

Türkiye’de Bir Üniversitenin Su ve Soğutma Sistemlerinde Legionella Cinsi Bakterilerin Araştırılması

Investigation of Legionella Bacteria in Water and Cooling Systems of a University in Turkey

Merve ÖZİŞ¹, Hamide KAYA¹, Taylan BOZOK¹, Seda TEZCAN ÜLGER¹, Gönül ASLAN¹

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

Özet

Amaç: Su sistemlerinde Legionella kolonizasyonu toplumsal ve hastane kökenli pnömoni insidansını etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Bu çalışma ile tıp fakültesi hastanesinin yataklı servislerinin ve üniversiteye bağlı fakültelerin su ve soğutma sistemlerinde Legionella varlığının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Şubat-Ekim 2020 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi yataklı servislerinin ve üniversiteye bağlı 11 fakültenin su ve soğutma sistemlerinden alınan 418 su ve sürüntü örneğinde Legionella cinsi bakterilerin varlığı araştırıldı. Örnekler BCYE besiyerine inoküle edildi ve üreme tespit edilen örneklerin lateks aglütinasyon testi ile tür ve serogrup düzeyinde identifikasyonları yapıldı. Ayrıca bu izolatların doğrulanması için rpoB dizi analizi yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Hastanenin yataklı servislerinden toplanan örneklerin (n=97) dördünde (%4.1), fakültelerden toplanan örneklerin (n=321) üçünde (%0.9) olmak üzere toplamda yedi (%1.67) örnekte Legionella cinsi bakteri izole edildi. Lateks aglütinasyon testi ile bu izolatlardan biri (%14.3) Legionella pneumophila serogrup 2-14, altısı (%85.7) Legionella pneumophila serogrup 1 olarak gruplandırıldı. Tür tanımlamaları dizi analizi sonuçları ile uyumlu bulundu.

Sonuç: Yataklı servislerden alınan örneklerde fakültelere göre daha yüksek oranda Legionella pneumophila izole edilmesi büyük bir risk oluşturmaktadır. Çalışmamızdaki Legionella tespit oranı düşük olsa da su ve soğutma sistemlerinin dezenfeksiyonun, takip ve denetimin düzenli yapılmasının Legionella nedenli pnömonilerin azaltılmasında etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Legionella, Lejyoner hastalığı, Pontiac ateşi, Su

Abstract

Objective: Colonization of Legionella in water systems is among the factors affecting the incidence of community and hospital-acquired pneumonia. In this study, it was aimed to investigate the presence of Legionella in the water and cooling systems of the inpatient services of the faculty of medicine hospital and the faculties of the university.

Material and Methods: The presence of Legionella was investigated in 418 water and swab samples were taken from the water and cooling systems of the inpatient services of Mersin University Faculty of Medicine Research and Practice Hospital and 11 faculties of the university between February-October 2020. Collected water and swab samples were inoculated into BCYE medium and identification at the species and serogroups by latex agglutination test. In addition, rpoB sequencing was used to confirm these isolates.

Results: Legionella were isolated in four (4.1%) of the samples collected from the inpatient services of the hospital and in three (0.9%) of the samples collected from the faculties (n=321), in total seven (1.67%) samples. One of these isolates (14.3%) was grouped as Legionella pneumophila serogroup 2-14 and six (85.7%) as Legionella pneumophila serogroup 1 by latex agglutination test. Species identifications were consistent with sequence analysis results.

Conclusions: The isolation of Legionella pneumophila in samples taken from inpatient services at a higher rate than in faculties poses a great risk. Although the detection rate of Legionella in our study was low, we think that regular disinfection, follow-up and inspection of water and cooling systems may be effective in reducing Legionella-related pneumonias.

