Gemilerin Su Sistemlerinden İzole Edilen *Legionella* Türleri ve Moleküler Karakterizasyonu

Legionella Species Isolated in the Water Systems of Ships and Their Molecular Characterization

Mahmut ÜLGER¹(ID), Seda TEZCAN ÜLGER²(ID), Aslıhan BEKÇİ²(ID), Selin Nar ÖTGÜN³(ID), Nuran DELİALİOĞLU²(ID), Gönül ASLAN²(ID)

¹ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

³ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı, Ankara.

³ Turkish Public Health Institution, National Respiratory Pathogens Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

*Bu çalışmaya ait ilk veriler, 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (18-22 Kasım 2015, Antalya)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Ülger M, Tezcan Ülger S, Bekçi A, Ötgün SN, Delialioğlu N, Aslan G. Gemilerin su sistemlerinden izole edilen *Legionella* türleri ve moleküler karakterizasyonu. Mikrobiyol Bul 2022;56(1):11-24.

ÖZ

Legionella türleri genelde doğada ve su kaynaklarında bulunmakta olup, su sistemlerinden insana aerosol veya aspirasyon yoluyla bulaşarak pnömoniye neden olan gram negatif basillerdir. Etkenin neden olduğu Lejyoner hastalığı yolcu gemilerinde halen halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Yaptığımız bu çalışmada, Mersin Uluslararası Limanı'na yanaşan gemilerin su sistemlerinden alınan su örneklerinde kültür yöntemiyle *Legionella* türlerinin kolonizasyonunun yaygınlığının ve izole edilen *Legionella*'ların moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Aralık 2014-Haziran 2015 tarihleri arasında Mersin Uluslararası Limanı'na yanaşan 18 feribot ve/veya yük gemisinden toplam 158 soğuk su örneği alınmıştır. Örneklerin 54'ü depo, 68'i musluk ve 36'sı duş başlıklarından elde edilmiştir. Alınan tüm örnekler santrifüj edilmiş ve çöktürden demir pirofosfat, L-sistein ve α -ketoglutarat içeren "supplement" (Oxoid, SR0110, İngiltere) eklenmiş "Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE)" (Oxoid, CM0655, İngiltere) agar besiyerine ekimi yapılmıştır. Besiyerleri 37°C'de desikatörde mikroaerofilik ortamda 10-15 gün inkübe edilmiştir. Kültürlerde üreyen şüpheli kolonilerin lateks aglütinasyon testi (Oxoid, DR0800M, İngiltere) ve direkt floresan antikor yöntemiyle (m-Tech Monoclonal Technologies, Inc., ABD) serogruplandırılması yapılmıştır. Kültürde üreyen *Legionella* türlerinin moleküler analizi için *Legionella* kolonilerinden DNA izolasyonu yapılmış ve sonrasında *Legionella* genomunun rpoB gen bölgesini hedefleyen özgül primer dizileri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra rpoB gen ürünlerinin direkt DNA dizi analizi ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA dizilerinin BLAST analiziyle tiplendirilmesi yapılmış ve belirlenen tipler ile National Center for Biotechnology Information (NCBI) referans *Legionella*

İletişim (Correspondence): Dr. Öğr. Üyesi Mahmut Ülger, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yenişehir Kampüsü, 33169, Yenişehir, Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324 341 28 15-12152, **E-posta (E-mail):** mahmutulg@yahoo.com.tr

dizileri Mega 7 programında "Neighbor-Joining" karşılaştırma yöntemiyle filogenetik olarak karşılaştırılmıştır. Toplam 158 örneğin 18 (%11.4)'ünde *Legionella* spp. izole edilmiştir. Bunlardan dördü (%7.4, 4/54) depo, 11 (%16.2, 11/68)'i musluk ve üçü (%8.33, 3/36) duş başlığından tespit edilmiştir. Üreyen bakteri kolonilerinden yapılan lateks aglütinasyon testiyle izolatların beşi (%27.8) *Legionella* spp., dördü (%22.2) *Legionella pneumophila* sg 5, ikisi (%11.1) *L.pneumophila* sg 1, ikisi (%11.1) *L.pneumophila* sg 8, ikisi (%11.1) *Legionella bozemanii* ve biri (%5.6) *L.pneumophila* sg 3 olarak serogruplandırılmıştır. Kültürde üreyen izolatlardan ikisi (%11.1) ise serogruplandırılmamıştır. Toplam 12 *Legionella* izolatının moleküler karakterizasyonu yapılabilmektedir. Bunlardan biri serolojik olarak *L.bozemanii* olarak serogruplandırılmış olup, BLAST programında NCBI *Legionella* dizi verileriyle karşılaştırıldığında *Legionella rubrilucens* ile %99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Serogruplandırma ile ayrımı yapılamayan bir izolat ise DNA dizi analizi sonrası BLAST programında *Legionella erytra* olarak tanımlanmıştır. Kalan 10 izolat (%55.6, n= 18) ise referans NCBI dizileri ile karşılaştırılma sonrası *L.pneumophila* olarak doğrulanmıştır. Çalışmamızda Mersin Uluslararası Limanı'na yanaşan gemilerin su sistemlerinden toplanan su örneklerinin %11.4'ünün *Legionella* türü ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen *Legionella* türleri, gemilerde seyahat eden kaptan, gemi çalışanları ve yolcular için önemli enfeksiyon kaynağı olma potansiyeline sahiptir. Bu doğrultuda, yaptığımız bu çalışma gemilerin su sistemlerinde *Legionella* risk yönetiminin iyileştirilmesine yönelik çalışmaların oluşturulması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: *Legionella*; gemi; su sistemleri; kültür; dizi analizi.

