



© Filiz Orak,
© Ekrem Kireççi,
© Yavuz Orak,
© Kezban Tülay Yalçinkaya,
© Hafize Öksüz

Bir Üniversite Hastanesinde Farklı Bölümlerde *Legionella* ve Diğer Patojen Mikroorganizmaların Araştırılması: Prospektif Çalışma

Investigation of *Legionella* and Other Pathogenic Microorganisms in Different Departments of a University Hospital: A Prospective Study

Geliş Tarihi/Received : 03.01.2022
Kabul Tarihi/Accepted : 23.05.2022

©Telif Hakkı 2022 Türk Yoğun Bakım Derneği
Türk Yoğun Bakım Dergisi, Galenos Yayınevi
tarafından yayınlanmıştır.

Filiz Orak, Ekrem Kireççi, Kezban Tülay Yalçinkaya
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Kahramanmaraş, Türkiye

Yavuz Orak, Hafize Öksüz
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim
Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

Dr. Öğr. Üyesi Filiz Orak (✉),
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Kahramanmaraş, Türkiye

E-posta : drfilizorak@hotmail.com

Tel. : +90 344 300 33 92

ORCID ID : orcid.org/0000-0001-5153-7391

ÖZ Amaç: Bu çalışmada, 25 Temmuz 2019-1 Kasım 2019 tarihleri arasında üçüncü basamak sağlık hizmeti sunan bir hastanenin farklı birimlerinden alınan sürüntü örneklerinde *Legionella* spp. ve diğer patojen mikroorganizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hastanenin laboratuvar, ameliyathane ve farklı yoğun bakım ünitelerinde bulunan mekanik ventilatör, klima filtrelerinin su çıkış noktaları ve lavabo musluklarından 92 sürüntü örneği alındı. Tüm örnekler santrifüjlenerek doğrudan *Legionella* için seçici bir besiyeri olan buffered charcoal-yeast extract agara ve diğer konvansiyonel besiyerlerine inoküle edildi. Kültür ve serolojik testler ile *Legionella* pozitif olan 6 örnek rastgele seçilerek tür düzeyinde tanımlama için 16S rRNA dizi analizi yapıldı.

Bulgular: Kültürlerin 24'ünde (%26,08) *Legionella* spp. kolonisi ile uyumlu üreme gözlemlendi. Serogrubu belirlenen 6 örnekten sadece üçü moleküler tanımlama ile doğrulandı. Bunların ikisi *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* diğeri *Legionella anisa* olarak tanımlandı. Mekanik ventilatörlerin filtrelerinden *Penicillium* spp., *Aspergillus flavus*, *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morganii*, *Moraxella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ve bir musluk örneğinden *Escherichia coli* izole edildi.

Sonuç: Yüksek riskli hastaların *Legionella* spp. ile potansiyel maruziyeti, örneklem sıklığının artırılması ve etkili kontrol önlemleri ile ortadan kaldırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *Legionella* spp., patojen, identifikasyon, 16S rRNA

ABSTRACT Objective: In this study, it was aimed to investigate *Legionella* spp. and other pathogenic microorganisms in swab samples taken from different units of a tertiary healthcare hospital between July 25, 2019 and November 1, 2019.

Materials and Methods: Ninety-two swab samples were taken from the mechanical ventilator, air conditioner filters, water outlets, and sink faucets in the laboratory, operating room and different intensive care units of the hospital. All samples were centrifuged and inoculated directly onto buffered coal yeast extract agar, a medium selective for *Legionella* and other conventional media. 16S rRNA sequence analysis was performed for identification at the species level by randomly selecting 6 samples that were positive for *Legionella* by culture and serological tests.

Results: Growth compatible with *Legionella* spp. colonies was observed in 24 (26.08%) cultures. Only three of the 6 serogrouped samples were confirmed by molecular identification. Two of these were identified as *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* and the other as *Legionella anisa*. *Penicillium* spp., *Aspergillus flavus*, *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morganii*, *Moraxella* spp., and *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from the filters of mechanical ventilators and *Escherichia coli* from a tap sample.

Conclusion: Potential *Legionella* spp. exposure in high-risk patients should be eliminated with increased sampling frequency and effective control measures.

Keywords: *Legionella* spp., pathogen, identification, 16S rRNA

Giriş

Legionella cinsi bakteriler, kapsülsüz, sporsuz ve aerobik üreme özelliğinde olan Gram-negatif kokobasillerdir. Bu cins içerisinde, 50 tür ve bu türlere ait 70 farklı serogrup bulunmaktadır (1). Birçok *Legionella* türünün insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu enfeksiyonlardan Lejyoner hastalığı, hem hastane kaynaklı hem de toplum kökenli bir halk sağlığı sorunudur. Özellikle toplum kökenli hastalığı olanlar için olgu ölüm oranları %20 civarındayken, sağlık hizmeti ile ilişkili Lejyoner hastalığı olanlar için olgu ölüm oranları %38-53'e kadar yükselmektedir (2).

