

Turistik bölgelerden alınan su örneklerinde *Legionella pneumophila* serogrup 2-14 sıklığı

Frequency of *Legionella pneumophila* serogroup 2-14 isolated from water samples at touristic regions

Gökhan Afacan¹, Zeki Yumuk², Yasemin Baskın¹, Erdener Balıkcı²

¹İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü, İzmir ²Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

İletişim / Correspondence: Zeki Yumuk Adres / Address: Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Umuttepe Yerleşkesi, 41380, Kocaeli Tel: 262 303 74 48 E-mail: zyumuk@kou.edu.tr

ÖZET

Legionella pneumophila legionellosis hastalığının en sık etkenidir. *L.pneumophila*'nın 15 serogrubu belirlenmiştir. *L.pneumophila* serogrup 1 klinik örneklerden en sık izole edilen serogruptur. *L.pneumophila* serogrup 2-14 nadir de olsa hastalığa neden olmaktadır. Bu çalışmada amaç, *L.pneumophila*'nın sık görüldüğü turistik bölgelerde serogrup 2-14 varlığını araştırmaktır. Toplam 23 izolatın; %30,4'ü SG-3, %26,1'i SG-6, %7,7'si SG-8, %4,3'ü SG-10, %4,3'ü SG-11 ve %7,7'si SG-13 şeklinde serogruplandırılmıştır. *Legionella* kültürü, rutin klinik mikrobiyoloji hizmeti veren laboratuvarlarda yapılamamaktadır. Bunun yerine idrarda antijen aranmaktadır. İdrarda belirlenen antijen *L.pneumophila* serogrup 1'i yansıttığı için, diğer serogrupların meydana getirdiği hastalıkların belirlenmesinde yetersizdir.

Anahtar Sözcük: *Legionella pneumophila*, serogrup

SUMMARY

Legionella pneumophila is the most frequently isolated species from legionellosis. There are 15 serogroups of *L.pneumophila*. *L.pneumophila* serogroup 1 was most frequently isolated serogroup from the clinical cases. *L.pneumophila* serogroups 2-14 may rarely lead to legionellosis. The aim of this study was to investigate the *L.pneumophila* serogroups 2-14 in touristic region where the incidence of legionellosis is to be high. Totally, 23 *L.pneumophila* serogroups 2-14 were isolated, of those SG-3, SG-6, SG-8, SG-10, SG-11 and SG-13 was %30.4, %26.1, %7.7, %4.3, %4.3, and %7.7, respectively. *Legionella* culture could not be performed by routine clinical laboratories. Instead, urinary antigen detection tests are preferred. Urinary antigen test is not reliable to detect *L.pneumophila* serogroups other than 1.

Key Words: *Legionella pneumophila*, serogroup

GİRİŞ

Legionella türleri doğada ve su kaynaklarında bulunmaktadırlar (1). Su sistemlerinden insana aerosolizasyon veya aspirasyon yolu ile bulaşmakta ve pnömöniye neden olmaktadır (2). Doğada oldukça yaygın olarak bulunan, ancak laboratuvar ortamında üretilmeleri için özel şartlar gereken bu bakterinin 48 türü tanımlanmış ve bu türlerin yaklaşık 20 kadarının insanlarda hastalık yapabileceği yeteneğinde olduğu kanıtlanmıştır (1). Ancak klinikte en sık enfeksiyona neden olan tür *L.pneumophila*'dır

ve olguların %80-85'inden sorumlu olduğu bilinmektedir. *L.pneumophila* serogrup 1 (SG-1) diğer serogruplara göre daha fazla hastalık yapmaktadır (3). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, 2-14 arası serogruplarında hastalığa neden olabileceğini göstermektedir.

Ülkemizde toplum kaynaklı lejyoner hastalığı daha çok seyahat ilişkili vakalar olarak ortaya çıkmaktadır. Turizm sektöründe, hastalığın yayılmasının engellenmesi için bazı organizasyonlar yapılmaktadır (4, 5). Avrupa ülkeleri için bir ha-

berleşme ağı kurulmuş olup, ülkemiz de bu ağ içinde yer almaktadır (5). Turizmin önemli bir kaynak olduğu Ege Bölgesinde oldukça fazla sayıda turistik tesis bulunmaktadır. Bölgemizdeki tesisler Sağlık Bakanlığı adına il Sağlık Müdürlükleri ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı adına da İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü tarafından *Legionella* kolonizasyonu açısından isteğe bağlı olarak ya da vaka bildirimleri olması durumunda zorunlu olarak taranmaktadır.

