

AHMET AKTAŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEVRE SU ÖRNEKLERİNDE LEGIONELLA PNEUMOPHILA VE
MAKROLİD DİRENÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AHMET AKTAŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. FATMA KÖKSAL ÇAKIRLAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI



ÖĞRENCİNİN

Numarası : 2701160043
Adı Soyadı : Ahmet AKTAŞ
Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Programı : Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Tez Savunma Sınav Tarihi : 08.07.2019
Tez Savunma Sınav Saati : 11.00
Öğretim Yılı/Dönemi : 2018-2019 Bahar

MEVCUT TEZİN

Tez Adı	Çevre Su Örneklerinde Legionella Pneumophila ve Makrolid Dirençlerinin Araştırılması
Yabancı Dilde Tez Adı	Investigation of Legionella Pneumophila and Macrolide Resistance in Environmental Water Samples

Yukarıda bilgileri sunulan öğrencinin tez savunma sınavı "İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği"ne uygun olarak yapılmış ve jüri OY BİRLİĞİ ile tezin KABULÜNE karar vermiştir.

JÜRİ TARAFINDAN DÜZELTİLEN TEZİN

Tez Adı	
Yabancı Dilde Tez Adı	

Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR
Danışman

Prof. Dr. Gökhan AYGÜN
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Pelin YÜKSEL
Jüri Üyesi

Açıklamalar

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ahmet AKTAŞ



ITHAF



Aileme...

TEŞEKKÜR

Bu çalışma ve Bilim Uzmanlığı eğitimim süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden, danışman hocam Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR'a

Yüksek Lisans eğitimim boyunca mesleki ve sosyal anlamda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e

Bilim uzmanlığı eğitimim boyunca harcadıkları emek ve gösterdikleri ilgiden dolayı Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'ye, Prof. Dr. Bekir Sami KOCAZEYBEK'e, Prof. Dr. Hrisi Bahar TOKMAN'a, Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya, Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye Prof. Dr. Sevgi ERGİN'e, Doç. Dr. Erdal POLAT'a teşekkürlerimi sunarım.

Ders dönemimde paylaşımda bulunduğum tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemediğim yanımda olan ve sürekli olarak güvenen aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32405

İÇİNDEKİLER

AHMET AKTAŞ.....	İ
TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLOLAR LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET.....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Legionella spp. Genel Özellikleri.....	4
2.1.1. Tarihçe.....	4
2.1.2. Sınıflandırma.....	4
2.1.3. Morfolojik Özellikleri.....	5
2.1.4. Üreme ve Kültür Ortamları.....	7
2.1.5. Biyokimyasal Özellikleri.....	8
2.1.6. Yaşam Alanları.....	8
2.2. Patogenez.....	9
2.2.1. İnfeksiyon Kaynakları.....	9
2.2.2. Bulaş Yolları ve İnsidans.....	10
2.2.3. Legionella Bakterilerinin Hücreye Girişi ve İntrasellüler Yaşamları.....	10
2.2.4. Legionella ve Demir Etkileşimi.....	12
2.2.5. Klinik Belirtiler.....	13
2.2.5.1. Lejyoner Hastalığı (Legionellosis).....	13
2.2.5.2. Pontiak Ateşi.....	13
2.2.5.3. Ekstra Pulmoner Hastalıklar.....	14
2.3. Virulans.....	14

2.3.1. Biyofilm İçinde Yaşama Yetenekleri.....	14
2.3.2. Hücre Dışı Uzantıları	15
2.3.3. Antijenik Yapıları ve Toksinleri	16
2.3.3.1. Sekresyon Sistemleri.....	16
2.3.3.2. Nukleaz Aktivitesi.....	17
2.3.3.3. Proteaz Aktivitesi	17
2.3.3.4. Fosfolipaz Aktivitesi	18
2.3.3.5. Lipaz Aktivitesi.....	18
2.4. Klinik Dışı Örneklerde Legionella Bakterilerinin İzolasyon Yöntemleri.....	18
2.4.1. Kültür Metodu.....	18
2.4.1.1. Su Numunelerinin Toplanması ve Yoğunlaştırılması	19
2.4.1.1.1. Sıcak Su Tanklarından Örneklerin Toplanması	19
2.4.1.1.2. Lavabo Musluk ve Duş Başlıklarından Örnek Alınması	19
2.4.1.1.3. Havalandırma Sistemleri Soğutma Kulesinden Örnek Alınması.....	20
2.4.1.2. Kullanılan Besiyerleri	20
2.4.1.2.1. BCYE Agar (Brillant Charcoal Yeast Extract Agar)	20
2.4.1.2.2. DGVP (Dye-Glisin-Polimiksin-Vankomisin) Agar	20
2.4.1.2.3. CCVC (Cycloheximide-Colistine-Vancomycine-Cephalothine) Agar	20
2.4.1.2.4. GVPC (Glisin-Vankomisin-Polimiksin-Cycloheximide) Agar	21
2.4.1.2.5. MWY (Modified Wadowsky Yee) Agar.....	21
2.4.1.3. Su Örneklerinin Çalışılması	21
2.4.1.3.1. Su tanklarından (Soğuk/Sıcak) Alınan Örneklerin Çalışılması	21
2.4.1.3.2. Havalandırma Sistemi Soğutma Kulesi Su Örneklerin Çalışılması.....	22
2.4.1.3.3. Musluk ve Duşlardan Eküvyonla Alınan Örneklerin Çalışılması.....	22
2.4.2. Kültür Besiyerleri Üzerinde Legionella Doğrulaması ve Serogruplaması	22
2.4.2.1. Lateks Aglutinasyon Testi.....	23
2.4.2.2. Direkt Floresan Antikor Testi (DFA).....	23
2.4.2.3. Polimer Zincir Reaksiyon (PCR)	23
2.5. Tedavide Kullanılan Ajanlar	24
2.5.1. Makrolid Grubu İlaçlar	25
2.5.1.1. Direnç Gelişim Mekanizması.....	27
2.5.2. Tetrasiklinler	28
2.5.3. Kinolonlar	28

2.6. Korunma ve Kontrol	29
2.7. Su Sistemlerinin Dezenfeksiyonu	30
2.7.1. Mekanik Yöntemler	30
2.7.1.1. Membran Filtrasyon	30
2.7.1.2. Isıl Şok Uygulama.....	30
2.7.1.3. UV Radyasyon Uygulaması	31
2.7.2. Kimyasal Yöntemler	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Araç ve Gereçler	32
3.2. Kullanılan Suşlar ve Alınış Yerleri.....	32
3.3. Besiyerleri ve Antimikrobiyal Ajanlar.....	33
3.3.1. BCYE Agar Besiyeri.....	33
3.3.2. Serolojik testler	34
3.3.3. Antimikrobiyal Diskler	35
3.3.4. E test analizleri.....	36
3.3.5. RT PCR İşlemleri.....	36
4. BULGULAR.....	39
4.1. Serogrup Tayini	39
4.2. Disk Difüzyon Testi	40
4.3. E test Analizleri.....	43
4.4. RT-PCR Analizleri.....	48
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	54
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	65
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: <i>Legionella</i> spp. yaşam alanları ve türlere ait serogrup sayıları (117)	6
Tablo 2.2: Serogrup tespit testlerinin performansları (52)	24
Tablo 3.1: Alınış yerlerine göre suş sayıları	32
Tablo 3.2: Depo sularından izole edilen suşların numaraları	33
Tablo 3.3: Suşlara ait numaralar	33
Tablo 3.4: BCYE Agar besiyeri kimyasal bileşenleri (Liofilchem, İtalya) (54)	33
Tablo 3.5: QIAcube cihazına örneklerin yerleşim sırası ve MIC değerleri.....	37
Tablo 3.6: RT-PCR cihazı program içeriği.....	38
Tablo 4.1: Lpn serogrup sayıları.....	39
Tablo 4.2: Duş başlığında alınan örneklere ait sonuçlar.....	40
Tablo 4.3: Musluktan alınan örneklere ait sonuçlar	40
Tablo 4.4: Depodan alınan örneklere ait sonuçlar	40
Tablo 4.5: <i>L.pneumophila</i> ATCC 33152 zon çapları (mm).....	41
Tablo 4.6: Lpn Sg 1'e ait zon çapı değerleri.....	41
Tablo 4.7: Lpn Sg 2-14'e ait zon çapı değerleri	42
Tablo 4.8: Sg 1'e ait MIC değerleri ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ve EUCAST verileri (33).....	44
Tablo 4.9: Sg 2-14'e ait MIC değerleri ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ve EUCAST verileri (33)	45
Tablo 4.10: Kontrol suşu MIC seviyeleri ve EUCAST verileri ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (33)	46
Tablo 4.11: Örneklere ait MIC değerleri, zon çapları ve Ct değerleri.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: <i>Legionella pneumophila</i> 'nın koloni mikroskobundaki görüntüsü	7
Şekil 2.2: Gri membran filtre üzerinde <i>Legionella pneumophila</i> görüntüsü	8
Şekil 2.3: Fagositoz çeşitleri (87)	12
Şekil 2.4: Membran filtrasyon sistemi ve 0,45 µ'luk gri filtre kağıdı	30
Şekil 3.1: Mc Farland cihazı görüntüsü	34
Şekil 3.2: Latex aglutinasyon testinde çökme.....	35
Şekil 3.3: QIAcube cihazına viallerin yerleşim sıralaması (90)	36
Şekil 4.1: BCYE Agar üzerinde kontrol suşu	42
Şekil 4.2: BCYE Agar üzerinde disk difüzyon deneyleri (Solda zon oluşturan suş, sağda zon oluşturmeyen suş)	42
Şekil 4.3: BCYE Agar üzerinde kontrol suşu ("Lpn ATCC 33152").....	46
Şekil 4.4: BCYE Agar üzerinde MIC deneyleri (Sağda MIC değerini ≥ 256 µg/mL olan suş, solda MIC değeri okunabilen suşlar).....	47
Şekil 4.5: RT-PCR' a ait kantitasyon eğrisi.....	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACES: N - 2-aminoetansülfonik asit

Azm: Azitromisin

BCYE: Brilliant Charcoal Yeast Extract Agar

CDC: Centers for Disease Control

Clr: Klaritromisin

Ct: Sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PCR ürününün log-linear fazda ekspanensiyal olarak artmaya başladığı zaman

DDT: Disk Difüzyon Testi

DGVP: Dye-Glisin Vankomisin Polimiksin Agar

Ery: Eritromisin

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GVPC: Glisin Vankomisin Polimiksin Cycloheximide Agar

ISO: International Organization for Standardization

Lpn: Legionella pneumophila

MOMP: Major Outer Membrane Protein

MWY Agar: Glisin, Vankomisin, Polimiksin B, Anisomisin içerikli selektif agar

PMNL: Polimorfonükler Lökosit

RT-PCR: Real Time PCR

Sg: Serogrup

THSGM: Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

ÖZET

AKTAŞ A. (2019). Çevre Su Örneklerinde *Legionella pneumophila* ve Makrolid Dirençlerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Legionella pneumophila, Legionellosiz olarak adlandırılan ciddi pnömونيye neden olabilir. Çalışmamızda Lpn serogrupları üzerinde makrolid grubu antibiyotiklerin etkinliği ve etkinlik derecesini belirleyen effluks pompasını kodlayan gen bölgeleri araştırıldı. Azitromisin, eritromisin ve klaritromisinin çevresel ve hastane su sistemlerinden izole edilen 43 *Legionella* spp. suşu üzerine etkileri değerlendirildi. Aglutinasyon kiti ile Lpn türlerinin serogrupları belirlendi. Serogrupları belirlenen 30 Lpn suşundan (15 Sg 1, 15 Sg 2-14) üç Sg 1 (no.10,13,30) ve 3 Sg 2-14 (no.16,17,26) suşlarında test edilen antibiyotiklere karşı DDT'nde zon oluşumu izlenmedi ve bu suşların MIC değerleri $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi. Bu 6 suş ile MIC değeri düşük olan (no.9) suşun effluks pompasını kodlayan gen bölgeleri olan *lpp 2879* ve *lpp 2880*'in baz dizilimleri, RT-PCR kullanılarak kantitatif olarak yapılan analizlerinde Lpn Philadelphia 1 standart suşun Ct değeri 16,74 olarak bulundu. Zon oluşturan ve MIC değeri okunabilen suşumuzun Ct değeri 11,5 iken zon oluşturmayan ve MIC değeri $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ olan suşların Ct değerleri sıfır olarak tespit edildi. Çalışmamız sonucunda, DDT'nde zon oluşturmayan ve MIC değeri $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ olan suşlara ait effluks pompasını kontrol eden gen bölgelerindeki baz dizilerinin, MIC değeri okunabilen, zon oluşturan suşlardan farklı olduğu belirlenmiştir. Gen bölgelerindeki bu farklılığın, effluks pompasının yapısı ve işlevini değiştirdiği, böylece ilaç aktivite seviyelerinde farklılıklara neden olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Legionella pneumophila*, Makrolid Direnci, RT-PCR, Legionelloz, Effluks pompası

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32405

ABSTRACT

AKTAS A. (2019). Investigation of *Legionella pneumophila* and Macrolide Resistance in Environmental Water Specimens. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Microbiology. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Legionella pneumophila can cause severe pneumonia called Legionellosis. In our study, gene regions encoding efflux pump which determine the efficacy and efficacy of macrolide antibiotics on Lpn serogroups were investigated. The effects of azithromycin, erythromycin, clarithromycin on 43 *Legionella*-spp. strains isolated from environmental and hospital water systems were evaluated. Serogroups of Lpn species were determined by agglutination kit. Against the antibiotics tested in three Sg-1 (no.10,13,30) and 3 Sg2-14 (no.16,17,26) strains from 30 Lpn strains (15 Sg1, 15 Sg2-14) whose serogroups were determined No zone formation was observed in DDT and the MIC values of these strains were ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$. The base sequences of the *lpp2879* and *lpp2880*, the gene regions encoding the efflux pump of these 6 strains and the low MIC (no.9) strain, were quantitatively analyzed using RT-PCR and the Ct value of the Lpn Philadelphia 1 standard strain was found 16.74. While the Ct value of our strain-forming strain, whose MIC was readable, was 11.5, the Ct values of the non-zone-producing strains with MIC values ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ were found to be zero. As a result of our study, it was found that the base sequences in the gene regions controlling the efflux pump of the strains that did not create zone in DDT and whose MIC value was ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ were different from the zone forming strains whose MIC values could be read. This difference in gene regions is thought to alter the structure and function of the efflux pump, thereby causing differences in drug activity levels.

Key Words: *Legionella pneumophila*, Macrolide Resistance, RT-PCR, Legionellosis, Efflux pump

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 32405

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Legionella pneumophila (Lpn) aerob, sporsuz, kapsülsüz, hareketli ve pleomorfik görünümde fakültatif intrasellüler çomaklardır. Lpn (% 5), nozokomiyal ve toplum kaynaklı pnömoni olgularında etken olarak *Streptococcus pneumonia* (% 15) ve *Haemophilus influenza* (% 11)'nin ardından üçüncü sırada yer almaktadır (15,58). Klinik izolasyonda ya da akciğer biyopsi örneklerinde inceleme yapıldığında 1-2 µm uzunluğunda kokobasiller ya da uçları yuvarlak kısa basiller olarak görünürler (116). Ancak kültür ortamında uzun süre bekletildiklerinde boyları 50 µm'ye uzanabilen filamentöz şekilde alabilmektedir (110). Gram boyanma özellikleri olarak Gram (-) olarak nitelendirilse de duvar yapılarında fazla miktarda uzun zincirli yağ asitleri içermeleri nedeniyle klasik Gram (-) yapısından farklılık göstermektedir. Boyama işlemi yapılırken zıt boya olarak % 0,1'lik bazik fuksin kullanımı bakteriyi iyi boyamaktadır (117). Gram boyama yöntemleri dışında Gimenez boyası ve doku örnekleri için Warthin-Starry gümüşleme boyası kullanılabilir (86).

Legionella spp. içinde *L.micdadei*, *L. dumoffii*, *L.bozemanii* gibi türlere de sık rastlanır ancak bu türler durgun sularda saprofitik olarak yer alır ve enfeksiyona sebebiyet vermezler. Bu nedenle cins içerisindeki tek patojen tür olan Lpn önem kazanmıştır (79,80).

1947 yılında sebebi bilinmeyen ateşli hastalık sebebi yaşamını kaybeden bir hastaya ait kan örneğinin kobaya enjekte edilmesi sonucunda *Rickettsia* benzeri bakteri izole edilmiştir. Aradan 30 yıl geçtikten sonra hastaya ait kan örneklerinin tekrar incelenmesi sonucunda asıl etkenin Lpn olduğu tespit edilmiştir (26,70).

1976 yılında Philadelphia'da Amerikan Lejyonerleri toplantısının düzenlendiği otelde görülen salgın sonucunda 182 kişide enfeksiyon görülmüş, enfeksiyon tespit edilen hastalarda pnömoni olgusu hızlı şekilde gelişmiştir. Sonuç olarak, bu salgında 29 kişi hayatını kaybetmiştir (42,69).

Lpn, çevresel kontamine su birikintilerinde soğutma kuleleri, sıcak/soğuk su tankları, duş başlıkları, termal banyo-çamur gibi nem oranının yüksek ve 20-45 °C'lik sıcaklığın olduğu yerlerde yaşam göstermektedirler (25,84). Ayrıca kontamine sularla temas edilmesi durumlarında evapotatörler-nebulizatörler ve solunum terapi ekipmanları ile de bulaşım gerçekleşebilir (110). Kloro dirençli olmaları, mavi-yeşil algler, amip, kirpikli protozoonlar içerisinde yaşama yetenekleri onları çevre şartlarında

uzun süreler hayatta kalmalarına imkan vermektedir. Siyanobakterilerin ürettiği metabolitler, sediment birikimleri, yüksek oranda Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeriği Lpn üremesine olumlu yönde etki etmektedir. 63°C sıcaklık, pH 5-8,5 ve çözünmüş O_2 içeriği 0,2-15 mg/L olan ekstrem koşullarda hayatta kalma yeteneklerine sahiptirler (63,121). Kontamine sular kaynaklı aerosollerin inhale edilmesi yolu ile bulaşım söz konusudur. Ancak hastalığın gelişimi için alınan partikül boyutunun 5 μm 'den küçük olması gerekmektedir. Zira bu partiküller alt solunum yollarına rahatlıkla ulaşabilmektedir (32). Genel itibariyle aerosollerin alınması ile enfeksiyonun dağılım sergilediği bilinse de açık yaraların kontamine sularla teması ile yara enfeksiyonları, hemodiyaliz fistül enfeksiyonları ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları da bildirilmiştir (111).

Lpn genel olarak iki tip enfeksiyon oluşturmaktadır: pnömoni ile karakterize Legionellozis (Lejyoner Hastalığı) ve nonsistemik, nezle ile benzerlik gösteren Pontiak Ateşi (13). Lpn enfeksiyonlarının % 90'undan Sg 1 sorumludur. Geri kalan kısımda ise Sg 4 ve 6 sorumludur (40).

Lpn ile kontamine haldeki aerosoller inhale edildiğinde, solunum sistemi silli epitel hücrelerini hedef alır ve bu hücrelerin içersinde çoğalmaya başlar (55). Lpn savunmasından sorumlu olan birincil bileşen alveolar makrofajlardır. Makrofajlar tarafından fagosite edilen bakteri, makrofajın iç iş akışını modernize ederek fagolizozom oluşumunu engeller ve makrofaj içi vakuol oluşturarak burada yaşamaya devam eder (68). Makrofaj içindeki süreç makrofajı patlatana dek devam eder, buradan yayılım sağlayarak diğer hücreleri de enfekte ederler. Lpn zar yapısında amip, siliat ve silli epitelinin enfekte edilmesinde görevli 24 kDa'luk Macrophage Infectivity Potentiator (MIP) olarak tanımlanmış bir protein vardır (59).

Lpn Philadelphia 1, opsonizan faktör olmaksızın "cooling phagocytosis" olarak adlandırılan fagositoz ile hücre içine alınır. Bu olayda önce makrofaj pseudopod oluşturur ve bakteriyi çevreleyerek vezikül içersinde alır. Oluşan vezikül sırası ile granülsüz endoplazmik retikulum, mitokondri ve ribozom ile interaksiyona girer. Ancak lizozom ile kontak kuramadığı için replikatif vakuol oluşur ve bakteri makrofaj içersinde yaşamına devam eder. Bir diğer mekanizma ile Lpn, ürettiği ekstrasellüler madde yardımı ile oksijen radikallerinin etkilerini inhibe eder (43,110).