Lejyoner hastalığına, *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) türünün alt serogruplarının neden olduğu belirlenmiştir (1,3). *Legionella* türleri, akuatik özellikleri ile göller, nehirler, termal sular gibi sıcak ve soğuk su kaynakları bulunan doğal alanlarda yaşayabilen saprofit mikroorganizmalardır. Habitatları çoğunlukla su olup, bu alanlarda yaşayan amip ve mavi-yeşil alglerde hücre içi paraziti olarak çoğalırlar. Bu bakteriler hastanelerde su ve soğutma sistemlerine, özellikle de musluk, duş başlıkları, ameliyathane ve yoğun bakımlarda mekanik ventilatör ve soğutma sistemleri gibi üremeye elverişli alanlara yerleşerek biyofilm tabakaları içerisinde çoğalabilmektedir (4,5). Patojen *Legionella* türleri, içerisinde bulundukları su ortamlarından, klimalar, musluk ve duş başlıkları, çeşitli tıbbi malzemelerden aerosol yol ile insanlara bulaşarak hastane kaynaklı solunum yolu hastalıklarına yol açabilmektedirler (3). Hastanelerde su kaynaklarının %12-75'inin *Legionella* ile kontamine olduğu belirlenmiştir (6).

Legionella spp. enfeksiyonları ile mücadelede ve özellikle yaz aylarında, hastane ortamında yer alan ve bu bakteri ile kontamine olabilen su depoları, musluklar, duş başlıkları, mekanik ventilatörlerin filtre üniteleri hem mekanik olarak hem de çeşitli dezenfektanlarla (iodoforlar, amonyum bileşikler, glutaraldehit, formalin) periyodik aralıklarla temizlenmelidir (7).

Bu çalışma ile üçüncü basamak bir sağlık hizmeti sunan bir hastanenin farklı birimlerinden alınan sürüntü örneklerinde *Legionella* türleri ile diğer patojen mikroorganizmaların izolasyonu ve identifikasyonu amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada 25 Temmuz 2019-1 Kasım 2019 tarihleri arasında, üçüncü basamak ayaktan ve yataklı teşhis, tedavi ve rehabilitasyon hizmeti sunan bir hastanenin,

ameliyathane, anesteziyoloji ve reanimasyon yoğun bakım (ARYÜ) ve öğretim üyeleri odaları (ÖÜO), beyin cerrahi yoğun bakım, dahiliye yoğun bakım ünitesi, göğüs hastalıkları ve nöroloji yoğun bakım üniteleri ve mikrobiyoloji laboratuvarı birimlerinin el yıkama muslukları ve mekanik ventilatörlerin filtre su çıkış noktaları ile merkezi laboratuvarlara ait kullanım musluklarından toplam 92 örnek alınmıştır.

Etik Kurul Onayı ve Kurum İzni

Çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 17.07.2019 tarihli oturumda, karar no: 11 ile onaylanmış ve hastane başhekimliğinden çalışma izni alınmıştır.

Örneklerin Alınması

Ameliyathane ve yoğun bakımlarda bulunan mekanik ventilatör, klima filtrelerinin varsa su çıkış noktalarıyla, lavabo musluklarından 100 mL'lik steril numune şişelerine 100 mL su örneği alınmıştır. Toplanan örnekler önceden steril hale getirilmiş burgu kapaklı cam tüplere konulmuştur. Klima filtrelerinden alınan sürüntü örnekleri ise, steril eküvyon çubuk distile su ile ıslatıldıktan sonra klimanın hava çıkış filtresine çepeçevre sürülerek alınmış ve steril burgu kapaklı cam tüplere konulmuştur. Tüm örnekler tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına yarım saat içinde gönderilmiştir. Hastane suyu soğuk su için, üst limiti 17 °C iken, sıcak su yaz aylarında 40-42 °C, kış aylarında >45 °C ve pH 7,8 civarında değerlendirilmiştir.

Legionella Cinsi Bakterilerin İzolasyon ve Identifikasyonu

Toplanan su örnekleri santrifüjlendikten sonra *Legionella* cinsi bakterilerin izolasyonu için 0,1 mL özel besiyeri olan buffered charcoal yeast extract (BCYE) (OXOID CM 655, İngiltere) besiyerine ekim yapılmıştır. BCYE agar, tamponlu kömür maya ekstraktı ve L-sistein içeren seçici bir besiyeridir. Besiyerleri ilk izolasyonda %5 oranında CO₂ içeren nemli etüv ortamında ve 37 °C'de 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. BCYE agardaki kültürlerin ilk 24-72 saatte günlük incelemeleri yapılarak üreme durumu kaydedilmiştir. Kültürde yüzeyleri düzgün, hafif bombeli, gri-beyaz veya mavi buzlu-cam görünümü veren koloniler "*muhtemel Legionella kolonileri*" olarak değerlendirilerek Gram boyaması ile mikroskopik morfolojisi incelenmiştir. Gram-negatif ince basil şeklinde olan bakterilere ait kolonilerin BCYE agara pasajları yapılarak üreyen kolonilere katalaz ve oksidaz testleri uygulanmıştır. Gram-negatif, katalaz pozitif ve oksidaz negatif olan *Legionella* spp. kolonileri, *Legionella* lateks aglütinasyon

testi (Oxoid, DR0800, İngiltere) ile tiplendirilmiştir (8,9). Teste göre; *L. pneumophila* serogrup 1, *L. pneumophila* serogrup 2-14 ve tiplendirilemeyen diğer serogruplar *Legionella* spp. olarak değerlendirilmiştir.