Keywords: Legionella, Legionnaires' Disease, Pontiac fever, Water

Yazışma Adresi: Taylan BOZOK, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Yenişehir, Mersin, Türkiye

Telefon: +05054882888

Email: taylanbozok@hotmail.com

ORCID No (Sırasıyla): 0000-0001-6563-7609, 0000-0002-2956-8762, 0000-0002-7094-4838, 0000-0002-0823-3680, 0000-0002-1221-7907

Geliş tarihi: 06.12.2021

Kabul tarihi: 10.01.2022

DOI: 10.17517/ksutfd.1033028

GİRİŞ

Legionella cinsi bakteriler 50'den fazla tür ile 71 farklı serogrup içerir (1). İnsanda yaptığı enfeksiyonların yaklaşık %90'undan Legionella pneumophila sorumludur ve bu türden en sık izole edilenler serogruplar 1 ve 6'dır (2). Legionella pneumophila 55-60°C sıcaklıklarda ve nemli ortamlarda hayatta kalabilen mikroorganizmalardır (3). Sıcak su sistemlerine kolonize olan Legionella türleri duş başlıklarından ve musluklardan aerosol oluşturarak alt solunum yollarına penetre olabilmektedir (4). Ayrıca klima sistemlerinde kolonize olup hava yolu ile veya kontamine sularla direkt temas yolu ile bulaşabilirler (5). Dört farklı klinik tabloya sebep olan Legionella'nın bilinen en önemli iki klinik formu Lejyoner Hastalığı (LH) ve Pontiyak Ateşidir (6,7). Hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında özellikle immunsupresif hastalar açısından mortalitesi yüksek bir hastalıktır (7). Lejyonelloz salgını görülen bölgelerde suların hiperklorinasyonu veya depolardan sıcak su ısısının 70°C üzerine çıkarılarak ısı ile dezenfeksiyon işlemi uygulamalarının salgın kontrol için ve bakterinin çoğalmasını önleme bakımından önemli yöntemler olduğu bildirilmiştir (8).

Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da lejyoner hastalığının prevalansı ortalama bir milyonda 9-11.5 olgu olarak bildirilmektedir (9,10). Ülkemizde sporadik olgular

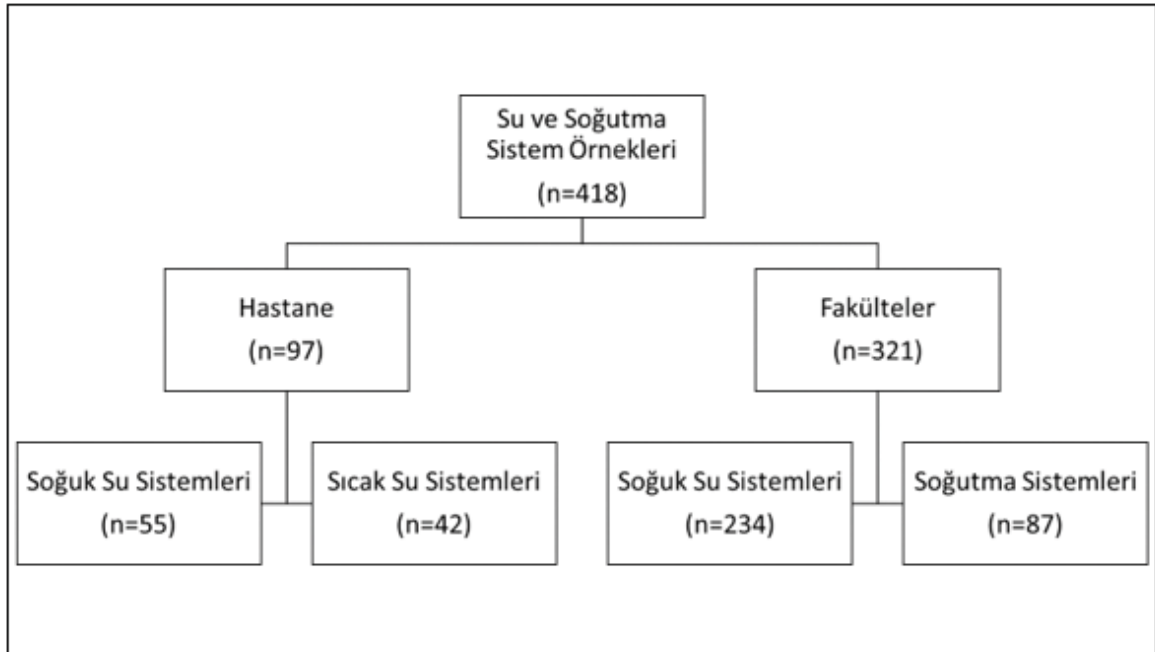
halinde bildirimler yapılmıştır (11,12). Bununla birlikte Avrupa Legionella Enfeksiyonları Çalışma Grubu verilerine göre seyahat ilişkili Lejyoner hastalığının en sık saptandığı ülkelerden biri Türkiye'dir (13,14).

Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde yataklı servislerin musluk ve duş başlıklarından, üniversiteye bağlı çeşitli fakültelerin musluklarından ve klimalardan sürüntü örnekleri alınarak Legionella cinsi bakterilerin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Üniversitedeki su ve soğutma sistemlerindeki Legionella prevalansının ve serotiplerinin belirlenmesinin yanı sıra yapılan dezenfeksiyon işlemlerinin yeterliliği değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Örneklerin Toplanması

Çalışmada, Şubat 2020 - Ekim 2020 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin bazı yataklı servislerinin musluk ve duş başlıklarından ve Mersin Üniversitesi'ne bağlı bazı fakültelerin depo, musluk, duş başlıkları ve klimalarından alınan su ve sürüntü örnekleri işleme alındı. Hastaneden 97 ve üniversiteye bağlı 11 fakülteden alınan 321 örnek olmak üzere, toplam 418 su ve sürüntü örneği çalışmaya dahil edildi (**Şekil 1**).



Şekil 1. Toplanan örneklerin alındığı yer dağılım şeması

Su örnekleri musluklar ve duş başlıklarında su bir miktar akıtılarak ikişer adet 50 mL'lik steril tüplere alındı. Sürüntü örnekleri için musluk başlıkları çıkarılarak steril eküvyon ile musluk içerisinden sürüntü örneği alındı. Duş başlıkları için sürüntü alınırken eküvyon ile tüm yüzeye teması sağlandı. Klima filtrelerinden sürüntü örneği almak için burgu kapaklı cam tüp içerisine yaklaşık 25 ml distile su eklenerek öncelikle eküvyon ıslatıldı. Sonra ıslatılan eküvyon, klimanın hava çıkış filtresine çepeçevre sürülüp burgu kapaklı cam tüpe konuldu (15).

Bakteriyolojik Analiz ve Serogruplandırma

Örnekler bekletilmeden laboratuvara getirilerek 3500 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırılması sağlandı. Santrifüj işleminden sonra örneklerin süpernatant kısmı atıldı. Kalan dip çökelti vorteksenerek 0.1 mL örnek alındı. Üretici firmanın talimatına uygun olarak taze hazırlanan suplement (Oxoid, İngiltere) eklenmiş BCYE agara (Oxoid, İngiltere) ekimi yapıldı. 10 gün %5 CO₂'li ortamda 37°C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda üreme olan besiyerlerinden şeffaf şüpheli kolonilere Gram boyama yapıldı ve Gram negatif basil görülenler yeniden BCYE agar ve %5 koyun kanlı agara pasajlandı. Pasaj ekimleri 24-48 saat 37°C'de etüvde %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Koyun kanlı agarda üremeyen ve BCYE agarda üreyen kolonilere katalaz ve oksidaz testi uygulandı. Katalaz ve oksidaz testi pozitif olan örneklerle üretici firmanın önerileri doğrultusunda lateks aglütinasyon testi (Oxoid, İngiltere) uygulandı. Lateks aglütinasyon testi sonucuna göre serogruplandırma yapıldı (15).

