



**BİNA SU SİSTEMLERİNDE LEGIONELLA BAKTERİ
KOLONİZASYONUNUN KÜLTÜR VE REAL-TIME
PCR YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI**

Hakan HEDEF

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2019

Hakan HEDEF tarafından hazırlanan “BİNA SU SİSTEMLERİNDE LEGIONELLA BAKTERİ KOLONİZASYONUNUN KÜLTÜR VE REAL-TIME PCR YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN BAKIRCI

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ

Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 28/08/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hakan HEDEF

28/08/2019

BİNA SU SİSTEMLERİNDE LEGIONELLA BAKTERİ KOLONİZASYONUNUN KÜLTÜR VE REALTIME PCR YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hakan HEDEF

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2019

ÖZET

Bu çalışmada, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı'na 2017 Mayıs – 2019 Şubat tarihleri arasında gönderilen su numuneleri arasından 64 tanesi seçilerek, numunelerde *Legionella pneumophila* varlığı araştırılmıştır. Kuruma gelen bu su numuneleri hastane, fabrika, işyeri gibi farklı bina yapılarının soğuk su deposu, lavabo muslukları ve duş kabinleri gibi su sistemlerinin farklı noktalarından alınan sularından elde edilmiştir. Su numunelerine hem filtrasyon hem de direk ekim yöntemi uygulanmış olup, Buffered Charcoal Yeast Ekstrakt (BCYE) ve dye glisin Vankomiksin polimiksin B (DGVP) katı besiyerlerine ekimi yapılmıştır. 37 °C'de en fazla 10 gün inkübe edildikten sonra şüpheli koloniler hem koyun kanlı agara hem de BCYE agara alınmıştır. İkinci pasajlarda koyun kanlı agarda üremeyip, BCYE agarda üreyen kolonilerin tanımlamaları yapılmıştır. Daha sonra, *L. pneumophila* kolonileri Lateks aglütinasyon testi (OXOID) ile sero-gruplandırılmıştır. Elde edilen verilerin sonucunda 64 adet su numunesinden 3 *L. pneumophila* SG1, 8 *L. pneumophila* SG 2-14, 12 *Legionella* spp. varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada kültür yöntemi ile birlikte Real-time PCR yöntemi de çalışılmıştır. Real-time PCR sonuçlarına göre 15 numunede *L. pneumophila* SG1 pozitifliği, 2 numunede *L. pneumophila* SG 2-14 pozitifliği, 8 numunede *Legionella* spp. pozitifliği görülmüştür. 39 numunenin PCR sonucu ise negatif sonuçlanmıştır. Bu çalışma göstermektedir ki, hastane ve iş yerleri gibi birçok binanın su sistemlerinde *Legionella* varlığı söz konusudur. Bu nedenle bina su sistemleri düzenli aralıklarla kontrol edilerek, *Legionella* açısından tetkik edilmelidir. Bu tetkikler sonucu etken mikroorganizma varlığı teşhis edilirse, dekontaminasyon yöntemleri hızlı bir şekilde uygulanmalıdır. Dekontaminasyon işlemlerinden sonra dahi bina su sistemleri periyodik olarak kontrol edilmelidir. Halk sağlığı açısından tehdit unsuru olan bu patojen mikroorganizmanın tanısında birden fazla yöntemin beraber kullanılması tanının hızlı ve doğru bir şekilde konmasında faydalı olmaktadır. Tanının hızlı konması sonucu tedavi daha hızlı bir şekilde uygulanmakta ve hastalık büyük bir sağlık problemi olmadan önlenmektedir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Legionella, su sistemleri, kültür, real-time PCR
Sayfa Adedi : 65
Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

INVESTIGATION OF LEGIONELLA BACTERIA COLONIZATION IN BUILDING
WATER SYSTEMS WITH CULTURE AND REAL-TIME PCR METHOD

(M. Sc. Thesis)

Hakan HEDEF

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2019

ABSTRACT

In this study, the presence of *Legionella pneumophila* was investigated in 64 of water samples sent to National Respiratory Pathogen Reference Laboratory of General Directorate of Public Health between May 2017 and February 2019. These water samples were obtained from the water taken from different points of the water systems such as cold water tank, sink taps and shower cabins of different building structures such as hospitals, factories and offices. Water samples were subjected to both filtration and direct seeding methods, and Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) and Dye Glicine Vancomycin Polymyxin b (DGVP) were cultured in solid media. After incubation for a maximum of 10 days at 37 ° C, suspected colonies were taken into both sheep blood agar and BCYE agar. In the second passages, the colonies that breed in BCYE agar did not grow on sheep blood agar. Then, *L.pneumophila* colonies were sero-grouped by Latex agglutination test (OXOID). As a result of the obtained data, 3 *L. pneumophila* SG1, 8 *L. pneumophila* SG 2-14, 12 *Legionella spp.* It was determined. In addition to this, Real-time PCR method was also studied. According to the results of real-time PCR method *L. pneumophila* SG1 positivity in 15 samples, *L. pneumophila* SG 2-14 positivity in 2 samples, *Legionella spp.* positivity. PCR results of 39 samples were negative. This study shows that *Legionella* is present in the water systems of many buildings such as hospitals and workplaces. For this reason, building water systems should be inspected regularly and inspected for *Legionella*. Decontamination methods should be applied rapidly if the presence of microorganism is detected as a result of these tests. Even after decontamination, building water systems should be checked periodically. The use of multiple methods together in the diagnosis of this pathogen microorganism, which is a threat to public health, is helpful in making the diagnosis quickly and accurately. As a result of rapid diagnosis, treatment is applied more quickly and the disease can be prevented without a major health problem.

Science Code : 20309

Key Words : Legionella, water systems, strain, real-time PCR

Page Number : 65

Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleri ile çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a, en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Biyolog olma sürecimin başlarında mesleki ve insani anlamda tüm deneyimini benimle paylaşan Biyolog Sinem BEDİR'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez yazım sürecimde desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Selin NAR ÖTGÜN'e, Dr. Nuriye ÜNAL ŞAHİN'e, Biyolog Aysun KOCA'ya ve Arif YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere gelişimde en büyük emeği sergileyen sevgili annem Bilser HEDEF'e, babam Günay HEDEF'e ve abim Volkan HEDEF'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR..... | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ..... | ix |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ | x |
| RESİMLERİN LİSTESİ | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI | 3 |
| 2.1. <i>Legionella</i> Türlerinin Tanımı ve <i>Legionella</i> 'nın Tarihçesi | 3 |
| 2.2. <i>Legionella</i> Türlerinin Sınıflandırması | 4 |
| 2.3. <i>Legionella</i> Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri | 4 |
| 2.4. <i>Legionella</i> Epidemiyoloji | 7 |
| 2.4.1. <i>Legionella</i> türlerinin ekolojisi | 7 |
| 2.4.2. Enfeksiyon kaynağı | 8 |
| 2.4.3. Bulaş yolları | 9 |
| 2.4.4. Prevalans | 10 |
| 2.5. Patogenez..... | 12 |
| 2.6. Klinik Belirtiler ve Bulgular..... | 13 |
| 2.7. Laboratuvar Tanısı..... | 15 |
| 2.7.1. Su numunelerinde <i>Legionella</i> bakteri izolasyonu için kültür yöntemi..... | 15 |
| 2.7.2. Su numunelerinde <i>Legionella</i> bakteri izolasyonu için real-time PCR yöntemi..... | 17 |
| 2.8. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Tür Tanısı ve Sero-gruplandırılması..... | 19 |

| | Sayfa |
|---|--------------|
| 2.8.1. Lateks aglütinasyon yöntemi..... | 19 |
| 2.8.2. Direkt floresan antikor yöntemi (DFA)..... | 19 |
| 2.9. Tedavi..... | 19 |
| 2.10. Nozokomiyal Salgınlar, Koruma ve Kontrol..... | 20 |
| 2.11. Kontamine Bina Su Sistemlerinin Dekontaminasyon Yöntemleri..... | 21 |
| 3. MATERYAL VE METOT..... | 25 |
| 3.1. Materyal..... | 25 |
| 3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler..... | 25 |
| 3.1.2. Besiyerleri..... | 25 |
| 3.1.3. Test kitleri..... | 27 |
| 3.2. Metot..... | 28 |
| 3.2.1. Kültür yöntemi..... | 28 |
| 3.2.2. Real-time PCR yöntemi..... | 30 |
| 3.3. İstatiksel Analiz..... | 34 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 35 |
| 4.1. İzolasyon..... | 35 |
| 4.2. Tanımlama..... | 36 |
| 5. TARTIŞMA..... | 43 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 53 |
| KAYNAKLAR..... | 57 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 65 |

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge | Sayfa |
|--|-------|
| Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan su numunelerinin alındığı yere göre sayısal dağılımı | 29 |
| Çizelge 3.2. Koloni sayımının ekim yöntemine göre hesaplanması | 30 |
| Çizelge 3.3. Uygulanan real-time PCR protokolü | 33 |
| Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan su numunelerinin kültür ve real-time PCR sonuçları | 38 |



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 3.1. Real-time PCR çalışmasında pozitif kontrol görüntüsü | 34 |
| Şekil 3.2. Real-time PCR çalışmasında negatif kontrol görüntüsü | 34 |
| Şekil 4.1. Kültürde <i>Legionella</i> varlığı tespit edilen numunlerin yüzdesel dağılımı | 36 |
| Şekil 4.2. Kültürde tespit edilen numunlerin tür bazında yüzdesel dağılımı | 37 |
| Şekil 4.3. Real-time PCR ile <i>Legionella</i> varlığı tespit edilen numunlerin yüzdesel dağılımı | 37 |
| Şekil 4.4. Real-time PCRda tespit edilen numunelerin tür bazında yüzdesel dağılımı .. | 38 |
| Şekil 4.5. <i>Legionella</i> varlığı tespit edilen numunlerin alındığı yerlere göre yüzdesel dağılımı | 41 |

RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim | Sayfa |
|---|--------------|
| Resim 2.1. <i>Legionella</i> bakterisinin gram negatif görüntüsü | 5 |
| Resim 3.1. Real-time PCR cihazı (Biorad CFX 96 Real-time system) ve bilgisayar..... | 33 |
| Resim 4.1. <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin BCYE besiyerindeki görüntüsü | 35 |



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler | Açıklamalar |
|---------------------------------|---|
| % | Yüzde |
| <i>g</i> | G kuvveti |
| g | Gram |
| kDa | Kilo dalton |
| L | Litre |
| M | Molarite |
| mg/L | Miligram/litre |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| mol/L | Molaritenin birimi |
| nm | Nanometre |
| °C | Santigrad derece |
| pH | Hidrojen konsantrasyonu |
| ppm | Parts per million |
| µL | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| | |
| Kısaltmalar | Açıklamalar |
| ACES | N-2-asetamido-2-aminoetansülfonik asit |
| AIDS | Edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu |
| BAL | Bronkoalveolar lavaj |
| BCYE | Tamponlu kömür maya ekstrakt agar |
| BCYE-α | Alfa ketoglutarik tamponlu kömür maya ekstrakt agar |
| BMPA | Sefamandol, polimiksin B, anizomisinli BCYE |
| CDC | ABD hastalık kontrol ve korunma merkezleri |
| DFA | Direkt floresan antikor |
| DGVP | Dye glisin vancomiksin polymiksin b agar |

