

Bronkoalveolar lavaj sıvısı ve transtrakeal aspirasyon örneklerinden Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile Legionella türlerinin saptanması

Detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage fluids and transtracheal aspiration samples by Polymerase Chain Reaction method

Şöhret AYDEMİR¹, Feza BACAĞOĞLU²

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, İzmir

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İzmir

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı solunum yolu örneklerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile Legionella türlerinin saptanmasını değerlendirmektir.

Yöntemler: Göğüs hastalıkları yoğun bakım ünitesinde yatan atipik pnömonili hastaların bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen transtrakeal aspirasyon ve bronkoalveolar lavaj sıvı örnekleri Legionella pneumophila 16S rRNA'nın 386 bp'lık bölgesini hedefleyen Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile incelenerek Legionella türleri açısından araştırılmıştır.

Bulgular: Elli altı örnek üzerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile yapılan denemeler sonucunda yalnızca bir örnekte Legionella spp. saptanabilmıştır.

Sonuç: Atipik pnömoni tanısı alan hastaların solunum örneklerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu yönteminin Legionella spp saptanmasında hızlı ve etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Bronkoalveolar lavaj sıvısı, transtrakeal aspirasyon, Legionella spp, PZR

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the detection of Legionella species from the respiratory tract samples by Polymerase Chain Reaction method.

Methods: The bronchoalveolar lavage fluid and transtracheal aspiration samples of patients with atypical pneumonia hospitalized in the Intensive Care Unit of Chest Diseases Department were examined to identify Legionella species by Polymerase Chain Reaction method. This method was performed to amplify a 386-bp product within the 16SrRNA gene of Legionella pneumophila in these samples sent to Bacteriology Laboratory of this department.

Results: The Polymerase Chain Reaction method was applied to 56 respiratory samples and only in one specimen Legionella species was identified.

Conclusion: It was concluded that for patients with atypical pneumonia Polymerase Chain Reaction method is fast and effective to isolate Legionella species from the respiratory samples.

Key words: Bronchoalveolar lavage fluids, transtracheal aspiration, Legionella spp, PCR

Alındığı tarih: 06.09.2011

Kabul tarihi: 18.09.2011

Yazışma adresi: Doç. Dr. Şöhret Aydemir, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-35100-İzmir
e-mail: sohret1990@yahoo.com

GİRİŞ

Legionella pneumophila, atipik pnömoni etkenlerinden biri olup, görülme sıklığı ülkelerin özelliklerine göre değişmekle birlikte, %1-27 arasında bildirilmektedir^(1,2,3). İleri yaş, renal yetmezlik, steroid, siklosporin, azotioprin gibi immun süpresyona neden olan ilaçların kullanımı ve CD3 gibi monoklonal antikor tedavisi enfeksiyonu kolaylaştırıcı nedenlerdir⁽⁴⁾.

Tanıda kültür altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, bakterinin özel besiyeri gerektirmesi, güç ve zayıf üremesi nedeniyle *Legionella* antijenlerini saptamaya yönelik serolojik testlere daha sık başvurulmaktadır. Ancak, balgamdan direkt floresan testi ile *Legionella* antijenlerinin saptanması yalnızca belli serotipler için kullanılabilir (5-9). Ayrıca *Legionella*'ların hem hücre içi patojen hem de boyutlarının çok küçük olmaları nedeniyle antijenlerini saptamak güçtür. *L. pneumophila* serogrup 1' in lipopolisakarit antijenlerini hastalık başlangıcından itibaren idrarda saptamak olasıdır. Yöntemin duyarlılığı hastalığın şiddetine bağlı olarak değişebilmekle beraber, özgüllüğü oldukça yüksektir (5-9).

Hastalık sırasında etkene özgü antikorların ise geç oluşması ve hastalık sonrasında da uzun süre yüksek titrelerde devam edebilmeleri nedeniyle, akut enfeksiyonların tanısında antikor saptamaya yönelik testler daha çok epidemiyolojik araştırmalar için kullanılmaktadır.

Tüm bu nedenlerden dolayı, *L. pneumophila* enfeksiyonlarının tanısında duyarlılığı yüksek ve kısa sürede sonuç veren tanı yöntemlerine giderek daha fazla gereksinim duyulmaktadır.

Son yıllarda mikrobiyolojinin birçok alanında olduğu gibi *L. pneumophila* tanısında da kısa sürede sonuç veren moleküler tanı yöntemleri uygulanmaya başlanmıştır. Karşılaştırmalı çalışmalarda en yüksek duyarlılık nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) ile olan testlerdedir (5-9).