Moleküler Analiz

Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Lateks aglütinasyon testi ile serogruplandırılan Legionella izolatlarından hızlı DNA ekstraksiyon yöntemi ile DNA'ları elde edildi. Bunun için izolatlardan BCYE agara tekrar pasaj alınarak taze üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak içerisinde 1 ml steril distile su bulunan mikrosantrifüj tüpüne alınarak iyice süspansiyon edildi. Daha sonra 1200 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Altta kalan pelet üzerine 400 µl steril distile su eklendi. 5 dk vortex yapıldıktan sonra 80°C'de 20 dk inkübe edildi. Sonrasında vorteksenerek üzerlerine 400 µl kloroform eklendikten sonra ve 12.000 rpm'de 15 dk tekrar santrifüj edildi. Süpernatant steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak PCR amplifikasyonunda kalıp DNA olarak kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Elde edilen ekstraksiyon ürünlerinin rpoB gen bölgesinin PCR amplifikasyonu için RL1; 5'-GAT GAT ATC GAT CAY CTD GG-3' ve RL2; 5'-TTC VGG CGT TTC AAT NGG AC-3' primer çifti kullanıldı (16). Amplifikasyon 50 µl'lik reaksiyon hacimlerinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 5 µl 10X PCR tampon, 4 µmol/µl MgCl₂, 1 µmol/µl dNTP karışımı, 0.25 pmol/µl her bir primer, 0.25 µl U Taq DNA polimeraz ve 5 µl örnek DNA'sı içerecek şekilde hazırlandı. Reaksiyon karışımının ısı döngü cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Almanya) amplifikasyon koşulları, 94°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 40 döngü 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 55°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1,5 dakika uzama basamaklarını takiben 70°C'de 7 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR (Polymerase Chain Reaction) ürünleri, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra UV transilüminatörde görüntülendi. Amplifiye edilmiş DNA parçalarının oluşturduğu bantlar (369 bp) değerlendirildi. Uygun şekilde bant oluşumu gözlenen PCR ürünleri dizi analizi işlemine alındı.

rpoB Gen Bölgesinin Dizi Analizi

Elde edilen PCR ürünleri işaretli dideoksinükleotidler içeren "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystem, Foster City, ABD) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda "Cycle Sequence PCR" işlemine tabi tutuldu. Ardından elde edilen ürün Etanol/EDTA/Sodyum Asetat presipitasyon yöntemi ile saflaştırıldı ve ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, ABD) cihazında Sanger dizilemesi yapıldı.

Dizi analizi verileri "National Center for Biotechnology Information (Bethesda, ABD) BLAST sistemi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak analiz edildi ve izolatlar tür düzeyinde tanımlandı.

İstatistiksel Yöntemler

Çalışma sonuçları SPSS (versiyon 20.0, IBM, ABD) paket programı kullanılarak analiz edildi. Kategorik değişkenlerin ifadesinde sayı-yüzde değerleri ve gruplar arası karşılaştırma analizinde Fisher's exact test kullanıldı. P değeri <0.05 olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada toplanan 418 su (n=165; %39.5) ve sürüntü (n=253; %60.5) örneğinde; hastanenin yataklı servislerinden alınan örneklerin (n=97) dördünde fakültelerden alınan örneklerin (n=321) üçünde olmak üzere toplamda yedi (%1.67) Legionella cinsi bakteri izole edildi (%4.1 & %0.9; p=0.054). Örnek tipi olarak en fazla üreme musluklardan alınan örneklerde oldu (n=6; %2.1; p=0.435). Üreme tespit edilen yedi örneğin altısı (%85.7) sürüntü örneğiydi. Klima sürüntü örneklerinin (n=87) hiçbirinde Legionella cinsi bakteri izole edilmedi. Serogruplandırma sonucunda yedi örnekten bir tanesinde (%14.3) Legionella pneumophila serogrup 2-14 bulunurken, altı izolat (%85.7) Legionella pneumophila serogrup 1 olarak bulundu. İzolatların alındığı yerler **Tablo 1**'de gösterilmiştir. Yapılan dizi analizi sonuçlarına göre de yedi izolatin tamamının BLAST sisteminde Legionella pneumophila dizileri içinde gruplandığı görüldü.