ABSTRACT

Legionella species are generally found in nature and in water resources, and they are gram negative bacilli that can cause pneumonia by being transmitted from water systems to humans via aerosol or aspiration. Legionnaires' disease caused by this agent continues to be a public health problem in cruise ships. In this study, it was aimed to determine the prevalence of the colonization of *Legionella* species by culture method and to determine the molecular characterization of the isolated *Legionella* in water samples taken from the water systems of the ships docking in Mersin International Port. A total of 158 cold water samples were taken from 18 ferry and/or cargo ships docking in Mersin International Port between December 2014 and June 2015. Fifty-four of the samples were obtained from tanks, 68 from taps and 36 from shower heads. All samples were centrifuged and inoculated from the pellet onto "Buffered Coal Yeast Extract" (BCYE) (Oxoid, CM0655, UK) agar medium supplemented with iron pyrophosphate, L-cysteine and α -ketoglutarate (Oxoid, SR0110, UK). The culture plates were incubated for 10-15 days in microaerophilic environment in a desiccator at 37°C. The suspicious colonies grown in cultures were serogrouped by latex agglutination test (Oxoid, DR0800M, UK) and fluorescent antibody method (m-Tech Monoclonal Technologies, Inc., USA). For the molecular analysis of *Legionella* species grown in culture, DNA isolation was made from *Legionella* colonies and then polymerase chain reaction amplification was performed using specific primer sequences targeting the *rpoB* gene region of the *Legionella* genome. Direct DNA sequencing of *rpoB* gene products was performed in the "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, USA). The DNA sequences were typed by BLAST analysis and the determined types, and NCBI (National Center for Biotechnology Information) reference *Legionella* sequences were phylogenetically compared with the Neighbor-Joining comparison method by using the Mega 7 program. *Legionella* spp. was isolated in 18 (11.4%) of 158 samples. Of these, four (7.4%, 4/54) were detected from the tank, 11 (16.2%, 11/68) from the tap and three (8.33%, 3/36) from the shower head. After the latex agglutination test performed from the growing bacterial colonies, five (27.8%) were serogrouped as *Legionella* spp., four (22.2%) as *Legionella pneumophila* sg 5, two (11.1%, each) as *L.pneumophila* sg 1, *L.pneumophila* sg 8 and *Legionella bozemanii* and one (5.6%) as *L.pneumophila* sg 3. Two (11.1%) of the isolates grown in culture could not be serogrouped. Molecular characterization of 12 *Legionella* isolates could be performed. One of them was serologically serogrouped as *L.bozemanii*, and it was found to be 99% similar to *Legionella rubrilucens* when compared with NCBI *Legionella* sequence data in the BLAST program. One isolate that could not be differentiated by serogrouping was identified as *Legionella erytra* in the BLAST program after DNA sequence analysis. The remaining 10 isolates (55.6%, n= 18) were confirmed as *L.pneumophila* after the comparison with reference NCBI sequences. In this study, it was determined that 11.4% of the water samples collected from the water systems of the ships docking in Mersin International Port were contaminated with *Legionella* species. The detected *Legionella* species have an important potential source of infection for the captain, ship workers and passengers

travelling on the ships. In this respect, this study reveals the necessity of establishing studies to improve the risk management of *Legionella* in the water systems of ships.

Keywords: *Legionella*; ship; water systems; culture; sequence analysis.

GİRİŞ

Legionella türleri genelde doğada toprakta ve su kaynaklarında bulunan gram negatif basillerdir¹. *Legionella* türleri çoğu çevresel örneklerden izole edilen ve biyokimyasal özellikleriyle genetik ve serolojik analizlerle ayrımı yapılan 58 tür ve 70'ten fazla serogrup içermektedir^{2,3}. *L.pneumophila*, insanlarda yüksek mortalite oranına sahip Lejyoner hastalığı ve kendini sınırlandıran grip benzeri enfeksiyonla seyreden "Pontiac" ateşine neden olmaktadır⁴. *Legionella* türlerinin dünya genelinde toplum kökenli pnömoni olgularından sorumlu tutulan patojenlerin %3-10'unu oluşturduğu bildirilmektedir⁵. *L.pneumophila* 15 serogruptan oluşmuştur ve bütün tür ve serogruplar arasında en patojenik olan özellikle *L.pneumophila* serogrup 1 olup⁶, Avrupa ve Amerika'da klinik izolasyonların %90'ından fazlasında görülmektedir¹. *L.pneumophila* aynı zamanda su ve toprak gibi çevresel ortamlardan izole edilen en yaygın türdür⁷. İnsanlarda daha az sıklıkta hastalık etkeni olarak tanımlanan diğer *Legionella* türleri, *L.micdadei*, *L.bozemanæ*, *L.dumoffii* ve *L.longbeachæ*'dir³.

Legionella türleri dünya genelinde bir dağılıma sahiptir ve su dağıtım sistemleri, soğutma üniteleri, jakuziler¹ ile aerosol oluşturan duş başlıkları, musluklar, dekoratif havuzlar ve solunum tedavi ekipmanları gibi insan yapımı su sistemlerinde⁸ yaygın olarak bulunmaktadır. Doğal yaşam alanları su olan *Legionella*'ların su sistemlerinde persistansını sağlayan yaygın faktörler arasında boruların yüzeyine tutunma ve biyofilm oluşumu, amiplerde üreme, düşük organik maddeli ortamlarda üreme, düşük oksijen seviyeli ortamlarda üreme ile dezenfektan direnci bulunmaktadır^{9,10}. Ancak bağışıklığı zayıflamış kişiler, yaşlılar ve altta yatan solunum rahatsızlıkları olan bireylerde toplum kökenli⁴ veya sağlık tesislerinin su dağıtım sistemlerinde bulunduklarında özellikle immünsüpre hastalarda nozokomiyal enfeksiyon riski oluşturmaktadır¹¹. Duyarlı bireyler *Legionella* türleri ile kontamine aerosollerin inhalasyonu veya suların aspirasyon yolu ile enfekte olmaktadır¹². *Legionella* spp. duş başlıklarında ve spa havuzlarında 25°C ile 50°C arasındaki ılık su sıcaklıklarında çoğalabilir, bu da duşlardan ve diğer sıhhi tesisat armatürlerinden kaynaklanan aerosolizasyon yoluyla potansiyel maruziyete yol açabilir¹³. Lejyoner hastalığı salgınları, daha çok hastane ve oteller gibi kalabalık topluluklarda bildirilmekte olup, yolcu gemileri ve feribotlarda seyahat yapan yolcular arasında da Lejyoner hastalığı olguları oldukça sık bildirilmiştir¹⁴.

Gemiler, *Legionella* türlerinin çoğalması yönünden yüksek riskli ortamlar olarak kabul edilirler. Bunlar özellikle gemilerdeki su depolama ve dağıtım sistemlerinde gemi hareketi ile dalgalanma ve geri sifonaj riskinin bakteriyel kontaminasyona sebep olabilmesi, içme suyunun sıcaklığının makine dairesi gibi bazı alanlarda yüksek sıcaklıklara ulaşması ve bazı tropikal bölgelerde daha yüksek su sıcaklıkları nedeniyle tanklarda veya borularda uzun vadeli depolama ve durgunluk nedeniyle bakteriyel çoğalmaya uygun ortam sağ-

laması olarak sayılabilir¹³. Gemilerde güvenli içme suyunun sağlanması hem yolcuların hem de gemi çalışanlarının sağlığı için kritik öneme sahiptir¹⁵. Dünya Sağlık Örgütü, gemilerde su kaynaklı salgın riskinin içme suyunun uygun şekilde kullanılması ve su dağıtım sistemlerinin bakımı yoluyla azaltılabileceğini kabul etmektedir¹³.