Legionella cinsi bakteriler dışında diğer mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyonu için; her bir örnek patojen bakteri izolasyonu amacı ile %5 koyun kanlı agar (BD, ABD) ve eosin methylene blue agara (BD, ABD) ekimleri yapılmıştır. Besiyerleri 37 °C'de 48 saat süre ile aerobik şartlarda inkübe edilmiştir. Maya ve küf türü mantarların üremesi için Sabouraud %4 glukoz içeren agar (Merck millipore, Almanya) kullanılmıştır. Kültür ortamında üreyen bakterilere ait koloniler; Gram boyama, biyokimyasal testler ve BD Phoenix 100 (BD, ABD) identifikasyon sistemleri ile tanımlanmıştır.

16S rRNA Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PZR) Amplifikasyonu

Legionella spp. izole edilmiş kültürlerden 6 tanesi seçilerek tür düzeyinde tanımlama için moleküler analiz yapılmıştır.

DNA ekstraksiyonu daha önce tarif edildiği gibi single cell lysing buffer (SCLB) yöntemi kullanılarak yapılmıştır (10). 1 mL tris-EDTA buffer (pH 7,4) ve 10 µL 5 mg/mL proteinaz K kullanılarak stok SCLB solüsyonu hazırlanmıştır. Katı besiyerinden iğne öze ile alınan bakteri 40 µL SCLB solüsyonunda homojenize edildikten sonra ısı döngü cihazında 80 °C ve 55 °C'de 10'ar dakika bekletilmiştir. Daha sonra 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek ve süpernatant çalışmada DNA olarak kullanılmıştır. DNA örnekleri çalışma gününe kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Toplam hacim 20 µL olacak şekilde; 0,15 µL Taq DNA polimeraz (Solis HOT FIREPol 5 U/µL, Estonya); 0,2 µL dNTP (20 mM); 1,2 µL MgCl₂ (25 mM); 10,65 µL deiyonize distile su 0,4 µL primer (10 mM), 2 µL 10x buffer 1 ve 5 µL template DNA'dan oluşan karışım hazırlanmıştır. Amplifikasyon programı 95 °C'de 3 dakikadan sonra 40 siklus 95 °C'de 30 saniye, 56 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika; ardından 72 °C'de 7 dakika olarak uygulanmıştır. PZR ürünleri %2 agaroz (Vivantis, Malezya) içeren jel elektroforezinde değerlendirilmiştir. Hem amplifikasyon hem de nükleotid dizi analizinde evrensel primerler olan 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) ve 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) primerleri kullanılmıştır (11). Amplifiye edilmiş ürünler (yaklaşık 1,4 kb), %2 agaroz (Vivantis, Malezya) jel elektroforezi ile çözülmüş ve bir ultraviyole (UV) transillüminatör (UVP EC3 Chemi HR 410 Bioimaging System, Cambridge, UK) altında görüntülenmiştir.

16S rRNA Dizi Analizi

PZR ürünleri, cleanup kit (CleanSEQ, Beckman Coulter, ABD) kullanılarak saflaştırılmış ve üretici talimatları izlenerek big dye direct cycle sequencing kit kullanılarak, Sanger yöntemi (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ile nükleotid dizi analizi yapılmıştır. Sanger yöntemi ile belirlenen nükleotid dizileri BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı yardımıyla analiz edilmiştir.

Filogenetik Küme Analizi

Nükleotid dizileri BLAST sonuçlarında ≥%98 sorgu kapsamı üzerinde ≥%99 dizi benzerliği ve ilk en yüksek isabet ile ikinci en yüksek isabet arasında ≥%0,8 dizi farklılığına göre tanımlama yapılmıştır (12). Dizi analizi Sequencher 4.5.6 programı (AnnArbor, ABD, <https://www.genecodes.com/>) kullanılarak yapılmıştır.

Bulgular

Hastanenin yoğun bakım ünitelerinde bulunan mekanik ventilatörlerin filtre su çıkış noktalarından 31 ve lavabo musluklarından 61 olmak üzere toplam 92 sürüntü örneği alınmıştır. Kültürlerin 24'ünde (%26,08) *Legionella* spp. koloni morfolojisi ile uyumlu üreme gözlenmiştir. *Legionella* türlerinin tamamına yakını (23/24) musluklardan izole edilirken sadece bir örnek (1/31) mekanik ventilatör filtre su çıkış noktasından izole edilmiştir. Kültürden izole edilen diğer bakteri ve küf mantarları Tablo 1'de gösterilmiştir. BCYE agarda üreme saptanan *Legionella* spp. kolonileri için lateks aglütinasyon testi yapılmıştır (Şekil 1). Buna göre ameliyathane musluklarından alınan 24 örneğin 19'unda (%79,1) *L. pneumophila* tespit edilmiştir. Bunların 6'sı (%31,5) serogrup 1; 4'ü (%21) serogrup 2-14 ve 9'u (%47,3) diğer serogrup olarak tanımlanmıştır. ARYÜ mekanik ventilatörlerinden alınan 8 örnekten 1'inde (%12,5) ve ÖÜO'nun lavabo musluklarından alınan 14 örnekten 1'inde (%7,1) diğer serogrup ve mikrobiyoloji laboratuvarı musluklarından alınan 23 örnekten 2'sinde (%8,6) serogrup 2-14 ve 1 (%4,3) tanesinde serogrup 1 saptanmıştır (Şekil 1).