TARTIŞMA

Legionella cinsine ait bakterilerle enfeksiyonlarda insandan insana bulaş bildirilmemektedir. Su sistemlerinde çoğalabilen bu mikroorganizmalar, klima veya duş başlığı gibi ortamlarda oluşan aerosollerle ortama yayıldığı ve böylece insan solunum yollarına penetrasyonu ile enfeksiyona sebep olabileceği için Legionella'nın su sistemlerinde kolonizasyonu önemlidir (17,18). Türkiye'de ve başka ülkelerde bu tür kolonizasyonların değerlendirilmesi amacıyla yapılmış birçok benzer çalışma mevcuttur. Su sistemlerindeki Legionella spp. prevalansı ile ilgili yapılan çalışmalarda %3 ila %64 gibi değişiklik gösteren oranlarda bu mikroorganizmaya rastlandığı gösterilmiştir (19-22). Bizim çalışmamızda literatürdeki çalışmalara nazaran Legionella spp. prevalansı (%1.67) düşük bulundu. Sıcak su sistemlerinin kullanımının ve insan sirkülasyonunun daha fazla olduğu otel ve konakla-

ma tesisleri gibi yerlerden alınan örneklerde daha yüksek oranlarda Legionella spp. tespit edilmiştir (20-23). Bizim çalışmamızdaki örneklerin üniversite hastanesi ve fakültelerden toplanmış olması ve periyodik hiperklorizasyon uygulamasını takiben çalışmanın yapılması prevalansın düşük olmasını açıklayabilir. Çalışmamıza yakın pozitiflik oranı saptayan Yılmaz ve arkadaşlarının Erzurum'da yaptıkları bir çalışmada, hastane ve otellerden toplanan 2.025 su örneğinde 65 (%3.2) Legionella spp. izole etmişlerdir. Ancak serogruplandırmada bizim çalışmamızın tersine serogrup 2-14 (%70.8) daha yüksek oranda bulunmuştur (19). Serogrup sıklığı konusunda Türkiye'de yapılmış farklı çalışmalara baktığımızda 2000 yılında İzmir'de yapılmış bir çalışmada 128 Legionella cinsi bakteri tanımlanmış ve bunun 110'u (%85.9) Legionella pneumophila serogrup 1 olarak tespit edilmiştir (24). Özen ve arkadaşları, 2010 yılında Antalya'da yaptıkları bir çalışmada 56 otelden topladıkları toplamda 1.403 su örneğinden 142 (%10.1) Legionella pneumophila izole etmişlerdir (25). Gaziantep ilinde 2012-2013 tarihlerinde yapılan bir çalışmada ise 93 (%29.7) örnekte Legionella spp. izole edilmiş ve bu izolatların 74 (%79.6)'ü Legionella pneumophila serogrup 2-14 olarak tanımlanmıştır (26). Türkiye dışındaki çalışmalara baktığımızda İtalya'da sıcak su sistemlerinde yapılan bir çalışmada %40 gibi yüksek bir oranda Legionella spp. tespit edilmiştir (20). Yine İsrail'de 168 otel ve tatil köyünden toplanan 2.830 örnekle yapılmış bir araştırmada 470 Legionella spp. (%17) izole edilmiştir. Bu çalışmada serogrup 2-14 daha yüksek oranda (%69.8) tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada serogrup 2-14'ün sıcak su sistemlerinden, serogrup 1'in ise soğuk su sistemlerinden daha çok izole edildiği belirtilmiştir (21). Bizim çalışmamızda elde edilen izolat sayısı yetersiz olsa da serogrup 2-14 olarak tanımladığımız tek izolatin bir sıcak su sistemi aparatı olan duş başlığından izole edilmesi dikkat çekicidir.