Yapılan bu çalışmada, Ege bölgesindeki turistik tesislerin su sistemlerinden izole edilen *Legionella pneumophila* serogrup 2-14 izolatlarının direkt flöresan antikor (DFA) yöntemiyle serogrup tayini yapılarak bölgesel bir serogrup dağılımı çıkarılması hedeflenmiştir

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Örnekler. Bu çalışmada Ege bölgesindeki çeşitli turistik tesislerin su sistemlerinden alınan su örneklerinden İzmir Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nde üretilmiş olan *Legionella* izolatları incelemeye alınmıştır. Bu *L.pneumophila* izolatlarından serogrubu lateks aglutinasyon yöntemiyle 2-14 olarak bulunan izolatlar çalışmadaki örnek grubumuzu teşkil etmiştir. Bu grupta duş başlıkları, sıcak ve soğuksu muslukları ve soğutma kulelerinden üretilmiş toplam 23 izolat bulunmaktadır.

Besiyerleri. Su örneklerinin izole edilen ve %15 Gliserollü Triptik Soya Broth besiyerinde -80°C de saklamaya alınan izolatların canlandırılması için BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract agar) besiyerleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan besiyerleri Refik Saydam İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü'nde hazırlanmıştır.

Bir litre besiyeri için 12,5 gr CYE agar bazı 450 ml distile suya konularak içerik çözülünceye kadar kaynatılmış ve 121°C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50-55°C'ye kadar soğutulan besiyerine ve aseptik şartlarda BCYE growth suplemanı (SR110A) ve selective suplemanı (SR118B)'eklenerek karıştırılmıştır. BCYE growth suplemanı (SR110A)

50 ml steril distile suda, selective suplemanı (SR118B) 10 ml steril distile suda çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyeri steril Petri kaplarına dökülerek donmaya bırakılmıştır.

Besiyerinde ACES buffer, pH değişikliklerine çok duyarlı olan *Legionella*' lar için besiyerini gerekli pH aralığında (6,95±0,02) tutmak amacıyla kullanılmaktadır. Aktif kömür ise bakteri üremesi ve ışığa maruz kalma sonucunda oluşan toksik oksijen radikallerinin nötralize edilmesinde görev almaktadır.

L. pneumophila 2-14 suşlarının canlandırılması.

Ege bölgesinin değişik noktalarından alınmış su örneklerinde İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsünde üretilmiş ve polivalan *L. pneumophila* SG 2-14 serumları ile test edilip serogrup 2-14 olarak belirlendikten sonra -80°C de %15 gliserollü triptik soya broth içerisinde saklamaya alınan suşlar dondurucudan çıkarılarak çözümleri beklendikten sonra bir öze dolusu alınarak BCYE α agar pasajlanmıştır. Nemli atmosferde 35°C de üreme durumlarına göre 24-48 saat inkube edilerek canlandırılıp çoğaltılmışlardır.

Lateks aglutinasyon testi (Oxoid,UK). Bu test için BCYE α agarda çoğalan (24-48 saatlik) kültürler kullanılmıştır. Test yapılmadan önce testin çalışıp çalışmadığı pozitif kontrol ve negatif kontrol süspansiyonları ile denenmiştir. Test kısaca şu şekilde yapılmıştır; lateks test ayrıcaları oda sıcaklığına getirilir ve lateks süspansiyonları çalkalama ile homojenize edilir; her lateks ayrıcandan reaksiyon kartındaki dairelerin kenarlarına birer damla konulur; her daireye birer damla süspansiyon tamponundan konulur. Lateks ayrıcacı ve süspansiyon tamponu birbirine karıştırılmamalıdır; BCYE α agarda çoğalan kolonilerden bir öze yardımı ile bir tanesi alınarak tamponda dikkatlice emülsifiye edilir; lateks ayrıcacı ve bakteri süspansiyonu dikkatlice karıştırılarak bütün reaksiyon alanına yayılır; reaksiyon kartı yavaşça dairesel hareketlerle sallanır ve aglutinasyon olup olmadığına bakılır. Aglutinasyon varlığı çıplak gözle tayin edilir, herhangi bir büyüteç kullanılmaz.