Legionella türlerinin su sistemlerinden saptanmasında primer tespit yöntemleri kültür ve moleküler tekniklere dayalı yöntemlerdir¹⁶. Kültüre dayalı yöntemler canlı bakterilerin elde edilmesi ve doğrulanmasında kullanılmaktadır ve bu sebeple enfeksiyöz patojenlerin belirlenmesinde altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak kültüre dayalı yöntemlerin emek yoğun, zaman alıcı olmaları ve deneyimli personel gerektirmesi dezavantaj olarak kabul edilmektedir¹⁷. Diğer yandan *Legionella*'ların zor üreyen yapısı ve üreme için uzun inkübasyon periyoduna gereksinim duyması izolasyon ve identifikasyonu zorlaştırmaktadır. Ancak kültür, izolatlardan "pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)" ile moleküler tiplendirmeye olanak sağladığı için salgınların incelenmesinde oldukça önemlidir¹⁶. Moleküler tekniklere dayalı yöntemlerin ise az sayıda bakteri olsa bile saptayabilme özelliği, yüksek duyarlılık ve özgüllükleri, kültürü yapılamayan etkenleri saptama ve kısa sürede sonuçlanması avantajlı yönleridir¹⁷. Klinik ve çevresel örneklerden hızlı, duyarlı ve özgül bir biçimde *L.pneumophila*'nın tespiti ve diğer *Legionella* türlerinden ayrılmasında 23S rRNA'yı hedefleyen, multipleks gerçek zamanlı PCR tekniği kullanılabilmektedir¹⁶. Fenotipik olarak kültürde üreyen çeşitli *L.pneumophila* serogruplarının belirlenmesinde ve *L.pneumophila*'nın diğer *Legionella* türlerinden ayrılmasında monoklonal antikorları içeren çeşitli immünolojik teknikler kullanılmaktadır. Genotipik olarak da PFGE, "amplified fragment length polymorphism (AFLP)" ve genomik dizinin analizine dayanan yöntemlerle tiplendirme yapılabilmektedir¹⁸.

Son yıllarda uluslararası gemi trafiği hacmi önemli ölçüde artmış olup¹⁹, enfeksiyöz hastalıklara yakalanma riskini artırmıştır. Seyahatle ilişkili enfeksiyonlar içinde, gemi yolcuları arasında giderek artan Lejyoner hastalığı insidansı bildirilmektedir²⁰. Ülkemizde ve bölgemizde yolcu ve/veya yük gemilerinin su sistemlerinde *Legionella* bakterileri yönünden içme veya kullanma suyu kaynaklı risk konusunda bir bilgiye rastlanmamıştır. Kesitsel tipteki bu çalışmada, Mersin Uluslararası Limanı'na yanaşan gemilerin su sistemlerinden alınan su örneklerinde *Legionella* türlerinin kolonizasyonunun kültür yöntemi ile ortaya konularak yaygınlığının belirlenmesi ve izole edilen *Legionella*'ların moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çevresel örneklerden yapılmış olan bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na yapılan başvuru sonrası Etik Kurul Onayı gerekmediği sözlü olarak bildirildi.

Çalışmanın gerçekleştirilmesi için T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Hudut ve Sahiller Sağlık Genel Müdürlüğü, Mersin Sahil Sağlık Denetleme Merkezinden izin alındı (Tarih: 02.09.2021 ve Sayı: E-16364792-367).

Su Örneklerinin Toplanması

Çalışmada, Aralık 2014 - Haziran 2015 tarihleri arasında Mersin Uluslararası Limanı'na yanaşan 16'sı yük gemisi ve ikisi feribot olmak üzere 18 gemiden toplam 158 örnek alındı. Çalışmaya dahil edilen örneklerin 54'ü depo, 68'i musluktan elde edilen soğuk su örnekleri, 36'sı duş başlıklarından elde edilen sürüntü örnekleriydi. Su örneklerinin alınmasında, 100 ml'lik ağzı vida kapaklı steril kahverengi şişeler kullanıldı. Bunun için depoların tahliye muslukları ve genel kullanım amaçlı musluklar açılıp, özellikle depolama tanklarının dibinde türbülans oluşturarak sedimentteki bakterinin suya geçmesi için yaklaşık bir dakika tazyikli biçimde akıtıldıktan sonra 100'er ml su örneği alındı. Sürüntü örnekleri için de eküvyon çubukları kullanılmış olup, önce örnek alınacak duş başlığı hafifçe açılıp birkaç damla su akıtıldı. Duş başlığı da ıslatıldıktan sonra eküvyon çubukla tüm yüzeyinden sürüntü örneği alındı. Daha sonra eküvyonlar, örnek aldığımız duştan eklenmiş su içeren steril tüplerin içine aktarıldı. Depo, musluk ve duş başlıklarından alınan su ve sürüntü örnekleri bir saat içerisinde laboratuvara getirildi²¹.

Bakteriyolojik Kültür

Laboratuvara ulaştırılan su örnekleri 3500 devirde 30 dakika santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı. Santrifüj işleminden sonra örneklerin süpernatant kısmı atıldı. Su sistemlerinden *Legionella* cinsi bakterilerin üretilmesinde L-sistein içeren BCYE agar kullanımı tavsiye edilmektedir²². Santrifüj sonrası kalan dip çökelti vortekslelendikten sonra 0.1 ml örnek alınarak, demir pirofosfat, L-sistein ve α -ketoglutarat içeren suplement (Oxoid, SR0110, İngiltere) eklenmiş BCYE (Oxoid, CM0655, İngiltere) agara ekildi. Kültürü yapılan besiyerleri 37°C'de desikatörde mikroaerofilik ortamda 10-15 gün inkübe edildi.

Kültürlerde üreyen kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram boyamada zayıf boyanmış, şüpheli ince gram negatif basiller görülmesi durumunda; *Legionella* türü bakterilerin koyun kanlı agarda ürememe özelliği göz önünde bulundurularak koloniler bu besiyerine pasajlandı. Ayrıca şüpheli koloniler çoğaltmak için BCYE agara pasajları yapılarak 24-48 saat 37°C etüve kaldırıldı.

