böbrek transplantasyonu hastalarında saptanan yüksek oran, hastalığın özellikle ciddi seyir gösterdiği bu tip hastaların yattığı bölümlerin su sistemlerinin *Legionella* kontaminasyonu açısından rutin olarak araştırılmasının önemini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- **Yu VL:** *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). "GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds): **Principles and Practice of Infectious Diseases**", p2424, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia (2000).
- 2- **Campins M, Ferrer A, Callis L, Pelaz C, Cortes PJ, Pinart N, Vaque J.:** Nosocomial Legionnaire's disease in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 19:228 (2000).
- 3- 413. Centers for Disease Control. Case definitions for public health surveillance. *MMWR* 39 RR13:18. (1990).
- 4- **Wilkinson HW, Crude DD, Broome CV:** Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. *J Clin Microbiol* 13:139 (1981).
- 5- **Kocabeyoğlu Ö, Emekdaş G:** Akciğer tüberkülozlu hasta serumlarında *Legionella pneumophila* antikollarının araştırılması. *Sağ Derg* 61:2 (1989).
- 6- **Yılmaz G, Badur S, Çetin ET, Çelikel T:** Serokonversiyonun ELISA ile belirlendiği bir *Legionella* pnömonisi olgusu. *İnfek Derg* 5:71 (1991).
- 7- **Öğünç G, Özdemir T:** Böbrek transplantasyonu sonrası gelişen lejyoner hastalığı. *Mikrobiyol Bül* 27:137 (1993).
- 8- **Yenicesu M, Gün H:** *Legionella* pnömonisi görülen renal transplantlı bir olgu. *GATA Gült* 36:101 (1994).
- 9- **Vural T, Süleymanlar G, Ergin Ç, Öngüt G:** *Legionella pneumophila* antibodies in haemodialysis patients. 'Legionella Infections and Atypical Pneumonias'. Proceeding of the 11th Meeting of the European Working Group on *Legionella* Infections, p.121 (1996).
- 10- **Boşça A, Birengel S, Kurt H, Tekeli E:** Toplumdan kazanılmış pnömonilerde *Legionella pneumophila*'nın yeri ve tedavide makrolid grubu antibiyotiklerin etkinliği, VIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Özet Kitabı, s.366 (1997).
- 11- **Vural T, Çolak D, Öğünç D, Ergin Ç, Öngüt G, Tuncer D, Er D:** İmmünespresif hastalarda *Legionella* enfeksiyonları. III. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Özet Kitabı s.537 (1997).
- 12- **Zuravleff JJ, Yu VL, Shonnard J:** Diagnosis of Legionnaires' disease: An update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture. *JAMA* 250: 1981 (1983).