Su sistemlerinde *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio* gibi bakterilerin rahatlıkla kolonize olabildikleri bilinmektedir. Göl suları üzerinde yapılan araştırmada *Vibrio parahaemolyticus* sayısının 27 gün sonunda log 7 oranında azalma sergilediği, buna

karşın *Legionella* spp. için bu oranın 1,5 yılın sonunda ancak log 2 oranında olduğunun tespit edilmesi bakterinin genetik anlamda incelenmesi ihtiyacını doğurmuştur (68).

Lpn genomu incelendiğinde 3000 gen bulunduğu, bunların 2434 tanesinin 6 suşun tamamında ortak olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Kalan gen bölgelerinin fonksiyonları hakkında tam olarak bilgi sahibi olunmasa da yapılan çalışmada *IspD*, *IspE*, *IspF* ve *pilD* gibi genlerin, bakterinin 4-17 °C sıcaklıklarda hayatta kalabilmesinde etkili olduğu ispatlanmıştır. Virulans genlerin hedef alındığı bir başka çalışmada 597 gen incelenmiş bu genlerin besiyerilerde gelişme için gerekli olduğu sonucu ortaya çıkmıştır (67). Norveç'te yapılan bir çalışmada farklı bölgelerden izole edilen suşları moleküler yönden araştırılmış ve aralarında 10 km mesafe bulunan iki suşun ortak kökene sahip oldukları gösterilmiştir (113).

Legionella spp.'nin intrasellüler aktivitesi nedeniyle tedavisinde Makrolidler (eritromisin, azitromisin, klaritromisin) ve Florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin) kullanılmaktadır. Ancak eritromisin damar ilhitabı oluşturma riski nedeniyle alt sıralarda yer almaktadır (59,85).

Sanayileşme ile birlikte temiz su kaynaklarına çok miktarda kimyasal atık karışmaktadır. Bu atıkların içine antimikrobiyal ajanların da karışması bakterilerin doğal ortamlarında dirençli hale gelmelerine neden olabilmektedir.

Tez çalışmamızdaki amacımız, Lpn tedavisinde kullanılan makrolid grubu antibiyotiklerin etkinlik profillerini izlemektir. Çevre ve hastane su örneklerinden izole edilmiş olan *Legionella pneumophila* izolatlarından, MIC değeri ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olan suş ile MIC değeri ≤ 256 $\mu\text{g/mL}$ olan suşun *lpp 2879* ve *lpp 2880* gen bölgeleri RT-PCR ile kantitatif olarak karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Legionella spp. Genel Özellikleri

2.1.1. Tarihçe

1976'da Amerikan Lejyonerleri toplantısının düzenlendiği otelde görülen salgın sonucunda 182 kişide enfeksiyon görülmüş, hızla görülen pnömoni olgusu kaynaklı 29 kişi hayatını kaybetmiştir (42,69). Bu keşif bilim insanlarında yeni bir ufuk açmış ve 1957 yılında Minnesota'da sebebi bilinmeyen ateşli hastalık kaynaklı yaşamını kaybeden bir hastaya ait kan örneğini tekrar incelemeye karar veren araştırmacılar asıl etkenin Lpn olduğu tespit ettiler. Bu nedenle tarihte bilinen ilk Lpn kaynaklı salgın 1957 yılında Minnesota'daki mezbaha işçileri salgını bilinmektedir (26,70).

Sağlık kuruluşları kaynaklı olarak yaşanan ilk salgın Washington'da St. Elizabeth's Psikiyatri Kliniğinde kayıtlara geçmiştir. Hastanede 1965 yılında yaşanan 81 pnömoni vakasının 14'ü hayatını kaybetmiş; serum örnekleri 12 yıl sonra tekrar incelendiğinde % 80'den fazla oranda Lpn antikoru pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular *Legionella* spp.'nin hastanelerde enfeksiyon oluşturma potansiyelini açık şekilde açığa çıkarmıştır. 1980 yılında yapılan bir araştırmada nozokomiyal legionellosis gözlenen bir hastanın odasında yer alan duş başlığından örnek alınmış ve *Legionella* spp. bakterisi izole edilmiştir (2,101,122).

2.1.2. Sınıflandırma

Philadelphia'daki otel salgının ardından Amerikan Hastalık Kontrol Merkezi tarafından etken üzerine yoğunlaşmıştır. Dr. Mc Dade hayatını kaybeden hastaların akciğerlerinden alınan biyopsi örneklerini çalışarak Gram (-) çomaklar izole etmiş ve *Legionellaceae* ailesi içinde *Legionella* cinsine dahil etmiştir (69). *Legionella* spp.'nin tanımlanmasının ardından yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda Lpn ile *Coxiella burnetti* arasında yakın akrabalık tespit edilmiştir (36). Bu bilgiden hareket eden araştırmacılar 1957 yılında Minnesota'da yaşanan salgın verilerini tekrar değerlendirdiklerinde gerçek etkeni tespit edebilmişlerdir (69).

16 S rRNA analizlerinde *Legionellaceae* ailesinin *Proteobacteria* Gamma 2 alt grubunda yer aldığı gösterilmiştir. Besiyerilerinde kolaylıkla üretilmeyen bu bakteri grubu üzerinde DNA dizi analizi, baz oran analizi (Guanin ve Sitozin) yapılmış ve *Legionellaceae* ailesinin *Legionella* (*L.pneumophila*), *Fluoribacter* (*F. bonzemanii*, *F.*

gormanii, *F. dumaffii*) ve *Tatlockia* (*T. micdadei*, *T. maceachernii*) olmak üzere 3 cinsle ayrılması gerektiği önerilmesine rağmen günümüzde *Legionella* cinsi kullanılmaktadır (110).

Legionella spp.'ye ait olarak tanılanmış 59 tür ve 70'den fazla serogrup vardır (Tablo 2.1). Sayıca bu kadar çok üyeye sahip olmasına karşın, enfeksiyonların büyük kısmından Lpn sorumludur. Lpn kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen türler üzerinde yapılan serogruplama çalışmalarında, etkenin % 90'a yakın oranda Lpn Sg 1 olduğu, geri kalan enfeksiyonlardan Sg 4 ve 6'nın sorumlu olduğu ispatlanmıştır (20,38). Lpn ardından en sık enfeksiyon etmeni *L.micdadei* olarak bildirilmiştir (28).

2.1.3. Morfolojik Özellikleri

Legionellaceae ailesi Gram (-), sporsuz, zorunlu aerob, hareketli ve genelde kapsülsüz pleoformik görünümlüdürler. 0,3-0,9 µm eninde, 2-20 µm boyunda bakterilerdir. Kültür ortamlarında boyların 50 µm'ye kadar erişebilir. Doku örneklerinde kokobasil olarak görünür olsalar da, kültür ortamlarında filamentöz şekilde yer alırlar (110). Polar flagellaya sahip olabilirler. İstisnai olarak sadece *L. oakridgensis*'de bu yapıya rastlanmamaktadır (86). Flagellaların sayısı besin ve sıcaklığa bağlı olarak değişim göstermektedir (30).

Legionella spp. üyeleri iç ve dış kısımlarında trilaminer membran, peptidoglikan tabaka ve bazı türlerde kapsül yer almaktadır. Lpn'de 24000-29000 mol ağırlığında dış membran proteini bulunmaktadır. Lpn Sg 1 antikorları bu yapı sayesinde tespit edilebilmektedir. Hücre zarı özel yapıları nedeni ile gram boyamada iyi sonuç vermezler. *Corynebacterium* hücre zarlarında olduğu gibi zar yağ asitlerinin % 80'inden fazlası dallı zincir yapısındadır ve mikolik asit gibi uzun karbon zinciri içeren yapıya sahiptirler. Gram boyamada zıt boya olarak % 0,1'lik bazik fuksin kullanılması boyama performansını artırmaktadır (86). Eğer doku kesitlerinde *Legionella* spp. gösterilmek isteniyorsa Dieterle ve Warthin-Starry gümüşleme boyası kullanılabilir. Doğrudan klinik izolatlardan elde edilen *Legionella* spp.'nin bazı üyeleri (*L.micdadei*) asite dirençli özellik gösterebilmektedirler. Bu nedenle Ehrlich Ziehl Nielsen gibi asitli boyama yöntemleri kullanılabilir.

Tablo 2.1: Legionella spp. yaşam alanları ve türlere ait serogrup sayıları (117)

Çevre ve insandan izole edilen türler		Sadece çevreden izole edilen türler	
Türler	Serogruplar	Türler	Serogruplar
<i>L. anisa</i> *	1	<i>L. adelaidensis</i>	1
<i>L. bozemanii</i> *	2	<i>L. beliardensis</i>	1
<i>L. birminghamensis</i> *	1	<i>L. brunensis</i>	1
<i>L. cincinnatiensis</i> *	1	<i>L. cherrii</i>	1
<i>L. dumoffii</i> *	1	<i>L. donaldsonii</i> *	1
<i>L. erythra</i>	2	<i>L. fairfieldensis</i>	1
<i>L. feelei</i> *	2	<i>L. fallonii</i>	1
<i>L. gormanii</i> *	1	<i>L. geestiana</i>	1
<i>L. hackeliae</i> *	2	<i>L. gratiana</i>	1
<i>L. jordanis</i>	1	<i>L. gresilensis</i>	1
<i>L. drancourtii</i>	1	<i>L. israelensis</i>	1
<i>L. longbeachae</i> *	2	<i>L. jamestowniensis</i>	1
<i>L. lytica</i>	1	<i>L. londiniensis</i>	1
<i>L. maceachernii</i> *	1	<i>L. moravica</i>	1
<i>L. micdadei</i> *	1	<i>L. nautarum</i> *	1
<i>L. oakridgensis</i> *	1	<i>L. quateirensis</i>	1
<i>L. parisiensis</i>	1	<i>L. quinlivanii</i>	2
<i>L.pneumophila pneumophila</i> *	15	<i>L. rowbothamii</i>	1
<i>L. pneumophila fraseri</i> *	1	<i>L. rubrilucens</i>	1
<i>L. pneumophila pascullei</i> *	1	<i>L. santicrucis</i>	1
<i>L. sainthelensi</i> *	2	<i>L. shakespearei</i>	1
<i>L. tuesonensis</i> *	1	<i>L. spiritensis</i>	1
<i>L. wadsworthii</i> *	1	<i>L. steigerwaltii</i>	1
		<i>L. taurinensis</i>	1
		<i>L. waltersii</i>	1
		<i>L. worsleiensis</i>	1

*: İnsanlarda enfeksiyon oluşturabilen türler

Ancak bakterinin kültür ortamında üretilmesi bakterinin bu özelliğinin yitirilmesine neden olmaktadır. Stoplazmik granülleri gösterilmek istendiğinde Sudan Black B boyası kullanılarak polibetahidroksibutirat granülleri hedef alınabilir (30,122).

2.1.4. Üreme ve Kültür Ortamları

1977 yılında *Legionella* spp. tanımlanması ile bakterinin biyokimyasal özellikleri üzerine yoğunlaşıldı. Adi besiyerlerinde üretilmeyen bu bakteri için özel supplement ve kimyasallar gereklidir. Günümüzde Lpn üretimi için BCYE gibi kompleks besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyeri Lpn üretilmesi için ortamda mutlaka bulunması gereken demir ve L-sistein içermektedir. Aktif kömür, oksijen radikalleri ve yağ asitlerinin neden olacağı negatif yönlü etkiyi ortadan kaldırmaktadır. Bakteri için gereken maddelerin ortama eklenmesi yaşam için mutlak gerekli olsa da, besiyeri pH değerinin 6,9 olması gerekir (30,54,106).

Doku ya da çevresel örneklerden izole edilen bakterinin besiyeri inokülasyonun ardından $36,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ve % 90 nemli ortamda inkübe edilmesi gereklidir. Ortamda % 5 CO_2 varlığı üremeyi artırmaktadır. Ortalama 3-4 günlük inkübasyonun ardından gözle görünür koloniler oluşturabilse de; üreme gözlemlenmeyen petrilere 10 güne kadar takibi yapılmalıdır. Bakteri, kültür ortamında S tipi buzlu cam görünümünde, şeffaf, gri-beyaz koloni oluştururlar (Şekil 2.1) (30,107). Bazı koloniler kırmızı, beyaz ya da mavi renkte intrasellüler floresans özellik gösterebilirler (Şekil 2.2) (75).

Şekil 2.1: *Legionella pneumophila*'nın koloni mikroskopundaki görüntüsü



Şekil 2.2: Gri membran filtre üzerinde *Legionella pneumophila* görüntüsü



2.1.5. Biyokimyasal Özellikleri

Legionellaceae ailesine ait bakteriler zorunlu aerobdurlar. İhtiyaç duydukları şekeri pentoz çevrimi ve Embden-Meyerhof sistemindeki enzimler ile sentezler. Jelatinaz, katalaz ve oksidaz enzimlerine sahip olmalarına karşın, üre ve nitrat kullanımı yoktur. Lpn, hippurat hidroliz yeteneğine sahip olması ile cinsin diğer üyelerinden ayırmaktadır (106,117).

2.1.6. Yaşam Alanları

Legionella spp.'nin ekolojisinin bilinmesi potansiyel salgınların önüne geçilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Lpn, çevresel kontamine su birikintilerinde, soğutma kuleleri, sıcak/soğuk su tankları, duş başlıkları, termal banyo-çamur gibi nem oranının yüksek ve 20-63 °C sıcaklıkta yaşam göstermektedirler (40). Sulak alanlarda çözülmüş oksijen içeriğinin 0,2-15 µL olduğu, pH 5-8,5 olan alanlarda 10 yıla kadar hayatta kalabilmektedirler (110).

Lpn'nin doğal ortamlarda hayatta kalabilmeleri çeşitli faktörlerin varlığı ile kolaylaşabilmektedir. Suda serbest yaşayan amipler ve kamçılı protozoonlar içerisine girme kabiliyetleri, uygunsuz şartlar altında bile canlı kalabilmelerini sağlamaktadır. Siyanobakterilerin ürettiği metabolitler, sediment birikimleri, yüksek oranda Ca⁺² ve Mg⁺² içeriği Lpn üremesine olumlu yönde etki etmektedir (121).

İnsan nüfusunun artması çok katlı yerleşim alanları ile su taşıma ve depolama sistemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. İnsan yapımı su sistemlerinin dışa açılım noktaları ve suyun depolandığı durgun alanlardan yapay sistemlere geçiş yaparlar.

Bakterinin klora dirençli olması ve biyofilm içinde hayatta kalabilme yetenekleri, su sistemlerinde canlı kalabilmelerinde kilit rol oynamaktadır (89).

Su sistemlerinde *Legionella* spp. kolonizasyonu suyun sıcaklığı, mikroflora varlığı ve mikrofloranın üretmiş olduğu sedimentlerin birikimi ile ilişkilidir. Sediment yüzeyinde yer alan ortam bakterileri *Legionella* spp. için temel besinleri sağlamaktadır. Genel itibariyle 5 µm'den küçük aerosollerin alınması ile enfeksiyonun dağılım sergilediği bilinse de açık yaraların kontamine sularla teması ile yara enfeksiyonları, hemodiyaliz fistül enfeksiyonları ve gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına da neden olabilmektedir (110).

2.2. Patogenez

2.2.1. İnfeksiyon Kaynakları

Sulak alanlar *Legionella* spp. için rezervuar görevi görmektedir. Bu sulardan beslenen su dağıtım sistemleri bakterinin geniş alanlara yayılmasında ana yoldur. Hastanelerin su sistemlerinde gelişen bakteri kolonizasyonu, hastane enfeksiyonlarının ana kaynağını oluştururken; toplumdan kazanılan enfeksiyonlar için kontamine sular ile temas esas neden olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, endüstriyel atıkların kontrolsüz şekilde sulara salınması mevcut bakteri yapısında modifikasyonlara neden olmakta ve bu durum tedaviyi güçleştirmektedir (34,50).

Lpn'nın kolonize olduğu sistemler şunlardır (110);

- ◆ Su tankları
- ◆ Sıcak ve Soğuk su sistemleri
- ◆ Duş başlıkları ve Sıcak su için kullanılan musluk başları
- ◆ Klima suları
- ◆ Termal banyolar

Bakterinin neden olduğu salgınlar üzerine yapılan çalışmalar su sistemleri vastasıyla bakteri yayılımının çok geniş alanlara ulaşabildiğini göstermiştir. Blatty, farklı bölgelerden izole edilen suşlar moleküler yönden araştırılmış ve aralarında 90 km mesafe bulunan iki suşun ortak kökene sahip oldukları tespit edilmiştir. Araştırmada 3,5 µm çaplı aerosolde yaklaşık olarak 147 bakteri olduğunu ve bu mesafeye yayılma süresi olarak 11 saatten kısa olduğunu belirlemişler (11).

2.2.2. Bulaş Yolları ve İnsidans

Bakterinin yayılım şekli kesin olmamakla birlikte solunum yolu ile bulaşmanın gerçekleştiği kanısı yaygındır. Aspirasyon ya da solunum yollarının manipülasyonu, kontamine su ile direk temas, açık yaraların kontamine su ile teması ile de bakteri bulaşımı gerçekleşebilir (57). Kontamine sular ile yıkaması yapılan solunum ekipmanları da aerosol kaynağı olabilirler. Bu aerosollerin sayısının az olduğu ancak hastalığın gelişebilmesi için gerekli olan çok ufak partikülleri (1-5 µm) meydana getirebileceği gösterilmiştir. Kontamine sularla temasa bağlı olarak yara enfeksiyonlarının da gelişebileceği bildirilmiştir (110).

Toplum kaynaklı Lpn enfeksiyonlarında, su kaynaklarının bakteri tarafından kontaminasyon derecesi, kontamine su ile temas eden kişinin duyarlılığı ve etkenin maruz kalan kişiye olan bulaş yoğunluğu hastalığın insidansında etkilidir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar; hastanın durumuna, bakterinin kolonizasyon derecesine direk olarak bağlıdır. Yapılan çalışmalar hastane enfeksiyonlarının büyük kısmının su depolarından orjinlendiğini göstermiştir (1). Hastalık seyrinde bakterinin tanılanma süreci de önemli yer tutmaktadır. Bu nedenle hastaların ya da hastalardan alınan örneklerin Lpn tanısını yapabilecek bir laboratuvara yakın olmaları hastalık seyrinde önemli bir etkidir.

Toplum kaynaklı pnömoni vaka etkenleri incelendiğinde Lpn % 1-5 oranıyla *Streptococcus pneumonia* ve *Haemophilus influenzae*'nin ardından üçüncü sırada yer almaktadır. Ancak Lpn kaynaklı pnömoni vakalarında hastanın yaşı, sigara kullanımı, immün sistem sorunları ve kronik akciğer rahatsızlıkları bulunması ölüm oranını ciddi oranda (% 5-30) yükseltmektedir (102,117).

2.2.3. Legionella Bakterilerinin Hücreye Girişi ve İntrasellüler Yaşamları

Aerosoller içinde solunum yolu ile vücuda girişini gerçekleştiren bakteri alveolar boşluklara doğru yönelim göstermektedir. Bunun için aerosollerin boyutlarının 5 µm'den küçük olması gerekmektedir. Alveolar boşluklara ulaşan bakterilerin oluşturacağı klinik tablo, bakteri virulansına ve konağın savunma yeteneğine bağlıdır (109). Konak savunmasında ilk etki eden komponent alveolar makrofajlardır. Alveolar makrofajlar iki farklı yol ile bakteriyi absorbe ederler. Birincisi klasik olarak pseudopodlar ile bakteriyi çevreler ve hücre içinde fagolizozom oluşturur

(Konvansiyonel Fagositoz). Diğer yol ise coiling fagositoz denen sarmallar oluşturarak hücre içine alınmasıdır (87) (şekil 2.3).

Konvansiyonel Fagositoz; Lpn, Lipopolisakkarit tabakası ve MOMP (Major Outer Membrane Protein-Temel Membran Porin Proteini) sayesinde komplemanı hem klasik hemde alternatif yoldan aktive edebilme yeteneğine sahiptir. Lipopolisakkarit tabaka ile klasik yoldan aktivasyon sağlar (87). Alternatif yolda C₃b, lipopolisakkarit yapı yerine MOMP'ye bağlanarak aktivasyon sağlamaktadır. Ancak MOMP yapısı hem virulan hem de avirulan suşlarda bulunabildiği için virulanstaki rolü hakkında kesin bir fikir yoktur.

Coiling Fagositoz; Alveolar makrofaj tarafından tek taraflı bir yalancı kol oluşturulur ve bu kol bakteri etrafında helezon şekilde sarmal oluşturur. Bu sarmal yardımı ile bakteri fagosite edilir. Bu fagositoz şekli Lpn Sg 1'de gözlenmektedir (79). Konvansiyonel fagositozdan farklı olarak işlemin geręekleřmesi için bir opsonine ihtiyaç yoktur. Özellikle amip enfeksiyonu sonrasında geręekleřen enfeksiyonlarda gözlenen bu fagositoz tipinde gözlemlenen bakterinin daha patojen olduğunu ve coiling fagositozla hücre içine invazyon yeteneği arasında doğru orantı olduğu gösterilmiştir (19).