16S rRNA Filogenetik Analizi

Nükleotid dizileri belirlenen altı örneğin üçü (4,5,7) BLAST veri tabanında *Legionella* spp. olarak tanımlanmıştır (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). İki örnek *Acidovorax temperans*, bir örnek *Boseaeneae*, bir örnek ise *Sphingobium yanoikuyae* olarak saptanmıştır (Şekil 2). Çalışmada izole edilen 4, 5 ve 7

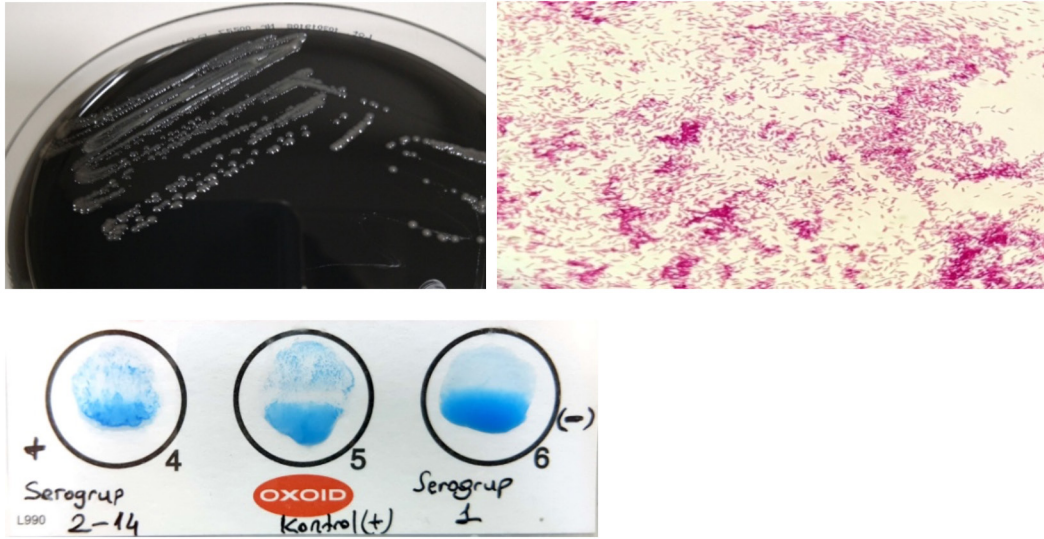
Tablo 1. Kliniklere göre izole edilen mikroorganizmaların ve *Legionella* serogruplarının dağılımı

Örnek no	Kaynak	Toplam örnek sayısı	İzole edilen mikroorganizma	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella</i> serogrupları		
				İzolasyon sayısı	Serogrup 1	Serogrup 2-14	Diğer serogrup
1	Ameliyathane mekanik ventilatör filtresi	15					
1 ^{1, 8, 9, 10, 11, 12, 13}			<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-	-
1 ³			<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-	-
1 ⁴			<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-
1 ⁵			<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-	-
1 ⁷			<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Moraxella</i> spp.	-	-	-	-
1 ^{2, 6, 14}			-	-	-	-	-
2	Ameliyathane lavabo muslukları	24		-	-	-	-
2 ^{1, 2, 3, 9, 18}			-	5	+	-	-
2 ⁴			<i>Bacillus</i> spp.	-	-	-	-
2 ⁵			-	1	-	+	-
2 ⁶			-	1	-	-	+
2 ⁷			-	1	-	-	+
2 ⁸			<i>Bacillus</i> spp.	1	-	-	+
2 ⁹			-	1	+	-	-
2 ¹⁰			<i>Bacillus</i> spp.	1	-	-	+
2 ^{11, 14, 16, 21, 22, 24}			-	3	-	-	+
2 ^{12, 13}			-	2	-	-	+
2 ^{15, 19, 20}			-	3	-	+	-
3	ARYÜ mekanik ventilatör filtresi	8					-
3 ^{1, 6, 8}			<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-
3 ²			<i>A. baumannii</i> + <i>K. oxytoca</i> + <i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-
3 ^{3, 4}			<i>A. baumannii</i> + <i>M. morgani</i>	-	-	-	-
3 ⁵			<i>P. aeruginosa</i>	1	-	-	+
4	DYBÜ mekanik ventilatör filtresi	3		-	-	-	-
4 ^{1, 2}			-	-	-	-	-
4 ³			<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-
5	Göğüs/nöroloji YBÜ mekanik ventilatör filtresi	2	-	-	-	-	-
5 ¹			-	-	-	-	-
5 ²			<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-

Tablo 1. Devamı

Örnek no	Kaynak	Toplam örnek sayısı	İzole edilen mikroorganizma	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella</i> serogrupları		
				İzolasyon sayısı	Serogrup 1	Serogrup 2-14	Diğer serogrup
6	BCYBÜ mekanik ventilatör filtresi	3	-	-	-	-	-
6 ^{1, 2, 3}			<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-
7	Mikrobiyoloji laboratuvarı muslukları	23	-	-	-	-	-
7 ^{1, 4, 5}			-	-	-	-	-
7 ²			-	1	-	+	-
7 ^{3, 23}			-	2	-	+	-
7 ⁹			<i>E. coli</i>	-	-	-	-
7 ^{17, 19, 20, 21, 22}			-	-	-	-	-
8	AR öğretim üyeleri odaları lavabo muslukları	14	-	-	-	-	-
8 ^{1, 2, 3, 5-14}			-	-	-	-	-
8 ⁴			-	1	-	-	+

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi, ARYÜ: anesteziyoloji ve reanimasyon yoğun bakım ünitesi, DYBÜ: dahiliye yoğun bakım ünitesi, BCYBÜ: beyin ve sinir cerrahisi yoğun bakım ünitesi

