

PAMUKKALE YÖRESİ TERMAL SU KAYNAKLARINDA KÜLTÜR VE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE LEGİONELLA TÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF LEGIONELLA SPECIES IN THERMAL WATER SOURCES OF PAMUKKALE REGION BY CULTURE AND POLYMERASE CHAIN REACTION

Çağrı ERGİN**, Ata Nevzat YALÇIN***, Ahmet PINAR****
Çiğdem Banu ÇETİN***, Hüseyin TURGUT***

ÖZET: Bu çalışmada Pamukkale yöresindeki insan yapımı termal su dağıtım sistemleri ve çevresel travertenlerden toplanan 55 su örneğinde Legionella türleri seçici "Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE)" agarda kültür ve Legionella türleri için özgül polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı. Her iki yöntem farklı merkezlerde uygulanarak sonuçlar çalışma bitinceye dek duyurulmadı. Sonuç olarak, kullanılan yöntemlerle örneklerin hiçbirisinde Legionella türleri saptanmadı.

Anahtar kelimeler: Legionella, polimeraz zincir reaksiyonu, su kaynakları.

SUMMARY: In this study 55 water samples collected from human-made thermal water distributing systems and environmental travertains of Pamukkale region have been investigated for the presence of Legionella species by culture methods using selective Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar and polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for Legionella species. Culture and PCR techniques have been performed at different study centers and results have not been reported until the study has finished. As a result, Legionella species have not been detected in any of the water samples by both of the techniques.

Key words: Legionella, polymerase chain reaction, water sources.

* XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde Sunulmuştur.

** Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Isparta.

*** Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Denizli.

**** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

GİRİŞ

Legionella türleri, klimalar, havalandırma sistemleri, nemlendiriciler, duş başlıkları, termal banyolar, sıcak su muslukları gibi insan yapımı sistemlerde kolonize olabilmekte ve buradan insana bulaşarak başta Lejyoner hastalığı olmak üzere çeşitli patolojilere yol açabilmektedir. Legionella türleri için uygun üreme ve bulaşma ortamları, daha çok su dağıtım sistemlerinin eski olduğu ve ekolojik olarak ılıman iklime sahip bölgelerde oluşmaktadır¹.

Pamukkale ve Karahayit bölgesi turizm yapılaşmasının eski olması, iklim ve doğal yapısı nedeniyle Legionella türleri ekolojisine uygundur. Bu bölgeden lejyonellozis tanısı alan olgular bildirilmiştir². Ülkemizde sporadik lejyonellozis olguları saptanmakla birlikte Türkiye'den kaynaklanan olguların büyük kısmı turist olarak bölgeyi ziyaret etmiş ve ülkelerine döndükten sonra tanı konmuş kişilerdir. Bu nedenle enfeksiyon odaklarımız genellikle yurtdışından izlenmektedir²⁻⁴. Çevresel kaynaklardan bulaşması nedeniyle Legionella enfeksiyonları kontrol edilmediğinde hem Türk halkının, hem de ülkemize gelen turistlerin sağlığını tehdit ederek büyük ekonomik kayıplara neden olabilir. Bu amaçla çalışmamızda ülkemiz turizminin önemli merkezlerinden Pamukkale yöresinde, su örneklerinden Legionella türleri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin toplanması: Toplam 55 su örneği 1998 yılı Nisan ayında Pamukkale yöresinde bulunan fiziksel ve kimyasal olarak iki farklı yapıya sahip ana kaynak ile çevresel ve insan yapımı su dağıtım sistemlerinden toplandı. Örneklerin 4'ü ana kaynak bölgesinden, 2'si Karahayit bölgesi çevresel sularından elde edildi. İnsan yapımı su dağıtım sistemleri olarak yörede bulunan otellerin termal havuz, duş başlığı ve musluğu, drenaj suyu, soğutma kulesi ana tankı ve denge tankı ile drenaj musluğundan su örnekleri toplandı. Bu örneklerin 15'i ana kaynak bölgesi otellerinden, 34'ü Karahayit bölgesi otellerinden elde edildi. Su örneklerinin toplanmasında Barbaree ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem uygulandı⁵. Her örnek öncelikle 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldıktan sonra dip çökeltileri eşit olarak ikiye ayrılıp bir bölümü kültür için, diğer bölümü PCR için kullanıldı.