C₃b opsonizasyonu Lpn fagositozunu uptake etmektedir. Ancak Lpn'yi özel kılan MIP olarak isimlendirilen 24 kDa'luk bir dış membran proteini yardımı ile opsonizasyon olmaksızın hücre içine girebilme yeteneğidir. Bakteride in vitro koşullarda geręekleřtirilen *MIP* gen delesyonun, bakteri invazyon yeteneğini azalttığı gösterilmiştir. *Non-pneumophila grubu Legionella*'larda ise 24-30 kDa uzunluğunda *MIP* benzeri protein tespit edilmiştir. Ayrıca fosfolipaz C, asit-fosfataz, protein kinaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimleri ile intra-sellüler yaşamlarını devam ettirmektedirler (55, 86).

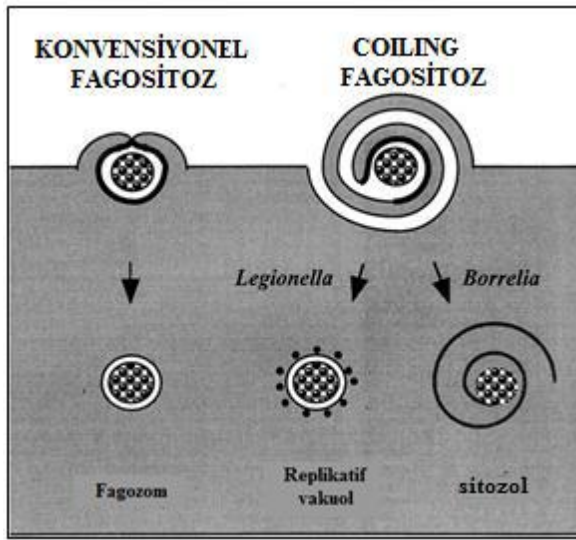
Fagositozun normal seyrinde gitmesi durumlarında hücre içine alınan bakteri vakuölü, lizozom birleşerek bakteri sindirilir. Lpn için bu birleşme için geçen süre 8 saatten az değildir. Bunun nedeni *dot* ve *icm* genlerince kodlanan *dot/icm* tip 4 salgı sisteminin fagolizozom oluşum sistemini tekrar regüle etmesidir. Bu sistem ayrıca konak hücre apopitozunu da düzenlemektedir (17,44).

Coiling fagositozda ise bakteriyi barındıran sarmal sırasıyla konağa ait düz endoplazmik retikulum vezikülleri, mitokondri ve ribozomları ile bağlantı kurarken; lizozom ile füzyon geręekleřmez. Oluşan bu yapıya Replikatif fagozom denir. Bu yapı

sayesinde bakteri ihtiyaç duyduğu aminoasitleri konağa sentezletir ve yaşamını sürdürür. Log fazının ortalarında bakteri sayısının iki katına çıkması 2 saati alır ve 48-72 saat içinde 1000 kata kadar sayısı artabilmektedir (41).

Konağa ait aminoasit kaynaklarının tüketilmesinin ardından 3',5'- bispirofosfat (ppGpp) birikir. Bu yapı, sodyuma duyarlı ve hareketli yapının oluşmasına neden olur. Ekspotensiyel fazın sonlarına doğru ppGpp sentetaz ile durağan faz RpoS σ faktör miktarı artar. Bu yapı yeni konak enfeksiyonları, tuz hassasiyeti, osmotik direnç, hareket gibi özelliklerin kazanılmasına katkı sağlar (103).

Şekil 2.3: Fagositoz çeşitleri (87)



2.2.4. Legionella ve Demir Etkileşimi

Demir yaşayan organizmalar için esansiyel elementtir. Doğada Fe^{+3} halinde yer alan demir, indirgenerek Fe^{+2} halinde hücreye alınmaktadır. Demir, hücre içine doğrudan ya da transferrin, laktoferrin olarak bilinen proteinlere bağlanarak alınır (28). Virülans faktörü olarak bilinen bu yapılara siderofor denir. Mikroorganizmalar arasında mikobaktin (*Mycobacterium*), basillibaktin (*Bacillus subtilis*), pseudobaktin (*Pseudomonas*) ve enterobaktin (*E.coli*) gibi farklı isimlerle anılsalar da aynı görevi üstlenmişlerdir (117).

Demir, *Legionella* spp. için hem hücre dışı yaşamda hem de hücre içi yaşamda önemlidir. Makrofaj enfeksiyonunda rol alan pneumobaktin ile birlikte piyoverdin benzeri sideroforlar üretiminde görev alırlar. Legiobaktin, periplazmik ve sitoplazmik

ferrik redüktazlar ile birlikte sitokrom c biyogenez sistemi demir kazanımında etkin rol oynamaktadır. Ayrıca periplazmik ve sitoplazmik Fe^{+3} redüktazlar gibi demir asimilasyonuna katkı sağlarlar.

Legionella spp.'nin makrofaj içi yaşamı demir varlığı ile orantılıdır. Yapılan çalışmalarda transferrin reseptör ekspresyonunun düşük olmasının *Legionella* spp. enfeksiyonlarının önüne geçtiği gösterilmiştir. Transferrin ve laktoferrini direkt kullanma yeteneği olmayan bakteri, demir ihtiyacını konak hem bileşiklerini kullanarak sağlamaktadır (81). Demir kazanımı için gerekli olan genler transkripsiyonel *Fur* tarafından regüle edilir. *Frg A* geni *e.coli*'deki *Aerobaktin Sentetaz*, *luc A* ve *luc C* ile homolog görevde proteinleri kodlamaktadır. *Frg A* mutasyonları olan suşlarda üreme yeteneklerinin 80 kat azaldığı tespit edilmiştir (48).

2.2.5. Klinik Belirtiler

2.2.5.1. Lejyoner Hastalığı (Legionellosis)

Konağa girişinden itibaren hücre içi çoğalmı gerçekleştirerek sayısal anlamda artan bakteri, hücreyi patlatarak yeni hücreleri enfekte etmek için dağılır. Alveolar bölgede çok sayıda makrofaj parçalanması nedenli litik ürünler açığa çıkarak doku hasarı ve enflamasyona neden olur (9). Enfeksiyon, bebek ve çocuklarda, kronik hastalarda, AIDS olgularında, organ nakilli hastalarda, sigara kullanan orta ve üst yaş gruplarında, diyabetlilerde yüksek oranda görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, immün sistem sıkıntısı olan hastalarda ölüm oranının % 7-24 arasında değişim gösterdiği ve bu olguların bir çoğunda seyahat geçmişi olduğu tespit edilmiştir (67,75).

Lejyoner hastalığı olarak bilinen bu tabloda ilk klinik belirti pnömoni'dir. Hastalığın gelişmesi için gereken kuluçka süresi 2-10 gündür. Öncelikle hafif ateş kendini gösterir. Ardından öksürük, baş ve kas ağrısı, titreme, sulu diyare, hipoksi gibi belirtiler ortaya çıkar. Ateş yüksek oranda 40 °C'nin üzerindedir. Her dört hastanın birinde denge kaybı ve halisülasyon gözlemlenebilir (36).

Akciğer grafileri diğer pnömoni olgularından farksızdır. İlk anlamlı görüntü tek taraflı infiltrasyondur. Diğer pnömoni olgularından farklı olmak üzere anormal karaciğer fonksiyonları, hematüri, hiponatremi görülmektedir (77,122).

2.2.5.2. Pontiak Ateşi

Adını 1968 yılında Michigan-Pontiak'da görülen salgından alan hastalık, immün sistemi güçlü olan kişilerde görülen grip-soğuk algınlığı benzeri hastalıktır. Kuluçka

süresi saatlere kadar inebildiği gibi, pnömonik vakalardan daha kısa olup ortalama 1-2 gün arasında sürmektedir. Miyalji, hafif ateş, titreme ve mental keyifsizlikle karakterize olan hastalık kapsamlı tedaviye ihtiyaç duymaz. Hatta kişiler ilaç desteğine ihtiyaç duymadan iyileşirler (77,102).

2.2.5.3. Ekstra Pulmoner Hastalıklar

Lpn, sulak ve nemli alanlarda kolonize olup bu bölgelerden yayılım gösterse de kontamine suya direk temas ile bulaşım oldukça nadirdir. Pnömoni ve Pontiak ateşi gibi bu hastalıklar da immün sistem sorunları olan kişilerde görülmektedir. Solunum sistemi dışında nadir olarak endokardit, deri absesi, perikardit, beyin absesi, peritonit ve pankreatit gibi farklı doku tiplerinde enfeksiyon görülmektedir (3,4,33,64).

2.3. Virulans

2.3.1. Biyofilm İçinde Yaşama Yetenekleri

Bakterilere ait yapışma özellikleri, 1928 yılında Rus bilim insanı Sergei Winogradsky'in toprak örnekleri üzerinde yaptığı çalışma esnasında mikrobiyal örneklerin cama yapıştığını fark ettiği andan itibaren bilim dünyasının ilgisini üzerine çekmiştir (114). 2 yıl sonra Zobell, tatlı su içinde yer alan organizmaların da cam yüzeylerine yapışabildiklerini ve burada koloni oluşturabildiklerini göstermiştir (123). Yapılan çalışmalar bu yapının isimlendirilmesine ihtiyaç doğurmuş, 1976 yılında Marshal tarafından “sulak ortam ile temas halinde yer alan cansız yüzey üzerinde mikroorganizma kolonizasyonu” olarak tanımlanmıştır (66).

Biofilm oluşumu sudaki organik maddelerin tutulması ve sonrasında mikroorganizmaların o alana tutunması şeklinde gelişir. Tutunmanın ardından bakterilerce salınan polisakkarit madde ile biofilm sağlanmış olur. Ortamda oluşan mikro koloniler süregelen zaman içinde diğer organizmaların da o alana gelmesine olanak sağlar ve kominite oluşmuş olur. Yapılan araştırmalar biofilm oluşumunda su sistemlerinde kör noktaların olması, mevsimsel olarak su sistemlerinin kullanımının olmaması ve demir gibi aşınması kolay malzemelerden su sistemlerinin kurulması gibi çevresel faktörler sıralanmıştır. Bunun yanında bakterinin sıcaklık, kimyasal etmenlerin varlığı ve besin eksikliği gibi faktörlerin etkisinden arınmak için serbest yaşamdan ayrılarak biofilm içine girmeyi tercih ettiği düşünülmektedir. Bunun yanında biofilm tabakasından ayrılarak farklı alanlarda kolonize olarak biofilm oluşturma ve çoğalmaya da olanak sağlamaktadır (112).

Bakterilerin biofilm içinde yaşama tercihleri korunma amaçlı olarak düşünülse de kominite içinde yer alan farklı kökene ait bireylerin kendi aralarında gen alışverişi yapabilmeleri genetik mozaik açısından önem taşımakta ve yeni dirençlere neden olabilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda bakterinin canlı kalmasında etkin role sahip olan amiplerin de bu tabaka içinde yer alabildikleri gösterilmiştir (109). Biofilm yeteneği kimi araştırmacılar tarafından virulans faktörü olarak değerlendirilmese de gerek gen alışverişi gerekse de biofilmin oluşmasını sağlayan glikoproteinlerin hücre zarından geçişini bir virulans faktörü olan Twine-Arginine Translokasyon yolunun regüle ettiği tespit edilmiştir. 2009 yılında Lau tarafından yapılan bir araştırmada virulent suşların biofilm içinde, avirulent suşların ise serbest formda daha sık rastlandığına işaret edilmiştir (60).

2.3.2. Hücre Dışı Uzantıları

Bakterilerde hücre dışı uzantıların tanımlaması yapıldığında iki ana eleman akla gelmektedir; flagella ve pilus. Hareketi sağlayan, bazal membrana bağlı olan filamentöz yapı flagella olarak adlandırılmaktadır. Bakteriden bakteriye konumu ve sayısı değişiklik gösterse de görev itibarıyla aynı işlevi görmektedir. Gram negatif bakterilerin büyük kısmında gözlemlenen bu yapıların bulunma yerlerine göre bakteriler; monotrik (tek ve polar), lofotrik (min 2 ve polar), amfitrik (iki tarafta birer), amfilotrik (iki tarafta en az iki) ve peritrik (tüm yüzey kaplı) olarak gruplanmaktadır (118).

Flagella; filament, bazal cisim ve çengelden meydana gelmektedir. Filament kısmı flagellin proteininden oluşan antijenik yapıdır. Bazal cisim; membran, periplazmik alan, peptidoglikan tabaka ve lipopolisakkarit yüzeye temas halinde olan 4 halkadan oluşur ve ana hareketten sorumludur (30). Bazal cisim ve flagellin arasındaki hareket koordinasyonu çengel ile sağlanmaktadır. Lpn yapısı değerlendirildiğinde bakterinin hareketli olmasına ve hücre içi yaşama yeteneği sağlamasına ve biyofilm içine dahil olmasına olanak sağladığı için önemlidir (118).

Pilus, konağa ya da yüzeye yapışmadan sorumlu olan ekstramembranal elemanlarıdır. Yapışmayı ve bir araya gelmeyi sağlamanın dışında biyofilm tabakası içinde genetik alışverişi düzenlediği için genetik çeşitliliğe ve olası dirençlere zemin hazırlamaktadır. DNA alışverişinden sorumlu olan seks pilusu, bir bakteride en fazla 10 tane bulunmaktadır (7).

Lpn'de bulunan pilus yapıları genetik materyalin *pilD* gen bölgesi tarafından sentezlenmektedir. İmmün sistemin uyarılmasında etkin olan bu yapılar sıcaklık, viskosite ve osmosite ile regüle edilmektedir. Buna dair en bilinen örnek, Lpn'de yer alan yapışmadan sorumlu olan tip IV pilusudur. 2005 yılında Molofsky'nin yaptığı araştırmada ortamda yer alan besin maddelerinin tükenmesi ile bakteri flagella üreterek konak hücre lizisini uyardığı ve yeni besin kaynağı bulmak adına hücre patlamasını teşvik ettiğini göstermiştir (74).

2.3.3. Antijenik Yapıları ve Toksinleri

Lpn'nin virulansını belirleyen organik ya da inorganik bir çok etken bulunmaktadır. Lipopolisakkaritler, flagella, fimbria ve ısı şok proteinleri bu yapılar arasında yer almaktadır. Bu yapılar bakteriye özgü antijenik özellik kazandırmaktadır. Tanımlanmış olan legiolisin proteini bakterinin UV ışını, sıcaklık ve diğer fototif etkenlere karşı koruyarak kültür ortamına adaptasyona katkı sağlamaktadır (10).

Dış zarda yer alan Dış Membran Porinleri, komplementleri bağlayarak opsonizasyondan sorumludur. MIP proteini bakteri hücre içine girdikten sonra propilprolil izomeraz aktivitesi göstererek bakterinin hücre içi sindirimden korunmasını sağlamaktadır. *mip* geni akciğerlerde gerçekleşen enfeksiyonun erken evresinde fagozomun yüzey proteinlerinin izomerizasyonunu sağlayarak bakterinin canlı kalmasını sağlar. 24-25 kDa boyutlarında tek bir dış membran proteininin olduğu, bunun bakterinin yapışmasında görev aldığı belirlenmiştir (18).

Isı Şok Proteinlerinin sıcaklığa dayalı ekstrem durumlarda sentezlendiği bilinse de, hücre içi konumlanan *Hsp 60*'ın makrofajlardan sitokin salgılanmasında etkili olduğu bilinmektedir (92).

2.3.3.1. Sekresyon Sistemleri

Bakterinlerin tümünde hücre içi toksinlerin ve yaşamsal artık maddelerin dış ortama salınımı ile; hücre dışı kofaktörlerin hücre içine alınımı zar proteinleri tarafından regüle edilmektedir. Bakterilerde bu zar proteinleri tarafından oluşturulmuş 6 tip sekresyon sistemi tanımlanmıştır (6).

- ❖ Tip I: Membran Füzyon proteini, ABC proteini ve transmembran proteininden oluşmuş olan transport sistemi
- ❖ Tip II: Por sisteminde bir parçası olan taşıma sistemi

- ❖ Tip III: *Yersinia*, *Vibrio* ve *Salmonella* gibi Gram negatif bakterilerde flagella oluşumundan sorumlu olan taşıma sistemi
- ❖ Tip IV: Hücre içi patojenite yeteneğine sahip olan bakterilerde bulunan taşıma sistemi
- ❖ Tip V: Oto-taşıma sistemi olarak görev alan sistem
- ❖ Tip VI: Bazı *Vibrio* ve *Pseudomonas* türleri tarafından savunma mekanizması olarak kullanılan taşıma sistemi

Hücre içi patojeni olan Lpn'de tip IV sekresyon sistemi bulunmaktadır. Bu sistem genetik materyalin *dot* ve *icm* bölgelerince sentezlenmektedir. Bu proteinlerin etkisi ile fagozom lizozom birleşimini tamamlayamaz ve öncelikle endoplazmik redikulum ile bağlantı kuran fagozom sonraki basamaklarda ribozom ve mitokondri ile etkileşim kurar (98).

Lpn'nin sahip olduğu diğer sistem ise Tip II'dir. *pilD* geni tarafından regüle edilen bu sistem ile proteaz, fosfataz, nukleaz, fosfolipaz A, süperoksit dismutaz gibi enzimlerin üretimini düzenlemektedir (5).

2.3.3.2. Nukleaz Aktivitesi

Nukleaz enzimleri nükleik asitlerin sindiriminde, gen regülasyonlarında, genetik tamiratta ve virüslere karşı savunmada görev alan enzimlerdir. Hedef aldıkları nükleik asit tipine göre Deoksiribonukleaz (DNaz) ve Ribonukleaz (RNaz) olarak isimlendirilmektedirler. *Legionella* spp.'ye tip II sekresyon sisteminin kazandırmış olduğu bu enzim, bakterinin hücre içi yaşam başarısında etkin rol oynamaktadır. Ancak yapılan araştırmalar, Lpn söz konusu olduğunda sadece RNaz'ın bu gen tarafından regüle edildiğini göstermiştir (5,29).

2.3.3.3. Proteaz Aktivitesi

Protein denatürasyonundan sorumlu olan Proteaz enzimi, işlev ve bulunuş yerine göre metalloproteaz, aspartat, serin, sistein gibi isimlendirilir (8). Lpn enfeksiyonları düşünüldüğünde akla ilk akciğer enfeksiyonları gelse de doku harabiyeti yapma kabiliyetleri de bulunmaktadır. Doku harabiyetlerini hücre dışına salgıladıkları proteaz enzimleri sayesinde gerçekleştiren bakterinin metalloproteaz ve amilopeptidaz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Akciğer enfeksiyonlarında diğer bakteri enfeksiyonları ile olan benzeşimi doku hasarı için de geçerlidir. Ekstrasellüler proteaz enzimi *Pseudomonas aeruginosa*'nın elastaz enzimi ile benzerlik göstermektedir (28).

Proteolitik etkisinin yanında hemolitik etkisinde bulunan enzimin polimorfonükleer hücreler üzerinde kemotaksis ve oksidatif etkisinin zayıf olduğu tespit edilmiştir. Enzim üretme özelliklerini yitiren suşlarda enfeksiyon yeteneği kaybolduğu da gösterilmiştir (73).

2.3.3.4. Fosfolipaz Aktivitesi

Temel fonksiyonları fosfolipitleri parçalamak olan fosfolipazlar her biri farklı görevlerde bulunan A, B, C ve D olarak 4 alt grup altında incelenirler. Açıl zincirlerini parçalamakla görevli olan A ve B'nin haricinde fosfolipaz C diaçilgliserolün hidrolizinden, fosfolipaz D ise fosfattan alkol ve fosfatidik asit oluştururlar.

Lpn'nin sahip olduğu fosfolipaz A ve fosfolipaz C hücre içi sinyal iletimini bozarak bakterinin sindirilmeden canlı kalmasına olanak sağlamaktadır. Fosfolipaz C, fosfoinositid fosfotidilinosito-4,5 bifosfat'ı (PIP₂) hidrolize uğratarken açığa çıkan metabolitler Ca⁺² iyonlarının sitoplazmadan endoplazmik retikuluma doğru akmasına yol açar. Ca⁺² iyonlarının yoğunluğunun artması fosfolipaz C aktivasyonuna neden olur. Aktive olan fosfolipaz C oksijen radikallerinin salınımını sağlar. Oksijen radikallerinin etkisi ile nötrofil kemotaksisi hızlanır ve enfeksiyon seyrini hızlandırır (28,37).