Legionella Serogruplarının Belirlenmesi

Koyun kanlı agarda üremeyip BCYE agarda üreyen şüpheli kolonilerin lateks aglütinasyon testi ile kit prosedürü doğrultusunda (Oxoid, DR0800M, İngiltere) serotiplendirilmesi yapıldı. Lateks aglütinasyon test seti genellikle en sık serogrup veya türlerin polivalan reaktiflerini içermektedir; bunlar *L.pneumophila* serogrup 1 antiserumu, *L.pneumophila* serogrup 2-14 için polivalan antiserum ve *L.pneumophila* dışında sık rastlanan diğer türler (*L.longbeachae* 1 ve 2, *L.bozemanii* 1 ve 2, *L.dumoffii*, *L.gormanii*, *L.jordanis*, *L.micdadei* ve *L.anisa*) için polivalan antiserum şeklindedir.

İzolatların özgül serogruplarının belirlenmesi amacıyla özgül monoklonal antikorlar (m-Tech Monoclonal Technologies, Inc., ABD) kullanılarak direkt floresan antikor yöntemi uygulandı.

Moleküler Analiz

Bakteriyel DNA İzolasyonu

Hızlı DNA izolasyon yöntemiyle BCYE agarda üreyen *Legionella* spp. kolonilerinden DNA elde edildi. Bunun için besiyerinde üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak, 1.5 ml'lik ependorf tüplerinde 1 ml steril distile su içerisinde süspanse edildi. Tüpler, 80°C'de 20 dakika tutularak bakterilerin parçalanması sağlandı. Daha sonra ependorf tüpü 12 000 x "gravity (g)" düzeyinde 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Çökelti üzerine 200 µl kloroform ve 200 µl steril distile su ilave edildikten sonra karışım 12 000 x g'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi. Süpernatant analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı ve PCR amplifikasyonunda kalıp DNA olarak kullanıldı.

Legionella PCR Amplifikasyonu

Kültürde üretilen *Legionella* türlerinin moleküler analizi için rpoB gen bölgesinin 369 baz çifti (bp) büyüklüğünde bir bölgesini hedefleyen oligonükleotit primer dizileri (RL1; 5'-GAT GAT ATC GAT CAY CTD GG-3' ve RL2; 5'-TTC VGG CGT TTC AAT NGG AC-3') kullanarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi². Her bir örneğin PCR amplifikasyonu 50 µl'lik reaksiyon hacimlerinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 5 µl 10X PCR tampon, 2.5 µmol/µl MgCl₂, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, 0.2 pmol/µl her bir primer dizisi, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve 5 µl örnek DNA'sı içermektedir. Örneklerin ısı döngü cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Almanya) amplifikasyon koşulları ise, 95°C'de beş dakika başlangıç denatürasyonu, arkasından 30 siklus 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye primer bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama basamakları ve arkasından 70°C'de beş dakika son uzama basamaklarını içermektedir. PCR ürünleri, %1.5'luk agaroz jel elektroforezinden sonra 0.5 µg/ml etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole transiluminatörde görüntülendi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin DNA Dizi Analizi

Legionella izolatlarının amplifiye edilen rpoB kısmi gen bölgesi PCR ürünlerine direkt DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Toplam 13 izolata ait PCR ürünlerinin "sense" ve "anti-sense" dizileri "Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak dizi analizi gerçekleştirildi. Dizi analizi verileri "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, ABD) kromatogram şeklinde toplandı.

Her örneğe ait "sense" ve "anti-sense" dizi analizi verileri CLUSTAL X versiyon 1.83 yazılım programıyla hizalandıktan sonra GENDOC versiyon 2.6.002 (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility) yazılım programı ile konsensus dizi olarak kaydedildi. Her bir izolata ait dizisi çıkarılan rpoB gen bölgeleri, the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programına yüklenerek, Gen-Bankası veri tabanında yayımlanmış referans *Legionella* dizi verileriyle karşılaştırıldı ve *Legionella* türlerinin doğrulanması yapıldı. Değerlendirmede, bit-score, maksimum identity (karşılaştırmada identik dizilerin sayısı) ve E-değeri (karşılaştırmının istatistiksel anlamı) çıktıları göz önünde bulunduruldu. *Legionella* izolatlarının belirlenmesinde, en benzer ve anlamlı sonuç veren dizi eşleşmeleri temel alındı.

Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz için dizi analizi gerçekleştirilen *Legionella* izolatları ve referans "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" *Legionella* dizilerinin filogenetik karşılaştırması MEGA versiyon 7.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi²³ ve filogenetik ağaç "Neighbor-Joining" yöntemiyle oluşturuldu.

NCBI dizilerinin GenBank erişim numaraları: AF087812.1; *L.pneumophila*, AF101273.1; *L.pneumophila*, AF113670.1; *L.pneumophila*, AF113669.1; *L.longbeachae*, AF101271.1; *L.longbeachae*, AF101270.1; *L.bozemanii*, AF101272.1; *L.micdadei*, AF367729.1; *L.erythra*.

BULGULAR

Çalışmada örnek toplanan 18 gemiden 10 (%55.6)'unda *Legionella* spp. üremesi saptanmıştır. Toplam 158 örneğin 18 (%11.4)'inde *Legionella* spp. üremiştir. Bunlardan 4 (%7.4, 4/54)'ü depo, 11 (%16.2, 11/68)'i musluk ve üçü (%8.23, 3/36) duş başlığından tespit edilmiştir. Üreyen *Legionella* bakterilerinin biri feribottan alınan depo su örneğinden izole edilmiştir. Üreyen bakteri kolonilerinden yapılan serogruplandırma ile izolatların beşi (%27.8) *Legionella* spp., dördü (%22.2) *L.pneumophila* sg 5, ikisi (%11.1) *L.pneumophila* sg 1, ikisi (%11.1) *L.pneumophila* sg 8, ikisi (%11.1) *L.bozemanii*, biri (%5.6) *L.pneumophila* sg 3 olarak serogruplandırılmıştır. Kültürde üreyen izolatlardan ikisi (%11.1) ise serogruplandırılmamıştır (Tablo I). Serogruplandırma sonucuna göre dokuz izolatın (%50, n= 18) *L.pneumophila* olarak tanımlandığı görülmüştür. Feribot depo su örneğinden izole edilen izolatın serogruplandırma ile *L.pneumophila* sg 1 olduğu belirlenmiştir.