Bu çalışmanın amacı, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile atipik pnömoni olgularında *Legionella pne-*

umophilia varlığını araştırmak ve PZR yönteminin rutin uygulamada kullanılabilirliğini değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Göğüs hastalıkları yoğun bakım ünitesinde yatan ve atipik pnömoni ön tanısı alan hastalardan, rutin tanı amacıyla bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen transtrakeal aspirat (TTA, n=32) ve bronkoalveolar lavaj (BAL, n=24) örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir.

Laboratuvarda, bu örnekler gerekli rutin tetkikler için kullanıldıktan sonra -80°C'de korunmuştur. Toplam 56 örnek üzerinde çalışılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler ön hazırlık olarak homojenizasyon-dekontaminasyon işlemine tabii tutulmuştur. Homojenizasyon-dekontaminasyon sıvısının hazırlanması için 50 mL %2.94 trisodyum sitrat- 3H₂O (0.1 M) ile 50 mL %4'lük NaOH karıştırılmıştır. Bu solusyona 0.5 gram toz N-asetil-L-sistein (NALC) eklenmiştir ve aşağıdaki şekilde örnekler işlemlenmiştir:

1. Örnekle eşit miktarda solüsyon karıştırılmış.
2. Karışımı iyice homojenize edecek şekilde 15-20 saniye vortekslenmiştir ve oda ısısında 15 dk. bekletilmiştir.
3. Üzerine 50 mL PBS eklenmiştir.
4. 15-20 dk. 2000-3000 g'de santrifüj edilmiştir.
5. Süpernatant dökülerek alt kısım ekstraksiyon aşamasına kadar -80°C'de saklanmıştır.

DNA ekstraksiyonu: Ön hazırlık sonrası DNA ekstraksiyonu üretici firma önerileri doğrultusunda yapılmıştır (NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel Inc. PA, USA).

PZR: Çalışmada kullanılan primerler; *L. pneumophila* ATCC 33152'nin yaklaşık 451. bazı ile 837. bazı arasındaki 16S r RNA geninin bir bölümünü amplifiye edebilecek özellikte olup, kullanılan primerler ve yapılan işlemler aşağıda özetlenmiştir⁽¹⁰⁾. Forward primerler: JFP: 5'-AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC

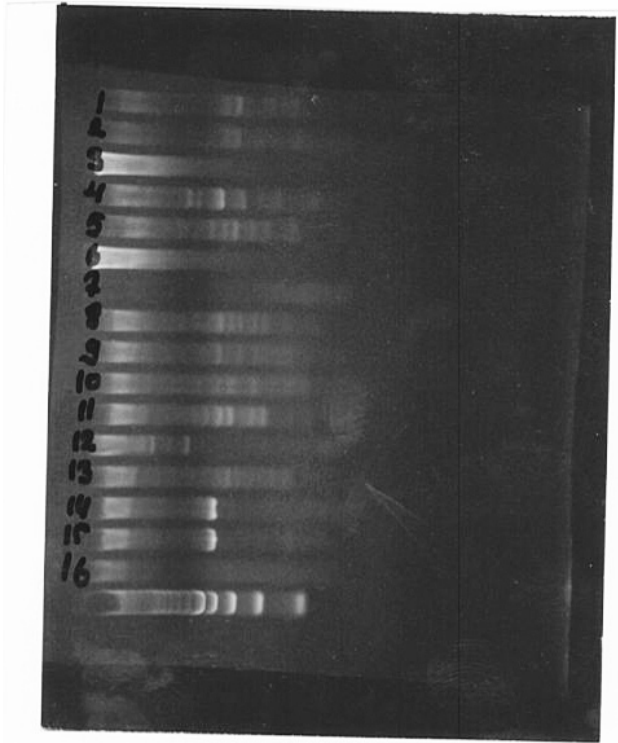
Revers primerler: JRP: 5'-CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG

PZR uygulaması: Her bir örnek için: estrakte edilmiş template DNA'dan 5 µl, 10 pmol'lük primerlerden (JFP ve JRP) 5'er µl, 5U/µl AmpliTaqGold'dan 0.7 µl, 10 mM dNTP'den 1µl, Taq Buffer'dan 5µl ve 28.3 µl dH₂O toplamı 50 µl olacak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Termal döngüler Techne TC-512 sisteminde yapılmıştır. Isı döngü uygulaması başlangıçta 10 dk. 37°C'de inkübasyonla başlamıştır. 20 dk. 95°C'de tutulmuş ardından 38 döngü 94°C'de 45 saniye, 57°C'de 45 saniye ve 72°C'de 45 saniye ve final ekstansiyon 72°C'de 60 dk. şeklinde tamamlanmıştır. Karışım bu ısıda jel görüntüleme işlemine dek tutulmuştur.