2.3.3.5. Lipaz Aktivitesi

Lipaz enzimi Lpn'nin intrasellüler yaşamında etkin rol oynamaktadır. Genetik materyalin *pilBCD* bölgesi tarafından sentezlenen enzimin granülosit kemotaksisini önlediği, hücre içi sindirimi engellediği, bakterinin hücre zarını parçalayarak yayılma hızını artırdığı gösterilmiştir (98).

2.4. Klinik Dışı Örneklerde Legionella Bakterilerinin İzolasyon Yöntemleri

2.4.1. Kültür Metodu

Lpn izolasyonu ile alakalı olarak tüm dünya genelinde ortak fikir olarak kullanılan bir standart, besiyeri ve yöntem bulunmamaktadır. International Organization for Standardization (ISO) tarafından çevresel su örneklerinin toplanması, yoğunlaştırılması ve bakterinin izole edilmesini açıklayan 11731 numaralı standart dünya genelinde en fazla kullanıcıya ulaşan rehberdir. Ülkemizde Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nce (THSGM) hem klinik örnekler hemde su gibi klinik dışı örneklerin toplanması ve bakterinin izolasyona yönelik yöntemler geliştirilmiştir.

ISO standardı, yan flora üyerinin baskılanması için ısı ya da asit ile muameleyi ardından da BCYE- α ve GVPC besiyerine ekimi önermektedir (54).

Amerikan Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC), Lpn analizi için musluk ve duş başlığı gibi özel bölgelerden örnek alınmasını, yan floranın ortadan kaldırılması için pH 2,2'lik HCl/KCl ile 15 dk. yıkamayı, ardından ekim işleminin yapılmasını, bakteri yoğunluğunun az olduğu suları göz önünde bulundurarak filtrasyon yöntemi ile yoğunlaştırma yapılmasını önerir. Besiyeri olarak BCYE, CCVC ve PCV gibi besiyerlerini işaret etmektedir (15).

THSGM, su sistemelerinden alınacak olan örneklerde, örneğin alınış yerine göre farklı ön işlemler uygulanmasını önermektedir (107).

Kabul gören standartlar incelendiğinde ortak noktanın asit ile yan flora baskılanması ve az yoğun koloniye sahip sular için filtrasyon ile yoğunlaştırma olduğu görülür. Ancak asit ile muamelede pH 2,2 HCl-KCl solüsyonu önerilse bile, örneğin asit ile muamele edilmesi önerilen süreler 5-30 dk arasında değişiklik göstermektedir. İncelenmesi tavsiye edilen örnek miktarı ise vakalar arasında değişim göstermektedir. Bazı standartlar eküvyon sürüntüsü ile çalışılmaya olanak sağlarken (96), diğer standartlar incelendiğinde örnek miktarlarının 100 mL-10 L arasında değişim gösterdiği görülmektedir (54,107).

2.4.1.1. Su Numunelerinin Toplanması ve Yoğunlaştırılması

Lpn izolasyonu için farklı noktalardan örneklerin nasıl ve ne kadar alınması ile alakalı farklı görüşler hakimdir. Özellikle numune miktarları konusunda çeşitli uygulamalar olsa da ortak nokta numunelerin alındığı şişelerin steril ve Na-Tiyosülfat içermemesi gerektiğidir (107).

2.4.1.1.1. Sıcak Su Tanklarından Örneklerin Toplanması

Tanktan su tahliyesini sağlayan musluk açılıp 100 mL su alınır. Ardından yaklaşık 1 dk kadar su tazyikli şekilde akıtılır ve tekrar 100 mL örnek alınır ve şişenin ağzı kapatılıp en kısa sürede analize gönderilir (107).

2.4.1.1.2. Lavabo Musluk ve Duş Başlıklarından Örnek Alınması

Diğer standartların aksine yapılan pratik çalışmalar musluklardan ve duş başlıklarından örneklerin eküvyon çubuğu ile sürüntü şeklinde alınması gerektiğini göstermiştir. Bunun için önceden su akıtılmış olan musluk ağzından içeri bir çift

eküvyon çubuğu sokulur ve etraflıca örnekleme sağlanır. Ardından musluktan eküvyon kabı içinde 1-2 mL su akıtılır ve çubuk ucundaki pamuğun kurumaması engellenir.

Ancak eküvyonun bulunmadığı durumlar göz önüne alınırsa 100 mL su örneğinin de alınıp analiz edilebileceği belirtilmektedir (54,107).

2.4.1.1.3. Havalandırma Sistemleri Soğutma Kulesinden Örnek Alınması

Soğutma kulesi örnekleri diğer sistemlerden örnek alınmasından farklı olarak kule içersinde şişenin daldırılması esasına göre yapılmaktadır. Sistemi destekleyen birden fazla kule varsa da her kuleden ayrı ayrı olacak şekilde örnekleme yapılmalıdır (107).

2.4.1.2. Kullanılan Besiyerleri

2.4.1.2.1. BCYE Agar (Brillant Charcoal Yeast Extract Agar)

Dünya genelinde Lpn üretilmesi için kabul gören tüm standartlarda ortak olarak adı geçen besiyeridir. Seçici olarak bilinen diğer tüm besiyerlerin özünü oluşturmaktadır.

İçerisinde bulundurduğu ACES, L-sistein, demir III pirofosfat ve α -ketoglutarat ortam pH'ında oluşabilecek muhtemel değişikliğin yaratacağı olumsuz etkiyi minimize etmek amacıyla kullanılmaktadırlar. Özellikle ACES tamponu, Lpn üremesi esnasında oluşabilecek olan metabolitlerin etkisini karşı destek oluşturmaktadır. Aktif kömür ise ışık kaynaklı oluşabilecek oksijen radikallerinin oluşmasını engellemektedir.

Gerek genel üretici özellikteki BCYE, gerekse de seçici özellikteki diğer besiyerlerinde kritik nokta besiyeri pH'ının doğru şekilde ayarlanmasıdır. Lpn için hazırlanan besiyerinin son pH değeri mutlaka $6,9 \pm 0,3$ olmalıdır (54).

2.4.1.2.2. DGVP (Dye-Glisin-Polimiksin-Vankomisin) Agar

Genel üretici içerik içine polimiksin ve vankomisin eklemesi ile elde edilen seçici özellikteki besiyeridir. Çevresel su örneklerinde yer alabilecek yan flora üyelerinin baskılanması için antibiyotikleri bulundurması avantaj sağlamaktadır. Ayrıca bromotimol mavisi ve bromokresol moru Lpn dışındaki türlerde (*L.micdadei*) besiyerinde kromojenik özellik kazandırarak ayrımını sağlamaktadır (107).

2.4.1.2.3. CCVC (Cycloheximide-Colistine-Vancomycine-Cephalothine) Agar

Açık hava ile temas halinde olan su sistemleri küf mantarları ile kontaminasyona açık halde bulunmaktadır. CCVC besiyeri içinde yer alan sikloheksimit, küf üremesini baskılayarak DGVP ve BYCE'de gözlemlenebilen aşırı küf üremesi nedeni Lpn

baskılanmasının önüne geçmektedir. Lpn için incelenecek olan su örneklerinin çoğunlukla kapalı sistemleri olduğu ve laboratuvarda dökülen bir besiyerinin ortalama 2 aylık miadı olması bu besiyerinin pratik kullanımı sınırlanmaktadır (107).

2.4.1.2.4. GVPC (Glisin-Vankomisin-Polimiksin-Cycloheximide) Agar

Seçici özellikteki bu besiyeri başta ISO standartı olmak üzere bir çok standartta bahsedilen besiyeridir. İçerdiği glisin ile Lpn'nin besiyeri ortamında gelişmesi esnasında ortaya çıkan metabolitlerin neden olabildiği pH değişimlerini tolere ettiği, sikloheksimit ile de olası küf kontaminasyonunu engellemesi ile pratikte kullanımı DGVP'ye nazaran daha fazla olan besiyeridir (107).

2.4.1.2.5. MWY (Modified Wadowsky Yee) Agar

Bu besiyeri daha çok klinik Lpn örneklerinin izolasyonu için kullanılmaktadır. Bakterilerin bromokresol moru ve bromotimol mavisi ile incelenmesi, kolonileri renklendirmek ve organizmaların tanımlanmasına yardımcı olmak için başarıyla test edilmiştir. GVPC'den farklı olarak sikloheksimit yerine anisomisin kullanılmaktadır (82).

2.4.1.3. Su Örneklerinin Çalışması

2.4.1.3.1. Su tanklarından (Soğuk/Sıcak) Alınan Örneklerin Çalışması

Su tanklarından alınan örnekler genel üretici (BCYE) ve seçici (CCVC, DGVP, GVPC...) besiyeri olmak üzere çift plak ekimi şeklinde çalışılmalıdır. Alınan su örneğinde 0,1 mL'i direk olarak seçilen besiyerlerine ekilir ve steril cam baget yardımı ile plak üzerine iyice yayılır. Diğer ekim çiftleri ile 50 mL su örneğinin 0,22 µ por çapına sahip filtre yardımı ile yoğunlaştırılır. Filtre 5 mL steril su bulunan tüpe alınır yaklaşık 30 sn boyunca vortekslenir. Ardından filtre 2 mL su ve 2 mL HCl/KCl (pH 2,2) bulunan karışım içine alınarak 3 dk boyunca beklenir. Bu basamakta olası yan floranın baskılanması hedeflenmektedir. Sürenin sonunda tüp içindeki karışımdan 0.1 mL alınarak genel üretici ve seçici besiyerlerine damlatılarak steril cam baget yardımı ile plak üzerine yayılır. Hazırlanan petriyerler 36,5±0,5°C % 90 nemli ortamda inkübe edilir. Lpn, kültür ortamında zor üretilmediği için 3-10 gün arasında plaklar kontrol edilmelidir (107).

2.4.1.3.2. Havalandırma Sistemi Soğutma Kulesi Su Örneklerin Çalışılması

Laboratuvara getirilen örneklerden direkt ekim için 0,1 mL'si genel üretici ve seçici özellikteki besiyerine damlatılır ve cam bağıet yardımı ile besiyerine iyice yayılır. Soğutma kulesinden alınan örnekler için su tanklarında olduğu gibi konsantrasyon işlemi uygulanmaz. Şişe içinden steril pipet yardımı ile 2 mL örnek alınıp içinde 2 mL KCl/HCl bulunan asit ile 3 dk. boyunca dekontaminasyon işlemine tabi tutulur. Süreç sonunda tüp içeriğinden 0,1 mL alınır ve ilgili besiyerlerine inoküle edilir (107).

2.4.1.3.3. Musluk ve Duşlardan Eküvyonla Alınan Örneklerin Çalışılması

Örnekleme işlemine tabi tutulmuş olan eküvyonun pamuk kısmı içinde 2 mL KCl-HCl asit karışımı bulunan tüpe daldırılıp iyice çalkalanır. Ardından tüp yaklaşık 1 dk boyunca vortekslenip 3 dk boyunca beklenir sonra tekrar vortekslenir. Tüpten 0,1 mL alınarak besiyerlerine ekilerek $36,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ % 90 nemli ortamda inkübe edilir (107).

2.4.2. Kültür Besiyerileri Üzerinde Legionella Doğrulaması ve Serogruplaması

Francisella, *Bordatella* gibi Lpn'de kültür ortamında üretiminde zorluk yaşanan bakterilerdendir. L-sistein gibi üretilmeleri için esansiyel olan maddelerin kültür ortamına eklenmesi zaruriyetinin yanı sıra $36,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gibi mikrobiyolojide en sık kullanılan inkübasyon sıcaklığında üretilmesi için % 90'a yakın nem oranının sağlanması gerekmektedir. Tüm şartların sağlandığı düşünüldüğünde bile Lpn besiyerinde 3-4. günler sonunda koloni oluşturmaya başlamaktadır (54,106).

Kullanılan besiyeri üzerinde 3-4. günden sonra çıplak gözle bakıldığında yüzeyleri düzgün, hafif bombeli, gri-beyaz, 1-3 mm çaplı, mikroskop altında ise kenarları pembe, mor, yeşil veya mavi buzlu-cam görünümü veren koloniler hedef koloniler olarak değerlendirilir (107). Bazı Lpn türleri ise gün ışığı altında farklı renkte görüntü verebilir. Bakterinin sistine mutlak suretle ihtiyaç duyması onu diğer bakteri gruplarından ayırmada kolaylık sağlamaktadır. % 5 Koyun Kanlı Agar ya da Nutrient Agar'a ekildiğinde bir çok bakteri türünün aksine *Legionella* spp. bu besiyeri üzerinde üreme göstermemektedir. Ekim yapılan plak üzerindeki kolonilerden örnek alınarak eş zamanlı olarak BCYE ve Kanlı Agar/Nutrient Agar üzerine ekimleri yapılır. BCYE'de üreyip genel üretici agarda üreyemeyen koloniler olası *Legionella* spp. olarak değerlendirilir ve serogruplama basamaklarına geçilir (54).

Lpn için hippurat hidrolizi, jelatin hidrolizi, tirozinli besiyerinde pigment oluşturma deneyi, UV ışık altında ışımaya yapma gibi çeşitli testler tür tayini yapmak için kullanılabilir. *Legionella* spp.'de sadece *L.micdadei*'de dokuda asit direnci görülmesi ayırıcı tanıda önemlidir. Ayrıca tüm *Legionella* spp. sistein varlığında üreme yeteneği gösterse de *L.oakridgensis* in vitro koşullarda modifikasyon geçirerek sistein yokluğunda da üretilebilmektedir (121). Kullanılacak olan testler arasında seçicilik ve özgüllük bakımından farkların olması testler arasındaki kullanım şekil ve alanlarını sınırlamaktadır (Tablo 2.2) (116).

2.4.2.1. Lateks Aglutinasyon Testi

Bakterinin hücre duvarında yer alan O antijenine karşı tavşan vücudundan üretilen antikorların kullanılması ile yapılan testlerdir. Günümüz laboratuvar pratiğinde en sık Sg 1, Sg 2-14 ve Sg 8'e yönelik testler kullanılmaktadır (77,81). İdrar gibi klinik örneklerin kullanıldığı aglutinasyon testleri ile hızlı tanımlamalar yapılmaktadır. Pnömoni belirtileri gösteren bir hastaya uygulanan üriner antijen testi sonucunda pozitif sonuç alınması durumlarında hastanın Lejyoner hastalığı olduğu düşünülmelidir. Üriner antijenik pozitiflik antibiyotik tedavisine başlanmasından 1-2 hafta sonrasına kadar pozitiflik gösterebilmektedir (52).

2.4.2.2. Direkt Floresan Antikor Testi (DFA)

Tür ve alttüre özgül olan dış membran proteinlerine karşı elde edilmiş olan floresan antikorların kullanım esasına dayanan bu testte 4 saate kadar sonuç alınabilmesi kolaylık sağlamaktadır (89). Hızlı sonuç verebilmesine karşın, DFA yönteminin duyarlılığı, kültür yönteminin duyarlılığından daha düşüktür. Bunun nedeni, mikroorganizmayı saptayabilmek için, alınan örneğin her mL'sinde 10^4 - 10^5 bakteri bulunması gerekliliğidir (1). Ayrıca *Bacteroides fragilis* ve *Pseudomonas* spp. ile çapraz reaksiyon verebilmesi tek başına kullanımında sorun oluşturmaktadır (75).

2.4.2.3. Polimer Zincir Reaksiyon (PCR)

Lpn, tanınmış 59 *Legionella* spp. türünün en yaygın patojenik türüdür. Bu patojen enfeksiyonunun bir sonucu olarak yaşlılarda ve ciddi altta yatan hastalığı olan hastalarda önemli ölüm oranları ortaya çıkabilir. Diagnostik gecikme mortalitenin artmasına neden olabilir. Bu nedenle, doğrudan floresan-antikor testleri ve idrar antijen deneyleri gibi hızlı testler geliştirilmiştir. Her ne kadar yararlı olsa da, bu analizlerin

hassasiyeti % 100 değildir. 5 S ve 16 S ribozomal alt birimlerini kodlayan genlerin, Lpn ve başka organizmaların tanımlanması için faydalı imza dizileri içerdiği gösterilmiştir. Daha yakın zamanlarda, bu genlerdeki hedef diziler, *Legionella* spp. ve Lpn tespiti için gerçek zamanlı PCR ile birlikte kullanılmıştır (75,116).

Tablo 2.2: Serogrup tespit testlerinin performansları (52)

<i>Test</i>	<i>Hassaslık</i>	<i>Özgülük</i>
<i>Kültür</i>	20–80	100
<i>Üriner Antijen Testi (Sg1)</i>	70–100	95–100
<i>Serolojik Test</i>	80–90	>99
<i>DFA</i>	25–75	≥95
<i>PCR</i>	95–99	>99

Pratik anlamda hassas, tekrarlanabilir ve doğru sonuçların alınma garantisi vardır. Ayrıca kültür metodunda sadece canlı bakterilerin tespiti mümkün olduğundan bu yöntemde canlı ya da cansız tüm bakterilerin genetik materyallerinin tespiti mümkündür.

Sistemde kullanılan primerlerin türe ve serogruba özgü olması maliyeti artırmaktadır. Bu nedenle günümüzde PCR yöntemi klinik izolat ile çevresel örnek/su örneği arasındaki bağlantıyı kurmak için kullanılmaktadır. Nozokomiyal pnömoni olgularında hastalık kaynağının tespit edilmesi olası salgın durumlarının önüne geçmek için önem teşkil etmektedir (51).

2.5. Tedavide Kullanılan Ajanlar

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde seçilecek olan antimikrobiyal ajanların seçimi, bakterinin biyokimyası ve yaşam tarzına göre değişiklik göstermektedir. Lpn gibi fakültatif intrasellüler ve zorunlu intrasellüler bakteriler için bakteri hücre duvarını etkileyen ajanların kullanılması hastalığın tedavisinde etkisiz kalmaktadır. Ayrıca gereksiz antibiyotik kullanımı ve sularda bulunan ilaç kalıntılarıyla temas ile bakteri

genetik materyalinde modifikasyonlar olmakta ve rutinde kullanılan antibiyotikler etkisiz hale gelmektedir. Direnç gelişimleri ile birlikte yeni nesil ilaç geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır.

Geliştirilen ilaçların bakteri üzerinde etkinliğini tespit etmek amacıyla duyarlılık testleri yapılmaktadır. Duyarlılık testlerinin etkinliği kullanılan referans bakterinin özelliği ve besiyeri özelliklerine göre değişim göstermektedir. Duyarlılık testleri; sıvı/katı besiyerine ekim, doku kültürü ve infekte edilmiş kobaya enjeksiyon gibi yollarla yapılabilmektedir (99).

Legionellozis gibi solumun sistemini etkileyen bir enfeksiyon söz konusu ise erken tedaviye mortalite oranını ciddi şekilde düşürmektedir. Günümüzde klinik uygulamada Makrolidler, Tetrasiklinler ve Kinolon Grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak bu gruplar içinde de hasta profiline göre kullanım sıkıntısı yaşanan ilaçlar da vardır. Eritromisin yüksek dozda uygulanması sonucunda sitotoksik etkisi ve gastrointestinal sistem sorunu yaşayan bireylerde yan etkiler oluşturması nedeniyle kullanımı sınırlanmıştır (88).

2.5.1. Makrolid Grubu İlaçlar

1952 yılından itibaren kullanımda olan makrolid grubu ilaçların sınıflandırması kimyasal yapısında yer alan lakton halkasının büyüklüğüne göre değişmektedir. 14, 15, 16 makrosiklik halkaya bir ya da daha fazla şeker molekülü içeren antibiyotiklerdir.

Makrolid sınıfındaki ilaçlar bakterostatik etki göstermektedirler. Bu özellikleri ile Linkozamidler ve Streptogramin B (MLS_B) ile yapısal benzerlik sergilerler. Peptid bağlanmasında ribozomun 50S alt birimini etkileyerek peptidil transferaz inhibisyonunu sağlar ve protein sentezini bozarlar. Uzama sürecinde peptidil transferaz RNA disosiasyonunu indükleyerek protein sentezini baskılar ve bakteri üremesini durdurur. Ayrıca vücutta MIC (Minimal Inhibitory Concentration) değerinin altına inerse de bakterostatik etkisini koruyabilmektedirler (45).

Makrolidler tarafından protein sentezi inhibisyonunun kesin mekanizması, ilaç molekülünün spesifik kimyasal yapısına bağlıdır. Bu, inhibitör etki tarzının yanı sıra ribozom ile etkileşimini de etkiler.

Protein sentez inhibisyonunu 4 yolla yaptıkları düşünölmektedir (16,23,65,71).