Kültürde üreyen 18 *Legionella* izolatının hepsine rpoB gen bölgesini hedefleyen primer dizileri ile PCR yapılmış ve beş tanesinde dizi analizi uygulanacak nitelikte PCR ürünü elde edilememiştir. Geri kalan 13 izolata DNA dizi analizi uygulanmıştır. Dizi analizi uygulanan izolatlardan birinin ise DNA dizi analizi kromatogramları okunamamıştır (Tablo II).

Tablo I. Gemilerin Su Sistemlerinden Toplanan Örneklerin Kültür ve Serogruplandırma Sonuçları

Örnek tipi	Örnek sayısı	<i>Legionella</i> üreme	Lateks aglütinasyon serogrup sonuçları	Toplam
Depo	54	4	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 1 <i>L.pneumophila</i> Serogrup 5 <i>L.pneumophila</i> Serogrup 8 <i>Legionella</i> spp.	4
Musluk	68	9*	<i>L.bozemanii</i> (2) <i>L.pneumophila</i> Serogrup 1 <i>L.pneumophila</i> Serogrup 3 <i>L.pneumophila</i> Serogrup 5 <i>L.pneumophila</i> Serogrup 8 <i>Legionella</i> spp. (3)	9
Duş	36	3	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 5 (2) <i>Legionella</i> spp.	3
Toplam				16

* Musluk örneklerinde üremesi olan 11 izolatın ikisinin serogruplandırma işlemi gerçekleştirilememiştir.

Serogruplandırılması da yapılamayan bu izolatin BCYE agarda üreyen başka gram negatif bakteri olma ihtimali, koyun kanlı agarda ürememesi ve rpoB PCR amplifikasyonunun gerçekleşmesi ile dışlanmıştır.

Kalan 12 izolatin 11'i çoklu gen analiz programında hizalanırken, biri diğer *Legionella* izolatlarıyla birlikte hizalanmamıştır ve farklı gen dizisine sahip olduğu görülmüştür. Sero-lojik olarak *L.bozemanii* olarak serogruplandırılan bu izolat BLAST programında, referans NCBI *Legionella* dizi verileriyle karşılaştırıldığında *L.rubrilucens* ile %99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Musluk örneklerinin birinde üreyen, serogruplandırmayla ayrımı yapılamayan bir izolat ise DNA dizi analizi sonrası BLAST programında referans NCBI dizileri ile karşılaştırma sonrası *L.erytra* olarak tanımlanmıştır. Kalan 10 izolat (%55.6, n= 18) ise referans NCBI dizileri ile karşılaştırması sonrası *L.pneumophila* olarak doğrulanmıştır (Tablo II).

Çalışılan 11 izolat ve sekiz referans NCBI *Legionella* dizisinin filogenetik karşılaştırması, gemi su sistemlerinden izole edilen *Legionella* izolatlarının dizilerinin *Legionella* dizileri içinde gruplandığını göstermiştir (Şekil 1).

Tablo II. Gemilerin Su Sistemlerinden İzole Edilen *Legionella* türü bakterinin Serogruplandırma ve DNA Dizi Analizi Sonuçları (n=18)

İzolat no	Örneğin alındığı yer	Serogruplandırma sonucu	DNA dizi analizi-BLAST sonucu
G1	Musluk	<i>L.bozemanii</i>	<i>L.rubrilucens</i>
G2	Musluk	Serogruplandırılmadı	Dizi analizi değerlendirilemedi
G3	Musluk	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 1	<i>L.pneumophila</i>
G4	Depo	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 1	<i>L.pneumophila</i>
G5.1	Musluk	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 8	<i>L.pneumophila</i>
G5.2	Depo	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 8	<i>L.pneumophila</i>
G7.1	Musluk	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 5	<i>L.pneumophila</i>
G7.2	Musluk	Serogruplandırılmadı	<i>L.erytra</i>
G7.3	Depo	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 5	<i>L.pneumophila</i>
G8	Sürüntü	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 5	<i>L.pneumophila</i>
G9	Sürüntü	<i>Legionella</i> spp.	PCR non-spesifik
G10.1	Musluk	<i>Legionella</i> spp.	PCR non-spesifik
G10.2	Musluk	<i>Legionella</i> spp.	PCR non-spesifik
G10.3	Musluk	<i>Legionella</i> spp.	<i>L.pneumophila</i>
G10.4	Depo	<i>Legionella</i> spp.	<i>L.pneumophila</i>
G10.5	Sürüntü	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 5	<i>L.pneumophila</i>
G12.1	Musluk	<i>L.bozemanii</i>	PCR non-spesifik
G12.2	Musluk	<i>L.pneumophila</i> Serogrup 3	PCR non-spesifik

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Şekil 1. Gemilerin su sistemlerinden izole edilen 11 *Legionella* türü bakteri ve 8 NCBI veritabanı *Legionella* dizisi *rpoB* gen bölgesinin Mega 7 programında "Neighbor-Joining" karşılaştırma yöntemi ile oluşturulmuş filogenetik ağaç.

TARTIŞMA

Su yönetimi ve sanitasyonundaki gelişmelerle birlikte suyla bulaşan hastalıklar büyük ölçüde azalsa da, salgınlar oluşmaya devam etmektedir. ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)] 2011-2012 yılları arasında içme suyuyla ilişkili 32 salgın bildirmiştir ve *Legionella* salgınlarının %66'sından ve oluşan hastalıkların %6'sından sorumlu tutulmuştur. *Legionella* salgınının en yaygın nedenlerinin bina su tesisatı (%66) ve işlenmemiş yer altı suları (%13) olduğu belirtilmiştir²⁴. Bununla birlikte yolcu gemilerindeki su dağıtım sistemleri ve sıcak su kaynaklarının da *Legionella* türlerinin neden olduğu enfeksiyon için önemli bir kaynak olduğu belirtilmektedir¹⁴. Günümüzde deniz trafiğinin giderek artmasıyla özellikle kapalı ve kalabalık ortamlarda yolcular arasında Lejyoner hastalığı insidansında bir artış görülmüştür^{19,20}. Yolcu gemileriyle ilişkili birçok Lejyoner hastalığı salgını bildirilmiş olup, bu tip gemilerin su dağıtım sistemlerinde *Legionella* kolonizasyonlarını ortaya koyan çalışmalar mevcuttur^{25,26}. *Legionella*'lar gemilerin özellikle su borularında kolaylıkla çoğalmakta, klima sistemleri ve su dağıtım noktaları aracılığıyla çevreye yayılmaktadır^{20,25}.

Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı ülkemizde 1996 yılından beri yürütülmektedir. Turistik konaklama tesisleri, hastaneler, bakımevleri ve konaklamalı gemiler için 2015 yılında “Lejyoner Hastalığı Kontrol Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik” yayımlanmıştır. Feribot, küçük yolcu ve yük gemileri için de geçerli olan Lejyoner hastalığından korunma amaçlı alınacak önlemler ve rutin koruyucu uygulamalar tanımlanmıştır²⁷.

Ülkemiz limanlarına yanaşan gemilerin su sistemlerinde *Legionella* prevalansını ortaya koymayı amaçlayan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda yerel olarak Mersin Uluslararası Limanı'na yanaşan feribot ve yük gemilerinde %11.4 oranında *Legionella* kontaminasyonu gösterilmiş olup, bu durum özellikle sigara içen, yaşlı veya bağışıklığı baskılanmış gemi çalışanı veya yolcular için önemli enfeksiyon riski oluşturmaktadır. Ayrıca, musluklardan toplanan su örneklerinin %16.2'sinde saptanan *Legionella* üremesi, bu tip küçük gemilere özgül düzeltici eylemlerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Benzer bir şekilde Ahlén ve arkadaşları²⁸ tarafından Norveç kıyılarına yanaşan 41 askeri gemiye ait su dağıtım ağından alınan 439 su örneğinin, %12'sinde *L.pneumophila* DNA'sının saptandığı bildirilmiştir. Gemilerin 20 (%48.8)'sinde pozitiflik saptandığı ve yedisinde (%17) ise kültürde *L.pneumophila* sg 1'in izole edildiği belirtilmiştir.

Dünya çapında yapılan diğer çalışmalarda çok daha yüksek oranlarda *Legionella* kültür pozitifliği bildirilmiştir. İtalya'nın Kuzey Sardinya Limanı'na yanaşan yedi feribot ve iki yolcu gemisinde *Legionella* türlerinin sıklığını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada, feribotların altısında (%66.7) *Legionella* üremesinin saptandığı belirtilmiştir. Çalışmada yolcu ve gemi çalışanlarının kabinleri ile, mutfak ve diğer kullanım alanlarından toplanan 90 su örneğinin %42 (n= 38)'sinin *Legionella* spp. ile kontamine olduğu saptanmıştır. İzole edilen *Legionella* izolatlarının %95.5 (42/44)'inin *L.pneumophila* ve kalan %4.5 (2/44)'inin *L.micdadei* olduğu belirtilmiştir. *L.pneumophila* izolatlarının %45.2 (n= 19)'si *L.pneumophila* sg 6, %42.9 (n= 18)'ü *L.pneumophila* sg 2-14, %7.1 (n= 3)'i *L.pneumophila* sg 5 ve %4.8 (n= 2)'i *L.pneumophila* sg 3 olarak gruplandırıldığı belirtilmiştir²⁹. Yine İtalya, Sicilya'da yerel olarak 10 adet feribot ve altı adet yolcu gemisinde *Legionella* kontaminasyonunun sıklığını değerlendiren bir çalışmada, feribotlardan toplanan 92 su örneğinin %64 (n= 59)'ünde *Legionella* saptandığı bildirilmiş olup, %36 (n= 21)'si *L.pneumophila* sg 1, %51 (n= 30)'i *L.pneumophila* sg 2-14 ve %13 (n= 13)'ü *L.pneumophila* sg 1 ve sg 2-14 olarak tanımlandığı belirtilmiştir. Yolcu gemilerinden toplanan 136 su örneğinin ise altısında (%4) *Legionella* saptandığı bildirilmiş olup, dördü (%67) *L.pneumophila* sg 1 ve ikisi (33%) *L.pneumophila* sg 2-14 olarak tanımlandığı belirtilmiştir²⁰. Yunanistan Limanı'na yanaşan 21 feribot ve 10 yolcu gemisinin su dağıtım sistemlerinde *Legionella* kolonizasyonunu belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada, yolcu gemisinden toplanan 103 sıcak ve 20 soğuk su örneğinde herhangi *Legionella* üremesinin saptanmadığı, feribotlardan toplanan 172 sıcak su örneğinin %37.8 (n= 65)'inde ve 97 soğuk su örneğinin %17.5 (n= 17)'inde *Legionella* üremesinin saptandığı belirtilmiştir. Çalışmada toplam 96 *Legionella* spp. izolatının 87 (%90.6)'si *L.pneumophila* (bunların da %44.8'i *L.pneumophila* sg 1, %44.8'i *L.pneumophila* sg 2-14) ve kalan %9.4'ünün de *L.pneumophila* dışı *Legionella* olarak saptandığı belirtilmiştir. Çalışmada özellikle gemilerin yaşı ile yolcu ve gemi çalışanları

açısından risk teşkil eden kolonizasyonların ilişkili olduğu vurgulanmıştır¹⁴. İngiltere'deki limanlara yanaşan 360 yük gemisindeki su örneklerinin incelendiği bir çalışmada ise 803 su örneğinin *Legionella* yönünden kültürü yapılmış olup, gemilerin %58'inde *Legionella* üremesinin saptandığı bildirilmiştir. *L.pneumophila* sg 1'in yük gemilerinin %46'sında saptandığı ve 17 izolatin sekans temelli tiplendirmesinde dördünün sekans tipinin daha önce bildirilen insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir¹⁵.