Kısaltmalar**Açıklamalar**

| | |
|--------------|--|
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| EIA | Enzim immünolojik testi |
| ELISA | Enzim bağlı immünosorban yöntem |
| FITC | Floresan izotiyosiyanat |
| HCL | Hidroklorik asit |
| IFA | İndirekt floresan antikor |
| IgA | İmmunglobulin A |
| IgG | İmmunglobulin G |
| IgM | İmmunglobulin M |
| KCL | Potasyum klorür |
| LH | Lejyoner hastalığı |
| LLAP | <i>Legionella</i> benzeri amoebae patojeni |
| Mab | Monoklonal antikor |
| Mip | Makrofaj inflamatuvar protein |
| MR | Manyetik rezonans görüntüleme |
| MWY | Modifiye wadosky yee |
| PCR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RAPD | Rastgele arttırılmış polimorfik DNA |
| rDNA | Ribozomal DNA |
| RIA | Radyoimmün test |
| rRNA | Ribozomal RNA |
| UV | Ultraviyole |
| VAMC | Gazi olayları sağlık merkezi |

1. GİRİŞ

Legionella pneumophila ilk kez 1976 yılında yaşanan bir salgında tanımlanmıştır. Bu salgının sebebini tetkik etmek için yapılan çalışmalar nihayetinde takvimler 1977 yılının Ocak ayını gösterirken Atlanta Hastalık kontrol merkezinde *L. pneumophila* bakterisi izole edilmiştir [1]. “Legion” kelimesi toplantıya katılan Amerikan Lejyonlarını ifade etmekte, “pneumo” kelimesinin anlamı ise Yunanca akciğer demektir, “philos” ise Yunanca seven anlamını taşımaktadır [2]. *Legionellaceae* familyasında *Legionella* cinsine ait en az 52 tür ve en az 70 serogrup bulunmaktadır [3].

Legionella türlerinden birçoğu insanlarda enfeksiyon oluştururken bunlar içerisinde en patojen olan tür *L. pneumophila*'dır. Takribi olarak *Legionella*'nın sebep olduğu hastalıkların %75'i *L. pneumophila* serogrup 1 tarafından meydana gelirken, %20-30'u *L. pneumophila*'nın diğer serogrupları tarafından meydana getirilmektedir. %5-10'u ise diğer *Legionella* türleri tarafından meydana getirilmektedir. Birden fazla *Legionella* türünün meydana getirdiği vakalar da bulunmaktadır [4].

Lejyoner hastalığı üç gruba ayrılmaktadır. Bu üç grup toplum kökenli lejyoner hastalığı, seyahat ilişkili lejyoner hastalığı ve hastane ilişkili lejyoner hastalığıdır. Bu üç gruptan lejyoner hastalığına yakalanan kişilerin yaklaşık %70'inin toplum kökenli, yaklaşık %20'sinin seyahat ilişkili, yaklaşık %10'unun ise hastane tabanlı sebeplere bağlı olarak bu hastalığa yakalandığı belirtilmektedir [5].

Lejyoner hastalığını tanımlayabilmek için özel tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar kültür yöntemi, monoklonal antikor işaretli direkt floresan antikor (DFA), PCR, üriner antijen, DNA hibridizasyonu, immunfluoresans antikor (IFA), enzim immünassay (ELISA) ve hızlı mikroaglutinasyon gibi yöntemlerdir [6]. *Legionella* türlerinin kültürde saptanması % 100 özgüllükte olup, tanıda altın standart olarak kabul görmektedir [7]. Bununla beraber birçok araştırmada, *Legionella* izolasyonunun kolay olmadığı, çok uğraştırdığı ve rutin laboratuvarlarda teşhisinin konulmasında kültür yöntemi yüzdesinin düşük değerlerde çıktığı bilinmektedir [8, 9]. Moleküler yöntemlerden PCR ise *Legionella* identifikasyonunda çokça tercih edilen bir metottur. PCR yönteminde kullanılan primerler belirleyici olmaktadır. Bu nedenle PCR yöntemi ya sadece *L. pneumophila* ya da *Legionella* türlerinin birkaçını ya da tümünü saptayabilmektedir [10].

Lejyoner hastalığı ülkemizde bildirim zorunlu bir bulaşıcı hastalıktır. Tanının yaygın olmaması, teşhis koymadaki zorlukların yaşanması ve bildirim yapılmadığı için yeterli veri elde edilmemekle beraber seyahat kaynaklı, toplum kaynaklı ve nozokomiyal lejyoner hastalığı vakalarının varlığı bilinmektedir.

Bu çalışmada, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı'na *Legionella* analizi için gelen su numunelerinde *Legionella* cinsi bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla kuruma gelen farklı bina su sistemlerinden alınan su numunelerinin öncelikle selektif besiyerinde kültür yöntemi ile tanımlamaları yapılmış, daha sonra real-time PCR yöntemi ile de *Legionella* cinsi bakterilerin varlığı belirlenmiştir. Hızlı ve kesin tanıyı koymak amacıyla birden fazla tanı yöntemleri beraber kullanmak, hastalığın tedavisinde ve bu hastalığın prevalansını doğru bir şekilde aktarmak bakımından önemli olduğundan *Legionella* varlığının tespitinde kültür ve real-time PCR yöntemleri karşılaştırılmıştır.

Bu tezin amacı, ülkemizde *Legionella* bakterisinin etken olduğu hastalıklara karşı farkındalık oluşturabilmek, bu hastalıkları hızlı ve kesin bir şekilde tespit edip, en kısa sürede doğru müdahaleyi yapmak ve bu mikroorganizmaların insanlarla bulaşının gerçekleştiği yerlerden biri olan bina su sistemlerinin dezenfeksiyonu hakkında bilgilendirmektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Legionella* Türlerinin Tanımı ve *Legionella*'nın Tarihçesi

Legionella pneumophila ilk kez 1976 yılının Temmuz ayında Philadelphia'da Amerikan ordu toplantısına katılan üyelere tespit edilmiştir. Bu toplantıda yer alan Amerikan lejyonerlerinden 189'u pnömoni salgınına yakalanmış ve bunlardan 29 tanesi bu salgından dolayı yaşamını yitirmiştir [1]. Bu vahim olaydan 6 ay sonra, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinden (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) Joseph McDade ve Charles Shepard isimli bilim insanları, yeni bir Gram negatif basil olan bu bakteriyi keşfetmişlerdir. Bilim dünyasına yeni bir soluk getiren bu bakteri *Legionellaceae* familyası, *Legionella* cinsi ve *pneumophila* türü olarak isimlendirilmiştir [11].

1974 senesinde Philadelphia'daki yine aynı otelde yapılan Oddfellow toplantısında bulunan 11 kişinin de *Legionella* bakterisi kaynaklı pnömoni geçirdiği anlaşılmıştır. *Legionella pneumophila*'nın keşfinin ardından bu salgının gerçekleştiği fark edilmiştir. 1965 yılında Washington DC'deki bir psikiyatri hastanesinde yapılan geçmiş zamanı da içine alan çalışmalarda, burada meydana gelmiş olan önceki bir salgında 81 kişinin solunum yolu rahatsızlıkları yaşadığı ve bu kişilerden 15'inin vefat ettiği görülmüştür. Geçmişe yönelik bu incelemeler sonucu bu salgının ilk lejyoner hastalığı salgını olduğu anlaşılmıştır. Hastalardan toplanan serum örneklerinden 12 yıl sonra yapılan serolojik çalışmalarda, hastaların %85'inde *L. pneumophila* antikor serokonversiyonu saptanmıştır [12]. Broad caddesinde yer alan Bellevue Stratford Hotel'de gerçekleşen bu salgından sonra 1976 yılının 1 Temmuz–18 Ağustos tarihleri arasında, otelin yakın çevresinde bulunmamış ve salgın sırasında otel binasına giriş çıkışı olmamış, bir blok mesafelik alanda bulunan 39 farklı kişide de Lejyonella hastalığı (Legionellozis) görülmüştür. O zamanda bu hastalığa Broad Street Pneumoni'si de denilmiştir. Geçmişte meydana gelen olguları kapsayan çalışmalarda; 1965 yılında Washington'da bir psikiyatri kliniğinde 51 kişinin akciğer rahatsızlığına yakalanıp 15'inin ölmesiyle sonuçlanan salgında, hastaların %85'inde etkenin *L. pneumophila* olduğu bildirilmiştir. Bu kayıt altına alınan ilk *Legionella* salgınıdır. Ayrıca 1968 yılında Michigan'da 144 kişi, *Legionella* etkenlerinin sebep olduğu tespit edilen Pontiac ateşine yakalanmış, bu hastalık sonucu ölen kişi olmamıştır. Bunların dışında İngiltere'de bir hastanede 1985 yılında meydana gelen pnömoni salgınında ise hastalığa yakalanan 68 kişiden 22'si ölmüştür. Yine 11 Eylül–18 Ekim 1996 tarihinde Madrid'in

Alcala de Henares bölgesinde hastalık sebebinin *L. pneumophila* olduğu salgında, 197 kişi pneumoniye yakalanmış ve 11 kişi ölmüştür. Bu salgın Avrupa’da ortaya çıkan en etkili *Legionella* salgını olarak ifade edilmiştir [4].

2.2. *Legionella* Türlerinin Sınıflandırması

DNA havuzlarındaki dizilimlerin genetik olarak benzerliklerini ölçmek için yapılan çalışmalar sonucu 1976 yılındaki pnömöni salgınında etken olan bakterinin yeni bir tür olarak sınıflandırılması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1979 yılında Brenner, Steigerwalt ve McDade Philadelphia’daki lejyoner hastalığı sebebi olan *L. pneumophila* bakterisini *Legionellaceae* ailesi içine dâhil etmiştir [11]. *Legionella*’lar 1940’lı yıllarda Riketsiya’ya yakın mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. McDade ve arkadaşları 1947 yılında nefes alışverişinde sıkıntı yaşayan bir kişiden elde ettikleri, Riketsiya’ya benzerliğiyle bilinen ve herhangi bir sınıfa dâhil edilmeyen bakterinin aslında *Legionella* cinsi ile birebir aynı olduğunu 1979 yılında bir raporla açıklamıştır [4].