- İlk çeviri turları sırasında yeni oluşan peptid zincirinin ilerlemesinin inhibisyonu;
- Ribozomdan peptid tRNA ayrışmasının teşvik edilmesi
- Peptid bağ oluşumunun inhibisyonu
- 50S alt ünite bağlanmasına etki

Tüm mekanik mekanizmalar, ribozomdaki makrolid bağlama bölgesinin yeri ile bir miktar korelasyon gösterir. Klinikte kullanılmaya başlanan ilk makrolid üyesi olan eritromisin, düşük pH seviyesinde stabilitesini koruyamaz ve ketal formasyona sebep olur. Oral yoldan alındıktan sonra midede inaktif metabolitlere indirgenir ve bu metabolitleri gastrointestinal sistem yan etkilerine neden olur. İlacın atılımı biliyer yol ile olduğundan karaciğer rahatsızlığı olan hastalarda kullanılmaması gerekmektedir. Ayrıca kreatin klerensi 10 mL/dk'dan daha az olanlarda kullanımında dikkatli olunmalıdır. Hücre için penetrasyonu iyidir. Intraseüüler/Ekstraselleüler oranı 10'dan fazladır. Plasenta ve anne sütü penetrasyonu sergilediğinden hamilelerde kullanımına dikkat edilmelidir (45).

Klaritromisin, eritromisine oranla aside daha fazla direnç göstermektedir. Gastrointestinal sistem emilimi en iyi olan makroliddir. Biyoyararlılık oranı %50 dolaylarındadır. İlaç alımından hemen sonra 14-hidroksi metabolitine indirgenir ve bu şekilde etki eder. Doku penetrasyonu ve protein bağlanma yeteneğı eritromisine oranla daha iyi olduğundan polimorfonökleer lökosit (PMNL) penetrasyonu çok iyidir. Karaciğerde hepatik sitokrom P450 ile metabolize edilir, ana ilaç ve 14- hidroksi metaboliti idrar ile atılır. Bu nedenle karaciğer yetmezliğı olgularında kullanılmamalıdır.

Azitromisin gastrik asiditeye eritromisinden daha dayanıklı olmasına rağmen besin ile alınımı emilimini etkilemektedir. PMNL'lerde uzun süreli olarak kalabilir ve bu sayede PMNL'ler ile infeksiyon bölgesine taşınabilirler. Doku yarı ömrü 2-4 gün olup en uzun ömre sahip olan makroliddir (45).

2.5.1.1. Direnç Gelişim Mekanizması

Makrolid grubu ilaçlara karşı gelişen dirençler ile Linkosamid, Streptogramin B (MLS_B) dirençleri çok benzer ve aynı temele dayanmaktadır. Gelişen dirençler kromozomal ya da plasmid kaynaklıdır ve indüklenebilir.

Direnç oluşumunun kaynağı fark etmeksizin temelde 3 mekanizma ile direnç gelişmektedir (27):

- İlacın hedef aldığı *erm* geni olarak adlandırılan bölgede meydana gelen değişiklik
- İlacın *ere* veya *ere* benzeri gen tarafından kodlanan eritromisin esteraz, *vgb* geni tarafından kodlanan streptogramin B hidrolaz, *mph* geni tarafından kodlanan makrolid fosfotransferaz ve *lin* geni tarafından kodlanan linkozamit nükleotidil transferaz ile etkisizleştirilmesi
- İlacın *msr*, *erp*, *mef*, *mre* genlerince regüle edilen hücre zarı yerleşimli protein vasıtasıyla (efflux pompası) antimikrobiyal ajanın hücre dışına atılmasıdır.

Makrolid grubu ilaçların popülerliği penisilin intoleransı olan hastalarda kullanılması ve yüksek etkinliği ile ilişkilidir. Ancak geniş kullanım alanlarına yayılmaları, onlara dirençli suşların gelişimine de olanak sağlamıştır. Hedef bölge modifikasyonları, 23 S rRNA'da yer alan ribozomal proteinlerin modifikasyonu ya da 23 S rRNA'nın siteye özgü posttranskripsiyonel modifikasyonu şeklinde gelişir. Ribozomal L4 proteininde meydana gelen bir değişiklik makrolid bağlanmasını doğrudan etkileyen direnci oluşturmaktadır. Bir diğer ribozomal protein olan L22'de meydana gelecek olan mutasyonun doğrudan dirence neden olmasa da hücre zarında yer alan effluks pompasının çalışmasını indükleyerek tünelde yer alan makrolid molekülünün atılmasını sağlamaktadır.

Makrolid bağlama bölgesi modifikasyonunun en sık gözlemlenen mekanizması, *Erm*-tipi metiltransferazlar tarafından tek bir 23 S rRNA nükleotidi A2058'in dimetilasyonudur (24). *Erm* genleri, yatay gen transferi yoluyla dirençli suş oluştururlar. Makrolid bağlanma bölgesi içinde bulunan A2058'nin dimetilasyonu sterik engel nedeniyle ilaç afinitesini büyük ölçüde azaltır, böylece yüksek konsantrasyonlarda makrolid antibiyotiklere dirençli bakteriler oluşturur. A2058 ayrıca, Linkosamid ve Streptogramin B'nin bağlanmasına da yakından bağlıdır. Bu nedenle *Erm* bazlı metilasyon, hücreyi en az üç antibiyotik sınıfına karşı dirençli hale getirir. Ribozomun tamamı *erm* metilasyonu için bir substrat değildir. Çünkü A2058, büyük 50 S alt ünite

içindedir ve *erm* metiltransferazına erişilememektedir. A2058'in metilasyonu, sadece *erm* enziminin rRNA hedefini metillemesi için gerçekleşebilir (16,24,27,47).

2.5.2. Tetrasiklinler

Tetrasiklinler, çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere, *Mycoplasma*, *Chlamydia* ve *Rickettsia*'ya karşı bakteriyostatik etkili antibiyotik ailesidir. 30S ribozomal alt ünitesine bağlanıp transfer RNA'nın (tRNA) ribozom üzerindeki alıcı alana girmesini bloke ederek protein sentezini inhibe ederler. Bakteriler üzerindeki seçici etkisi, ribozom seviyesinde değildir, çünkü *in vitro* tetrasiklin, hem bakteriyel hem de insan hücrelerinden saflaştırılmış ribozomlarda protein sentezini eşit derecede önlemektedir. Seçiciliği, insan hücrelerine kıyasla duyarlı bakteriyel hücrelere etkinliği üzerine kuruludur.

Tetrasiklinler, üç R grubundaki farklı ikame edicilere sahip dört siklik halkaya sahiptir. Genel olarak tetrasiklinler düşük toksik etkiye sahip olsa da önemli yan etkileri de bulunmaktadır. Birincisi, ilaca dirençli bakteri ve mantarların ishal ve aşırı büyümesine yol açabilen normal bağırsak sisteminin florasının baskılanmasıdır. İkincisi, normal florada *Lactobacillus*'un baskılanması, *Candida albicans* üremesine ve vajinite yol açmasına izin veren pH'da bir artışa yol açmasıdır. Üçüncüsü, fetusların ve küçük çocukların dişlerinde birikmenin bir sonucu olarak kahverengi diş lekelenmesidir (40). Tetrasiklinlerin Ca^{+2} bağlanma afiniteleri yüksek olduğundan hamile kadınlarda ve 8 yaşından küçük çocuklarda kullanım için kontrendikedir. Tetrasiklinler ayrıca demiri şelatlar ve bu nedenle demir içeren vitaminler gibi demir içeren ürünler tetrasiklinlerle tedavi sırasında alınmamalıdır. Tetrasiklin tedavisi sırasında güneş ışığına duyarlılık da ortaya çıkabilir (61).

2.5.3. Kinolonlar

İlk kez 1962 yılında sıtma tedavisinde kullanılan klorokinin saflaştırılmasıyla elde edilen Nalidiksik Asit ile kullanıma giren sentetik antimikrobiyal ajan sınıfıdır. Farmakokinetik özellikleri ve günde iki doz uygulanabilmeleri onları β -Laktam sınıfı ilaçlarını büyük rakibi haline getirmiştir. Ancak, kötü oral emilim ve hızlı direnç gelişmesi kullanım alanlarını sınırlamıştır (88). Serum konsantrasyonunun 0,5 g/L'den yüksek olmaması sistemik enfeksiyonlar için kullanılmasını engellemektedir. Gelişen dirençlere karşılık olarak molekül yapılarında değişikliklere gidilmiş, C6 pozisyonuna flor eklenmesi ile DNA Giraz inhibisyonu sağlanmış ve gram pozitif bakterilere karşı

etkin şekilde kullanılmaktadır. C7 pozisyonuna piperazin grubu eklenmesiyle de gram negatif etkinliği sağlanmış oldu. C8 pozisyonuna ikinci flor grubunun eklenmesiyle de yarı ömür uzatılmış, eklenen metoksi grubu ile topoizomeraz II-IV enzimleri hedef alınmıştır (49).

Kinolon grubu antibiyotikler topoizomeraz II (DNA Giraz) ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek DNA sentez basamaklarının düzenini bozmaktadırlar. DNA Giraz enzimi *gryA* ve *gryB* genleri tarafından kodlanmaktadır. 4 alt ünitelerden oluşan bu enzim grubu replikasyon esnasında iki DNA zincirini kırarak replikasyonu ve transkripsiyonu mümkün kılar. Enzim inhibisyonu sonucunda DNA süper sarmal oluşumu bozulur ve aşırı DNA uzaması olur. Sonuç olarak bakteri aşırı şekilde uzayarak ölümü gerçekleşir. Topoizomeraz IV enzimi ise DNA pozitif süper sarmal oluşumunu sağlamaktadır. İnsan hücreleri yapı olarak DNA Giraz enziminden farklı ancak işlev olarak benzer olan topoizomeraz II enzimine sahiptir. Bu enzime karşı kinolonların etkinliği yaklaşık 2000 kat daha az olduğundan insan hücrelerinde toksisite oluşturmaz (46,49).

2.6. Korunma ve Kontrol

Legionella spp. sulak ve nemli ortamlarda, çevresel su birikintilerinde ve su sistemlerinin dışa açılım noktalarında kolonizasyon göstermektedir. Özellikle yurt ve hastane gibi toplu yaşam alanları kolonizasyon ve salgınlar için ideal ortamı oluşturmaktadır. Bina su sistemlerinin eski olması, sistem içindeki su sıcaklığının yüksek olması salgınlara zemin hazırlamaktadır. Hastane salgınlarında, hasta direnç profillerinin görece düşük olması gelişen enfeksiyonun şiddetini artırmaktadır (1).

Hastane salgınlarının önüne geçilmesi için çevresel su örnekleri ile hazırlanacak olan kültürler önem arz etmektedir. Örneklerden oluşturulan kültürlerde üretilen koloniler ile hastalardan alınan örnekler arasında genetik bağlantı bulunması, enfeksiyona kaynaklık eden sistem elemanını bulmaya ve bertaraf etmeye yardımcı olur. Su sistemlerinde Lpn taranması amacıyla su sistemlerinin değişik noktalarından örnekleme yapılmakta ve analiz edilmektedir. Sistemdeki bakteri kolonizasyonunu ortadan kaldırmak için çeşitli yöntemler bulunsa da en sık ısı şoklama kullanılmaktadır. Sistemde yer alan suyun sıcaklığı ≥ 65 °C olacak şekilde yükseltilerek en az 5 dk boyunca sistemin dışa açılan tüm elemanlarından akması sağlanır. Sistem durumu ısı şoklamaya uygun değilse hiperklorlama yapılabilir. Sistemi besleyen su depolarına en

az 10 mg/L olacak şekilde klor eklenerek tüm sistem elemanlarına ulaşması sağlanmaktadır (12).

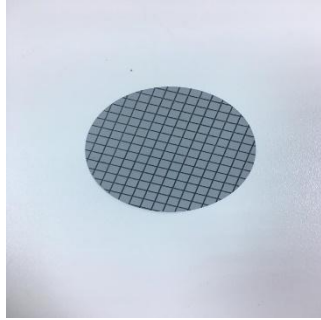
2.7. Su Sistemlerinin Dezenfeksiyonu

2.7.1. Mekanik Yöntemler

2.7.1.1. Membran Filtrasyon

Membranlar itici ya da emici bir güç varlığında sulara yer alan bakteri, maya, parazit ve yabancı maddeleri ayırabilen tabakalardır. Suların kullanım amaçlarına göre ve ayrıştırılmak istenen madde/organizmaya göre farklı por çaplarına sahip membranlar kullanılabilir. Su sistemlerine ısı şok uygulanmadığı durumlarda filtrasyon sistemi etkin çözüm sunmaktadır. Bu sisteme ait elemanlar pratik mikrobiyolojik analizlerde en sık kullanılan yöntemdir. 0,45 μ por çapına sahip membranlar kullanılarak Mikobakteri dışında tüm bakterileri tutabilmektedir (Şekil 2.4). Vonberg tarafından Almanya’da hastanelerini su sistemleri üzerinde yapılan çalışmalarda 0,2 μ por çapına sahip filtreler kullanmış ve Lpn’yi izole etmiştir. Bu nedenle immün suprese hastalarda yüksek derecede nozokomiyal enfeksiyon riski oluşturan Lpn izole edilmesi için hastanelerin su sistemlerine bu çapta filtre önerilmektedir (53,109).

Şekil 2.4: Membran filtrasyon sistemi ve 0,45 μ 'luk gri filtre kağıdı



2.7.1.2. Isıl Şok Uygulama

Su sisteminin suyun yüksek sıcaklıklarda sistemde dolaşmasına elverdiği durumlarda en güvenilir yol olarak düşünülmektedir. Sistemin dışa açılan noktalarından ≥ 65 sıcaklıkta minimum 5 dakika boyunca su akıtılmasının dezenfeksiyonu sağladığı, su sıcaklığının 60 $^{\circ}$ C’de tutulmasının tekrar kolonizasyonu engellediği yapılan

çalışmalarda gösterilmiştir. Hastalarda yanık tehlikesi oluşturması bu yontemin kullanılmasını kısıtlamaktadır (56).

2.7.1.3. UV Radyasyon Uygulaması

UV ışınları, bakteri DNA'sını kırarak timin dimerleri oluşmasına neden olur ve bu şekilde bakteriyi öldürür. Özellikle atık su tesislerinde kullanımı tercih edilse de, ultra saf su sistemlerinde suyun dezenfeksiyonu için de kullanılmaktadır. Ancak etkinlik süresi diğer yontemlere nazaran daha kısadır. Hiperklorlama ve ısıl şok uygulamaları ile birlikte kombine halde kullanıldıklarında diğer yontemlerin etkinliklerini artırmaktadır (39).

2.7.2. Kimyasal Yontemler

Kimyasal dezenfeksiyon yontemleri sularda yer alan akut kirlenmeyi ortandan kaldırmakla birlikte sularda süreli korumayı sağlamak için de kullanılmaktadır. Isıtma/Soğutma kule sistemlerine sahip olan hastanelerin ya da depo kullanılan sistemlerde sıklıkla tercih edilen yontemlerdir (100). Hedef alınan mikroorganizma farketmeksizin su ve su sistemlerinin dezenfeksiyonu için klor, ozon, iyot, biguanid, hidrojen peroksit gibi kimsayal ajanlar kullanılmaktadır. Etkinlikleri arasında bariz farklar olmasına rağmen günümüzde en çok tercih edilen sanitasyon yontemleridir.

Klorlama, en sık kullanılan ve en etkin sistemdir. Yapılan çalışmalar Lpn'nin *Koliform* bakterilere göre daha dayanıklı olduklarını, sistemlerden temizlenmeleri için 2-6 mg/L oranında kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Normal koşullarsa su şebekelerinde kullanılan klor miktarının 1 mg/L olduğu düşünöldüğünde bakterinin ne derece dirençli olduğu ortaya çıkmaktadır. *Legionella* spp. su birikintilerinde amiplerin içinde yaşam sürme yeteneğinde olduğundan kullanılacak olan klor miktarının 50 mg/L'den fazla olması gerekmektedir. Bu derece etkin olan klorun su içinde azotlu bileşiklerin varlığında ve uzun süreli kullanımda rezidüel hacminin artması (Bağlı Klor), bu durumunda su sistemlerinde korozif etki yaratmasıdır. Ayrıca bağlı klorun karsinojenik ve toksik etkisinin olduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (56,99).

Klor kadar etkili olan bir yontem olan ozonlama, bakteri DNA'sını hedef alarak aktivite göstermektedir. Klordan daha kısa etki etmesi, kalıntı bırakmadığı ve uçuculuğu nedeniyle çok uzun süreli dezenfeksiyon sağlamamaktadır. Biguanid ve Hidrojen peroksitte klor kadar etkin olmayan ancak pratikte kullanılan dezenfeksiyon ajanlarındandır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çevre su örneklerinden izole edilmiş olan 43 *Legionella* spp. izolatının, latex aglutinasyon kiti ile Lpn doğrulaması ve serogrup tayinleri yapıldı. Lpn olarak tespit edilen suşlara önce disk difüzyon testi ardından E test uygulandı.

3.1. Araç ve Gereçler

- Steril cam baget
- Steril plastik öze
- Mikrosantrifüj tüpleri
- Mc Farland cihazı (Biosan DEN 1B)
- Koloni Mikroskobu (IRMECO IM-SZ550-T-ST5-H)
- Vorteks
- İnkübatör (36±2 °C)
- Legionella latex test kiti (Microgen, UK)
- RT-PCR başlangıç solüsyonu (LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I)
- QIAGEN QIAcube izolasyon cihazı
- QIAGEN ROTOR GENE PCR cihazı
- Serum Fizyolojik

3.2. Kullanılan Suşlar ve Alınış Yerleri

Çalışmamızda çevresel kaynaklardan ve hastane su örneklerinden izole edilen 43 tane *Legionella* spp. suşu kullanıldı. Farklı noktalardan alınan örneklerden izole edilen suşlara dair sayılar Tablo 3.1 ve Tablo 3.3.'de gösterildi. Depodan alınan örnekler çevresel su kaynaklarını ve hastane depolarından, musluk başı ve duş başlıklarından alınan örnekler sadece hastanelerden izole edildi (Tablo 3.2).

Tablo 3.1: Alınış yerlerine göre suş sayıları

<i>Alınan Nokta</i>	<i>Musluk Başı</i>	<i>Duş Başlığı</i>	<i>Depo</i>
<i>Sayı</i>	11	11	21

Tablo 3.2: Depo sularından izole edilen suşların numaraları

Çevresel Depolar (6 suş)	Hastane Depoları (15 suş)
5,6,7,8,19,20	3, 12,15,23,25,28,30,32,34,37,38,39,41,42,43

Tablo 3.3: Suşlara ait numaralar

Musluk	2,10,13,14,24,26,29,31,35,36,40
Depo	3,5,6,7,8,12,15,19,20,23,25,28,30,32,34,37,38,39,41,42,43
Duş Başlığı	1,4,9,11,16,17,18,21,22,27,33

3.3. Besiyerleri ve Antimikrobiyal Ajanlar

3.3.1. BCYE Agar Besiyeri

Legionella spp. üremesi için esansiyel olan L-sistein ve aktif kömür içeren ISO 11731 standardı çerçevesinde kullanılan besiyerleridir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: BCYE Agar besiyeri kimyasal bileşenleri (Liofilchem, İtalya) (54)

Kimyasal Ajan	Miktar (gr/Litre)
Maya Özütü	10
Agar	12
Aktif Kömür	2
ACES (N-2-asetoamid-2-aminoetansülfonik asit)	10
Potasyum Hidroksit	2.8
L-sistein Hidroklorid monohidrat	0.4
Demir 3 pirofosfat	0.25
α -ketoglutarat	1

Kullanılacak olan besiyerlerinin TS EN ISO 11133 standartında önerilen şekilde pozitif kontrolü *Legionella pneumophila* ATTC 33152, negatif kontrolü ise *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ile yapıldı (105).

Mc Farland cihazı kullanılarak 0,5 Mc Farland değerinde ($1-1,5 \times 10^8$ kob/mL) referans materyal hazırlandı (Şekil 3.1). Bu referans materyal serum fizyolojik kullanılarak seri dilüsyonlar ile 10^2 seviyesine kadar dilüe edildi. Son seviye referans maddeden 0,1 mL pipetlenerek BCYE Agar üzerine cam baget yardımı ile besiyeri yüzeyine yayıldı ve 36 ± 2 °C'de 48 saat inkübe edildi. Bu şekilde besiyerinin üretilebilirliği ve performansı değerlendirildi.