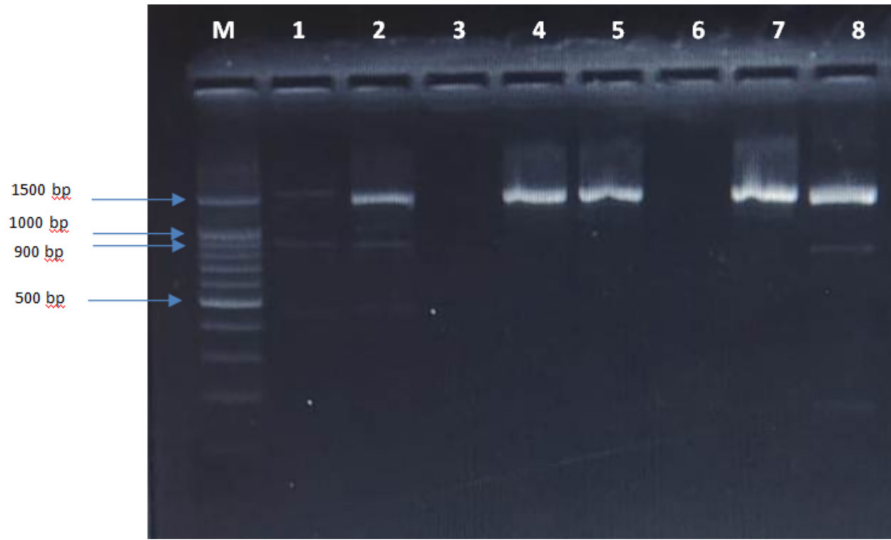


Şekil 1. *Legionella* spp.'nin BCYE agarda koloni görünümü (solda), mikroskop inceleme ile Gram-negatif ince basillerin görünümü (sağda) ve latex aglütinasyon yöntemiyle serogrup tanısı (aşağıdaki görüntü)

BCYE: Buffered charcoal yeast extract

no.lu örnekler ve 16 referans nükleotid dizisi gen bankasından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) indirilerek Sequencher programında hizalanmıştır. Dendrogram MEGA v10 programında (<https://www.megasoftware.net/>)

maximum likelihood yöntemi ile oluşturulmuştur. Programın default parametreleri olan bootstrap filojeni testi, 1000 bootstrap tekrar sayısı, Tamura-Nei modeli kullanılmıştır (13). İki izolatin (4 ve 5) daha önce iyi karakterize edilmiş



Şekil 2. 16S rRNA PZR amplifikasyon ürünleri

PZR ürünleri %2 agaroz jelde yürütüldü. M: Marker (Vivantis 100bp DNA ladder, Malezya), 1 ve 2: *Acidovorax temperans*, 3: *Sphingobium yanoikuyae* 4-5: *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*, 6: *Boseaeneae*, 7: *Legionella anisa*, 8: Pozitif kontrol (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)

PZR: Polimeraz zincirleme reaksiyonu

L. pneumophila Philadelphia 1 ve JCM7571 suşu ile aynı nükleotid dizilerine sahip olduğu ve bir izolatin (7) *L. anisa* olarak ayrı bir dal oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 3).

Gen Bankası Nükleotid Erişim Numaraları

İki *L. pneumophila* ve 1 *L. anisa* izolatinın nükleotid dizisi GenBank veri tabanında KSU-Lpfo, KSU-Lpyo ve KSU-Lafo adı ve OL423538-OL423540 erişim numaraları altında saklanmıştır (Tablo 2).

Tartışma

L. pneumophila ve daha az yaygın olarak diğer *Legionella* türlerinin neden olduğu enfeksiyon çevresel bir kaynaktan yayılarak salgın yapma potansiyeline sahiptir (14). Özellikle mekanik ventilatöre bağlı hastalarda *L. pneumophila*, pnömoni ve diğer solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan

patojenlerden biridir (3). Ayrıca hastanede kalış süresi 1 ile 84 gün arasında değişmekle birlikte ortalama 10,3 güne kadar uzayabilmektedir (14). Çoğu zaman gözden kaçan enfeksiyon etkeninin hem salgına yol açma potansiyeli hem de hastaneye yatış maliyeti göz önünde bulundurularak araştırılması gerektiği görülmektedir. Enfeksiyon ve çevresel kaynak araştırmasının yapıldığı bir çalışmada, mekanik ventilatöre bağlı hastalardan bronş lavaj sıvısı ve hastane musluğu örnekleri alınmıştır. Kültür ve PZR analizlerinde hasta örneklerinin sırasıyla 24 (%8,6) ve 5'inde (%1,8), su kaynaklarının ise 23 (%19,8) ve 8'inde (%6,9) *L. pneumophila* saptanmıştır. Aynı çalışmada tüm pozitif klinik örneklerin ve 14 (%60,8) çevresel örneğin *L. pneumophila* serogrup 1'e ait olduğu gösterilmiştir (15). Ayrıca sigara kullanımı, yaş, yoğun bakımda kalış süresi ve mekanik ventilatör kullanım süresi ile enfeksiyon arasında yakın ilişki bulunmuştur (15). Avrupa'da bildirilen *L. pneumophila*'ya bağlı enfeksiyonların %70'inin *L.*

Tablo 2. *Legionella* spp. izolatlarının tür düzeyinde tanımı ve GenBank erişim numaraları