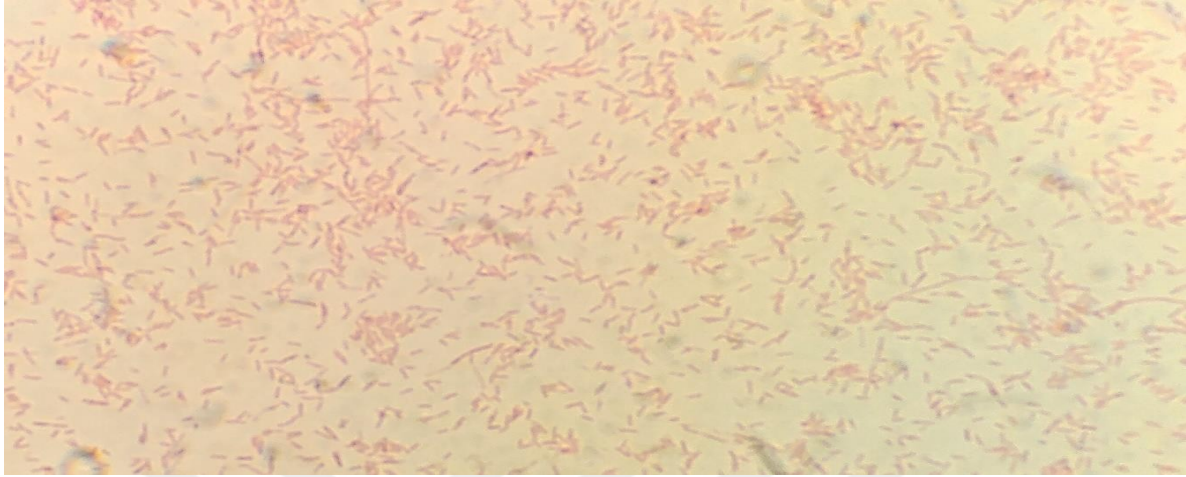
Amipler içerisinde yaşamını sürdürüp, çoğalabilen fakat genel olarak kullanılan *Legionella* besiyerlerinde canlılığını koruyamayan *Legionella*-benzeri bir takım bakteriler bulunmuş ve (*Legionella* benzeri amoebae patojeni-LLAP) adını almışlardır. LLAP’lerden *L. lytica*’nın insanlarda patojen bir etken olduğu bildirilmiştir ve 4 adet LLAP grubunun 4 farklı *Legionella* türü olduğu belirtilmiştir [11].

Lejyoner hastalığının %90’dan fazlasında rol alan en güçlü etken *L. pneumophila* bakterisidir [13]. Enfeksiyon sebebi olarak düşünüldüğünde büyük çoğunluğu *L. pneumophila* serogrup 1, serogrup 4 ve serogrup 6 etkenleri oluşturmaktadır [14]. Bunun dışında *Legionella*’nın *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffi*, *L. feeli* ve *L. longbeachae* türleri de *L. pneumophila*’ya benzer şekilde patojen olup, hastalık etkeni olmaktan sorumludurlar [15]. Birçok *Legionella* türünün beraber yer aldığı enfeksiyonlar da literatürlerde kayıt altına alınmıştır [16].

2.3. *Legionella* Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Legionellaceae ailesi içerisinde yer alan *Legionella* cinsi bakteriler 0,3-0,9 µm eninde ve 2-20 µm uzunluğunda olmakla beraber bu bakteriler aerop, sporsuz, kapsülsüz ve Gram negatif olan kokobasil şeklindedir (Resim 2.1). Özel besiyerlerinde izole edildikten sonra uzun

filamentöz formları izlenebilir [12]. Polar veya lateral flajelleriyle aktif hareket edebilen kokobasil yapıdaki bakterilerdir [17].



Resim 2.1. *Legionella* bakterisinin gram negatif görüntüsü

Mikroorganizmanın klinik numunelerde Gram boyama yöntemiyle boyanması zordur, Gram boyama yönteminde kullanılan bazik fuksin, safranine göre daha iyi bir oranda boyama gerçekleştirir. Gimenez boyası ile mikroorganizma Gram boyamaya eşdeğer bir sürede ve çok daha etkili bir şekilde boyanır. Dieterle ve Warthin-Starry gibi gümüş içerikli boyalar parafinli doku kesitlerinde *Legionella*'nın görülmesini kolaylaştırır [12]. *L. micdadei* dokularda zayıf bir halde aside dirençlidir ve modifiye Kinyoun tekniği ile etkin bir şekilde boyanır [11].

Legionella cinsi bakteriler klora oldukça dirençli olmakla beraber, aside karşı toleranslıdır. pH aralığının 2,7-8,3 değerlerine sahip olduğu habitatlardan bu bakteriler izole edilebilmektedir. 35 – 37°C sıcaklık aralıkları bu bakteriler için optimum sıcaklık değerleridir [18]. *Legionella* cinsi bakteriler 28-40°C aralığındaki sıcaklıklarda üreme özelliğine sahiptirler ancak sıcaklık değeri 20°C'nin altına düştüğü durumlarda üreme kabiliyetleri durur. Sıcaklığın 60 °C ve üzerine çıktığı ortamlarda ise inaktive olurlar [4]. Bu bakteriler için optimum pH değeri 6,9'dur. *L. pneumophila*'ların kısa süreli olarak aside maruz kaldıklarında, direnç gösterdikleri ve yaşamlarını sürdürdükleri de bilinmektedir. Söz konusu bu özellikleri *Legionella* bakterilerinin izolasyonun da önemli bir etkidir [19].

Legionella cinsi bakterilerin yağ asit yapıları incelendiğinde diğer Gram negatif bakterilerin yağ asit yapılarından farklı olarak hücrelerinde bol miktarda dallara ayrılmış yağ asiti

zincirleri ve sayıca daha az ester bağlarıyla tutunmuş hidroksiasitler vardır. Kompleks bir yapı oluşturan bu yağ asitleri, ekstrem sıcaklıklarda bakterinin yaşamsal döngülerini muhafaza etmektedirler [20].

Mikroorganizma besin ihtiyaçları bakımından oldukça seçicidir ve temel besiyerlerinden izole etmek mümkün değildir. Bu mikroorganizmayı üretebilmek için özel besiyerleri gerekmektedir. Bunun için besiyeri içeriğinde pH 6,9'da sabitlenmiş kömür ve maya özlü agar (BCYE; buffered charcoal yeast ekstrakt) bulunmalıdır. L-sistein, mikroorganizma kültürü için kesinlikle elzemdir. Keto asitler ve demir iyonları bir araya gelerek üremeyi aktif hale getirmektedir. Maya ekstreli pürin ve pirimidin türevleri aktif maddeler olup bunların içinde en önemlisi de guanindir. Aktif kömür, yağ asitlerini ve oksijen radikallerini içine hapsederek, bu maddelerin toksisitesini bertaraf ederek, sisteinin de oksidasyonuna mani olmaktadır. BCYE besiyeri içeriğine α -ketoglutarik asitin eklenmesi sonucu oksijen tutucu enzimlerin üretimini aktive ederek *Legionella*'nın çoğalmasını hızlandırmaktadır [12].

Genellikle *Legionella* türleri en iyi üreme sıcaklığı olan 35°C'de ve BCYE α besiyerinde plağa ekimi gerçekleştirildikten sonra 2-5 gün aralığında yeterli miktarda ürer. Bazı ender rastlanılan *Legionella* türlerinin plağa ekimi gerçekleştirildikten sonra üremesinin 10 güne kadar sürdüğü bilinmektedir [21]. Katı besiyerinde inoküle edilen bakterilerin üremesi nem oranının artırılmasıyla kolaylaştırılır. İnkübasyonun %2-5 CO₂'li koşullarda sağlanması, bazı *Legionella* türlerinin çoğalmasını hızlandırır da birçok tür için bu durum söz konusu değildir. BCYE besiyerinde ürediğinde *Legionella* bakterisi gri-beyaz veya mavi-yeşil, konveks, yapışkan, takribi 2-4 mm çapında koloniler oluşturur. Koloni mikroskobu aracılığıyla detaylı bir gözlem yapıldığında genç kolonilerin ortası buzlu cam görünümünde, parlak gri ve granülü bir yapıda olduğu izlenmektedir. Besiyeri plaklarının günlük olarak okunması önemlidir bunun sebebi ilk üreyen kolonilerin spesifik görünümünü kaybederek diğer bakterilerle karıştırılma riskinin bulunmasıdır [13]. *L. pneumophila* asakkarolitik, üreaz-negatif, nitrat-negatif ve jelatinaz-pozitiftir. Ailenin diğer fertleri de nonfermentatif, üreaz ve nitrat negatiftir. *L. pneumophila* hippuratu etkin bir halde hidroliz eder [12]. Klinik örneklerden elde edilen diğer *Legionella* türlerinin büyük bir kısmında sodyum hippurat hidroliz testinin sonucu negatiftir. Sodyum hippurat hidroliz testi, *L. pneumophila* ve diğer *Legionella* türlerinin aralarındaki ayırma etkili bir metottur [22]. *L. micdadei*, *L. maceachaernii* ve *L. feeleii* dışındaki birçok tür β -laktamaz üretmektedir [12].

L. pneumophila tirozin ihtiva eden besiyerinde melanin benzeri dağılabilen kahverengi pigment üretmektedir. Uzun-dalga UV ışığı ile seyredildiğinde ise floresan pozitiflik verdiği gözlemlenebilir. *Legionella*'nın bazı türlerinde ise UV ışık altında mavi-beyaz veya kırmızı otofloresan gözlenmektedir [12].

Birincil izolasyonda birçok türde tek, polar flajel ya da aşırı sayıda fimbria bulunmaktadır. İç sitoplazmik membran, peptidoglikan tabaka ve dış sitoplazmik membran bir arada bulunmasıyla meydana gelen hücre duvar yapısı diğer Gram-negatif basillerdekine benzer biçimdedir. Polisakkarit kapsüle sahip olabilirler. *L. pneumophila*, 24-29 kDa moleküler ağırlıkta bir dış membran proteini ihtiva etmektedir. Bu protein lipit membranlarla bağlantılı bir şekilde iyon-geçirgen kanallarını meydana getirmektedir. *L. pneumophila* serogrup 1'in lipopolisakkariti söz konusu bu proteine iyice bağlanmıştır. İndirekt immünfloresan metodu kullanılarak tespit edilen antikorlar primer olarak lipopolisakkarite karşı oluşmaktadır [12].

2.4. *Legionella* Epidemiyoloji

2.4.1. *Legionella* türlerinin ekolojisi

L. pneumophila sıklıkla doğal su ortamlarında ve toprakta bulunabilir. Mecburi hücre içi paraziti şeklinde yaşayan *Legionella*'nın su habitatında ve su sistemlerinde meydana gelen biyofilm tabakası içerisinde var olan protozoonlar ve alglerin vakuollerinde yaşamsal faaliyetlerini devam ettirerek çoğaldıkları ve bu hücreleri parçalayarak su içeriğine karıştırdıkları araştırmalar neticesinde aydınlatılmıştır [23].