Direkt flüoresan antikor (DFA) yöntemi. Kültürel doğrulamaları yapılan ve Lateks aglütinasyon testi sonucu pozitif bulunan *Legionella*'lar Direkt Floresan Antikor reaktifleri kullanılarak DFA yöntemi ile serogrup 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 düzeyinde tiplendirme yapılmıştır. Test kısaca şu şekilde yapılmıştır: BCYE α agar da canlandırılıp çoğaltılan kültürlerden alınan bir öze dolusu hücre, içerisinde 5 ml distile su bulunan tüpün içine transfer edilir ve distile suda iyice homojenize edilir; distile suda homojenize edilen süspansiyondan teflon kaplı lamaların üzerindeki her bir çukura mikropipet yardımıyla 0,1 (10 μ) mililitre konur. (*L. pneumophila* serogrup 2-14 düzeyinde tiplendirme yapmak amacıyla 1 örnek için 2 tane teflon kaplı lam kullanılmaktadır. Birinci teflon kaplı lamda 10 adet çukur, ikinci teflon kaplı lamda bir tanesi kontrol amaçlı kullanılmak üzere 5 adet çukur bulunmaktadır.); teflon kaplı lamlardaki her bir çukura yerleştirilen örnek daha sonra oda sıcaklığında ışığa maruz kalmadan kurumaya bırakılır; Kuruduktan sonra sonra ısıyla fikse edilir; Fiksasyonun ardından serogrup 2-14 ticari kitleri (M-Tech USA) iyice vortekslendikten sonra numara sırasıyla her biri teflon kaplı lamaların üzerindeki bir çukura denk gelecek şekilde ilave edilir; Hazırlanan lamalar, nemli ortam sağlanarak etüvde 30 dakika bekletilir; etüvden çıkarıldıktan sonra PBS ile hafifçe yıkanır; örnekler PBS ile dolu kaplara daldırılır ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir; Distile su ile yıkanır ve havada kurumaya bırakılır; son işlem olarak Mounting Medium kullanılarak üzerine lameller kapatılarak flüoresan mikroskopunda incelenir. Her bir daire 40x objektif ile bütün yüzeyi incelenir. *Legionella* hücreleri küçük kokobasil formunda yeşil (elma yeşili) floresans özelliği gösterir. Pozitif sonuç, bakteriler yoğun yeşil floresans ve *Legionella* için tipik morfoloji gösterirler. Hangi serogruba ait gode de yoğun floresans görülürse *L.pneumophila* serogrubu buna göre saptanır. Negatif sonuçta ise, bakteriler yoğun floresans göstermezler.

BULGULAR

Bu çalışmada Ege bölgesindeki çeşitli turistik otellerin su sistemlerinden izole edilen *L.pneumophila* SG 2-14 izolatlarının DFA ile serogrup tayini yapılmıştır. Bölgemiz çeşitli illerindeki tesislerin değişik noktalarından alınan su örneklerinden izole edilen ve lateks aglütinasyon (polivalan) metodu ile SG 2-14 olarak tespit edilen bu *Legionella pneumophila* izolatlarından toplam 23 örnek seçilmiştir (Tablo1).

Tablo 1. İncelenen turistik otellerde numunenin alındığı yerin, illere ve alınan örnek sayılarına göre dağılımı

ALINAN YER	Sayı (%)			
	İzmir (n) (%)	Aydın (n) (%)	Muğla (n) (%)	Bodrum (n) (%)
Lavabo	2/2 (100.0)	-	-	-
Duş başlığı	6/7 (85.7)	-	1/7 (14.3)	-
Termal sıcak su	2/4 (50.0)	-	2/4 (50.0)	-
Oda muslukları	2/5 (40.0)	1/5	-	2/5 (40.0)
Soğutma kulesi	3/4 (75.0)	1/4 (25.0)	-	-
Jakuzi	1/1 (100.0)	-	-	-
TOPLAM	16/23(69.6)	2/23 (8.7)	3/23(13.0)	2/23 (8.7)

Toplam 23 izolatin, %8,7'si lavabo, %30,4'ü duş başlığı, %17,4'ü termal sıcak su, %21,7'si oda muslukları, %17,4'ü soğutma kulesi ve %4,3'ü jakuzi örneğinden üretilmiş örneklerdir.