Kültür: Kültür çalışması Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Dip çökeltisi üzerine %10 oranında asit tampon (0.2M HCl, 0.2M KCl, pH: 2.2) eklendi. Vortekslendikten sonra 15 dakika oda ısısında bekletildi. Tekrar santrifüj edilerek üst kısım atıldı. Dip çökeltisi seçici besiyerine (Legionella CYE Base+BCYE Growth Supplement+GVPC Selective Supplement) ekildi. İnkübasyon 15 gün süresince 35°C'de nemli ortamda yapıldı. Ekim yapılan besiyerlerinde üreme olup olmadığı hergün kontrol edildi. Üreyen kolonilerin tanımlanmasında sırasıyla Gram boyama, katalaz testi, kanlı ve EMB (Eosin Methylene Blue) agarda üreme yeteneği, hipurat hidrolizi ve PCR testleri uygulandı⁶.

PCR: PCR çalışması Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında yapıldı. Dip çökteltisinin PCR için ayrılan bölümü üzerine 1 ml Tris-EDTA tamponu (2M Tris HCl, 0.5M EDTA, pH: 8.0) eklendi. Vortekslenildikten sonra 15000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atılarak işlem 2 kez daha tekrarlandı. Son santrifüjden sonra tüpler vortekslenerek kaynar su banyosunda 10 dakika tutuldu. Daha sonra -80°C'de en az 10 dakika tutularak dondurup çözme işlemi uygulandı. Tekrar 15000 g'de 10 dakika santrifüj edilen örneklerin üst kısımları bir başka mikrosantrifüj tüpüne alınarak PCR işlemine kadar -20°C'de saklandı.

Legionella türlerinin PCR ile belirlenmesi için hedef bölge 5S rRNA geninin 108 baz çiftlik bir parçasıydı. Bu bölgeyi çoğaltmak amacıyla Enviro-Amp Legionella kitinde (Perkin-Elmer Cetus Co.) kullanılan primer dizileri seçildi⁷. Buna göre diziler şu şekildedir:

Lpn A: Sense 5'-GGCGACTATAGCGATTTGGAA-3'

Lpn B: Anti-sense 5'-GCGATGACCTACTTTTCGCATGA-3'

Bu primerlerle Legionella bakterilerinin bütün türleri gösterilebilmekte, fakat tür ayırımına gidilememekteydi. Bu nedenle pozitif sonuç bulunduğu daha önce Pınar ve arkadaşları⁸ tarafından tanımlanan heterodupleks analizi yöntemi ile tür sınıflaması yapılması planlandı.

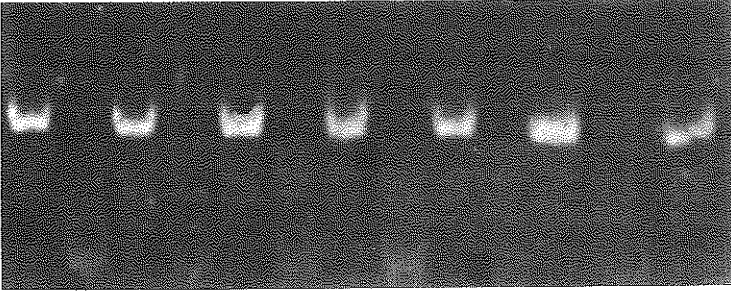
PCR ile hedef DNA bölgesinin çoğaltılması daha önce Ramirez ve arkadaşlarının⁹ tanımladığı şekilde yapıldı. Buna göre her örnek için tepkime tüpünde son derişimler 4 mM MgCl₂, 200 mM dNTP'ler, 0.5 µM primerler, 2.5U Taq polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Çoğaltım için MJ Research PTC-200 Peltier "Thermalcycler" kullanıldı. Döngüler 95°C'de 5 dakika inkübasyondan sonra 94°C'de 30 saniye ve 63°C'de 30 saniye olarak uygulandı. Bu iki basamaklı döngü 40 kez tekrarlandıktan sonra elektroforez işlemine kadar tüpler 4°C'de tutuldu. Elektroforez işlemi Bio-Rad Mini-Protean II sisteminde %12'lik 30:1 poliakrilamid jel hazırlanarak, oda ısısında 35 dakika 200V ile yapıldı. DNA boyaması etidyum bromür ile sağlandıktan sonra UV ışık altında kontrol bandı ile karşılaştırılarak sonuçlar saptandı.