Örnek no	Örnek yeri	Tür düzeyinde tanımlama	İzolat ismi	GenBank erişim numarası	URL adresi
4 (8 ^a)	DYBÜ mekanik ventilatör filtresi	<i>Legionella pneumophila</i>	KSU-Lpfo	OL423538	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OL423538
5 (2 ^s)	Göğüs/nöroloji YBÜ mekanik ventilatör filtresi	<i>Legionella pneumophila</i>	KSU-Lpyo	OL423539	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OL423539
7 (7 ²)	Mikrobiyoloji laboratuvarı musluğu	<i>Legionella anisa</i>	KSU-Lafo	OL423540	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OL423540

veya PZR ile 17 binanın %42'si ve 26 su örneğinin %20'sinin *Legionella* ile kontamine olduğu görülmüştür. Kültür yöntemi ile dört örnekte ve PZR ile 23 örnekte pozitiflik saptanmıştır. Aynı çalışmada; kültürde *L. pneumophila* ve *L. anisa* türleri izole edilirken, PZR ile *L. micdadei* gibi diğer türler de tanımlanmıştır. En çok izole edilen *L. pneumophila* subgrupları ise 1 ve 4 olmuştur (20). *Legionella* türleri içinde *L. anisa* pontiak ateşine neden olan etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir (20). Çalışmamızda 92 sürüntü kültürünün 24'ünde (%26,08) *Legionella* spp. izole edilmiştir. İzolatların tamamına yakını (23/24) musluklardan elde edilirken, sadece bir örnek (1/31) yoğun bakım ünitesi mekanik ventilatör filtre su çıkış noktasından izole edilmiştir. Ayrıca kültürden izole edilen 6 örnek rastgele seçilerek moleküler tanımlama yöntemi kullanılmıştır. Altı örnekten 2'si *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, 1 örnek *L. anisa* olarak tanımlanmıştır. Diğer 3 örnekte ise *Legionella* dışı akuatik bakteriler saptanmıştır. Mekanik ventilatöre bağlı gelişen pnömonilerde *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Acinetobacter*, *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* yaygın olarak saptanırken, nadiren *Mycoplasma pneumoniae* ve *L. pneumophila* gibi bakteriler de izole edilmektedir (21). Çalışmamızda hem *Legionella* hem de diğer patojen mikroorganizmaların izolasyon sayısını artırmak için filtrasyon yapılmadan, santrifüj ile çöküntü kısmından direkt kültür işlemi uygulanmıştır. Mekanik ventilatörlerin filtrelerinden *Penicillium*, *Aspergillus* tipi küf mantarları ve *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morganii*, *Moraxella* spp. ve *P. aeruginosa* gibi mikroorganizmalar izole edilmiş, bir musluk örneğinde ise *E. coli* saptanmıştır. *Legionella*, kendisi gibi akuatik bir bakteri olan *P. aeruginosa* ile aynı örnekten izole edilirken, diğer bakterilerin izole edildiği sularda tespit edilememiştir. Bu durum diğer mikroorganizmaların üremesi durumunda *Legionella* ekosisteminin bozulması şeklinde yorumlanabilir. Kusnetsov ve ark.'nın (18) su örneklerinin mikrobiyal ve fizikokimyasal kalitesi ile *Legionella* varlığını araştırdıkları çalışmada, heterotropik bakterilerle herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Yine sıcak su sistemlerinin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizlerinin yapıldığı başka bir çalışmada, yeterli klorlama ve düşük demir içeriğinin *Legionella* eradikasyonunda etkili olduğu belirtilmiştir (20). Leoni ve ark.'na (22) göre, *Legionella* düşük manganer içerikli suda çoğalmaktadır. İtalya'da yapılan bir araştırmaya göre de, su boru sistemlerinin sıcaklığının düşmesi ve suda bakır bulunması sonucunda *Legionella* ürememiştir (23). Ayrıca *L. pneumophila* serogrup 1, sert sularda çinko, kalsiyum

ve magnezyum nedeniyle diğer serogruplara göre daha az, manganer oranı yüksek sularda ise Leoni ve ark.'nın (22) çalışmasının aksine daha fazla izole edilmiştir (23). Sudaki yüksek klor ve düşük su sertliği seviyesi *Legionella* spp. kolonizasyon için uygun bir ortam sağlamaktadır. Amerikan Hastalık ve Önleme Merkezleri'ne göre, *Legionella* için uygun bir yaşam alanı olan kalsiyum ve magnezyum gibi minerallerin neden olduğu kireç ve aşırı klorun neden olduğu korozyonu önlemek için ısıtıcı sistem, tank ve su dağıtım borularının bakımı yapılmalıdır (24). 2007 yılında Sivas'ta 8 hamamdan 64 su örneğinin alındığı çalışmada *Legionella* spp. izole edilememiştir. Bunun nedeni, soğuk su sıcaklığının <20 °C veya sıcak su sıcaklığının >48 °C olması ve suyun sert olması şeklinde açıklanmıştır (25). *Legionella* spp. 32-45 °C optimum sıcaklık aralığında üremektedir (5).