Legionella cinsine ait bakteriler, biyofilm katmanı içinde yaşamsal faaliyetlerini devam ettirirken bulunduğu çevredeki diğer mikroorganizmalarla beraber etkileşim içindedirler. Bu karşılıklı etkileşim ilişkileri neticesinde *Legioenella* cinsi bakterilerin üremesi olumlu yönde gelişebilirken bazı mikroorganizmalarla olan etkileşimi ise *Legioenella* cinsi bakterilerin üremesinde olumsuz bir etkiye sebebiyet vermektedir. *Fischerella*, yeşil algler ve *Cyanobacteri*'ler *Legionella* cinsi bakterilerin üremesini pozitif bir şekilde etkilemektedir. Bunun dışında *Pseudomonas*, *Streptococcus* ve *Bacillus* türlerinin ise *Legionella* cinsi bakterilerin üremesini bloke ettikleri anlaşılmıştır [23].

Legionella cinsi bakterilerin üremesinde rol oynayan etkin unsurlardan biri su içeriğinde bulunan biyosit miktarıdır. Ayrıca bakterinin üremesini etkileyen önemli bir unsur da su

sıcaklığıdır. 20°C'nin altı ve 60°C'nin üstü sıcaklık değerlerinde söz konusu bakteri türünün yaşamsal faaliyetlerinin durma noktasına geldiği belirtilmiştir. Bunun dışında pH değerindeki değişiklikler, uv ışınları maruziyeti *L. pneumophila*'nın üremesini etkileyen farklı etmenlerdir [23].

Legionella cinsi bakterilerin kişilere bulaşı ise bu patojen bakterilerin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebildiği ve bulunma ihtimalinin fazla olduğu soğutma kulesi, duş başlığı, buz makinaları, nebulizörler, nemlendiriciler ve jakuzi gibi ortamlarda bulunan insanların bu bakterileri ihtiva eden aerosollerini solması sonucu solunum sistemlerine girişi ile gerçekleşmektedir [23].

Genel olarak patojen mikroorganizmalarda olduğu gibi *Legionella* bakterisinde, su sistemlerinde yoğun bir koloni oluşturma durumu vardır. Birçok *Legionella* türü su dağıtım sistemlerinde kolonize olmakla birlikte sadece birkaç spesifik tür ve tip suya maruz kalan kişilerde hastalık oluşturabilir. Legionellozisin bakterinin kesin rezervuarlarından eliminasyonu ve kontrolü yoluyla önlenabilir bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle binaların su sistemlerinden kaynaklanabilecek legionellozis riskini en aza indirmek için kontrol stratejileri ve rehberler geliştirilmiştir [21].

2.4.2. Enfeksiyon kaynağı

Doğal su habitatlarında suyun akışkan olduğu yerlerde *L. pneumophila*'nın koloni oluşturma ve çoğalma ihtimali oldukça düşük bir yüzdendir. Ancak insan yapımı yapay su sistemlerinin doğal su ortamlarına nazaran daha durağan bir yapıda olmasından kaynaklı *Legionella*'ların üremesi bu su sistemlerinde daha olasıdır [24]. Soğutma kuleleri ve merkezi klima sistemlerinin çalışma prensipleri gereği sistem içinde bulunan ve ısıyla buharlaşmaya başlayan su doğrudan ortamdaki havaya aktarılmaktadır. Soğutma kuleleri ve merkezi klimalardan aktarılan hava akımı aerosol yapıdadır. Enfeksiyon kaynağını barındıran bu aerosollerin, zayıf bir bağışıklık sistemine sahip kişilerde hastalığa sebebiyet verdiği kanaatine varılmaktadır [12].

Pontiac ateşi hastalığının, merkezi klima sistemleri, soğutma kuleleri, klimalar ve jakuziler gibi yapay su sistemlerinde yer alan patojen etkenin aerosolleşmesi ve bunun sonucunda havada asılı bulunan etken mikroorganizmaların solunum sistemine katılmasıyla

gerçekleşebildiği düşünülmektedir. Ayrıca soğutma kulelerini kapsayan bir çok araştırma sonucunda bu yapıların lejyoner hastalığı bakımından enfeksiyon kaynağı olabileceği anlaşılmıştır. İncelenen *Legionella* kaynaklı birden fazla vakada soğutma kulelerinin dezenfekte edilmesine karşın *Legionella* etkenlerinin devam ettiği görülmüştür. Bu çalışmalar sonucu enfeksiyon kaynağının sadece soğutma kulelerinde değil ayrıca su dağıtım sistemlerinde de bulunduğu anlaşılmıştır [12].

L. pneumophila'nın yapay su sistemlerinde varlığı bilindikten sonra söz konusu bu sistemler mikroorganizma bulaşında birincil kaynak olarak kabul görmüştür [21]. Gerçekleştirilen araştırmalar sonucu hastalık etkeni mikroorganizmayla kirlenmiş hastane su dağıtım sistemleri ile nozokomiyal enfeksiyon olguları arasında epidemiyolojik bir bağ olduğu anlaşılmıştır. Moleküler parmak izi “fingerprinting” metodu ile çeşme suyunda *L. pneumophila*'nın alt tiplmesi araştırılması yapılmış ve bu su kaynaklarının mikroorganizmalar için uygun yaşam koşullarını sağladığı anlaşılmıştır [12].

2.4.3. Bulaş yolları

Legionella'nın insanları enfekte etmesi aerosolizasyon, aspirasyon veya entübasyon esnasında doğrudan pulmoner sisteme girişiyle beraber gerçekleşmektedir [25]. İnsandan insana geçtiğini gösteren bir delil ortaya konulamamıştır [7]. *Legionella*'lar doğal su habitatlarında, bina su sistemlerinde, su bağlantılı havalandırma veya soğutma kulesi donanımlarında varlığını sürdürebilen mikroorganizmalardır. *Legionella* kaynaklı bulaşın gerçekleşebilmesi için bakterinin aerosol yoluyla solunum yoluna girerek akciğere ulaşması gerekmektedir. Akciğerde alveollarda etkenin bulaşması sonucu alveoler makrofaj enfeksiyonu oluşmaktadır. Lejyonella kaynaklı semptomların büyük bir bölümünde etken olan *L. pneumophila*, protozoa da hücre içi büyüme gerçekleştirdiğinden klora karşı direnç gösterebilmektedirler [26].

Aerosol oluşumu sonucu gelişen *Legionella* vakasına en iyi örnek 1968 yılında *Legionella* bakterisi ile kontamine olmuş klima sisteminden kaynaklı meydana gelen Pontiac ateşi salgını olayıdır. Bu salgın A.B.D'nin Michigan eyaletinin Pontiac şehrinde yaşandığı için Pontiac ateşi adını almıştır. *Legionella* ile kontamine olmuş merkezi klima sistemleri taşıdığı havayı ortama verdiğinden bu ortamda bulunan kobayların bu hastalık etkenini taşıdıkları

araştırmalar sonucu anlaşılmıştır. Bu kobaylardan alınan örnekler ile yapılan çalışmalar sonucunda salgın sebebinin *L. pneumophila* serogrup 1 olduğu bildirilmiştir [12].

Yapılan alışmalar sonucu, soğutma kuleleri ve klimalar aracılığıyla ortama verilen aeresollerin 1,6 km'den fazla hıza sahip oldukları bildirilmiştir. *Legionella* bulaşında önemli bir etken ise aeresol içeriğinde bulunan parçacıkların boyutudur. Söz konusu parçacıklar 1-5 µm boyutunda olmalıdır. Bu partiküller de etken 2 saat boyunca hayatta kalabilmektedir [27].

Hastanelerde bulunan ve *L. pneumophila* ile kontaminasyona uğramış, özellikle de solunum sistemi cihazları ve donanımlarının hastalarda kullanılması sonucu kişilerin lejyoner hastalığı riskini artırırken bu şekilde gerçekleşen lejyoner hastalığı çeşidine nozokomiyal lejyoner denmektedir [22].

Legionella bulaşının gerçekleşmesi için dört ana faktör gereklidir. Bu dört ana faktör kısaca şöyledir;

1. *Legionella*'nın ortamda varlığı,
2. Bakterinin çoğalması ve insana bulaşını sağlayan faktörlerin olması,
3. Bakteriyi duyarlı konağa taşıyan faktörlerin olması (suyun aerosolize olması ile solunum yolundan veya doğrudan aspirasyonu ile),
4. Lejyoner bakterilerinin respirasyon yolu ile hassas kişiye ulaşması,

Lejyoner bakterisinin pulmoner sisteme alınması, rahatsızlığın daima gelişeceğini göstermez. Kuvvetli bir immün sisteme sahip çocuklarda ve erişkinlerde enfeksiyon gerçekleşmeyebilir [28].

2.4.4. Prevalans

Lejyoner hastalığının prevalansı su kaynaklarının bu etken ile kontaminasyon yoğunluğuna, kişilerin etkene maruz kaldığı süreye ve kontamine su ile temas eden kişilerin immün sistemiyle ilişkili olarak değişkenlik göstermektedir. Ayrıca bu enfeksiyonun teşhisi, gelişmiş laboratuvarlarda yapılan özel testlerin enfeksiyon etkenini taşıyan hasta bireylerde çalışılmasıyla gerçekleşmektedir [12]. Bunun sonucunda gerçekleştirilen çalışmalar bu testlerin rutin uygulamaya alındıktan sonra daha evvel kuşku duyulmamış vakaların da gün

yüzüne çıktığını ispatlamıştır. Hastalık belirtilerinin tam olarak anlaşılması ve klinik semptomların diğer bakteriyel pnömonilerde görülen semptomlara oldukça yakın olması hastalığın teşhisinin ortaya çıkmasında karşılaşılan başlıca sorunlardandır. Lejyoner hastalığı günümüzde birden fazla ülkede görülmekle beraber, bu hastalık sonucu gelişen morbidite ve mortalite halk sağlığı istatistiklerinde yer almamıştır. Lejyoner hastalığı ve Pontiac ateşi insidansını sağlıklı bir şekilde ortaya çıkarmak için daha gelişmiş sürveyans programlarına gereksinim vardır [22].

Sağlık Bakanlığının 2016 yılında yayınladığı “Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı Rehberi”, lejyoner hastalığının (LH) kaynağını iki grupta sınıflandırmaktadır. Bunlar:

1. Hastane kaynaklı LH
2. Toplum kaynaklı LH
 - a. Seyahat ilişkili LH
 - b. Diğer yaşam alanlarından kaynaklanan LH

Söz konusu rehber diğer yandan lejyoner hastalığı ile alakalı il sağlık müdürlüğünün sorumlu birimleri aracılığıyla geniş çaplı bir sürveyans planının ortaya konmasını da tavsiye etmektedir. Bu sürveyans iki başlık altında toplanmıştır: Olgu sürveyansı ve çevresel sürveyans. Olgu sürveyansı; olgu tanısı, bildirim ve başka olguların varlığını bulmaya çalışırken, çevresel sürveyans ise lejyoner hastalığının sebebi olan su kaynaklarını tespit ederek ortaya çıkarmak amacı taşımaktadır [29].