Feribotlarda yüksek riskte *Legionella* kolonizasyonun altında yatan sebebin, bu gemilerin çoğunun eski olması ve genelde optimal olmayan koşullara sahip olması olarak belirtilmektedir. Ayrıca sınırlı sayıda mürettebat bulunması ve bunların dönüşümlü çalışmaları, su güvenliğinin doğru sürveyansını engellediği ifade edilmektedir. Diğer yandan küçük gemilerde su tanklarına erişimin zor olması nedeniyle sanitasyonun düzgün olmaması ve buna bağlı olarak *Legionella* veya diğer patojenlerin üremesi için uygun ortam hazırlayan biyofilm oluşumuna neden olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca yolcu gemilerinin aksine, feribot veya yük gemilerinde çok sık kullanılmayan duşlar ve diğer yıkama üniteleri, başka bir kontaminasyon nedeni olarak belirtilmiştir²⁰. Çalışmamız kapsamındaki gemilerin çoğu yük gemisiydi ve sadece iki gemi feribot olarak yer almıştı. Gemilerden alınan örnekler gemilerin soğuk su sistemlerinden alınmış olup, gemilerin yaşı, mürettebat sayısı ve *Legionella* türü bakterilere yönelik önlem alınıp alınmadığı bilinmemektedir. Kültürde üreten bakterilerden biri feribota ait olup, *L.pneumophila* sg 1 olarak serogruplandırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda, feribot ve yolcu gemilerinin su sistemlerinde yüksek sayıda *Legionella* türleriyle özellikle *L.pneumophila* kolonizasyonu görülmektedir^{14,20,29,30}. *Legionella* türleri arasında *L.pneumophila* sg 1'in en virülen ve insan hastalıklarında en yaygın rol oynayan tür olduğu belirtilmektedir³. Gemiyle ilişkili olguların da çoğundan *L.pneumophila* sg 1 sorumlu tutulduğu için, gemi çalışanları ve taşıdığı yolcular açısından büyük enfeksiyon riski taşımaktadır^{15,25,26}. Klinik izolatlara kıyasla çevresel izolatlarda daha yüksek bir genetik çeşitliliğin olduğu ve insanlarda görülen hastalık için özgül olan *L.pneumophila* klonlarının ağırlıklı olarak rol aldığı belirtilmektedir. Sonuç olarak, dünyanın farklı bölgelerinde farklı Lejyoner hastalığı paternlerinin olduğu ileri sürülmektedir³. Diğer yandan, klinik örneklerden *L.pneumophila* sg 1 izolasyon oranının etkenin çevresel baskınlığıyla çok fazla bağlantılı olmadığı, daha çok yüksek enfektivite veya etkenin hücre içi ortamda daha iyi üremesiyle ilgili olabileceği belirtilmektedir³¹. Yolcu gemilerinde Lejyoner hastalığı olgularından izole edilen diğer serotip ise *L.pneumophila* sg 5 olarak bildirilmiştir^{32,33}. Çalışma periyodu içinde yolcular veya gemi çalışanlarının pnömoni semptomu gelişmesi yönünden takibi yapılmamıştır. Çalışmamızda izole edilen *Legionella* izolatlarının serogruplandırma sonucuna göre %50 (n= 9)'sinin *L.pneumophila* olduğu görülmüştür. *L.pneumophila* serotipleri arasında diğer çalışmalardan farklı olarak en fazla %22.2 (n= 4/18) oranında *L.pneumophila* sg 5'e rastlanılmıştır, bunu sırasıyla %11.1 (n= 2/18) oranında *L.pneumophila* sg 1, %11.1 (n= 2/18) oranında *L.pneumophila* sg 8 ve %5.6 (n= 1/18) oranında *L.pneumophila* sg 3'ün izlediği görülmüştür. Bu durum muhtemelen *L.pneumophila* serotiplerinin çevresel prevalanslarının farklı olması ile ilgili olabilir.

Çalışmamızda izolatların moleküler karakterizasyonu sonrası serogruplandırmanın yetersiz kaldığı görülmüştür. Dizi analizi sonrası *L.bozemanii* olarak tanımlanan izolatın NCBI *Legionella* dizi verileriyle karşılaştırıldığında *L.rubrilucens* ile %99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Benzer şekilde serogruplandırmayla *Legionella* spp. olarak tanımlanan iki izolatın *L.pneumophila* olarak tiplendirildiği görülmüştür (Tablo II).

Çalışmamızda DNA dizi analizi sonrası *L.pneumophila* dışında, *L.rubrilucens* ve *L.erytra* olarak doğrulanan iki tür bulunmaktadır. *L.rubrilucens* çevresel bir tür olarak bilinse de^{34,35}, insan pnömoni olgularından da izole edildiği bildirilmiştir^{36,37}. *L.erytra*'nın ise çevresel örneklerden izole edilen bir tür olduğu görülmektedir^{38,39}. Çalışmada izole edilen potansiyel insan patojeni olan bu *L.pneumophila* dışındaki türlerin varlığı duyarlı konaklar için bir risk faktörü oluşturmaktadır.

Çalışmamızda, Mersin Uluslararası Limanı'na yanaşan gemilerin su sistemlerinden toplanan soğuk su örneklerinin %11.4'ünün *Legionella* spp. ile kolonize olduğu belirlenmiş olup, *Legionella* türlerinin yaygınlığı hakkında bir öngörü oluşmuştur. DNA dizi analiziyle izolatların %55.6'sının *L.pneumophila* olarak doğrulması yapılabilmüş olup, ülkemizde çevresel örneklerde *Legionella* tiplerinin moleküler epidemiyolojisine katkıda bulunulmuştur. Çalışmada tespit edilen *Legionella* türleri, gemilerde seyahat eden kaptan, gemi çalışanları ve yolcular için önemli enfeksiyon kaynağı oluşturmakta olup, gemilerdeki su sistemlerinde *Legionella* risk yönetimi konusunda endişe uyandırmaktadır. Yaptığımız bu çalışma gemilerin su sistemlerinde *Legionella* türlerinin kontrolüne yönelik çalışmaların ve koruyucu stratejilerin oluşturulması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

Çevresel örneklerden yapılmış olan bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapılan başvuru sonrası Etik Kurul Onayı gerekmediği bildirilmiştir.

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Hudut ve Sahiller Sağlık Genel Müdürlüğü, Mersin Sahil Sağlık Denetleme Merkezinden izin alınmıştır (Tarih: 02.09.2021 ve Sayı: E-16364792-367).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. van Heijnsbergen E, Schalk JA, Euser SM, Brandsema PS, den Boer JW, de Roda Husman AM. Confirmed and potential sources of *Legionella* reviewed. Environ Sci Technol 2015; 49(8): 4797-815.
2. 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): 325-37.
3. Burillo A, Pedro Botet ML, Bouza E. Microbiology and epidemiology of Legionnaire's disease. Infect Dis Clin North Am 2017; 31(1): 7-27.
4. Principe L, Tomao P, Visca P. Legionellosis in the occupational setting. Environ Res 2017; 152: 485-95.