Örnek içinde bulunması olası PCR inhibitörlerinin varlığını saptamak amacıyla her örneğe Legionella DNA'sının karıştırıldığı pozitif örnek kontrolleri de ayrı tüplerde çalışıldı. Bu kontrollerde pozitif bant elde edilemediğinde inhibitör olduğu sonucuna varılarak örnekler 1/10 sulandırılıp tekrar çalışıldı.

B U L G U L A R

Çalışmaya alınan 55 örneğin hiçbirinde kültür yöntemiyle Legionella türü bakteriler üretilmemiştir. Aynı örneklerin PCR ile incelenmesinde de Legionella türü bakterilere rastlanmamıştır. Örneklerin hiçbirisinde PCR inhibitörlerine rastlanmamış

ve sulandırma yapılmamıştır. İlk 6 su örneğinin PCR sonucu jel elektroforez görüntüleri Resim 1'de görülmektedir. Diğer su örneklerinin PCR sonuçları da aynı görüntüyü verdiği için, fotoğrafları ayrıca verilmemiştir.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Resim 1: İlk 6 su örneğinin PCR sonuçları. Kolonlar: İlk kolon tepkime pozitif kontrolüdür. İkinci kolondan itibaren örnek ve örnek pozitif kontrolü şeklinde sırayla PCR sonuçları görülmektedir.

TARTIŞMA

Lejyonellozis, tanımlandığı 1976 yılından bu yana teknik olanakların ve etken hakkında bilgilerimizin artması sonucunda sıklıkla karşılaşmaya başladığımız çevresel bir enfeksiyon hastalığıdır. Eski su dağıtım sistemlerine veya geniş bir alana hizmet veren soğutma kulelerine sahip binalar, Legionella enfeksiyonlarının bulaşmasında en riskli ortamlardır. Adı geçen su sistemlerinin gerek iç yapılarında oluşan erozyon, gerekse devamlı sıcak su ortamında bulunmaları, biyofilm tabakalarının oluşmasına neden olmaktadır. Öte yandan termal sular, içerdikleri değişik mineraller nedeniyle çok çeşitli sayıda mikroorganizma için uygun çoğalma ortamı sağlamaktadır¹⁰. Bütün bu nedenlerle termal turizm bölgelerinin Legionella ekolojisine çok uygun olduğu düşünülmektedir.

Legionella kültür yönteminin duyarlılığı %70, özgüllüğü %100'dür ve Legionella türlerinin çevresel veya klinik örneklerden tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir⁶. PCR ile Legionella türlerinin tanımlanması ise son yıllarda ilgi gören yöntemlerden birisidir. Hedef bölge olarak 5S rRNA geni seçilerek oluşturulan protokollerde PCR yöntemiyle 1-35 cfu (koloni oluşturan ünite) arasında bakteri saptanabilmektedir¹¹. Çalışmamızda Pamukkale yöresinden toplanan 55 su örneğinin hiçbirisinde Legionella türleri saptanmamıştır. Daha önce Erzurum yöresi termal sularında yapılan bir çalışmada da Legionella türü bakterilere rastlanmadığı bildirilmiştir¹⁴. Legionella enfeksiyonlarının tanısında altın standart kabul edilen kültür

yönteminin yanında, duyarlılığının daha yüksek olduğu yönünde bulgular olan PCR yöntemi de çalışmamızda uygulanmıştır. Legionella ekolojisine çok uygun olan Pamukkale yöresi sularında her iki yöntemle de bu bakterilerin saptanmamasının nedeni örneklerin sadece Nisan ayı içinde toplanması olabilir. Yöredeki çevresel ve insan yapımı su sistemlerinden bir yıl boyunca periyodik örnekleme yapılarak çalışılması, Legionella türlerinin saptanması açısından daha uygun olabilir.