Tablo 2. Çalışmadan izole edilen *L. pneumophila* izolatlarının serogruplara ve illere göre dağılımı

Serogrup	Sayı (%)			
	İzmir (n) (%)	Aydın (n) (%)	Muğla (n) (%)	Bodrum (n) (%)
SG-3	7/7 (100.0)	-	-	-
SG-6	2/6 (33.3)	-	2/6 (33.3)	2/6 (33.3)
SG-8	3/3 (100.0)	-	2/4 (50.0)	-
SG-10	1/1 (100.0)	-	-	-
SG-11	1/3 (33.3)	2/3 (66.7)	-	-
SG-13	3/3 (100.0)	-	-	-
TOPLAM	16/23(69.6)	2/23 (8.7)	3/23(13.0)	2/23 (8.7)

Toplam 23 izolatin; %30,4'ü SG-3, %26,1'i SG-6, %7,7'si SG-8, %4,3'ü SG-10, %4,3'ü SG-11 ve %7,7'si SG-13 şeklinde serogruplandırılmıştır (Tablo 2).

TARTIŞMA

Kırk sekiz adet *Legionella* türü bulunmaktadır. Yaklaşık yarısı insanda hastalık meydana getirme özelliğine sahiptir. *Legionella* türlerinden bir tanesi olan *L.pneumophila* legionellosis olguların yaklaşık %90'ında, meydana gelen hastalıklardan sorumludur. *L.pneumophila*'nın 15 serogrubu bulunmaktadır. Olguların %79'undan serogrup 1 izole edilmiştir (1). Ancak bütün *L.pneumophila* serogruplarının pnömoniye neden oldukları gösterilmiştir (6). Nispeten serogrup 3, 4 ve 6'nın serogrup 1 haricinde diğer serogruplardan daha fazla hastalık etkeni olarak izole edildiği bildirilmektedir (1). Örneğin serogrup 13 oldukça nadirdir, 508 olgunun sadece 2'sinden (%0,4) izole edilmiştir (7). Nadir görülen serogruplar özellikle immün yetmezliği olan hastalarda sorun oluşturmaktadır.

Legionella bakterileri nazlı üreyen bakteriler arasında yer almaktadır. Rutin hizmet veren klinik laboratuvarlarda *L.pneumophila* kültürü genellikle yapılmamaktadır. Bu nedenle, kültür sonucu, "üreme olmadı" şeklinde verilmektedir. Son yıllarda, yaygın olarak legionellosis teşhisi için idrarda antijen araştırılmaktadır. Bu nedenle *L.pneumophila* serogrup 1'in neden olduğu hastalık %0'dan %69-70 civarına yükselmiştir (7). Diğer taraftan, serogrup 1 haricindekilerin teşhisi ise %38'den %4'de gerilemiştir. İdrar antijen testi, serogrup 1 haricinde ki *L.pneumophila* serogruplarının belirlenmesinde yetersiz kalmıştır. Hastalığın teşhisinde direkt flöresan antikor testi gün geçtikçe daha sık kullanılmaktadır.