Şekil 3.1: Mc Farland cihazı görüntüsü



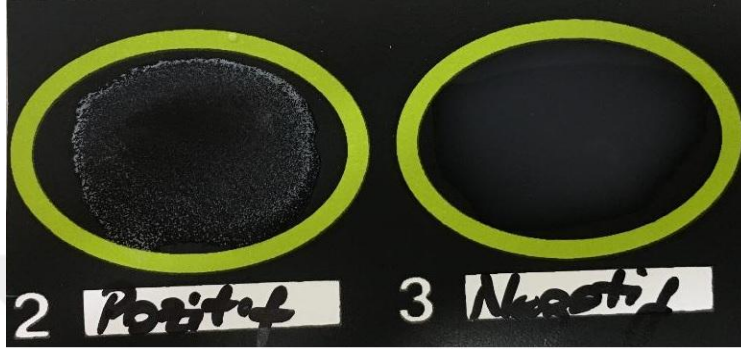
3.3.2. Serolojik testler

Lateks aglutinasyon testi (Microgen M45, UK) Lpn duvarında yer alan O antijenine özgü tavşandan üretilen antikorla çökeltme oluşturma esasına dayanan testtir. Kutu içeriği 1 şişe Sg 1, 1 şişe Sg 2-14, 1 şişe türe özgü antikora ait şişe, 1 şişe pozitif kontrol, 1 şişe negatif, 2 şişe NaCl (% 0,85 NaCl) çözeltisinden oluşmaktadır. *Legionella* spp.'ye özgü antikorlar; *L. micdadeii*, *L. bozemanii* 1-2, *L. dumoffi*, *L. longbeachae* 1-2, *L. jordanis*, *L. anisa*, *L. feelei* türlerini kapsamaktadır. testin spesifikliği % 100, özgülüğü % 100, doğruluğu % 100 olarak belirlenmiş ve kutu çalışma yapılana kadar belirtildiği gibi buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Derin dondurucudan çıkartılarak BCYE Agar üzerine steril cam baget ile yayılıp inkübe edilen taze suştan öze yardımı ile kutu içeriğinden çıkan reaksiyon kartına sürüldü. Üzerine bir damla NaCl solüsyonu damlatıldı ve suşun pelte hali çözdürüldü.

Ardından reaksiyon ayracı damlatılarak 1 dk boyunca çökeltme oluşturup oluşturmadığı izlendi. Süre içinde çökeltme gözlenen bölmeler test reaktifinin belirttiği serogrup olarak nitelendirildi (Şekil 3.2).

Şekil 3.2: Latex aglutinasyon testinde çökeltme



3.3.3. Antimikrobiyal Diskler

İntrasellüler yaşam süren Lpn tedavisinde hücre içine penetre olabilen ajanlar kullanılması gerektiği için aminoglikozidler ve β laktam grubu ilaçlar kullanılamamaktadır. Bu nedenle hastalık tedavisinde Makrolidler ve Florokinolon grubu ilaçlar etkin tedaviyi sunmaktadır. Çalışmamızda Makrolid grubu ilaçlardan azitromisin (15 μ g), eritromisin (15 μ g) ve klaritromisin (15 μ g) (Liofilchem, İtalya) kullanıldı.

Mc Farland cihazı kullanılarak 0,5 Mc Farland ($1-1,5 \cdot 10^8$ kob/mL) olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Seri dilüsyon yapılarak 10^2 seviyesine kadar seyreltildi. Son seviye tüpten eküvyon yardımı ile örnek alınıp 90 mm'lik petrilerde yer alan besiyerlerine homojen şekilde yayıldı. Oda sıcaklığındaki antibiyotik diskleri steril pens yardımı ile her petride 3 adet olacak şekilde yerleştirilip $36 \pm 0,5$ °C'de 5 gün inkübe edildi. Plakların ön yüzlerinden zon çapları ölçüldü.

90 mm petrilere dökülmüş olan BYCE Agar besiyeri üzerine, serum fizyolojik ile sulandırılmış Lpn suşundan eküvyon yardımı ile örnek alındı. Petri üzerinde erişilmeyen alan kalmayacak şekilde plak üzerine yayıldı.

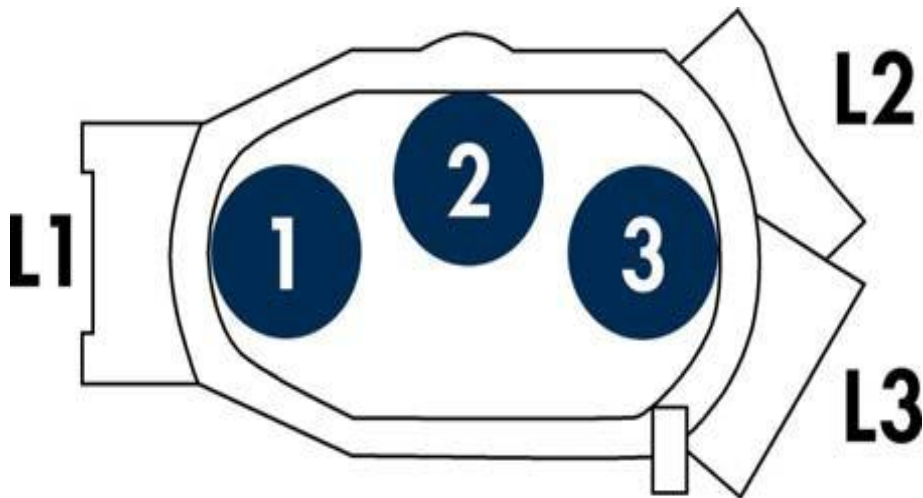
3.3.4. E test analizleri

Mikroorganizmanın üremesini engelleyen en düşük antibiyotik dozunu (MIC) belirlemek amacı ile azitromisin (0,016-256 µg/mL), eritromisin (0,016-256 µg/mL) ve klaritromisin (.016-256 µg/mL) (Liofilchem, İtalya) antibiyotiklerini içeren stripler kullanıldı. Mc Farland cihazı kullanılarak 0,5 Mc Farland ($1-1,5 \cdot 10^8$ kob/mL) olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Seri dilüsyon yapılarak 10^2 seviyesine kadar seyreltildi. Son seviye tüpten swap yardımı ile örnek alınıp 90 mm'lik petriye homojen şekilde yayıldı. İşlem tamamlandıktan hemen sonra petri üzerine antibiyotik test stripleri yerleştirildi. Petriler $36 \pm 0,5$ °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

3.3.5. RT PCR İşlemleri

Petrilerde bulunan taze suşlardan öze ile alınan örnekler steril distile su içinde süspanse edildikten sonra QIACube cihazı için tasarlanmış olan çevrim kolonlarına Şekil 3.3'te gösterilen 1 numaralı yere, toplama vialı de 3 numaralı yere yerleştirilerek Tablo 3.5'te belirtilen sırada cihaza takıldı. Tüpler, cihazın çalışma prensibi gereğince talimatta belirtilen şekillerde yerleştirildi. Cihazın reaktifleri yine talimatlarda geçen şekilde cihaza yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı ve 70 dk sonunda kolonlardan geçen DNA izolatları toplandı.

Şekil 3.3: QIACube cihazına viallerin yerleşim sıralaması (90)



Tablo 3.5: QIAcube cihazına örneklerin yerleşim sırası ve MIC değerleri

Sıra 1	<u>Sg 1 Numara 10</u> Azitromisin MIC \geq 256 μ g/mL Klaritromisin MIC \geq 256 μ g/mL Eritromisin MIC \geq 256 μ g/mL
Sıra 2	<u>Sg 1 Numara 13</u> Azitromisin MIC \geq 256 μ g/mL Klaritromisin MIC \geq 256 μ g/mL Eritromisin MIC \geq 256 μ g/mL
Sıra 3	<u>Sg 1 Numara 30</u> Azitromisin MIC \geq 256 μ g/mL Klaritromisin MIC \geq 256 μ g/mL Eritromisin MIC \geq 256 μ g/mL
Sıra 4	<u>Sg 2-14 Numara 16</u> Azitromisin MIC \geq 256 μ g/mL Klaritromisin MIC \geq 256 μ g/mL Eritromisin MIC \geq 256 μ g/mL
Sıra 5	<u>Sg 2-14 Numara 17</u> Azitromisin MIC \geq 256 μ g/mL Klaritromisin MIC \geq 256 μ g/mL Eritromisin MIC \geq 256 μ g/mL
Sıra 6	<u>Sg 2-14 Numara 26</u> Azitromisin MIC \geq 256 μ g/mL Klaritromisin MIC \geq 256 μ g/mL Eritromisin MIC \geq 256 μ g/mL
Sıra 7	<u>Sg 2-14 Numara 9</u> Azitromisin= 0.094 μ g/mL Klaritromisin= 0.047 μ g/mL Eritromisin= 0.75 μ g/mL
Sıra 8	Pozitif Kontrol
Sıra 9	Negatif Kontrol

İzolatlar DNA mini kit içeriğinden çıkan malzemeler kullanılarak pozitif PCR kontrolü, spesifik qDNA karışımı (lpp 2879 5'-GTGATGATTGTCTTATTGGTGCGA-3' ve lpp2880 5'-ATGGCGTTTAAGATGATGGTGATT-3'), izole ettiğimiz bakteri DNA izolatu ve negatif PCR kontrolü içeren 4 seri hazırlandı. Mini kit talimatında belirtilen şekilde viallere standart şekilde 12,5 μ L PCR mastermix karışımı, 1 μ L mikrobiyal DNA ve 5 μ L DNA izolatlarımızdan eklendi. Pozitif kontrol için 5 μ L kit içeriğinden çıkan materyal eklendi. Negatif kontroller için su ilave edildi ve toplamda

18,5 µL'lik vial içerikleri hazırlanarak vialler ROTOR GENE kuyucuklarına yerleştirildi. Programlama işleminin basamak ve içerikleri Tablo 3.6'da gösterildi (90).

Tablo 3.6: RT-PCR cihazı program içeriği

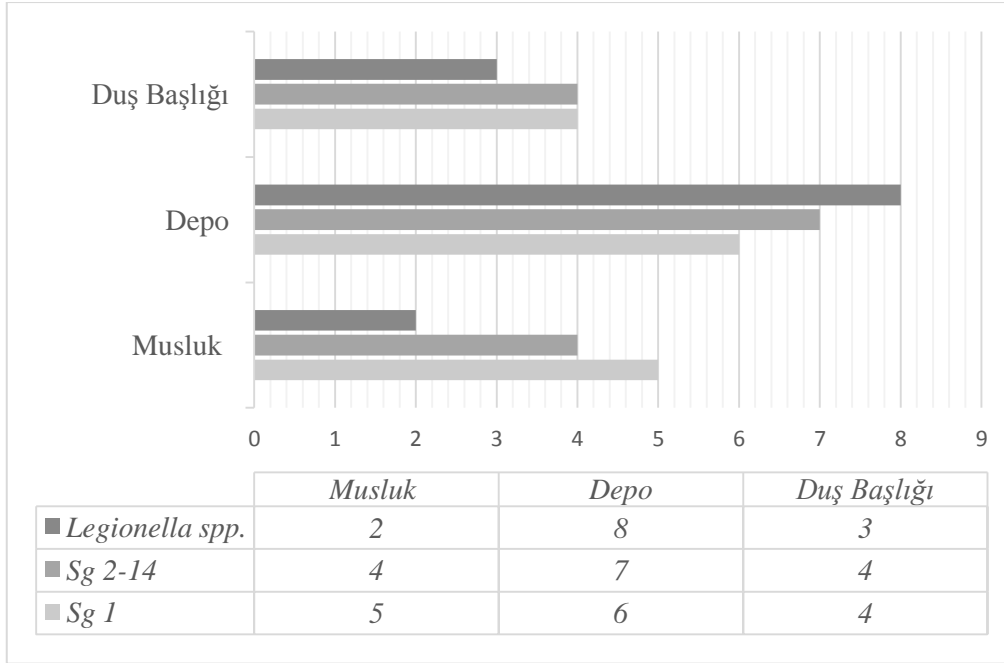
Çevrim (40 çevrimin her biri)		
Cihaz hazırlık aşaması	Denaturasyon	Çözülme ve Uzama
10 dk	15 sn	2 dk
95°C	95°C	60°C

4. BULGULAR

4.1. Serogrup Tayini

Çalışma sonucunda, işleme alınan 43 örneğe ait sonuçlar ve noktalara göre serogrup sayıları Tablo 4.1’de belirtildi. Analiz edilen örneklerden 13 tanesi *non-pneumophila* (*Legionella* spp.) olarak tespit edildi. 15 suş Lpn Sg 1, 15 suş ise Lpn Sg 2-14 olarak tespit edildi.

Tablo 4.1: Lpn serogrup sayıları



Duş başlığından alınan örneklerde 3 tane *Legionella* spp., 4 tane Sg 1 ve 4 tane Sg 2-14 izole edildi (Tablo 4.2).

Musluk başı su örneklerinde 5 tane Sg 1, 4 tane Sg 2-14 izole edildi. Musluk başı su örnekleri, *Legionella* spp.’nin en az izole edildiği (2 tane) örnekler oldu (Tablo 4.3).

En fazla Lpn, depolardan alınan su örneklerinden izole edildi (13 örnek). Sg 1 (6 tane) ve Sg 2-14 (7 tane) en fazla depolardan alınan su örneklerinden izole edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.2: Duş başlığından alınan örneklerle ait sonuçlar

Sg 1	4, 11, 18 ve 21 numaralı örnek
Sg 2-14	9, 16, 17 ve 33 numaralı örnek
<i>Legionella</i> spp.	1, 22 ve 27 numaralı örnek

Tablo 4.3: Musluktan alınan örneklerle ait sonuçlar

Sg 1	2, 10, 13, 31 ve 40 numaralı örnek
Sg 2-14	24, 26, 29 ve 36 numaralı örnek
<i>Legionella</i> spp.	14 ve 35 numaralı örnek

Tablo 4.4: Depodan alınan örneklerle ait sonuçlar

Sg 1	7, 12, 30, 32, 37 ve 38 numaralı örnek
Sg 2-14	5, 6, 15, 23, 25, 34 ve 39 numaralı örnek
<i>Legionella</i> spp.	3, 8, 19, 20, 28, 41,42 ve 43 numaralı örnek

4.2. Disk Difüzyon Testi

Serolojik analiz sonucunda Lpn olarak doğrulanan toplam 30 suşta (15 tane Sg 1, 15 tane Sg 2-14) azitromisin, eritromisin ve klaritromisinin etkinliği incelendi. Petrilerden sonuç okuma en erken 2'nci, en geç ise 4'üncü gün sonrasında yapıldı. Çalışma sonucunda 3 tane Sg 1, 3 tane Sg 2-14 olmak üzere toplam 6 suşta tüm antibiyotik disklerinde zon oluşumu izlenmedi.

Antibiyotik disklerinin aktivitesini kontrol amacı ile *L.pneumophila* ATCC 33152 (Lpn Philadelphia 1) ile hazırlanan kontrol petride (Şekil 4.1) zon çapları ölçüldü. Bu sayede disklerin etkinliği test edildi (Tablo 4.5).

Sg 1 için, musluktan izole edilen 2 örnek ile depodan izole edilen 1 suşta zon oluşumu izlenmedi. Sg 2-14 için ise depodan izole edilen 2 suş ile musluktan izole edilen 1 suşta zon izlenmedi. Zon oluşumu gözlenmeyen suşlarda, her 3 antibiyotik için tüm plak boyunca bakteri üremesi izlenmiş olup herhangi bir zon izlenmedi.

Sg 1’de ortalama zon çapı (mm) azitromisin için 23,8, klaritromisin için 24,5, eritromisin için 26,7 olarak tespit edildi (Tablo 4.6).

Sg 2-14’de ortalama zon çapı (mm) azitromisin için 25,8, klaritromisin için 27,6, eritromisin için 25,8 olarak tespit edildi (Tablo 4.7).

Difüzyon testi sonucunda zon oluşturan suşlar her 3 antibiyotikte de zon oluşturdu. Zon oluşturmayan suşlarda eritromisinde zon oluşturmayan suş, azitromisin ve klaritromisin için de zon oluşturmadı (Şekil 4.2).

Tablo 4.5: *L.pneumophila* ATCC 33152 zon çapları (mm)

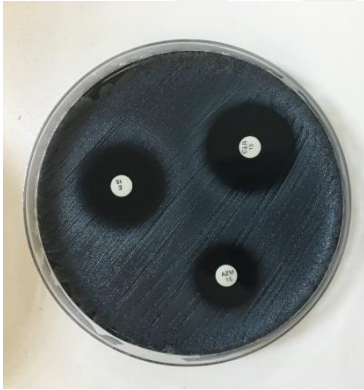
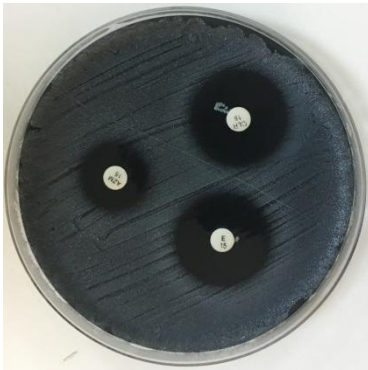
Azitromisin	Klaritromisin	Eritromisin
24	28	29

Tablo 4.6: Lpn Sg 1’e ait zon çapı değerleri

Suş No	Zon Çapları (mm)														
	2	4	7	10	11	12	13	18	21	30	31	32	37	38	40
Azm	26	25	20		19	27		26	25		24	22	23	22	27
Clr	28	21	21	Zon Yok	22	29	Zon Yok	25	24	Zon Yok	23	26	24	29	22
Ery	37	27	28		21	27		25	24		28	27	21	27	28

Tablo 4.7: Lpn Sg 2-14'e ait zon çapı değerleri

	Zon Çapları (mm)														
Suş No	5	6	9	15	16	17	23	24	25	26	29	33	34	36	39
Azm	16	26	44	29			17	22	20		23	39	25	23	26
Clr	21	27	38	27	Zon Yok	Zon Yok	24	27	29	Zon Yok	31	27	29	28	33
Ery	23	24	23	33			21	23	25		27	30	26	27	28

Şekil 4.1: BCYE Agar üzerinde kontrol suşu**Şekil 4.2: BCYE Agar üzerinde disk difüzyon deneyleri (Solda zon oluşturan suş, sağda zon oluşturmeyen suş)**

4.3. E test Analizleri

Dünya genelinde Lpn için disk difüzyon testini değerlendirecek bir kılavuz olmadığı için tüm izolatlarımızın MIC değerlerini tespit ettik.

Sg 1 içinde sadece 3 tane suşun MIC değerini ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit ettik. Eritromisin için 8 tane suşta EUCAST verisi olan 0,5 $\mu\text{g/mL}$ değerinden daha büyük ya da eşit MIC değeri elde ettik (% 53,3). Klaritromisin için 11 tane suşta EUCAST verisi olan 0,5 $\mu\text{g/mL}$ değerinden daha büyük ya da eşit MIC değeri elde ettik (% 73,3). Azitromisin için 5 tane suşta EUCAST verisi olan 1 $\mu\text{g/mL}$ değerine eşit MIC değeri elde ettik (% 33,3) (Tablo 4.8).

Sg 2-14 içinde 3 tane suşun MIC değerini ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit ettik. Eritromisin için 10 tane suşun MIC değerini EUCAST verisi olan 0,5 $\mu\text{g/mL}$ değerinden daha büyük ya da eşit elde ettik (% 66,7). Azitromisin için 8 tane suşun MIC değerini EUCAST verisi olan 1 $\mu\text{g/mL}$ değerinden daha büyük ya da eşit MIC değeri elde ettik (% 53,3). Klaritromisin için 9 tane suşun MIC değerini EUCAST verisi olan 0,5 $\mu\text{g/mL}$ değerinden daha büyük ya da eşit MIC değeri elde ettik (% 60) (Tablo 4.9).