Hastanemizde tüm sıcak su kullanım alanları için hastane arıtma sisteminde demineralize edilmiş yumuşak su; sterilizasyon, mutfak, diyaliz ünitesi ve çamaşırhane gibi ünitelere yumuşak soğuk su verilmektedir. Soğuk su sıcaklığı üst sınırı her zaman 17 °C'de sabit tutulurken, kış aylarında sıcak su 45 °C'nin üzerine çıkmaktadır. Ancak yaz mevsiminde sıcak su sıcaklığı üst sınırı 40-42 °C aralığında sabit tutulmaktadır. Çalışmanın yapıldığı yaz mevsiminde, hastanede sıcak su boru hattında yumuşatılmış su kullanılması ve pH değerinin 7,8 olmasının *Legionella* kolonizasyonu için uygun bir ortam sağladığı düşünülmektedir. *Legionella* enfeksiyonu tanısında kültür altın standart kabul edilse de, özgüllüğü %100, duyarlılığı %10 ile %80 arasında değişmektedir. Özellikle mikroorganizmanın hassas yapısı ve 3-5 günlük uzun bir inkübasyon süresi nedeniyle duyarlılık %50-60'lara kadar düşmektedir (26). Serotiplendirmede, henüz tüm türleri ve serogrupları tespit edebilen ticari bir kit bulunmamaktadır. İdrar antijen testleri sadece serogrup 1'i, direkt floresan antikor testleri ise serogrup 1 ve 6'yı tespit edebilmektedir (26). Kültürde üremeyen türler genellikle yalancı negatifliğe neden olmaktadır. Bunun yanında PZR yöntemi ile test analizi 1 saatten daha kısa sürmektedir. Ayrıca duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 80-100 ve >%90 olarak belirtilmiştir (27). Genellikle hızlı klinik tanı amacıyla alt solunum yolu örneklerinden direkt PZR analizi yapılabiliriyorsa idrar antijen testi ile birlikte tanımlama, PZR yapılamıyorsa kültür ve idrar antijen test kombinasyonu ile tanımlama önerilmektedir (27). İsfahan'da yapılan bir surveyans çalışmasında 11 hastanenin 44 su kaynağında *Legionella* varlığı kültür ve nested PZR (nPZR) yöntemleri ile araştırılmıştır. Kültür yöntemiyle su örneklerinin %50'sinde

Legionella izole edilirken, nPZR ile her hastanenin en az bir örneğinde pozitiflik saptanmıştır. Çalışmada, nPZR ile LEG 448-JRP primer seti kullanılarak örneklerin %66'sında (29/44) *Legionella* türleri tespit edilmiştir (5). ABD'de solunum örneklerinde *Legionella* tespiti için 16S rRNA geninde 386-bp'lik bir ürünü amplifiye eden bir PZR yöntemi geliştirilmiş ve sonuçlar kültür ile karşılaştırılmıştır. Kültürde *Legionella* üreyen örneklerin tamamı PZR testi ile pozitif bulunurken, kültürde üremeyen 12 örnek PZR ile pozitif bulunmuştur. PZR pozitif üç örnek non-*L. pneumophila* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada, salin solüsyonunun *Legionella* kültürünü olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Moleküler yöntemler hızlı tanı yöntemleri olmasına rağmen canlı ve ölü mikroorganizmalar ayırt edilememektedir. Ayrıca biyofilm varlığının, konsantrasyon miktarına bağlı olarak reaktifler üzerinde sitotoksik etki yarattığı bildirilmiştir (28). Hastane kaynaklı *Legionella* enfeksiyonunu önlemek ve kontrol altına almak için bir an önce epidemiyolojik araştırmaların başlatılması ve şüphelenilen su kaynağının *Legionella* varlığı açısından incelenmesi büyük önem taşımaktadır (27). Bir eradikasyon yöntemi olan "Aşırı-ısıt ve temizle" yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Boyler sıcaklığı 70 °C'ye yükseltilerek tüm su boruları, musluklar ve duş başlıkları en az 3 dakika sıcak su ile yıkanmalıdır (29). Hastanemizde de belirli aralıklarla bu yöntem uygulanmaktadır. Ayrıca soğuk su kulelerinde biyosidal uygulama etkili bulunmuştur (30). Ancak şebeke suyu sistemlerindeki klor içeriği *L. pneumophila* eradikasyonu için yeterli değildir. Amip kistleri üzerinde varlığını sürdüren *Legionella* bakterilerinin yok edilmesi için gereken klor miktarının >50 mg/L olduğu bildirilmiştir (7). Suda amonyak ve serbest klor karıştırılarak içme suyu dezenfeksiyonu serbest klordan daha başarılı bulunmuştur. Bunun yanında ozon ve klor, ozon ve kloramin, UV ve klor ile UV ve kloramin ile dezenfeksiyon yöntemleri de önerilmektedir (7). UV (dalga boyu 253,7 nm) ile ışınlama yönteminin *Legionella*'yı güvenilir şekilde öldürdüğü

gösterilmiştir. Ancak *Legionella* ile doğal konakçısı amibin inaktivasyonu arasında büyük farklılıklar gözlenmiş, ikincisi 100 kat daha dirençli bulunmuştur (31). Soğuk su sıcaklığını 20 °C'nin altında tutmak ve minimum su sağlamak için kazanların 60 °C'de ve dağıtım borularının tercihen 55 °C'de tutulması önerilen yöntemler arasındadır (32). Ayrıca su tankları ve su borularının tortu, birikinti, kireç vs. açısından düzenli olarak temizliği ve hasarlı su sistemlerinin onarımı sağlanmalıdır.

Sonuç

Sonuç olarak hastane kaynaklı *Legionella* enfeksiyonlarının önüne geçmek için düzenli epidemiyolojik çalışma ve su sistemlerinde etkin dekontaminasyon uygulaması yapılmalıdır.