Ülkemizde, klinik mikrobiyoloji hizmeti veren bir çok laboratuvarında *Legionella* kültürü yapılmaktadır. Genellikle idrarda antijen arama testi tercih edilmiştir. *L.pneumophil* serogruplarının 1 haricinde yaygınlığı bilinmemektedir. Çalışmamız bu anlamda önem kazanmaktadır. Çalışmamızda; elimizde bulunan çeşitli serogruplara ait *L.pneumophila* bakteri suşlarından gerçekleştirdiğimiz DFA tiplendirme çalışmaları sonucunda; 3 tanesi SG-13, 7 tanesi SG-3, 6 tanesi SG-6, 1 tanesi SG-10, 3 tanesi SG-11, 3 tanesi SG-8 olarak

identifiye edilmiştir. *L.pneumophila* serogruplarının Ege bölgesindeki çeşitli illere göre dağılımını incelediğimizde; SG-3'ün sadece İzmir'deki otellerde, SG-6'nın İzmir, Muğla ve Bodrum'daki otellerde, SG-8'in İzmir'deki otellerde, SG-11'in İzmir ve Aydın'daki otellerde ve SG-13'ün sadece İzmir'deki otellerde bulunduğu görülmektedir. Turizme hizmet veren bu bölgelerde legionellosis hastalığı araştırılırken (5), serogrup 1 haricinde diğer *L.pneumophila* serogruplarının da yaygın olduğunun bilinmesi önem taşımaktadır.

Su örneklerinden bakterinin izolasyon oranları her araştırmada değişiklikler gösterir (8). Bunun seçilen binaların özelliği, su sisteminin yapısı ve suyun organik içeriğinden coğrafi faktörlere kadar pek çok nedeni vardır (9). Öncelikle bina su sistemlerinin hangi sıklıkta *Legionella*'lar ile kolonize olduğu sorularına yanıt vermek gerekirse dünyanın farklı bölgelerinde yapılan araştırmalarda incelenen binalarda bu oranın %50-55 olduğu görülmektedir. Refik Saydam Hıfızsıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal *Legionella* Laboratuvarında gerçekleştirilen daha önceki benzer bir çalışmada *L.pneumophila*'ya rastlanma sıklığının % 61 olduğu göz önüne alındığında (10); bina kolonizasyon oranlarının mevsimsel koşullarda coğrafi bölgelere, incelemeye alınan binaların fiziksel özelliklerinden kontrol önlemlerinin uygulanmakta olup olmadığına kadar sayılabilecek pek çok faktörün etkisinde değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (11).

İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında etkenin izolasyonundaki güçlükler araştırmacıları yeni tanı metodlarının geliştirilmesine yöneltmiştir. Uyguladığımız DFA çalışması; birkaç saatte sonuç vermesi ve kolay kullanılabilmesi nedeniyle avantaj sağlamıştır. Ancak dikkat gerektirmektedir. Dikkat edilmezse özgül olmayan sonuçların yanlış değerlendirilmesi ile dezavantaj teşkil etmektedir.

Kaynaklar

- 1.Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002;15:506-26.
- 2.Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, et al. Legionella infection risk from domestic hot water. Emerg Infect

- Dis 2004;10:457-64.
3. Borella P, Montagna MT, Stampi S, et al. Legionella contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:5805-13.
4. Ricketts KD, Joseph CA. The distribution of travel-associated Legionnaires' disease within selected European countries, and a comparison with tourist patterns. *Epidemiol Infect* 2006;134:887-93.
5. Ricketts KD, McNaught B, Joseph CA. Travel-associated legionnaires' disease in Europe: 2004. *Euro Surveill* 2006;11:107-10.
6. Lindquist DS, Nygaard G, Thacker WL, et al. Thirteenth serogroup of *Legionella pneumophila* isolated from patients with pneumonia. *J Clin Microbiol* 1988;26:586-7.
7. Faris B, Faris C, Schousboe M, et al. Legionellosis from *Legionella pneumophila* serogroup 13. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1405-9.
8. Costa J, Tiago I, da Costa MS, et al. Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:663-71.
9. Rosmini F, Castellani-Pastoris M, Mazzotti MF, et al. Febrile illness in successive cohorts of tourists at a hotel on the Italian Adriatic coast: evidence for a persistent focus of *Legionella* infection. *Am J Epidemiol* 1984;119:124-34.
10. Akbas E, Dalkilinc I, Gozalan A, et al. Otel su sistemlerinde *Legionella* spp.: Ege ve Akdeniz bölgelerinde bir çalışma [*Legionella* spp in hotel's water system: a study at Aegean and Medeterinian Region]. *Flora* 1999;4:258-66.
11. Atlas RM. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* 1999;1:283-93.