L. pneumophila, gelişmiş ülkelerde toplum kaynaklı solunum rahatsızlıklarını meydana getiren ikinci en yaygın faktördür [30]. Yerleşmiş akciğer rahatsızlıkları, kronik kalp hastalığı, yaşlılık, zayıf bağışıklık sistemi ve sigara kullanımı en önemli risk etmenleridir [31]. Yüksek miktarda alkol içiciliği, böbreğe bağlı rahatsızlığı olanlar, hematolojik malignensiler, şeker hastalığı ve cinsiyetin erkek olması da kimi araştırmalarda risk etkeni olarak ele alınmıştır. Hastane kaynaklı lejyoner hastalığının bulaşının gerçekleşmesinde organ nakli sırasında uygulanan cerrahi işlemler etkeninin, konağa geçişine zemin hazırlayan bir basamaktır [12].

Nozokomiyal pediatrik vakaları; yenidoğanlar, zayıf bağışıklık sistemi bulunanlar ve akciğer rahatsızlığına sahip çocukların oluşturduğu gözlemlenmiştir. *Legionella*

enfeksiyonu AIDS'li kişilerde çoğalan bir biçimde gözlemlenmekle beraber bu kişiler ilerleyici enfeksiyonlara, akciğer harici semptomlara, bakteriyemi oluşumuna ve akciğer abselerine karşı daha savunmasız kalmaktadırlar [12].

Bilinen pnömoni vakalarının %1-5'inden azının *Legionella* spp. nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Lejyoner etkeninden kaynaklı epidemilerde, hastalığa yatkın bireylerin sayıca fazla bulunduğu gruplarda atak ihtimali %30'a kadar çıkmaktadır [22]. Hastanede izlenen vakalarda gerçekleştirilen etiyoloji çalışmalarında ise lejyoner hastalığıyla ilişkili toplum kaynaklı pnömoni yüzdesi %2-15 aralığında ortaya çıkmaktadır. CDC bir yıllık periyotlarla ABD'de 10 000-20 000 arasında değişen lejyoner hastalığına bağlı gelişen vaka olasılıklarını hesaplamaya çalışmaktadır [32]. Genel bir popülasyonda Pontiac ateşinin insidansı bilinmemektedir [22].

2.5. Patogenez

Legionella türleri sanılanın aksine doğada serbest bir halde bulunmazlar. Serbest yaşayan kimi amipler içerisinde, silialı protozoalarda ve biyofilm katmanları içerisinde yaşamsal faaliyetlerini sürdürüp, üreyebilmektedirler. Amip kistlerinin korunaklı bir yapı oluşturması ve biyofilm tabakasının besin açısından zengin olması üremeyi kolaylaştıran faktörlerdir. Bu sebeple *Legionella*'lar çevresel etkenlere ve biyositlere karşı dirençli bir şekilde yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilirler [33]. *Legionella*'ya ait türler buldukları yüzeylerde balçık üretmezler. Su depoları, soğutma kuleleri gibi bina su sistemlerinde diğer bakterilerin oluşturduğu biyofilm tabakasının içinde ürerler. Hastanelerde kullanılan özellikle de solunuma yardımcı cihazların bu etken ile kontamine olmuş sularla temizlenmesi ve dezenfeksiyon yapılmamasından kaynaklı hastaya bulaşı söz konusu olabilir [34].

L. pneumophila "Makrofaj inflamatuvar protein" (mip) adıyla tanımlanmış bir dış zar proteini ihtiva etmektedir. Bu dış zar proteini 24 kDa'luk bir ağırlığa sahiptir. Bu dış zar proteini etkenin enfekte olması bakımından önemlidir. Mip'in *L. pneumophila*'ya has bir protein olduğu bilinmektedir. Bununla beraber geriye kalan *Legionella* türlerinin de mip'e yakın 24-30 kDa'luk proteinleri bulunmaktadır [35]. Fosfolipaz C, asit fosfataz, protein kinazlar ve süperoksit dismutaz benzeri enzimler *L. pneumophila*'nın enfekte olduğu konakta üremesine yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu bakterilerle beraber bulunan proteazlar ise akciğer lezyonlarına yol açmaktadır [36]. Etken alveollere eriştiğinde enfeksiyonun gelişimini,

bakterinin virulansı ve konağın bağışıklık sistemi belirler. Konak savunmasında görevli birincil unsur alveolar makrofajlardır [12]. Pulmonere girişi normal koşullarda inhalasyonla olan mikroorganizmalar, alveolar makrofaj fagositozu sonucu parçalanmaktadırlar ancak patojen *Legionella* suşları Mip proteini aracılığıyla fagozom-lizozom engelini inaktifleştirerek makrofaj içinde yaşamını devam ettirirler. Çoğalan bakteriler nihayetinde makrofajı infilâğa uğratarak mononükleer ve polimorfnükleer fagositlerde döngüyü tekrar gerçekleştirmek suretiyle ortama dağılırlar [7, 12].

Nötrofil lökositlerin *Legionella* enfeksiyonu gerçekleşirken savunma mekanizması içindeki görevi tam belli değildir. Nötrofil sayısı düşüklüğünün lejyoner hastalığıyla arasında doğrudan bir bağlantı gözlemlenmemiştir [12]. Yapılan hücre dışı araştırmalar, edinsel bağışıklığın konak savunmasında ikincil olarak görev aldığını göstermektedir. Bu etkene maruziyet sonucu gelişen antikolar *L. pneumophila*'nın kompleman sistemle yok edilmesine sebebiyet vermez, sadece fagositlerce sindirilmesi bakımından yardımcı bir unsurdur. Fakat monositler ve alveolar makrofajlar içinde etkenin yaşamsal faaliyetleri devam etmektedir [12].

2.6. Klinik Belirtiler ve Bulgular

İnsanlarda *Legionella*'nın neden olduğu hastalıklar, pnömoni semptomlarının olduğu ve bununla beraber ateşin eşlik ettiği lejyoner hastalığı, pnömoninin ortaya çıkmadığı ateşli bir hastalık olan Pontiac ateşi ve herhangi bir semptom göstermeyen subklinik enfeksiyonlar halindedir. Subklinik enfeksiyonlarda pnömoni gözlenmez ve bu vakaların teşhisi *Legionella* türlerine karşı gelişen antikoların tespitiyle mümkün olmaktadır [37].

Legionella'nın neden olduğu hastalıklar 3 gruba ayrılmaktadır; birinci sırada toplumda en yüksek insidansa sahip olan sporadik olgular, ikincisi uzun sürmeyen ve düşük atak hızı ile ayırt edilen epidemik salgınlar ve üçüncüsü zayıf bağışıklık sistemine sahip kişilerde görülen hastane kaynaklı salgınlardır [31]. Enfeksiyonun en ağır şekli olan lejyoner hastalığı, pnömoni ile gerçekleşir. Bu hastalığın konağa girişi ile hastalığının meydana gelmesi arasındaki süre 2 ile 10 gün arasında değişmektedir. Hastalık yüksek ateş, bitkinlik, miyalji, iştahsızlık ve şiddetli olmayan öksürükle ilerlemektedir [25]. İlk başta kuru öksürüğün seyri hastalığın şiddeti artıkça irin içeren balgamlı bir duruma evrilir [4, 7]. Çıkarılan balgamda az miktarda kan bulunabilir fakat seyrek de olsa yoğun kanın bulunduğu vakalarda

bildirilmektedir. Bazı hastalarda ise göğüs ağrılarının olduğu bilinmektedir [2, 4]. Genellikle ateş 40°C ve üzerine çıkmaktadır [4, 16]. Bu hastalığa yakalanan kişilerde görülen ölüm oranı %5-80 dir. Bu oran kişiden kişiye farklılık gösteren yaş, zayıf bağışıklık sistemi, kronikleşmiş akciğer rahatsızlıkları gibi etkenlere göre değişebilir [4].

Hastalıkta baş ağrısı, patolojik ağır uyku, zihinsel hal değişimleri ve beyin hasarları da gözlenebilmektedir. Nörolojik bulgulardan bilinç bulanıklığı, kollaps, periferik nöropati ve serebellar ataksilerde kayıt edilmiştir. *L. pneumophila*'nın neden olduğu ve merkezi sinir sistemini etkileyen karakteristik bir vakanın varlığı bilinmektedir. Bu vakada hastada baş ağrısı, bellek yitimi, titreme ve yönü tayin edememek gibi semptomlar izlenmiş ve çekilen beyin MR'ında nasırlı cisimde ekstrem yoğunlukta kısımlar saptanmış ve çalışılan diğer testlerle de serebellum ve frontal loblarda normal görünümünden farklı bölgeler gözlemlenmiştir. Nadir görülse de hastada sistemik yangısal yanıt ve çoklu organ yetmezliği ortaya çıkabilmektedir. Radyolojik incelemeler sonucu akciğer hasarlarının da ortaya çıkabileceği anlaşılmıştır [4].

Lejyoner hastalığına bağlı gelişen ölüm oranları hastanın sağlık ve bağışıklık durumu, tanı ve tedavinin suresi, hastalığın hastane kökenli, salgın veya sporadik olup olmamasına göre değişebilmektedir. Son yıllarda kayıt altına alınan legionellosis insidansında küresel bazda yükseliş rapor edilmiştir. 2011'de Avrupa'da 4897, ABD'de 4202 vaka rapor edilmiştir ve bunun dışında raporu tutulmayan vakaların hafife alınmayacak bir sayıda olduğu tahmin edilmektedir. Bundan dolayı insidans değerinin kayıt altına alınandan daha fazla olduğu düşünülmektedir [38].

Pontiac ateşi, pnömonin gerçekleşmediği bir hastalık olmakla beraber soğuk algınlığına benzer bir şekilde seyreder. Antibiyotik müdahalesine ihtiyaç kalmadan 2 ila 5 gün arasında kendiliğinden iyileşme gerçekleşir [39]. Kuluçka için gerekli zaman 24–48 saat arasındadır. *Legionella* enfeksiyonları arasında en çok rastlanan hastalık olmakla beraber görülme sıklığı

%90–95 oranındadır. Bu hastalığın belirtileri arasında sıklıkla karşılaşılanlar; bitkinlik, kas ağrıları, ateş, üşüme, titreme ve baş ağrısı şeklindedir [23]. Pontiac ateşi üriner antijen testi aracılığıyla kolay bir şekilde saptanabilmektedir [16].

Akciğer dışı hastalıklar çoğunlukla pnömoniyi müteakip meydana gelmektedir. Pnömoninin gelişmediği vakalarda seyrek de olsa kayıt altına alınmıştır [40]. Sıklıkla akciğer dışı bulgular yetişkinlerde kalpte, çocuklarda ise karaciğer, beyin, dalak ve lenf nodüllerinde karşımıza çıkmaktadır [4]. Akciğer dışı enfeksiyonların ana sebebi kan yoluyla hastalık etkeninin yayılımıdır [7, 41]. Peritonit, sinuzit, piyelonefrit, pankreatit, lenfadenopati, prostetik kapak endokarditi, miyokardit, perikardit olguları *L. pneumophila* enfeksiyonları kaynaklı ekstrapulmoner semptomlardır. Seyrek olmakla beraber *Legionella* ile kirlenen sulara temas sonrasında oluşan yara ve yanık enfeksiyonları da rapor edilmiştir [4].