5. Miyashita N, Matsushima T, Oka M, Japanese Respiratory Society. The JRS guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults: an update and new recommendations. *Intern Med* 2006; 45(7): 419-28.
6. Whiley H, Bentham R, Brown MH. *Legionella* persistence in manufactured water systems: pasteurization potentially selecting for thermal tolerance. *Front Microbiol* 2017; 8: 1330.
7. Amemura Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki Hashimoto A, Furuhashi K, et al. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(12): 4263-70.
8. Caylà JA, Maldonado R, González J, Pellicer T, Ferrer D, Pelaz C, et al. A small outbreak of Legionnaires' disease in a cargo ship under repair. *Eur Respir J* 2001; 17(6): 1322-7.
9. Falkingham JO, Pruden A, Edwards M. Opportunistic premise plumbing pathogens: increasingly important pathogens in drinking water. *Pathogens* 2015; 4(2): 373-86.
10. Shaheen M, Scott C, Ashbolt NJ. Long-term persistence of infectious *Legionella* with free-living amoebae in drinking water biofilms. *Int J Hyg Environ Health* 2019; 222(4): 678-86.
11. 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(4): 713-9.
12. Sánchez Parra B, Núñez A, Moreno DA. Preventing legionellosis outbreaks by a quick detection of airborne *Legionella pneumophila*. *Environ Res* 2019; 171: 546-9.
13. World Health Organization (WHO). Guide to Ship Sanitation, 3rd ed. Geneva, Switzerland: WHO, 2011. Available on: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43193/9789241546690_eng.pdf;jsessionid=18BC62BA7913B460F6F6B40EA781BA74?sequence=1 (Accessed date: 21 July 2021)
14. Goutziana G, Mouchtouri VA, Karanika M, Kavagias A, Stathakis NE, Gourgouliazis K, et al. *Legionella* species colonization of water distribution systems, pools and air conditioning systems in cruise ships and ferries. *BMC Public Health* 2008; 8: 390.
15. Collins SL, Stevenson D, Mentasti M, Shaw A, Johnson A, Crossley L, et al. High prevalence of *Legionella* in non-passenger merchant vessels. *Epidemiol Infect* 2017; 145(4): 647-55.
16. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylors A, Limberger RJ, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62(2): 125-32.
17. Wang H, Bédard E, Prévost M, Camper AK, Hill VR, Pruden A. Methodological approaches for monitoring opportunistic pathogens in premise plumbing: A review. *Water Res* 2017; 117: 68-86.
18. Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol Biol* 2013; 954: 119-48.
19. United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD). Review of Maritime Transport 2019. United Nations publication, Sales No. E.19.II.D.20. Geneva, 2019. Available on: https://unctad.org/system/files/official-document/rmt2019_en.pdf (Accessed date: 30 November 2021).
20. Laganà P, Gambuzza ME, Delia S. *Legionella* risk assessment in cruise ships and ferries. *Ann Agric Environ Med* 2017; 24(2): 276-82.
21. ISO 19458:2006: Water quality - Sampling for microbiological analysis (Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:19458:ed-1:v1:en>) (Accessed date: 03.01.2022)
22. ISO 11731:2017: Water quality - Enumeration of *Legionella*. Available on: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:11731:ed-2:v1:en> (Accessed date: 22 July 2021).
23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33(7): 1870-4.
24. Beer KD, Gargano JW, Roberts VA, Hill VR, Garrison LE, Kutty PK, et al. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water - United States, 2011-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 64(31): 842-8.

25. Castellani Pastoris M, Lo Monaco R, Goldoni P, Mentore B, Balestra G, Ciceroni L, et al. Legionnaires' disease on a cruise ship linked to the water supply system: clinical and public health implications. Clin Infect Dis 1999; 28(1): 33-8.
26. Beyrer K, Lai S, Dreesman J, Lee JV, Joseph C, Harrison T, et al. Legionnaires' disease outbreak associated with a cruise liner, August 2003: epidemiological and microbiological findings. Epidemiol Infect 2007; 135(5): 802-10.
27. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu: Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı Rehberi. Ankara, 2016; SS:15-82. Available on: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/Lejyoner/Lejyoner_Hastalik_Rehberi/Lejyoner_Hastaligi_Kontrol_Programi_Rehberi_24072018.pdf (Accessed date: 22 July 2021).
28. Ahlén C, Aas M, Nor A, Wetteland PI, Johansen H, Sørbo T, et al. *Legionella pneumophila* in Norwegian naval vessels. Tidsskr Nor Laegeforen 2013; 133(14): 1445-8.
29. Azara A, Piana A, Sotgiu G, Dettori M, Deriu MG, Masia MD, et al. Prevalence study of *Legionella* spp. contamination in ferries and cruise ships. BMC Public Health 2006; 6: 100.
30. Arashiro T, Nakamura S, Asami T, Mikuni H, Fujiwara E, Sakamoto S, et al. SARS-CoV-2 and *Legionella* co-infection in a person returning from a Nile cruise. J Travel Med 2020; 27(3): taaa053.
31. Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, et al. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. J Clin Microbiol 2004; 42(1): 458-60.
32. Kobayashi A, Yamamoto Y, Chou S, Hashimoto S. Severe *Legionella pneumophila* pneumonia associated with the public bath on a cruise ship in Japan. J Anesth 2004; 18(2): 129-31.
33. Kura F, Amemura-Maekawa J, Yagita K, Endo T, Ikeno M, Tsuji H, et al. Outbreak of Legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. Epidemiol Infect 2006; 134(2): 385-91.
34. Brenner DJ, Steigerwalt AG, Gorman GW, Wilkinson HW, Bibb WF, Hackel M, et al. Ten new species of *Legionella*. Int J Syst Bacteriol 1985; 35(1): 50-9.
35. Girolamini L, Mazzotta M, Lizzadro J, Pascale MR, Dormi A, Salaris S, et al. Sit bath systems: a new source of *Legionella* infection. PLoS One 2020; 15(11): e0241756.
36. Matsui M, Fujii SI, Shirowa R, Amemura Maekawa J, Chang B, Kura F, et al. Isolation of *Legionella rubrilucens* from a pneumonia patient co-infected with *Legionella pneumophila*. J Med Microbiol 2010; 59(Pt 10): 1242-46.
37. Amemura Maekawa J, Kura F, Chida K, Ohya H, Kanatani JI, Isobe J, et al. *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species isolated from legionellosis patients in Japan between 2008 and 2016. Appl Environ Microbiol 2018; 84(18): e00721-18.
38. Huang SW, Hsu BM, Wu SF, Fan CW, Shih FC, Lin YC, et al. Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies. Water Res 2010; 44(16): 4805-11.
39. Papadakis A, Chochlakis D, Sandalakis V, Keramarou M, Tselentis Y, Psaroulaki A. *Legionella* spp. risk assessment in recreational and garden areas of hotels. Int J Environ Res Public Health 2018; 15(4): 598.