Ülkemizde Ankara ve Antalya yöresi konaklama tesislerinde periyodik taramalar Sağlık Bakanlığı Hıfzıssıhha Enstitüleri tarafından yapılmaktadır. Ancak geniş bir turizm sahasına sahip Türkiye'de bu taramaların kapsamı genişletilmelidir. Ülkemizdeki Legionella enfeksiyon odaklarının belirlenmesi halk sağlığı ve turizm açısından çok önemlidir. Bazı yörelere özgü taramalarda, çevresel ve otel sularında %5.88'e ulaşan oranlarda izolasyon rapor edilmektedir^{12,13}. Yurtdışında yapılan çalışmalarda da ülkemizde Legionella odakları bulunduğu bildirilmektedir^{3,4}.

Sonuç olarak bu çalışmada Pamukkale ve Karahayıt bölgeleri termal sularında ve turistik konaklama tesislerinin su dağıtım sistemlerinde kültür ve PCR yöntemleriyle Legionella türleri saptanmamıştır. Benzer çalışmaların her mevsim için periyodik olarak yinelenmesi ve ülkemizde Legionella ekolojisine uygun bütün bölgelerin çalışma kapsamına alınması, Türkiye'de Legionella enfeksiyonları için riskli bölgelerin belirlenmesine ve gerekli önlemlerin alınmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kwaik YA, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS: Invasion of protozoa by Legionella pneumophila and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Appl Environ Microbiol 1998, 64: 3127-3133.
2. Vural T, Süleymanlar G, Demircan A, et al: Legionella detected by direct fluorescens antibody and culture methods, p:123. In: Berdal BP (Ed), Legionella Infections and Atypical Pneumonias. Proceedings of the 11th Meeting of the European Working Group on Legionella Infections. 1996, Oslo.
3. Joseph C, Lee J: An international outbreak of travel-associated Legionnaires' Disease associated with the Hotel Imbat, Kusadasi, Turkey, p: 111. In: Berdal BP (Ed), Legionella Infections and Atypical Pneumonias. Proceedings of the 11th meeting of the European Working Group on Legionella Infections. 1996, Oslo.
4. Lee JV, Joseph CA, Jousimies SH, Harrison TG: Imbat Hotel revisited: an international investigation, p: 18. In: Book of Abstracts of the 12th Meeting of the European Working Group on Legionella Infections. 1997, Lisbon.
5. Barbaree JM, Gorman GW, Martin WT, Fields BS, Morrill WE: Protocol for sampling environmental sites for legionellae. Appl Environ Microbiol 1987, 53: 1454-1458.
6. Winn Jr WC: Legionella, p: 533-544. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds), Manual of Clinical Microbiology. 1995, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
7. Enviro-Amp Legionella package insert. 1992. Perkin-Elmer Cetus Co., Norwalk, Connecticut.
8. Pinar A, Ahkee S, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT: Use of heteroduplex analysis to classify Legionellae on the basis of 5S rRNA gene sequences. J Clin Microbiol 1997, 35: 1609-1611.

9. Ramirez JA, Ahkee S, Tolentino A, Miller RD, Summersgill JT: Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen. *Diag Microbiol Infect Dis* 1996, 24: 7-14.
10. Breiman RF, Butler JC: Legionnaires' disease: Clinical, epidemiological, and public health perspectives. *Semin Respir Infect* 1998, 13: 84-89.
11. Lisby G, Dessau R: Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994, 13: 225-231.
12. Vural T, Ergin Ç, Öngüt G, Demirgiller D, Er D: Isolation of *Legionella* spp. from potable water samples around Antalya region by low-pH treatment and use of selective medium (preliminary research), p: 39-40. In: Proceedings of European Working Group on *Legionella* Infections. 10th Meeting 1995, İstanbul.
13. Akbaş E, Dalkılıç İ, Güvener E: A long term prospective study: The investigation of *Legionella* spp. in domestic water supplies, p: 81-83. In: Proceedings of European Working Group on *Legionella* Infections. 10th Meeting 1995, İstanbul.
14. Şahin Ü, Yiğit N, Aktaş AE, Kayhan CB, Babacan M: Erzurum ili çevre ilçelerinde bulunan termal su kaynaklarından alınan su örneklerinde *Legionella pneumophila* ve diğer patojenlerin araştırılması. VIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 1997, Antalya. Program ve Özet Kitabı s:650.