2.7. Laboratuvar Tanısı

Lejyoner hastalığı, akciğerde hafif semptomlar şeklinde görülebildiği gibi bütün organları olumsuz yönde etkileyebilen, ağır koma ve hasta ölümüne kadar yol açabilecek seviyelere ulaşabilen bir hastalıktır. Temel patolojik vakalar akciğerlerde meydana gelmekte ve hastalığın ilerleyişini immün sistem elemanları tayin etmektedir. Diğer pnömoni olgularındaki semptomlarla benzerlik gösterdiğinden ayırt edilebilmesi için özel tanı testleri ve yöntemleri gerekmektedir [42].

Laboratuvarda uygulanan *Legionella* tanısından en çok tercih edilen yöntemler arasında selektif besiyerlerinde kültür yöntemi, üriner antijen testi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), indirekt flouresan antikör testi (IFA), ELISA, direk immunoflouresan test (DFA), katı faz radioimmunoassay (SPRIA), DNA hibridizasyonu ve mikroaglutinasyon testleri bulunmaktadır [4]. *Legionella* tanısında kültür yöntemi çok önemli bir uygulamadır ve altın standarttır; fakat laboratuvar personelinin tecrübesi, etkenin çalışılma yoğunluğu, özel besiyerlerini temin etme maliyeti ve örneğin uygunluğu gibi faktörler izolasyon sonucunu doğrudan etkileyen güçlüklerdir ve her laboratuvarın yapısı bu yöntem açısından elverişli olmayabilir.

2.7.1. Su numunelerinde *Legionella* bakteri izolasyonu için kültür yöntemi

Laboratuvarda su numunelerinde *Legionella* izolasyonunda tercih edilen yöntemin ilk hedeflerinden biri çevre mikrobiotayı baskılamak olmalıdır. Bu sebeple, su numunesinin alındığı bölgenin şartları göz önünde tutularak, su kültür işleminin yapılacağı plaklara “direkt” ve/veya “asitle işlem sonrası” ve/veya “filtre edildikten ve asitle işlem yapıldıktan

sonra” ekilir. Sağlıklı sonuçlar elde etmek için her bir numunenin, biri inhibitör içermeyen buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar tercih edilmek üzere en az iki besiyeri plağına ekimi gerçekleştirilmelidir. İnhibitör madde barındırmayan BCYE, şayet su numunesi baskılayıcı özellik gösteren bir biyotaya sahip değilse *Legionella* türlerinin üremesi (özellikle zor üreyen türler) bakımından uygun koşulları oluşturur. Fakat genellikle su numuneleri birçok mikrobiota barındırdığından, her bir su numunesi için inhibitör (glisin, antimikrobiyal vb.) içeren BCYE bazlı bir besiyeri tercih edilmelidir. Soğutma kulesinden alınan su numuneleri dış ortamlarla sürekli ilişkili olduklarından dolayı yoğun bir şekilde fungal içerikli etkenleri içerisinde barındırmaktadır. Bundan dolayı mantar üretimini bloke edebilen özelliği olan sikloheksimid içeren besiyerleri tercih edilmelidir [43].

Legionella'nın plakta üreyip çoğalması için besiyeri pH'ı da önemli bir faktördür. En ideal pH $6,9\pm 0,05$ olarak kabul görmüştür. *Legionella* izolasyonun yapılacağı numunenin cinsine göre besiyeri tercihi farklı olmalıdır. Glisin çevre kaynaklı numunelerde kontaminant bakterilerin blokajı açısından zorunluysen, klinik numuneler de maya mantarlarının varlığı dikkate alınarak kontaminant maya mantarlarının üremesini durduran bir özelliği olan anisomycinli besiyerleri tercih edilir [43].

Legionella ekimi gerçekleştirildikten sonra plaklarda üreme 2-7 gün sonra başlamaktadır. Genellikle plaklar üçüncü günden sonra okunur. Öncelikli olarak plaklar mikroskop altında incelenir. *Legionella* türleri 1-3 mm çapında, yüzeyleri düzgün, hafif bombeli, merkezleri gri-beyaz ve kenarları yeşil, mavi, mor veya pembe buzlu cam benzeri karakteristik bir görünümde dirler. Bir su numunesi değişik serogrupları yahut farklı *Legionella* türlerini de barındırabilir ve bunlar kültürün yapıldığı plakta koloni görünümündeki değişiklikler ile (örn. büyük ve küçük koloniler gibi) fark edilebilirler. Ayrıca kimi *Legionella* türleri de (*L. anisa*, *L. gormanii*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*) UV ışık altında mavi-beyaz floresan pozitifliği verirler. Çoğunlukla üremesi uzun süren ve kısmen daha küçük (toplu iğne tepesi kadar) kolonilerin 362 nm UV ışık altında da tanımlanması tavsiye edilmektedir [43].

Su ve sürüntü numunelerinin BCYE α ve seçici besiyerine ekiminden sonra nemli bir etüvde 35°C sıcaklıkta 10 gün boyunca inkübe edilir. İnkübasyon için %2-5 CO₂'li ortam sağlayabilen bir etüv seçilmelidir. Bakteriler 24 saatin ardından günlük rutin bir şekilde incelenmeye alınmalıdır [43]. Koloni mikroskopunda yapılan gözlemde şüpheli koloniler incelemeye alınır. Şüpheli kolonilerin BCYE ve kanlı agara ekimi gerçekleştirilir ve 48 saat

inkübasyon sonrası incelemeye alınır. Pasajlarda, *Legionella* ailesinin sistein ihtiva eden BCYE besiyerinde çoğaldığı, kanlı agarda çoğalmadığı görülür. Fakat kimi *Legionella* türlerinin birincil izolasyonda sisteine ihtiyacı varken, ardından kanlı agarda üremeye adapte olabildiği de tespit edilmiştir [13]. *L. pneumophila* harici kimi türler mavimsi-beyaz veya parlak kırmızı otofloresan özellik gösterebilirler [13].

2.7.2. Su numunelerinde *Legionella* bakteri izolasyonu için real-time PCR yöntemi

Nükleik asit tespiti, klinik numunelerde *Legionella*'nın ileri incelenmesinde genellikle tercih edilen metotlar arasında yer alır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, ilk olarak 1985 senesinde Kary Mullis ve arkadaşlarınca geliştirilmiştir. "Thermus aquaticus" bakterisinden izole edilen ısıya dayanıklı Taq polimerazın kullanımı ile birlikte enzimin her döngüde eklenme ihtiyacı kalmayarak PCR için otomatik termal döngü cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. PCR, hücre içinde DNA'nın kendini eşlemesi prensibine göre çalışmaktadır. DNA'nın çoğaltılması için PCR tepkimesinde olması gereken bileşenler; hedef DNA, aranan türe özgü primerler, Taq DNA polimeraz enzimi, deoksिनükleotid trifosfatlar (dNTP), Mg⁺² tamponu ve DNA barındırmayan sudur. Bu metot, çift zincirli DNA'nın yüksek sıcaklıklarda ayrılarak tek sarmal haline gelmesi, primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya bağlanması, Mg⁺² iyonlarının varlığında katalizör olan Taq DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenmesi ve DNA zincirinin uzaması işlem döngülerinin bir çok tekrarından oluşmaktadır [44].

Real-time PCR moleküler alanlarda tercih edilen önemli yöntemlerdendir. PCR aracılığıyla DNA ya da cDNA (komplementer DNA)'dan hedeflenen gen bölgeleri milyonlarca kez kopyalanabilir ya da çoğaltılabilir. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için; çoğaltılmak istenen bölgeye göre tasarlanmış ileri (F) ve geri (R) primerler, termotabil DNA polimeraz enzimi ve termal döngü cihazı gereklidir. PCR'de her siklusta tekrar eden 3 ana basamak vardır. Reaksiyonlar çoğunlukla 30-40 döngü aralığında gerçekleştirilir.

1. Denatürasyon basamağında yüksek sıcaklıkta gerçekleşir. Çift sarmallı yapıda olan DNA "erir" ve tek iplik bir form alır. Bu aşama genellikle DNA polimerazın dayanabileceği en uç sıcaklık olan 95°C'de gerçekleştirilir.
2. Bağlanma basamağında birbirini tamamlayan sekanslar hibridize olma şansı yakalarlar. Bu aşamanın primerlerin erime sıcaklığına uygun olarak seçilmesi gerekmektedir.

Uzama basamğında ise 70-72°C'de DNA polimerazın aktivitesi gerçekleşir ve primer uzaması 100 baz/saniye hızında meydana gelir. Real-time PCR'da genellikle çoğalacak olan ampikon kısa olduğundan bu basamak çoğunlukla 60°C'deki bağlanma aşaması ile birleştirilir [45].

Seçilen primerlere özgün PCR sonucu sadece *L. pneumophila* veya *Legionella* türlerinin bazıları tespit edilebilmektedir [10]. Real-Time PCR metodunda 16S rRNA genleri, 23S-5S spacer bölge, 5S rDNA veya macrophage inhibitor potentiator (mip) gen gibi özel bölgeler amaçlanmıştır [46-48]. Real-time PCR metodu, PCR çalışması sırasında ortaya çıkan nükleik asit elemanlarının çift zincirli DNA arasına katılan floresan bir boya veya floresan ile işaretli prob lar aracılığıyla PCR çalışmasının anlık takip edilebilmesini sağlayan bir uygulamadır. Real-time PCR yöntemi sonucunda ortaya çıkan ürün miktarı tepkime süresince ortaya çıkan ürün miktarı ile orantılı bir şekilde artan floresan boyanın verdiği sinyalin bilgisayarda izlenmesiyle sonuç alınmaktadır [49].

Real- time PCR metodunun çalışma ilkesi Taq DNA polimerazın 5'– 3' eksonükleaz etkinliğine dayanmaktadır. Çifte işaretli bir prob olan Taqman prob ise Taq DNA polimeraz ile hidrolize uğrayarak ışımaya veren, artırılmak istenen DNA bölgesine göre dizayn edilmiş sentetik yapıda bir oligonükleotittir. Taqman probun 5' uç kısmında bir bildirici özellikli (reporter) boya, 3' uç kısmındaysa söndürücü nitelikli bir (quencher) boya yer almaktadır. PCR anında enzim aracılığı ile bildirici ve söndürücü uçlar arasında yer alan prob koparak ayrılmakta ve baskılama artık söz konusu olmamaktadır. Bunun sonucunda ışımaya oluşmaktadır. Amplifikasyon tekrarları çoğaldıkça bildirici boya daha fazla ortaya çıkar ve bunun sonucunda ışımaya doğrusal olarak artar. Bu şekilde artmış floresanın takibi bilgisayar sayesinde monitörden anlık olarak sağlanabilir [44].