Tablo 4.8: Sg 1'e ait MIC değerleri ($\mu\text{g/mL}$) ve EUCAST verileri (33)

Suş No	E test					
	EUCAST Azm MIC değeri	Azitromisin	EUCAST Clr MIC değeri	Klaritromisin	EUCAST Ery MIC değeri	Eritromisin
2		.25		.19		.064
4		.38		.75		.25
7		.75		.75		.38
10		≥ 256		≥ 256		≥ 256
11		1		.75		.75
12		.25		.25		.25
13		≥ 256		≥ 256		≥ 256
18		.38		.38		.38
21	1 $\mu\text{g/mL}$.50	0.5 $\mu\text{g/mL}$.50	0.5 $\mu\text{g/mL}$.50
30		≥ 256		≥ 256		≥ 256
31		.38		.50		.25
32		1		.75		.75
37		.75		.50		1
38		.50		.38		.38
40		.50		.75		.50

Tablo 4.9: Sg 2-14'e ait MIC değerleri ($\mu\text{g/mL}$) ve EUCAST verileri (33)

Suş No	E test					
	EUCAST Azm MIC değeri	Azitromisin	EUCAST Clr MIC değeri	Klaritromisin	EUCAST Ery MIC değeri	Eritromisin
5		3		1		.75
6		.38		.38		.5
9		.094		.047		.75
15		.25		.50		.19
16		≥ 256		≥ 256		≥ 256
17		≥ 256		≥ 256		≥ 256
23		3		.75		1
24	1 $\mu\text{g/mL}$	1	0.5 $\mu\text{g/mL}$.50	0.5 $\mu\text{g/mL}$	1
25		2		.50		.75
26		≥ 256		≥ 256		≥ 256
29		.75		.38		.25
33		.047		.38		.19
34		.38		.19		.25
36		1		.50		.50
39		.50		.19		.50

E testlerin çalışıp çalışmadığını denemek amacıyla kontrol suşumuz ile 0.5 Mc Farland değerinde bakteri süspansiyonumuzu hazırlayarak petri kutusundaki besiyerine yaydık. İnkübasyondan sonra elde edilen MIC değerlerinin kabul edilebilir olduğunu değerlendirmek için EUCAST tarafından 2017 yılında yayınlanan rehberde yer alan veriler ile karşılaştırdık. (Tablo 4.10) (33).

Tablo 4.10: Kontrol suşu MIC seviyeleri ve EUCAST verileri ($\mu\text{g/mL}$) (33)

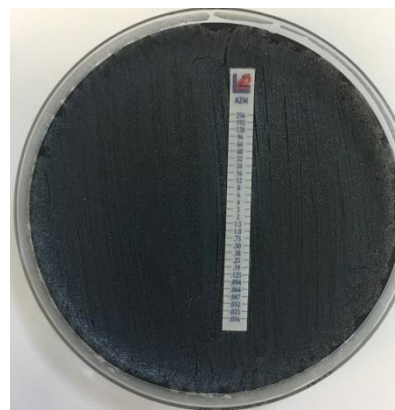
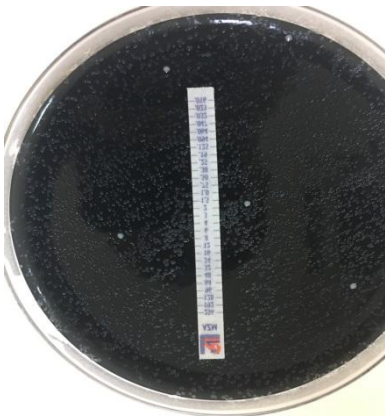
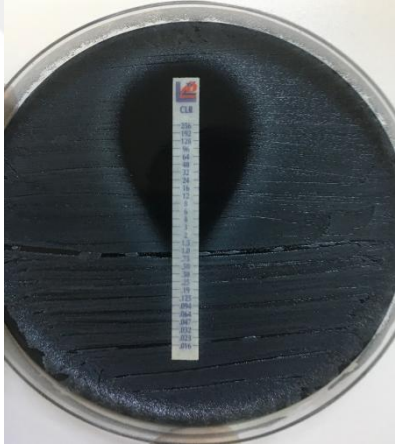
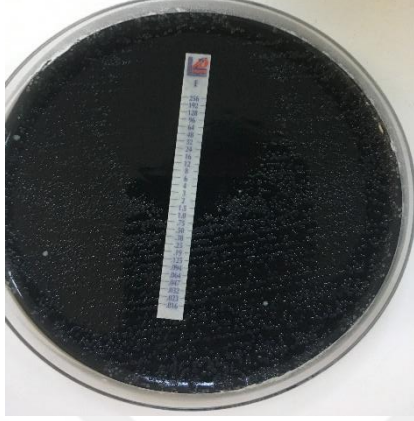
	Kontrol Suşu (Lpn ATCC 33152)	EUCAST Verileri (33)
Azitromisin	1	1
Klaritromisin	0,5	0,5
Eritromisin	0,5	0,5

Rehberde yer alan MIC değerleri ile elde ettiğimiz MIC değerleri arasında fark olmadığını gözlemledik. Bu veri ile tez çalışmamızda kullandığımız E test striplerinin çalıştığını doğruladık (Şekil 4.3).

Şekil 4.3: BCYE Agar üzerinde kontrol suşu (“Lpn ATCC 33152”)



Şekil 4.4: BCYE Agar üzerinde MIC deneyleri (Sağda MIC değerini $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ olan suş, solda MIC değeri okunabilen suşlar)

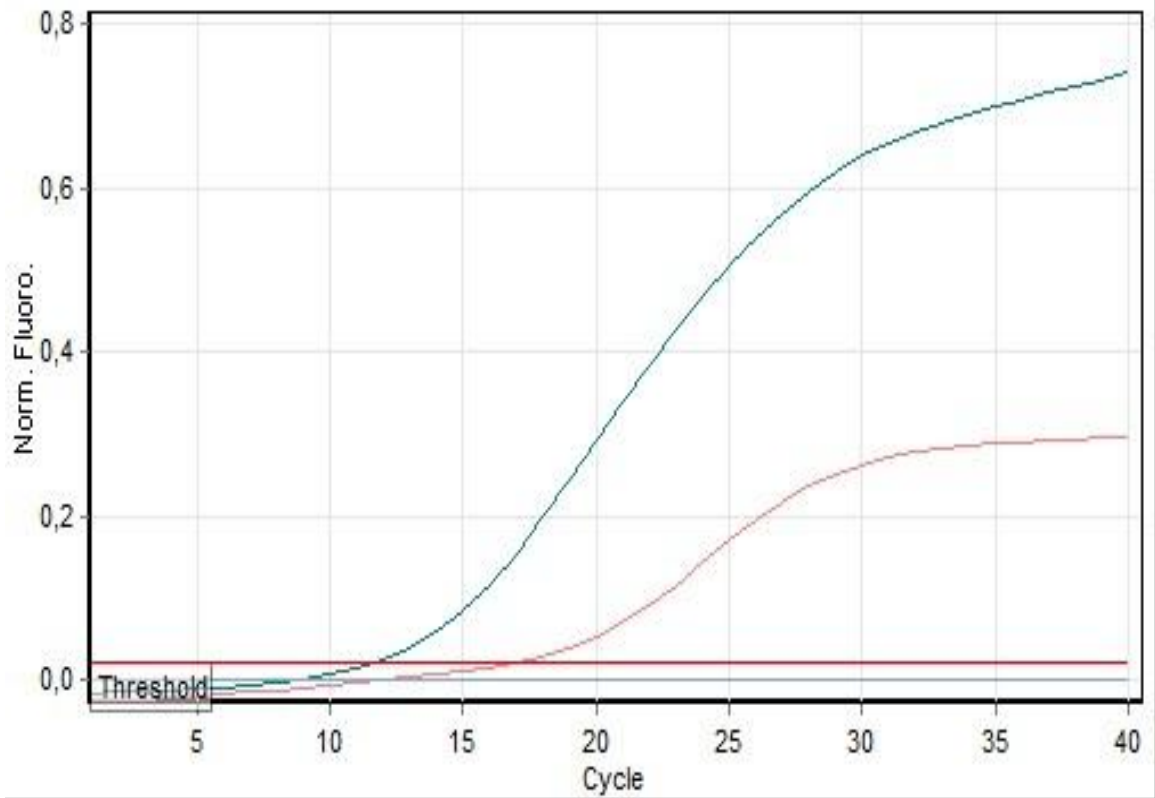


4.4. RT-PCR Analizleri

PCR işlemi için seçilen Lpn Philadelphia DNA'sına ait 5'-*GTGATGATTGTCTTATTGGTGCGA-3'* ve 5'-*ATGGCGTTTAAGATGATGGTGATT-3'* bölgeleri kantitatif olarak analiz edildiğinde, zon oluşumu gözlemlenmeyen ve MIC \geq 256 $\mu\text{g/mL}$ olan suşlarda bu bölge içerisinde baz dizilimlerinde farklılıklar tespit ettik. Cihaza ait yazılımdan elde edilen verileri incelediğimizde, 6'ncı çevrimden sonra zon oluşumu izlenen 7'nci sıradaki suşa kantitasyon piki oluşmaya başladığı tespit ettik. Ct değeri 7 numaralı örnek için 11,5, pozitif numune olan 8'inci sıradaki örnek için 16,74 olarak belirledik (Tablo 4.11). Zon oluşumu izlenen suşlarda dizilim farkı olduğu için grafikte pik oluşumu görmedik ve Ct değerini sıfır olarak tespit ettik (Şekil 4.5).

Sistemin kontrolü için yerleştirilen içinde steril su bulunan 9'uncu örnekte de Ct değeri ve pik oluşumu gözlemedik. Bu durum sistemin doğru çalıştığını ve yanlışlık olmadığını garanti altına aldı.

Şekil 4.5: RT-PCR' a ait kantitasyon eğrisi



Tablo 4.11: Örneklere ait MIC değerleri, zon çapları ve Ct değerleri

Sıra No	Eğri Rengi	Örnek Adı	MIC Değeri (µg/mL)	Zon çapı (mm)	Ct Değeri
1		Sg 1 No 10	Azitromisin MIC ≥ 256 µg/mL Klaritromisin MIC ≥ 256 µg/mL Eritromisin MIC ≥ 256 µg/mL	Zon yok	-
2		Sg 1 No 13	Azitromisin MIC ≥ 256 µg/mL Klaritromisin MIC ≥ 256 µg/mL Eritromisin MIC ≥ 256 µg/mL	Zon yok	-
3		Sg 1 No 30	Azitromisin MIC ≥ 256 µg/mL Klaritromisin MIC ≥ 256 µg/mL Eritromisin MIC ≥ 256 µg/mL	Zon yok	-
4		Sg 2-14 No 16	Azitromisin MIC ≥ 256 µg/mL Klaritromisin MIC ≥ 256 µg/mL Eritromisin MIC ≥ 256 µg/mL	Zon yok	-
5		Sg 2-14 No 17	Azitromisin MIC ≥ 256 µg/mL Klaritromisin MIC ≥ 256 µg/mL Eritromisin MIC ≥ 256 µg/mL	Zon yok	-
6		Sg 2-14 No 26	Azitromisin MIC ≥ 256 µg/mL Klaritromisin MIC ≥ 256 µg/mL Eritromisin MIC ≥ 256 µg/mL	Zon yok	-
7		Sg 2-14 No 9	Azitromisin MIC 0,094 µg/mL Klaritromisin MIC 0,047 µg/mL Eritromisin MIC 0,75 µg/mL	Azitromisin: 44 mm Klaritromisin: 38 mm Eritromisin: 23 mm	11,5
8		Lpn Mini Kit İçeriği	Azitromisin MIC 1 µg/mL Klaritromisin MIC 0,5 µg/mL Eritromisin MIC 0,5 µg/mL	+ Kontrol	16,74
9		Steril Su		- Kontrol	-

5. TARTIŞMA

Su sistemlerinde kolonize olan, Lpn salgınlara neden olmakla birlikte, hem yaşam kalitesini düşürmekte hem de ekomonik olarak kayba neden olmaktadır. Hastaneler gibi toplu yaşam alanlarında bakterinin varlığı, özellikle immün sistem sorunu yaşayan hastalarda enfeksiyon riski oluşturmaktadır.

Leoni ve ekibi, 2005 yılında hastane otel gibi kamu binaları ile özel binalarının da dahil olduğu 137 sıcak su örneğini incelenmiş ve örneklerin % 33'ünde Lpn izole etmişlerdir. Su örneklerini, binalardan alınmış yerlerine göre değerlendirdiklerinde, en yüksek kolonizasyonun sıcak su sistemlerinde olduğunu tespit etmişlerdir (62). Bizde çalışmaya aldığımız çevresel ve hastane su sistemlerine ait 43 adet örnek üzerine yaptığımız çalışmada 30 Lpn izole ettik. Duş başlıklarından alınan örneklerde 8 tane Lpn, musluklardan alınan örneklerde de 9 tane Lpn izole ettik. Ayrıca, depolardan alınan örneklerde 13 tane Lpn ve 8 tane *Legionella* spp. izole ettik. Depolardan alınan örnekler en fazla bakteri izole ettiğimiz örnekler oldu. Bu durumu depolarda bulunan suların diğer noktalara göre daha durgun olmasının bakterinin kolonize olmasında avantaj oluşturduğu şeklinde yorumladık.

De Giglio ve arkadaşları tarafından Güney İtalya'nın Apulia bölgesinde yer alan üniversite hastanesinin su sistemleri üzerinde yapılan çalışmada, seçilen 100 Lpn suşunda % 29,4 oranında Sg 1, % 29,2 oranında Sg 10, % 20,5 oranında Sg 8 olarak tayin edilmiştir (26). Çalışmamızda kullandığımız 43 *Legionella* spp. arasında % 69,8 oranında Lpn izole ettik. Lpn serogrupları arasında, Sg 1 ve Sg 2-14'ü eşit oranda (% 34,8) izole ettik. Bu sonuç De Giglio'nun çalışması ile uyumluluk göstermektedir.

Sharaby ve arkadaşları, 2019 yılında çevresel kaynaklardan izole edilen farklı Lpn genotipleri üzerine, çoklu lokus değişken sayı tandem tekrar analizi yöntemiyle, antibiyotiklere karşı sergilenen durumun genotipler arasında değişiklik gösterdiklerini tespit ettiler. Çalışmaları sonucunda Lpn için en etkili makrolidin klaritromisin olduğunu tespit ettiler (96). Çalışmamızda, *Legionella pneumophila* enfeksiyonlarında en sık izole edilen iki serogrup, Sg 1 ve Sg 2-14 çalışıldı. Sg 1 izolatları için en etkili antibiyotiğin eritromisin, Sg 2-14 için en etkili antibiyotiğin klaritromisin olduğunu tespit ettik.

Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, İngiliz Torasik Topluluğu ve Hollanda Göğüs Hekimleri Birliği başta olmak üzere bir çok halk sağlığı kurumu Lpn tedavisinde makrolid sınıfını önermektedir (86). Biz de çalışmamızda azitromisin ile birlikte diğer makrolidlerin etkinliğini gösterdik. EUCAST tarafından 2017 yılında yayınlanan rehberde, MIC değeri ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olan suş bulunmamıştır. 2 suшта klaritromisin için MIC değeri ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$, 2 suшта eritromisin için MIC değeri 16 $\mu\text{g/mL}$, azitromisin için 8 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir (33). Bizim çalışmamızda toplamda 6 suшта MIC değeri ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi. Ayrıca 3 suшта azitromisin için MIC değeri 3 $\mu\text{g/mL}$, eritromisin için 3 suшта MIC değeri 1 $\mu\text{g/mL}$ ve klaritromisin için 1 suшта MIC değeri 1 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu.

Endüstrinin gelişmesi ile birlikte temiz su kaynaklarına karışan atık miktarının artması, bakteri gelişimine pozitif katkı sağlayan sedimentlerin birikimine neden olmaktadır. Sedimentler arasında antibiyotik kalıntılarının olması bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine olanak sağlamaktadır. Lpn, farklı mikroorganizmaların oluşturduğu komuniteler içinde yaşamlarını sürdürürler. Böylece türler arası gen alışverişine olanak sağlayarak yeni dirençlerin önünü açarlar (89). Cazalet ve arkadaşları, *Legionella pneumophila* Paris suşu ve Lens suşlarının genetik elemanları üzerine yaptıkları çalışmada iki suşun genetik materyalinde 2932 genin ortak olduğunu tespit etmişler. Paris suşunun genetik materyalinin % 42,1'sinin fonksiyonsuz olduğu, % 21 oranının ise bakteriye ait özellikleri kodladığını ve spesifik 30 genin de proteazlar gibi işlevsel proteinleri sentezlediğini belirlemişlerdir (14). Biz de çalışmamızda Philadelphia 1 suşuna ait *lpp 2879* ve *lpp 2880* gen bölgelerini inceledik. Lpn Philadelphia 1 suşu ile MIC değeri ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ ve zon oluşturmayan izolatlarımızın gen bölgelerinde farklılıklar olduğunu kantitatif olarak tespit ettik. Ct değeri elde edilmeyen suşların MIC değerinin ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olması, disk difüzyon testinde zon oluşturmamasını *lpp 2879* ve *lpp 2880* gen bölgelerinde meydana gelen değişikliğin effluks pompası performansını etkilediğini ve meydana gelen değişikliğin makrolid grubu ilaçların etkinliğini etkilediğini tespit ettik.

Vandewalle-Capo ve arkadaşları tarafından 109 Lpn suşu kullanılarak yapılan çalışmada Paris suşu ile Philadelphia suşlarıyla kendi örneklerinin MIC seviyeleri ve *lpp 2879*, *lpp 2880* isimli 359 bp'lik gen bölgelerini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda dirençli suş elde edemeseler de azalmış azitromisin duyarlılığı tespit etmişlerdir. Ayrıca *rplD*, *rplV* ve *rrl* gen bölgelerini incelediklerinde bu bölgelerde

mutasyona rastlamamışlar. Bu sonuçları ile *lpp 2879* ve *lpp 2880* bölgelerin azalmış azitromisin duyarlılığına neden olabileceği düşünülmüştür (108). Biz de çalışmamızda MIC değeri ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olan suşlar ile MIC değeri daha düşük olan bir suşun *lpp 2879* ve *lpp 2880* gen bölgelerini RT-PCR ile kantitatif olarak karşılaştırdık. Pozitif kontrol olan Philadelphia 1 suşunda Ct değerini 16,74, MIC değeri kontrol suşundan daha az seviyede olan izolatımızın Ct değerini 11,5 olarak tespit ettik. Ct değerindeki bu farklılığın zon çapı farklılığına neden olduğunu tespit ettik. *lpp 2879* ve *lpp 2880* gen bölgelerindeki bu farkın, MIC değerlerinin ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olması ve disk difüzyon testinde zon olmamasının sebep olabileceğini sonucuna vardık.

Sikora ve arkadaşları tarafından Polonya’da halka açık binaların su sistemleri üzerinde yapılan çalışmada, 28 Lpn suşu (16 tane Sg 1, 12 tane Sg 2-14) izole edilmiştir. Bu suşların makrolid grubu ilaçlara karşı duyarlılıkları incelenmiş ve en fazla duyarlı oldukları ajanı azitromisin olarak bulunmuştur (97). Biz çalışmamızda 43 *Legionella* spp. arasından izole ettiğimiz 30 tane Lpn suşu kullandık (15 tane Sg 1, 15 tane Sg 2-14). Disk difüzyon testinde elde ettiğimiz zon çaplarını ortalama olarak değerlendirdiğimizde, Lpn Sg 1 için en geniş ortalama zon çapının eritromisin (26,7 mm), Sg 2-14 için klaritromisin (27,6 mm) olduğunu tespit ettik.

Torre ve arkadaşlarınca 2012-2016 yılları arasında İtalya’nın Campania bölgesinden topladıkları toplam 5321 adet numuneyi Napoli II. Federico Üniversitesi’nde analiz edilmiş, rastgele seçilen ve Sg 1, 3, 5, 6, 8’ e dahil Lpn suşlarını azitromisin, sefotaksim, klaritromisin, doksisisiklin, eritromisin, rifampisin, tigesiklin, siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin antibiyotikleri için E test yöntemi ile duyarlılıklarını ölçmüşler ve hiçbir antibiyotiğe karşı direnç tespit etmemişlerdir. Suşlara en etkili antimikrobiyal ajanın rifampisin ve makrolid grubu içinde en etkili klaritromisin, en düşük etkili ise azitromisinin olduğunu belirlemişlerdir (104). Biz de E test çalışmamızdan elde ettiğimiz verileri incelediğimizde, toplamda 6 suшта (3 tane Sg 1, 3 tane Sg 2-14) MIC değerini ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit ettik. Sg 1 için eritromisinin diğer antibiyotiklere göre daha düşük MIC değerine sahip olduğunu, Sg 2-14 için ise klaritromisinin daha düşük MIC değerine sahip olduğunu tespit ettik.