Teşekkür: Bakteri dizi analizlerinin nükleotid erişim numaralarını alarak GenBank'a kaydeden Prof. Dr. Fuat Aydın'a teşekkür ederiz.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 17.07.2019 tarihli oturumda, karar no: 11 ile onay almıştır.

Hasta Onamı: Çalışma hasta onamı gerektirmemektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: F.O., E.K., Dizayn: F.O., E.K., Veri Toplama veya İşleme: Y.O., H.Ö., Analiz veya Yorumlama: F.O., E.K., K.T.Y., Literatür Arama: F.O., E.K., Yazan: F.O., E.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

- Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Marin M, et al. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:1708-17.
- Collier SA, Stockman LJ, Hicks LA, Garrison LE, Zhou FJ, Beach MJ. Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. *Epidemiol Infect* 2012;140:2003-13.
- Kireççi E, Dağlı S. Kahramanmaraş ilindeki Camilerin Klima ve Şadırvanlarından *Legionella* Cinsi Bakterilerin İdentifikasyonu. *Duzce Univ Sağlık Bilim* 2019;9:6-9.
- Burak DM, Zeybek Z. İstanbul'daki evlerin sıcak su sistemlerinde *Legionella pneumophila* ve özgür yaşayan amiplerin araştırılması. *Türk J Biol* 2011;35:679-85.
- Lasheras A, Boulestreau H, Rogues AM, Ohayon-Courtes C, Labadie JC, Gachie JP. Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control* 2006;34:520-5.
- Asghari FB, Nikaeen M, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Surveillance of *Legionella* species in hospital water systems: the significance of detection method for environmental surveillance data. *J Water Health* 2013;11:713-9.
- Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 2002;36:4433-44.
- Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis* 2003;36:64-9.
- Standard B. Microbiological methods, detection and enumeration of *Legionella*. Water Quality part 4 BS 6068- 412, ISO 11731 London: British Standards Institution; 1998.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* 1961;3:208-18.
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E GM, editor. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: Wiley; 1991. p. 115-75.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by Targeted DNA Sequencing, MM18. In: Institute CLaS, editor. 2nd ed: *Clinical and Laboratory Standards Institute, MM18*; 2018.
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993;10:512-26.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Lejyoner Hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı, UMS-B-MT-06. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi 934. Ankara: Sağlık Bakanlığı Yayın 2014.
- Sakhaee F, Mafi S, Zargar M, Vaziri F, Hajiesmaeili M, Siadat SD, et al. Correlation between *Legionella pneumophila* serogroups isolated from patients with ventilator-associated pneumonia and water resources: a study of four hospitals in Tehran, Iran. *Environ Sci Pollut Res Int* 2022;29:41368-74.
- World Health Organization. *Legionella and the prevention of legionellosis*. Geneva: World Health Organization; 2007.
- Dooling KL, Toews KA, Hicks LA, Garrison LE, Bachaus B, Zansky S, et al. Active Bacterial Core Surveillance for Legionellosis - United States, 2011-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015;64:1190-3.
- Kusnetsov JM, Martikainen PJ, Jousimies-Somer HR, Vaisanen ML, Tulkki AI, Ahonen HE, et al. Physical, Chemical and Microbiological Water Characteristics Associated with the Occurrence of *Legionella* in Cooling-Tower Systems. *Water Res* 1993;27:85-90.
- Erdogan H, Arslan H. Colonization of *Legionella* species in Turkish baths in hotels in Alanya, Turkey. *Environ Monit Assess* 2015;187:235.
- Edagawa A, Kimura A, Doi H, Tanaka H, Tomioka K, Sakabe K, et al. Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *J Appl Microbiol* 2008;105:2104-14.
- Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, Menéndez R, Chalmers JD, Wunderink RG, et al. Pneumonia. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7:25.
- Leoni E, De Luca G, Legnani PP, Sacchetti R, Stampi S, Zanetti F. *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *J Appl Microbiol* 2005;98:373-9.
- Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:5805-13.
- Centers for Disease Control and Prevention. *Legionella Water Management Programs Overview*. Available from: URL: <https://www.cdc.gov/legionella/wmp/overview.html>. Accessed April 12, 2022.
- Alim A DTZ, Ataş AD, Güneş T. Investigation of *Legionella* spp. from the Turkish baths in Sivas. *J Microbiol Infect Dis* 2007;12:103-7.
- Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 2000;38:1709-12.
- Pierre DM, Baron J, Yu VL, Stout JE. Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2017;16:59.
- Taylor MJ, Bentham RH, Ross KE. Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate Between Live and Dead *Legionella* in Biofilm Samples. *Microbiol Insights* 2014;7:15-24.
- Unterberg M, Rahmel T, Kissinger T, Petermichl C, Bosmanns M, Niebus M, et al. *Legionella* contamination of a cold-water supplying system in a German university hospital - assessment of the superheat and flush method for disinfection. *J Prev Med Hyg* 2021;62:E751-8.
- Mouchtouri VA, Goutziana G, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. *Legionella* species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control* 2010;38:50-5.
- Cervero-Aragó S, Sommer R, Araujo RM. Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free *Legionella* and *Legionella* associated with its amoebae hosts. *Water Res* 2014;67:299-309.
- Boss R, Baumgartner A, Kroos S, Blattner M, Fretz R, Moor D. Rapid detection of viable *Legionella pneumophila* in tap water by a qPCR and RT-PCR-based method. *J Appl Microbiol* 2018;125:1216-25.