Solunum salgılarından elde edilen numunelerin ihtiva ettiği inhibitörler, yalancı negatiflik sonucu hatalı sonuçlar verebildiğinden doğru sonuçları elde etmek amacıyla numunelere ayrıca kültür yöntemi de uygulanmalıdır [50]. Hatta yalancı pozitif sonuçlar da kayıt altına alınmalıdır [17, 51].

2.8. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Tür Tanısı ve Sero-gruplandırılması

Legionella cinsine ait mikroorganizmaların tür bazında tanımlanmasında, biyokimyasal, morfolojik ve enzimatik içerikli testler yararlı olmakla beraber yeterli gelmemektedir. Pasaj sonucu çoğalan şüpheli kolonileri doğrulamak ve tür teşhisini yapmak amacıyla DFA veya lateks aglütinasyon çalışmaları uygulanmaktadır [52].

2.8.1. Lateks aglütinasyon yöntemi

Legionella hücre duvarının geliştirdiği antijenlere karşı, tavşandan sağlanan spesifik antikörlerle benzer serogruptan olan *Legionella* türlerinin, rengi mavi olan lateks partiküller aracılığıyla aglütinasyonu temeline göre çalışmaktadır. Lateks aglütinasyon test kitleri bu hedef doğrultusunda genellikle tercih edilen bir yöntemdir [27]. Kitin duyarlılığı kullanım kılavuzunda %99, özgüllüğü ise %100 olarak belirtilmiştir. Kültür ve biyokimyasal deneylerin sonuçları *Legionella* cinsi olduğunu göstermesine rağmen, *Legionella* lateks aglütinasyonu ile negatif sonuç veren suşlar, kesinlikle *Legionella* spp. negatiftir düşüncesine varılamaz. Bu kit içeriğinde bulunmayan diğer *Legionella* spp. türlerinden biri olma ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır [53].

2.8.2. Direkt floresan antikor yöntemi (DFA)

DFA testleri CDC'den Cherry ve arkadaşları (1978) tarafından daha ileri bir seviye taşınmıştır [22]. Alt solunum yolu numunelerinde yoğunlukla gözlemlenen *Legionella* türlerinin teşhisi DFA yöntemi ile türe ve serogruba özgün dış membran proteinlerine karşı geliştirilen monoklonal tavşan antikörleri, floresan izotiyosiyanat (FITC) ile konjuge bir şekilde kullanılır. Tekniğin 2-4 saat gibi kısa bir zaman dilimi aralığında neticelendirilmesi oldukça önemlidir [11].

2.9. Tedavi

Legionella bakterisinin hücre içi çoğalma kabiliyetlerinden dolayı tedavi sürecinde tercih edilen antibiyotikler, hücre içinde yüksek konsantrasyona ulaşabilmelidir [16]. *Legionella* enfekte olduğu olgularda tedavi amacıyla kullanılan antibiyotik genellikle eritromisindir. Ancak hastalığın ağır seyrettiği vakalarda eritromisinle beraber rifampisin de kullanımı uygundur. Penisilin grubuna dâhil olan antibiyotikler *Legionella* türlerinin bu antibiyotiğe

gösterdiği direnç sebebiyle tedavide tercih edilmezler. Bununla beraber eritromisin, gastrointestinal ve aşırı miktar alınımının da ototoksisite gibi yan etkileri nedeniyle hekimler tarafından tercih edilmemektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen tedavi uygulamalarında azitromisin ile klaritromisin gibi geniş antibakteriyel etki spektrumlu makrolidler ve siprofiloksasin, perfloksasin gibi kinolonlar ön plana çıkmaktadır. Makrolidler, kinolonlar, rifampin, trimetoprim-sulfametoksazol ve tetrasiklinlerin, *in vivo* ortamlarda, *Legionella* türlerinin tedavisinde kullanılmasıyla başarı sağlanmıştır. Antibiyotik kullanımı sonrası, 2-5 gün içinde hastada hafif bir iyileşme görülmektedir. Tamamen iyileşme 10-14 günü bulabilir. Zayıf bağışıklık sistemine sahip hastalarda bu süre 21 güne çıkmaktadır. Lejyoner hastalığında doğru bir şekilde tedaviye başlayamamak bazı risk grupları için mortalite yüzdesini artıran bir unsurdur [27].

2.10. Nozokomiyal Salgınlar, Koruma ve Kontrol

Hastaneler immün sistemin baskılandığı kişilerin mevcut popülasyona nazaran daha sık bulunduğu yaşam alanlarıdır ve lejyoner hastalığı açısından önemli bir risk unsurudur. Hastalık bu ortamlarda daha ağır geçmekle beraber ölüme kadar götürebilmektedir bunlar haricinde hastanın iyileşmesinin uzaması ve artan harcamalar sebebiyle ek yükler yaratması olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Bu olumsuzlukları ortadan kaldırmak için hastanelerde etkin kontrol programlarının uygulanması elzem bir hal almıştır. Hastane kaynaklı lejyoner hastalığı kontrol programının iki genel unsuru su sistemi yönetimi ve aktif olgu sürveyansıdır [43].

Sağlık kuruluşlarında lejyoner hastalığı etkeninin bulaşını minimum düzeye getirebilmek amacıyla ABD hastalık kontrol ve koruma merkezi (CDC); su sistemlerinin bakımı, nozokomiyal pnömonili olguların incelenmesi ve bulaşın gerçekleştiği hallerde uygulanan işlemleri belirlemiştir [17]. CDC tarafından hazırlanan raporun sonucuna göre; hastane kaynaklı lejyoner hastalığından korunma ve kontrol amacıyla alınacak önlemler birincil ve ikincil önlemler olarak ikiye grupta yer almaktadır. *Birincil önlemler*; personel için yeterli eğitimlerin verilmesi bunun dışında enfekte faktör ve çevre sürveyansı ile tıbbi cihazların kullanımı ile alakalıdır. Uzmanların lejyoner hastalığı kuşkusıyla gelen vakalarda, uygun teşhis metotlarını seçebilmesi amacıyla eğitilmesi, *Legionella* etkenine karşı tedbir alınması ve bu etkenin kontrol altına alınması konusunda yardımcı personelin eğitimi, transplantasyon birimlerinde *Legionella* açısından su örneklerinin rutin kültürünün

yapılması, riskli hastaların bulunmadığı diğer ünitelerde rutin su kültürünün yapılmaması gibi tavsiyeler yer almaktadır. Ayrıca solunum cihazı ve ekipmanlarının temizlenmesinde steril su kullanımı tercih edilmeli ve nebulizatörlerin havuzlarında yalnızca steril suyun kullanılması tavsiye edilmektedir. Büyük hacimli hava nemlendirici cihazların tercih edilmemesi veya günlük temizliğinin yapılması yahut güçlü bir dezenfeksiyon işleminin uygulanması çok önemlidir. Bilhassa immün sistemi zayıf bireyler, sigara içiciliği, 50 yaş üstü erkek bireyler gibi çeşitli risk unsurlarını taşıyan hastaların yer aldığı ünitelerin kullanım suyu sıcaklıkları $\geq 51^{\circ}\text{C}$ ya da $\leq 20^{\circ}\text{C}$ olması ciddi bir noktadır. Kullanım suyu sıcaklığı $\geq 51^{\circ}\text{C}$ değerlere sahipse yanmayı engellemek maksatlı termostatik karıştırıcı valflerin kullanılması gereklidir. Suyun dezenfeksiyonunda klor dioksit, ağır metal iyonları, ozon ve UV aracılığıyla dezenfeksiyon tavsiye edilmemektedir. Hastanelerde gerçekleştirilen *Legionella*'nın kontrolü amacıyla uygulanan dezenfeksiyon işleminde monokloramin ihtiva eden suyun kullanımı uygun görülmüştür. Organ naklinin gerçekleştiği birimlerde kullanılan su numunelerinde *Legionella* teşhis edildiğinde su kaynağının dekontamine edilmesi, zayıf bağışıklık sistemine sahip kişilerin duş almasının engellenmesi, dış fırçalama, içme suyu vb. için sterilize edilmiş suyun kullanılması tavsiye edilmektedir. *İkincil önlemler*, sağlık kurumunun *Legionella* kaynaklı bir vakaya hızlı ve doğru bir şekilde tanı koyması ve tanı konulduktan sonra tedavinin hızlı bir biçimde uygulanmasını içerir. *Legionella* spp.'nin kaynağının ortaya çıkarılması amacıyla epidemiyolojik ve çevresel incelemeler gerçekleştirilmeli ve kaynak ortaya çıkarıldığında dekontamine işlemi yapılmalıdır [54].

2.11. Kontamine Bina Su Sistemlerinin Dekontaminasyon Yöntemleri

Termal yöntem

Bu uygulamada, etkenin hangi sıcaklık aralıklarında yaşamsal faaliyetlerini sürdürebildiği çok iyi bilinmeli ve buna bağlı olarak bu yöntem uygulanmalıdır. *Legionella* ailesinin büyük bir kısmı 60°C sıcaklığa yarım saate yakın dayanabilmekte ve sonrasında yaşamları sona ermektedir. Bu 60°C sıcaklığa sahip suyun bütün çıkışlardan birkaç dakika akıtılması gereklidir. Bu yöntem sık tercih edilen yöntemler arasında yer almaktadır. Sıcak su tank sıcaklığı 70°C 'ye yükseltilerek tüm su boruları musluklar ve duş başlıkları en az 30 dakika sıcak suya maruz bırakılmalıdır [23]. Bu yöntem sürekli tekrarlanmazsa şayet *Legionella* birkaç haftaya kalmadan yeniden sistem içerisinde çoğalacaktır. Bu yöntem uzun sürmekle beraber su ısıtıcılarının kapasitesiyle sınırlıdır. Bu yöntemin olumsuz yanlarından biri yanık

riskidir. Bunun dışında sıcak su sıcaklığının yükselmesi, iki sistem arasındaki ısı transferinden kaynaklı olarak soğuk su sistemini, olduğundan daha sıcak bir hale getirebilir. Bu ısı transferi sonucu soğuk su sisteminde *Legionella* açısından daha elverişli bir ortam oluşabilir. Bunun sonucunda hastalığın bulaşı daha yüksek bir oranda gözlemlenebilir[11].

Ultraviyole ışınları

Kısa dalga boylu UV ışınları, timin dimerleri aracılığıyla hücresel DNA hasarına neden olarak *Legionella* üzerinde öldürücü bir etkiye sahiptir. Bu yöntem bölgesel dezenfeksiyonda tercih edilmektedir. Ultraviyole ışınları maruziyeti sonucunda geriye kalıntı kalmadığından tekrardan kolonileşmenin oluşmaması için, merkezden uzak bölgelerin süper ısıtma ve akıtma yöntemiyle dezenfekte edilmesi gereklidir. Kalıntı bırakmaması sebebiyle çevre dostu bir yöntemdir. Yöntemin bu özelliği atık su dezenfeksiyonunda bu yöntemi daha çok tercih edilebilir kılmaktadır. Yöntemin daha güçlü bir dezenfeksiyon yapması için gümüş-bakır iyonizasyonu ve klorlama ile beraber tercih edilmesinde fayda vardır. Ultraviyole ışık ünitelerinde tortu yığılmasını önlemek amacıyla ön filtrasyon işlemi gerekli bir unsurdur [12, 55, 56].