Amplikon saptama:

PZR amplikonundan 10 µl, %2'lik agoroz jele yüklenip elektroforez sonrası ethidium bromide ile görüntülenmiştir.



DNA LAD: 100 base

Şekil 1. Agoroz gel elektroforezde *Legionella* spp.ait 16S rRNA-geninin gösterilmesi (14 numara pozitif örnek, 15 numara pozitif kontrol).

Çalışmada pozitif kontrol olarak *L. pneumophila* ATCC 33152 kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya, mikrobiyoloji ve klinik mikrobiyoloji anabilim dalı, rutin bakteriyoloji laboratuvarına göğüs hastalıkları yoğun bakım ünitesinden atipik pnömoni ön tanısı ile yatan hastalara ait 56 örnek (32 TTA+24 BAL) dahil edilmiştir. Atipik pnömoni ön tanısı ile gönderilen 56 örneğin yalnızca biri PZR ile pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1). Söz konusu örnek göğüs hastalıkları yoğun bakım ünitesinde yatan erkek bir hastaya ait bronkoalveolar lavaj örneği olup, hastanın DFA sonucu da negatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan DFA testi ile çalışmaya dahil edilen örneklerin hiçbirinde pozitif sonuç saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Uzun yıllar *Legionella* infeksiyonlarının tanısında kültür altın standart olmuştur. Kültür sonuçları için günlerce beklemek zorunda kalınmıştır. Daha hızlı sonuç alınabilecek test yöntemlerinin arayışına gidilmiştir. Dokudan direkt histokimyasal boyama, dokunun ya da solunum örneklerinin floresan antikor boyaması, idrardan antijen saptanması ve seroloji gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Birçoğu kullanışlı olmuş, ancak yeterli duyarlılık ve özgüllüğe ulaşamamıştır. Son yıllarda *Legionella* enfeksiyonlarının tanısında moleküler tanı yöntemleri konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak değerlendirmeye çalışılmaktadır⁽¹⁰⁾.

PZR yöntemleri, klinik örneklerden *Legionella* infeksiyonlarının tanısında hız, özgüllük ve duyarlılığı arttıran testlerdir^(5,11). Günümüzde tanı amaçlı PZR testlerinde amplifikasyon için çeşitli hedef bölgeleri seçilmektedir. Birçok çalışmada 16S rRNA içindeki spesifik bölgeler, 23S-5S spacer bölgesi, 5S rRNA ya da makrofaj inhibitör potentiator geni (*mif*) kullanılmıştır. Bu çalışmada ise 386-bp'lık 16S rRNA bölü-

mü amplifiye edilmiştir. Jones ve ark. kullandığı primerler (JFP, JRP) birçok araştırmacı tarafından kullanılmış olup, 16S rRNA geninin yaklaşık 451 ile 837 bazları arasını içermektedir⁽¹⁰⁾. Yapılan çalışmalar sonucunda bu primerler kullanılarak başta *L. pneumophila* olmak üzere *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. longbeacheae*, *L. feeleii* ve *L. dumofii* gibi tıbbi önemi olan *Legionella* türlerinin saptanabildiği de gösterilmiştir. Ayrıca büyük amplifikasyon ürünleri elde edildiğinden, agaroz jel elektroforezinde kolaylıkla görünebilirler^(10,11).

Bazı araştırmacılar, PZR'ın alt solunum yolu örneklerinde kültür kadar duyarlı olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle de özellikle balgam çıkaran hastalarda seçilmesi gereken yöntem olarak önerilmektedir⁽⁵⁾. Ancak, laboratuvar yapımı ve ticari olarak bulunan testlerde yanlış pozitif sonuçlar bildirilmiştir. Çalışmalardaki yanlış pozitifliği değerlendirirken, kültür olan referans yöntemin başarısızlığı mı, yoksa gerçek bir yalancı pozitiflik mi gibi sorunlar yaşanmaktadır. Henüz bu sorunu çözmek kolay değildir çünkü etiyojisi belli olmayan pnömonilerde *Legionella* PZR'ının tam duyarlılığı ve özgüllüğünü belirleyecek iyi tasarlanmış bir çalışma yoktur^(5,11,12).