Tablo 1. İzolatların alındığı yerler ve örnek tipleri

Örnek kaynağı	Örnek Tipi	Serogruplandırma	İzolat sayısı
Hastane	Duş başlığı sürüntü	Legionella pneumophila serogrup 2-14	1
	Musluk sürüntü	Legionella pneumophila serogrup 1	2
	Musluk filtre sürüntü	Legionella pneumophila serogrup 1	1
Fakülte	Musluk su	Legionella pneumophila serogrup 1	1
	Musluk sürüntü	Legionella pneumophila serogrup 1	2
Toplam			7

Çevresel örneklerden Legionella cinsi bakterileri tanımlamak için kullanılan kültür yönteminin standart bir prosedürü olmaması nedeniyle araştırmacılar farklı yöntemler kullanmakta ve farklı bulgular elde edilmektedir (27). Çalışmamızda toplam örnek sayısına göre pozitiflik %1.67 oranı literatüre göre daha düşük bulunmuştur. Ayrıca serogrup 1'in daha yüksek tespit edilmesi çalışmamızda daha çok soğuk su sistemi örneklerinin analiz edilmesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Çalışmamızda COVID-19 pandemisi nedeniyle alınan önlemlere ve ekonomik kısıtlılıklara bağlı örnek toplama sayısında ve çeşitliliğinde yetersizlikler olmuştur. İlimizdeki profili değerlendirmek açısından değerli olacağını düşündüğümüz çevre hastanelerin de çalışma grubuna dahil edilmesi planlanmış ancak yerel sağlık otoriteleri tarafından gerekli izinlerin alınamamasından dolayı çalışmaya dahil edilememiştir. Ayrıca sıcak su sistemlerinden alınan örnek sayısının az olması ve soğutma sistemlerinin filtrelerinden örnek toplanmaması bu çalışmanın kısıtlılığıdır.

Hastanemizdeki son hiperklorizasyonun tarihi ve örnek alınma tarihi arasındaki yakınlık ve hiperklorizasyon düzeninin pandemi nedeniyle bozulması çalışma sonuçlarını etkileyen parametreler olabilir. Bu konuda daha geniş zaman dilimini kapsayacak şekilde çalışmaların devam ettirilmesi faydalı olacaktır.

Sonuç olarak toplum ve hastane kökenli pnömoni-lerin en önemli etkenlerinden biri olan Legionella cinsi bakterilerin çevresel kontaminasyonunun azaltılması pnömoni sıklığının azalmasına büyük katkı sağlayacaktır. Hiperklorinasyon yönteminin yetersiz kaldığı durumlarda birden fazla dezenfeksiyon yönteminin aynı anda uygulanmasının daha etkili olabileceği düşünülmektedir. Yılda iki defa yapılan hiperklorinasyonun yanı sıra hasta odalarındaki musluk ve duş başlıklarının dezenfeksiyonunun günlük, haftalık ve aylık kontrollerinin rutin olarak yapılmasının bu etkenle mücadelede daha etkili olacağı kanısındayız. Ayrıca geniş alanları kapsayan ve daha fazla sayıda ve çeşitte örnek içeren çalışmaların planlanması izlenebilirlik ve kontrol açısından yararlı olacaktır.

Finansal açıklama: Bu çalışma herhangi bir kuruluş tarafından finansal olarak desteklenmemiştir.