Yaptığımız duyarlılık testleri sonucunda 6 suшта azalmış antibiyotik duyarlılığı tespit ettik. Antibiyotik etkinliğini belirleyen faktörlerden biri olan effluks pompası kontrol eden gen bölgelerini (*lpp 2879* 5’-GTGATGATTGTCTTATTGGTGCGA-3’ ve

lpp 2880 5'-ATGGCGTTTAAGATGATGGTGATT-3') içeren primerler kullanılarak yaptığımız RT-PCR çalışmaları sonucunda, azalmış antibiyotik duyarlılığı tespit edilen ($MIC \geq 256$ olan ve zon oluşturmayan) suşlar ile Lpn Philadelphia 1 kontrol suşunun *lpp 2879* ve *lpp 2880* gen bölgeleri arasında farklılıklar tespit ettik. RT-PCR çalışmalarından elde ettiğimiz verileri de düşündüğümüzde, bakterinin genetik materyalinde değişikliklerin olduğu, bu değişikliklerin ilaç duyarlılığını etkilediğini tespit ettik. Projemize ayrılan mali desteğin yetersizliği nedeniyle sekanslama çalışması yapılamamış ve hangi bazlarda değişiklik olduğu tespit edilememiştir. Sekanslama çalışmalarının yapılması ile bazlarda meydana gelen değişikliğin makrolid duyarlılığını etkilediği belirlenebilecektir. Bu çalışmalar sonucu elde edilen veriler ile geliştirilecek ilaçların, yaşam kalitesini artırmasını ve ekonomik kayıpların önüne geçeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Aktaş F. Nozokomiyal pnömoni. *Klinik Derg* 2000; 13: 3-6.
2. Aktova M. Lejyoner Hastalığı. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1996. 393-396
3. Ampel NM, Ruben FL, Norden CW. Cutaneous abscess caused by *Legionella micdadei* in an immunosuppressed patient. *Ann Intern Med* 1985; 102(5): 630-632.
4. Andersen BB, Sogaard I. Legionnaires' disease and brain abscess. *Neurology* 1987;37(2): 333-334.
5. Aragon V, Kurtz S, Flieger A., Neumeister B., Cianciotto NP, Secreted enzymatic activities of wild-type and pILD deficient *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 2000, 1855-1863
6. Arslan Aydoğdu EÖ, Farklı *Legionella Pneumophila* İzolatlarının Virülans Faktörlerinin İncelenmesi Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012
7. Aschtgen MS, Bernard CS, De Bentzmann S, Lloubes R, Cascales E, SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (22), 7523-7531.
8. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd edition, Academic Press, 2003, ISBN 0-12-079610-4.
9. Bauer M, Mathieu L, Deloge-Abarkan M, Remen T, Tossa P, Hartemann P, *Legionella* bacteria in shower aerosols increase the risk of pontiac fever among older people in retirement homes, *Journal of Epidemiology and Community Health*, 2008, 62, 913-920.
10. Bender L, Ott M, Debes SA, Rdest U, Heesemann J, Hacker J, Distribution, expression, and long-range mapping of legiolysin gene (lly)-specific DNA sequences in *Legionellae*, *Infection and Immunity*, 1991, 59 (9), 3333-3336.
11. Blatny JM, Ho J, Skogan G, Fykse EM, Aarskaug T, Waagen V, Airborne *Legionella* bacteria from pulp waste treatment plant: aerosol particles

- characterized as aggregates and their potential hazard. *Aerobiologia*, 2011, 27 (2), 147-162.
12. Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, Neglia R, Marchesi I, Fantuzzi G, Tatò D, Napoli C, Quaranta G, Laurenti P, Leoni E, De Luca G, Ossi C, Moro M, Ribera D'Alcalà G. Legionella infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis*. 2004, 10(3), 457-64.
 13. Byrd TF, Horwitz MA. Interferon gamma-activated human monocytes down regulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J Clin Invest* 1989, 83:1457-65.
 14. Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C. Evidence in The *Legionella Pneumophila* Genome For Exploitation of Host Cell Functions and High Genome Plasticity, *Nat Genet*. 2004, 36(11):1165-73
 15. Centers for Disease Control and Prevention. Increasing incidence of Legionellosis in the United States, 2000–2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2011, 60:1083–6
 16. Champney WS, Burdine R, Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995, 39, 2141-2144.
 17. Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H, Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 2005, 73 (7), 4272-4280.
 18. Cianciotto NP, Abu Kwaik Y, Edelstein PH, Fields BS, Geary DF, Harrison TG, Berotte Joseph C, Ratcliff RM, Stout JE, *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, Amer Society for Microbiology Press, Washington DC, 2006, ISBN 1555813909.
 19. Cirilo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS, Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 1999, 67 (9), 4427-4434.

20. Collins S, Stevenson D, Bennett A, Walker J. Occurrence of Legionella in UK household showers Volume 220, Issue 2, Part B, 2017, Pages 401-406
21. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2003, 3675–3681.
22. Connell SR, Trieber CA, Dinos GP, Einfeldt E, Taylor DE, Nierhaus KH. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. 2003, *EMBO J* 22: 945–953.
23. Corcoran JW, Hahn FE, Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents, Eds; Springer-Verlag: New York, Heidelberg, Berlin, 1975, 459-479.
24. Cundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 1989, 43, 207-233.
25. D’Costa VM, Mc Grann KM, Hugues DW, Wright GD, Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311(5759), 2006. 374–377.
26. De Giglio O, Napoli C, Lovero G, Diella G, Rutigliano S, Caggiano G, Montagna M.T Antibiotic susceptibility of Legionella pneumophila strains isolated from hospital water systems in Southern Italy, *Environmental Research.* 2015 Oct;142:586-90
27. Douthwaite S, Hansen LH, Mauvais P, Macrolide ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA. *Mol. Microbiol.* 2000, 36, 183-193.
28. Dowling JN, Saha AK, Glew RH, Virulence factors of the family Legionellaceae, *Microbiological Reviews*, 1992, 56 (1), 32-60.
29. Engleberg NC, Dirita V, Dermody TS, Schaechter's mechanisms of microbial disease, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, ISBN 978-0781753425
30. Erdem B. Legionella. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999, 559-566.
31. Erdogan H, Can F, Demirbilek M, Timurkaynak F, Arslan H, In vitro activity of antimicrobial agents against Legionella isolated from environmental water systems: first results from Turkey. *Environ. Monit. Assess.*171(1–4), 2010,487–491.

32. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2013: Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013
33. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST guidance document on Legionella, Antimicrobial Susceptibility testing of Legionella pneumophila, 2017
34. Euzéby JP, List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature-Genus Legionella. 24.05.2019, URL: <http://www.bacterio.net/legionella.html>
35. Fang GD, Fine M, Orloff J, et al. New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multi-center study of 359 cases. *Medicine (Baltimore)* 1990, 69:307-16.
36. Fields BS, Benson RF, Besser RE, Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15 (3), 506-526
37. Flieger A, Gong S, Faigle M, Deeg M, Bartmann P, Neumeister B, Novel phospholipase A activity secreted by Legionella Species, *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (5), 1321-1327.
38. Fontana S, Scaturro M, Rota MC, Caporali MG, Ricci ML. Molecular typing of Legionella pneumophila serogroup 1 clinical strains isolated in Italy. *Int. J. Med. Microbiol*, 2014, 304(5-6), 597-602
39. Franzin L, Cabodi D, Fantino C. Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by Legionella. *J Hosp Infect* 2002; 51: 269-274.
40. Fraser DW, Tsai T, Orenstein W, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977;297:1189-97
41. Friedman H, Yamamoto Y, Newton C, Klein TW, Immunologic response and pathophysiology of Legionella infection, *Seminars in Respiratory Infections*, 1998, 13 (2), 100-108.
42. Friedman RL, Lochner JE, Bigley RH, Iglewski BH. The effects of Legionella pneumophila toxin on oxidative processes and bacterial killing of human polymorphonuclear leucocytes. *J Infect Dis*, 1982, 146:328-34.
43. Gabay J, Blake M, Niles W, Horwitz MA. Purification of Legionella pneumophila major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J Bacteriol* 1985, 162:85-91.

44. Gao LY, Abu Kwaik Y, Activity of caspase-3 during *Legionella pneumophila* induced apoptosis, *Infection and Immunity*, 1999, 67(9), 4886-4894.
45. Gaynor M, Mankin AS, Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance Current Topics in Medicinal Chemistry 2003, 3, 949-961
46. Günel E, Erdem H. Kinolonlar, İç Hastalıkları Dergisi 2014; 21: 69-85
47. Hansen JL, Schmeing TM, Moore PB, Steitz TA, Structural insights into peptide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 2002, 99, 11670-11675
48. Hickey EK, Cianciotto NP, An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases, *Infection and Immunity*, 1997, 65, 133-143.
49. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance, *Ann N Y Acad Sci*. 2015, 1354(1): 12–31. doi:10.1111/nyas.12830
50. Horwitz MA. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* 1983;158:1319-31
51. <https://legionellacontrol.com/legionella/legionella-testing-polymerase-chain-reaction-pcr/>
52. <https://www.cdc.gov/legionella/clinicians/diagnostic-testing.html>
53. <https://www.safewater.org/fact-sheets/1/2017/1/23/ultrafiltrationnanoandro>
54. ISO 11731- Su Kalitesi-Legionella Sayımı, İkinci Versiyon 2017
55. İğnak S. İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Su Sistemlerinde *Legionella* Cinsi Bakterilerin Araştırılması Yüksek Lisans Tezi İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2007
56. Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. Literature review efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 2002; 36: 4433-4444.
57. Korvick JA, Yu VL. Legionnaires' disease: an emerging surgical problem. *Ann Thorac Surg*. 1987, 43(3):341-7.
58. Köksal F, Oğuzkurt N, Samastı M. İstanbul'da Üç Eğitim Hastanesinin Depo ve Musluk Sularında *Legionella* Bakterilerinin Araştırılması. *Klinik Dergisi*, 2002, Cilt 15, Sayı:1, 16-18,

59. Kuchta JM, States SJ, McNamara AM, Wadowsky RM, Yee RB. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46, 1134-9.
60. Lau HY, Ashbolt NJ, The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water, *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107, 368-378.
61. Leoni E, De Luca G, Legnani PP, Sacchetti R, Stampi S, Zanetti F. *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 373–379
62. Levinson W. Lange Review of Medical Microbiology and Immunology, 2014,174-175
63. Li L, Mendis N, Trigui H, Faucher S. Transcriptomic changes of *Legionella pneumophila* in water, *BMC Genomics*. 2015; 16(1): 637
64. Lowry PW, Tompkins LS. Nosocomial legionellosis: A review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. *Am J Infect Control* 1993, 21(1): 21-27.
65. Mao JCH, Robishaw EE, Erythromycin a peptidyl transferase effector. *Biochem*. 1972, 11, 4864- 4872.
66. Marshall KC, *Interfaces in Microbial Ecology*. Cambridge MA: Harvard University Press, 1976, ISBN 9780674458222
67. Marston BJ, Lipman HB, Breitman RF, Surveillance for Legionnaires' disease: risk factors for morbidity and mortality, *Archives of Internal Medicine*, 1994, 154, 2417-2422.
68. Marston BJ, Plouffe JF, File, TM Jr, Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Arch Intern Med* 1997, 157:1709- 18.
69. Mc Dade JE, Brenner DJ, Bazeman FM. Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann Intern Med* 1979, 90:659-61.
70. Mc Dade 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 diseases. *N Engl J Med* 1977, 297:1197-203

71. Menninger JR, Otto DP, Erythromycin, carbomycin and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982, 21, 810-818.
72. Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, Shiomori T, Yoshida S. Development of new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63(7): 2489-2494.
73. Moffat JF, Edelstein PH, Regula DP, Cirillo JD, Tompkins LS, Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model, *Molecular Microbiology*, 1994, 12 (5), 693-705.
74. Molofsky AB, Shetron-Rama LM, Swanson MS, Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death, *Infection and Immunity*, 2005, 73 (9), 5720-5734.
75. Muder RR, Yu VL, Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*, *Emerging Infections*, 2002, 35, 990-998.
76. Murdoch D.R. Diagnosis of *Legionella* infection. *Med Microbiol* 2003, 36: 64-69.
77. Mülazimoğlu L. *Legionella* (Lejyoner Hastalığı). İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevi, 2002, 1667-1670
78. Nakipoğlu Y. İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde kullanılan sularda *Legionella* cinsi bakterilerin araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Tıp Fakültesi 1999
79. Nash TW, Libby DM, Horwitz MA. Interaction between the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) and human alveolar macrophages. Influence of antibody, lymphokines, and hydrocortisone. *J Clin Invest* 1984, 74:771-82.
80. Neil K, Berkelman R, Increasing incidence of legionellosis in the United States, 1990–2005 changing epidemiologic trends. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 47(5), 591–599.
81. O'Connell WA, Hickey EK, Cianciotto NP, A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding, *Infection and Immunity*, 1996, 64, 842-848.

82. Okuda K, Ikedo M, Yabuuchi E. Wadowsky-Yee-Okuda (WYO) medium: a new selective medium for the isolation of Legionellae strains from environmental water specimens J-STAGE home Kansenshogaku Zasshi Volume 58, 1984, Issue 10
83. Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, Rush TS III, O'Connell J, Bradford PA. Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 2156–2166.
84. Osterholm MT, Chin TD, Osborne DO, et al. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *Am J Epidemiol* 1983, 117:60-7.
85. Özyürek S, Şimşek S, Hocaoğlu B, Hitit G, Göktaş P, Toplumdan Edinilmiş Bir Legionella pneumophila Pnömonisi Olgusu, 17. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 1997
86. Pasculle AW. Legionella In: Howard BJ, Keiser JF, Smith TF, Weisfeld AS, Tilton RC (eds). *Clinical and Pathogenic Microbiology*. St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1994, 461-6.
87. Payne NR, Horwitz MA, Phagocytosis of Legionella pneumophila is mediated by human monocyte complement receptors, *The Journal of Experimental Medicine*, 1987, 166, 1377-1389
88. Pedro-Botet L, Yu L. Legionella: macrolides or quinolones? *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 Suppl. 3, 25–30
89. Pınar A. Doğa kaynaklı insan patojeni Legionella; tanı ve korunma yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Derg*; 33(2): 93-98.
90. QIAGEN, QIAcube Protocol Sheet, 2016
91. Rasmussen BA, Gluzman Y, Tally FP. Inhibition of protein synthesis occurring on tetracycline-resistant, TetM-protected ribosomes by a novel class of tetracyclines, the glycylyclines. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 1994, 1658–1660.
92. Retzlaff C, Yamamoto Y, Okubo S, Hoffman PS, Friedman H, Klein TW, Legionella pneumophila heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 beta mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages, *Immunology*, 1996, 89, 281–288

93. Rihs JD, Yu VL, Zuravleff A, Goetz A, Muder RR. Isolation of *Legionella pneumophila* from blood with the BACTEC system: a prospective study yielding positive results. *J Clin Microbiol* 1985, 22(3): 422-424.
94. Rittig MG, Jagoda JC, Wilskie B, Murgia R, Cingo M, Repp R, Burmester GR, Krause A, Coiling phagocytosis discriminates between different spirochetes and is enhanced by phorbol myristate acetate and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Infection and Immunity*, 1998, 66 (2), 627-635.
95. Schlunzen F. Zarivach R. Harms J. Bashan A. Tocilj A. Albrecht R. Yonath A. Franceschi F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 2001, 413, 814-821.
96. Sharaby Y, Nitzan O, Brettar I, Höfle M.G, Peretz A, Halpern M, Antimicrobial agent susceptibilities of *Legionella pneumophila* MLVA-8 genotypes, *Scientific Reports* 9, 2019, Article number: 6138
97. Sikora A, Gładysz I, Kozioł-Montewka M, Wójtowicz-Bobin M, Stańczak T, Matuszewska R, Krogulska B, Assessment of antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila* isolated from water systems in Poland, 2017, 24(1):66-69.
98. Steinert M, Hentschel U, Hacker J, *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray, *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (2), 1998, 149-162
99. Stout JE, Rihs JD, Yu VL. *Legionella*. İçinde Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Pres, 2003, 809-823
100. Stout JE, Yu VL. Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for *Legionella* control: Implications for the evaluation of other disinfection modalities. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003, 21(8): 563-568.
101. Stout JE, Yu VL. Nosocomial *Legionella* Infection. İçinde Mayhall CG, editor. *Hospital Epidemiology and Infection Control*. 3rd ed. US: Williams and Wilkins; 2004, 603-621.
102. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. *Lippincott's Illustrated Reviews*. Anđ Ö, çeviri editörü. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006
103. Swanson MS, Hammer BK, *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages, *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54, 567-613.

- 104.** Torre I, Alfano R, Borriello T, De Giglio O, Iervolino C, Montagna MT, Scamardo MS, Pennino F. Environmental Surveillance and in Vitro Activity of Antimicrobial Agents Against *Legionella pneumophila* Isolated From Hospital Water Systems in Campania, South Italy: A 5-Year Study. *Environmental Research* Volume 164, 2018, 574-579
- 105.** TS EN ISO 11133 Gıda, yem ve su mikrobiyolojisi-Kültür ortamının hazırlama, üretim, muhafaza ve performans deneyi, 2014
- 106.** Tuğrul HM. *Legionella* türleri. İçinde Serter D, Ertem E, Gökengin D, editörler Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları. İzmir: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000, 308-312.
- 107.** Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Suda *Legionella* Türlerinin Tanımlanması". T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2014
- 108.** Vandewalle-Capo M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Gilbert C, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C, Minimum inhibitory concentration (MIC) distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 50, 2017, 684–689
- 109.** Vonberg RP, Eckmanns T, Bruderek J, Rüdén H, Gastmeier P. Use of terminal tap water filter systems for prevention of nosocomial legionellosis. *J Hosp Infect* 2005; 60: 159-162
- 110.** Vural T, Er D. *Legionella* türlerinin mikrobiyolojik özellikleri ve laboratuvar tanısı. *Flora* 1999; 4(1): 9-25.
- 111.** Vural T. *Legionella* İnfeksiyonlarında Tanı Sorunu. 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Program ve Özet Kitabında: Tekeli E, Willke A (editörler). Antalya, 6-10 Ekim 1997,315-25
- 112.** Watrick P, Kolter R, Biofilm, city of microbes, *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (10), 2675-2679.
- 113.** White PS, Graham FF, Harte DJG, Baker MG, Ambrose CD, Humphrey ARG. Epidemiological investigation of a Legionnaires' disease outbreak in Christchurch, New Zealand: the value of spatial methods for practical public health. *Epidemiol Infect.* 2013, 141(04):789–99

114. Wilkinson HW, Fikes BJ. Slide agglutination test for serogrouping *Legionella pneumophila* and atypical *Legionella*-like organisms. *J Clin Microbiol* 1980; 11(1): 99-101
115. Wilson DA, Yen-Lieberman B, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene *J Clin Microbiol*. 2003, 41(7):3327-30.
116. Winn WC, Allen S, Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P, Woods G, Konemans's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Lippincott Williams and Wilkins Press, 2006, ISBN 0-7817-3014-7.
117. Winn WC, Koneman EW, Stephen DA, Gary WP, Janda WM, Schreckenberger PC, Woods GL. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2006
118. Winogradsky S, The direct method in soil microbiology and its application to the study of nitrogen fixation, *Soil Science*, 1928, 25, 37-43.
119. Xiong ., Yan H, Shi L, Mo Z, Antibiotic susceptibility of *Legionella* strains isolated from public water sources in Macau and Guangzhou, *J Water Health*. 2016, 14(6):1041-1046.
120. Yoon EJ, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013, 57:2989–2995.
121. Yu V.L. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' Disease). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Disease*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone Inc 1995, 2087-97
122. Yu VL. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' Disease). İçinde Mandel GL editor. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. US: Churchill Livingstone; 2000. 2424-2435
123. Zobell CE, Allen EC, Attachment of marine bacteria to submerged slides, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1933, 30, 1409-1411.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÇEVRE SU ÖRNEKLERİNDE LEGIONELLA PNEUMOPHILA VE MAKROLİD DİRENÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**5**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**5**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

- | | | |
|----------|---|-------------|
| 1 | Submitted to Haliç Üniversitesi
Öğrenci Ödevi | % 1 |
| 2 | N. HIRUTA, T. MURASE, N. OKAMURA. " An outbreak of diarrhoea due to multiple antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing O26[ϕ]H11 in a nursery ", Epidemiology and Infection, 2001
Yayın | % 1 |
| 3 | Alvaro J. Benitez, Jonas M. Winchell. "Rapid detection and typing of pathogenic nonpneumophila Legionella spp. isolates using a multiplex real-time PCR assay", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2016
Yayın | % 1 |
| 4 | acikerisim.istanbul.edu.tr
İnternet Kaynağı | % 1 |
| 5 | Submitted to Akdeniz University
Öğrenci Ödevi | <% 1 |

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ahmet	Soyadı	AKTAŞ
Doğ.Yeri	Fatih	Doğ.Tar.	10.11.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	23791565794
Email	ahmet.aktas@ymail.com	Tel	05327278436

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Ege Üni. Fen Fak. Biyoloji Bölümü	2009
Lise	İhsan Mermerci Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
.	Mikrobiyoloji Birim Sorumlusu	İstanbul 2 Nolu Halk Sağlığı Laboratuvarı	6 Yıl
.			-
.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	YDS Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta		51.25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80,052	78,366	75,513

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok İyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Yüzme, Motor Sporları, Basketbol