Kırk altı laboratuvarın katıldığı 2004-2005 yıllarında yapılan kalite kontrol çalışmasında katılımcıların %93'ü laboratuvar yapımı yöntemler kullanmıştır. Yanlış pozitiflik 2004 yılında %4 iken, 2005 yılında %8.2 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, nükleik asid testlerinin tüm laboratuvarlarda tam standardize edilememiş olduğunu göstermektedir. Bu nedenle laboratuvar çalışanları ve klinisyenler sonuçları değerlendirilirken klinik bulguların yanı sıra lokal epidemiyolojik verileri de göz önünde bulundurmalarıdır⁽⁵⁾. Çalışmamızda tek bir pozitif sonuç saptanmıştır. Bu sonuç hastanın kliniğiyle ve ön tanısıyla uyumlu bulunmuştur. Pozitif kontrol ve negatif kontrollerin her bir elektroforezde kullanılması ve saptanan 386 bp-lik amplifikasyon ürünü pozitif kontrolle uyumlu olması nedeniyle, yalancı pozitif sonuç düşünülmüştür. Cloud ve ark.⁽¹⁰⁾ PZR pozitif çıkan tüm örneklerin sekansı yapılarak doğrulanması gerektiğini, bu

sayede özgüllüğün çok daha artabileceğini bildirmiştir. Korosec ve ark.⁽¹³⁾ antimikrobiyal tedavinin, alt solunum yolu örneklerinde *Legionella* DNA'sının saptanmasında özgüllüğü çok düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmada elde edilen düşük pozitiflik oranı, hastaların yoğun bakımda yatan hastaların olması ve yoğun antimikrobiyal tedavi almaları ile kısmen açıklanabilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar konvansiyonel moleküler yöntemlerden daha az iş yükü gerektiren ve daha hızlı (örnek geldikten yaklaşık 2-3 saat sonra) sonuçlanan gerçek-zamanlı PZR yöntemleri üzerindedir. Ticari olarak gerçek-zamanlı PZR kitleri bulunmaktadır^(11,12,14).

Sonuç olarak, solunum örneklerinde *Legionella*'ya özgül 16S rRNA'nın 386 bp'lık bölgesini hedefleyen PZR yönteminin 6-8 saat içinde hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiğini, ancak sonuçlarımızın ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Yu VL. Legionella pneumophila (Legionnaires' disease). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed, Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005: p.2711.
2. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med 1977;297:1197-203. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197712012972202> PMID:335245
3. Cosentini R, Tarsia P, Blasi F, Roma E, Allegra L. Community acquired pneumonia: role of atypical organisms. Monaldi Arch Chest Dis 2001;56:527-34. PMID:11980285
4. Shelhamer JH, Toews GB, Masur H, Suffredini AF, Pizzo PA, Walsh TJ, et al. Respiratory disease in the immunosuppressed patient. Ann Intern Med 1992;117:415-31. PMID:1503334
5. Diederer BM, Legionella spp. and Legionnaires' disease, J Infect 2008;56(1):1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2007.09.010> PMID:17980914
6. Wolf J, Daley AJ. Microbiological aspects of bacterial lower respiratory tract illness in children: atypical pathogens. Pediatr Respir Rev 2007;8:212-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2007.07.004> PMID:17868919
7. Mülazımoğlu L, Legionella (Lejyoner Hastalığı), IN: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Etkenlere göre İnfeksiyonlar. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002: p.1667-70.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology, 6 th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2009; p.365-9.
9. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger

- P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins, Baltimore, 2006; p.549-562.
10. 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.
 11. Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of Legionella DNA in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2001;39:2904-10.
 12. Templeton KE, Scheltinga SA, Sillekens P, Crielaard JW, van Dam AP, Goossens H, et al. Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of Legionella pneumophila and other Legionella species. *J Clin Microbiol* 2003;41:4016-21.
 13. Korosec P, Silar M, Rezen R, Kosnik M, The influence of antimicrobial therapy on the sensitivity of Legionella PCR, *Scan J Infect Dis* 2006;38:925-28.
<http://dx.doi.org/10.1080/00365540600561777>
PMid:17008241
 14. Murdoch D, Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *APMIS* 2004;112:713-27.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1202.x>
PMid:15638835