Etik onay: Bu çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak yapılmış olup, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27.09.2021 tarihli 78017789/050.01.04./1090919 sayılı karar ile izin alınmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar aralarında çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar katkı oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Borges A, Simões M, Martínez-Murcia A, Saavedra MJ. Detection of Legionella spp. in natural and man-made water systems using standard guideline. J Microbiol Res. 2012;2(4):95-102.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Legionella. (Çev: Başustaoglu AC), s.365-9. Tıbbi Mikrobiyoloji. 6. Baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010.
- Fragou K, Kokkinos P, Gogos C, Alamanos Y, Vantarakis A. Prevalence of Legionella spp. in water systems of hospitals and hotels in South Western Greece. Int J Environ Health Res. 2012;22(4):340-354.
- Vural T, Er D. Legionella türlerinin mikrobiyolojik özellikleri ve laboratuvar tanısı. Flora. 1999;4(1):9-25.
- Daşdemir A. Klima tesisatında lejyonella hastalığını önlemek için alınması gereken tedbirler. Tesisat Mühendisliği. 2014;10-14.
- Alim A. Lejyoner hastalığında immunopatogenez. Mikrobiyol Bul. 2004;38:295-303.
- Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and epidemiology of Legionnaires' disease. Infect Dis Clin North Am. 2017;31(1):7-27.
- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic. 7th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2017. p.845-854.
- Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. The Lancet. 2016;387(10016):376-385.
- Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. Lancet Infect Dis. 2014;14(10):1011-1021.
- Vural ST, Ögünç MD, Öngüt G, Ögüş AC, Çolak D, Celeboğlu N et al. Antalya ve çevresinde saptanan beş yeni lejyoner hastalığı olgusu. XXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 4-9 Ekim 1998, Antalya. Kongre Özet Kitabı, s. 157.
- Akıncı E, Baran G, Erbay A, Çolpan A, Afacan G, Bodur H. Legionnaires' disease: A case report. T Klin J Microbiol-Infec. 2003;2:28-31.
- Joseph C, Yadav R, Ricketts K. Travel-associated Legionnaires' disease in Europe in 2007. Euro Surveill. 2009;14(18):19196.
- European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires_disease/ELDSNet/Pages/index.aspx. (Erisim tarihi: Ocak 2020).
- Suda legionella türlerinin tanımlanması. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/rehberler/SudaLegionellaTanimlanmasi.pdf (Erisim tarihi: Ocak 2020).
- Ko KS, Hong SK, Lee KH, Lee HK, Park MY, Miyamoto H et al. Detection and identification of Legionella pneumophila by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). J Microbiol Methods. 2003;54(3):325-337.
- Yu VL. Could aspiration be the major mode of transmission for Legionella? Am J Med. 1993;95(1):13-15.
- Blatt SP, Parkinson MD, Pace E, Hoffman P, Dolan D, Lauderdale P et al. Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. Am J Med. 1993;95(1):16-22.
- Yılmaz A, Orhan F. Investigation of the presence of Legionella pneumophila in water samples from Erzurum and surrounding provinces in Turkey. Ann Agric Environ Med. 2021;28(2):255.
- Leoni E, De Luca G, Legnani P, 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(2):373-379.

21. Yakunin E, Kostyal E, Agmon V, Grotto I, Valinsky L, Moran-Gilad J. A snapshot of the prevalence and molecular diversity of *Legionella pneumophila* in the water systems of Israeli hotels. *Pathogens*. 2020;9(6):414.
22. Abdalla A, Saidan M, Al-Alami N, Al-Naimat H. Comparative assessment of *Legionella pneumophila* prevalence among hospitals and hotels water systems. *Desalin Water Treat*. 2020;193:432-441.
23. Odabaş Köse E, Öngüt G, Ögünç D, Vural T. Antalya ili otel su sistemlerinden alınan su örneklerinde *Legionella pneumophila* araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*. 2004;18(2):143-147.
24. Uzel A, Ucar F, Hameş Kocabaş E. Prevalence of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water distribution systems in Izmir province of Turkey. *Apmis*. 2005;113(10):664-669.
25. Özen NS, Ataman ST, Emek M. Exploring the *Legionella pneumophila* positivity rate in hotel water samples from Antalya, Turkey. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(13):12238.
26. Sevinç M. Gaziantep il merkezindeki çeşitli soğutma sistemleri ve su sistemlerinde *Legionella pneumophila* varlığının araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Gaziantep, Gaziantep Üniversitesi, 2013.
27. Bartie C, Venter S, Nel L. Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Res*. 2003;37(6):1362-1370.