Klorlama

İçme suyu amacıyla tüketilen suyun bulunduğu şebeke suyu sistemlerinde düzenli bir şekilde gerçekleştirilen serbest klorlama (<0,5 mg/L) biyofilm tabakası içeriğinde yaşamını sürdüren, *Legionella* ve *Legionella* benzeri formlarda biyosidal etki meydana getirememektedir. *Legionella* bakterileri, *E. coli* ve diğer koliform bakterilere nazaran klorla karşı daha fazla bir direnç göstermektedirler. Standart seviyedeki klor, biyofilm katmanına, periferik bölgelere ve su sistemindeki suyun durağan olduğu alanlara etki edemez. Klor dozunun yükseltilmesi okside etkiyi artıracığından su sistemindeki tüm alanlara etki ederek *Legionella*'nın üremesini engeller. CDC'nin tavsiye ettiği serbest klor konsantrasyon değeri minimum 1 mg/L olmalıdır. Bununla beraber serbest klorun pH'ın yüksek olduğu değerlerde etkisinin azaldığı belirtilmiştir. Yoğun klor konsantrasyonunun olumsuz yanlarından biri 4-5 yıl klorlama yapılmış su sistemlerinde korozyon meydana getirmesidir. Serbest klor aracılığıyla dezenfeksiyon işleminin su sistemlerinde kanserojen madde biriktirmesi araştırmacılar tarafından dikkate alınan bir unsurdur [55,57].

Bakır-gümüş iyonizasyonu

Bina su tesisatlarında *Legionella* etkenine karşı koruma yöntemlerinin en kullanışlısı gümüş ve bakır iyonizasyon yöntemidir. Bakır ve gümüş iyonizasyon yöntemi insan sağlığı üzerinde olumsuz bir etki bırakmadan *Legionella* türü bakterileri ortamdan temizlemektedir [58]. Pozitif yüklü bakır (Cu^{+2}) ve gümüş (Ag^{+}) iyonları, mikroorganizmanın hücre çeperi üzerindeki negatif yüklü bölgeler ile birleşerek hücre çeperinin geçirgenliğini değiştirerek, hücre yapısını bozmaktadır. Bununla beraber protein denatürasyonuna da neden olarak hücrenin liziz olayı sonucu parçalanmasına sebebiyet vermektedir [23]. Ultraviyole ışık ve klorla bir arada uygulanabilir. Fakat meşakkatli ve pahalı bir yöntem olması eksi yönleridir [12].

Monokloramin

Bu yöntem, şebeke suyu dezenfeksiyonunda 1916 yılı itibariyle uygulanan bir yoldur. Monokloramin, amonyak ve serbest klorun suda belli oranlarda ($\text{Cl}_2/\text{NH}_3=3-5$) karıştırılması ile ortaya çıkarılmıştır. Biyofilm yapısına serbest klor dezenfeksiyon yönteminden daha çok etki etmektedir. 4 ppm (parts per million) değerindeki monokloraminin *Legionella* varlığını yok ettiği incelemeler sonucu bildirilmiştir. Monokloramin ile gerçekleştirilen dezenfeksiyon, serbest klor ile gerçekleştirilen dezenfeksiyona nazaran daha yavaş olmasına karşın su dağıtım sisteminde ileri derecede uç noktalara bile nüfuz edebilmektedir. Bunun yanı sıra, tüketilen suyun tadı ve kokusu geri kalan yöntemlerdeki kadar rahatsızlık verici değildir. Bir olumlu özelliği ise korozyon meydana getirmemesidir [57].

Birlikte kullanılan yöntemler

Bir arada uygulandıklarında ortaya çıkan dezenfeksiyon etkisi, ayrı ayrı uygulandıklarında ortaya çıkan etkiden daha fazla olan yöntemlerdir. Bunlar; Klor ve kloramin, Klordioksit ve kloramin, Ozon ve klor, Ozon ve kloramin, UV ve klor ve UV ve kloramindir [23].



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler

Bu çalışmada 2017 Mayıs – 2019 Şubat tarihleri arasında Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı'na gelen farklı su sistemlerinin ayrı su çıkış noktalarından alınan 64 su numunesinden *Legionella* cinsi bakterilerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu su numuneleri rastgele seçim yöntemine göre tercih edilmişlerdir. *Legionella* cinsi bakterilerinin izolasyonunda kültür yöntemi ve real-time PCR yöntemi kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Buffered charcoal yeast extract (BCYE) besiyeri

Legionella bakterilerinin geliştirilmesinde Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) besiyeri kullanılmıştır. Agarın pH değeri 6,9'a ayarlanmıştır. Bu pH değeri bakteri gelişimi için en ideal değerdir [59].

BCYE besiyerinin içeriği

| | |
|--------------------------------------|----------------|
| Yeast Ekstrakt (Difco) | 10,0 g |
| Bacto Agar (Difco)..... | 17,0 g |
| Kömür (Merck) | 2,0 g |
| ACES (Sigma) | 10,0 g |
| alfa-Ketoglutarik asit (Sigma) | 1,0g |
| KOH (Sigma, Merck)..... | 2,4g |
| Distile su | 985 mL |
| L(+) Sistein | (0,4 g) 4 mL |
| Demir (III) pirofosfat | (0,25 g) 10 Ml |

Hassas terazi kullanılarak tartılmışlardır.

DGVP besiyeri

BCYE besiyerine vankomisin, glisin, siklohekzimid, polimiksin B eklenerek hazırlanmıştır [13].

DGVP besiyerinin içeriği

| | |
|--------------------------------------|------------------|
| Yeast Ekstrakt (Difco) | 10,0 g |
| Bacto Agar (Difco) | 17,0 g |
| Kömür (Merck) | 1,5 g |
| ACES (Sigma) | 10,0 g |
| alfa-Ketoglutarik asit (Sigma) | 1,0 g |
| KOH (Sigma, Merck)..... | 2,4 g |
| Glisin (Sigma, Merck) | 3,0g |
| Distile su | 975 mL |
| L(+) Sistein | (1,0 g) 10 mL |
| Demir(III) pirofosfat | (0,25 g) 10 mL |
| Brom krezol moru | (10,0 mg) 1 mL |
| Bromtimol mavisi | (10,0 mg) 1 mL |
| Vankomiksin HCl | (1,0 mg) 1 mL |
| Polimiksin B | (50,000 µL) 1 mL |

Kanlı agar

Bu besiyeri *Legionella* mikroorganizmalarının ihtiyacı olan temel amino asitleri sağlayan L-sisteini ihtiva etmez. Bundan dolayı bu agarda *Legionella* ailesi üreyip gelişemez, bu nedenle şüpheli kolonilerin ayırımında önemli bir besiyeridir. [27]. Kanlı ağarın pH'sı 6,8 değerinde olmalıdır.

Kanlı ağarın içeriği

| | |
|--------------------------|--------|
| 'Lab-Lemco' Powder | 10 g/L |
| Pepton | 10 g/L |
| Sodyum klorit | 5 g/L |
| Agar | 15 g/L |

Defibrin kan 50 mL
 Distile su 1000 mL

3.1.3. Test kitleri

Lateks aglütinasyon test kitinin içeriği

- *L. pneumophila* serogrup 1 deney ayırıcı, mavi lateks partikülleri içeren özgül tavşan antikor.
- *L. pneumophila* serogrup 2-14 deney ayırıcı, mavi lateks partikülleri içeren özgül tavşan antikor.
- *L. pneumophila*'nın dışında kalan diğer *Legionella* spp. için deney ayırıcı, mavi lateks partikülleri içeren özgül tavşan antikor.
- Pozitif kontrol süspansiyonu, içeriğinde *Legionella* hücrelerinin tamponlanmış polivalan süspansiyonu yer almaktadır. Deney ayıraçları uygulandığında pozitif sonuç beklenmektedir.
- Negatif kontrol süspansiyonu, içeriğinde *Legionella spiritensis* hücrelerinin fizyolojik tuzlu sudaki süspansiyonu yer almaktadır. Deney ayıraçları uygulandığında negatif sonuç beklenmektedir.
- Kontrol lateks, reaktif olmayan tavşan globulinleri ile duyarlılaştırılmış mavi lateks partikülleri içeriğinde yer almaktadır. Bu kontrolün amacı yalancı pozitifliğin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmektedir. Deney ayıraçları ile pozitif sonuç vermiş suşlar bu süspansiyon ile negatif sonuç vermesi beklenmektedir [11].

Su numunelerinden canlı bakteriyel DNA izolasyon kiti

- HPLC ölçekli su
- DCEB (Ölü hücre eliminasyon tamponu; DNaz-I içerikli solüsyon)
- Triton™ X-100 içeren Tris-EDTA tamponu (TET)
- Lizozim enzimi (LZ)
- 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 (TC1)
- Proteinaz-K enzimi (Pr-K)
- Moleküler ölçekli su (MGW)
- Guanidinyum Tiosiyanat, 0,05 M Tris-Cl pH 8,0 (GIT)

- İzopropil alkol (IP)
- 1,5 M Guanid Tiosiyanat, 0,025 M Tris-Cl, %50 2-Propanol (GITIP)
- Yıkama tamponu; 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, %80 v/v Etanol (WB)
- Elüsyon tamponu; 1X TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) (EB)

Su örneklerinde *Legionella* spp., *L. pneumophila* ve *L. pneumophila* serogrup-1 Tespit Kiti

- 2X qPCR Mix; 2X qPCR enzim ve tampon karışımı
- *Legionella* spp.-Oligo Mix; *Legionella* spp. hedefli oligonükleotitler (primer&prob) (FAM)
- *L. pneumophila*-Oligo Mix; *L. pneumophila* hedefli oligonükleotitler (FAM)
- *L. pneumophila* SG1-Oligo Mix; *L. pneumophila* serogroup-1 hedefli oligonükleotitler (FAM)
- Negatif kontrol; Moleküler ölçekli su

3.2. Metot

3.2.1. Kültür yöntemi

Su numunelerinin ekilmesi

Çalışmada laboratuvarımıza gönderilmiş olan su numunelerinin alındığı yerler ve sayısal dağılımları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Su deposu, musluk başlığı, su tankı ve duş başlığı gibi su çıkış noktalarından alınan su numuneleri öncelikle homojenize edilmek amacıyla vortekslenmiş daha sonra direkt ekim ve filtrasyon sonrası asit işlemi uygulanmıştır. Soğutma kulesi ve su kulesi benzeri su çıkış noktalarından alınan su numunelerine ise direkt ekim ve doğrudan asit ile muamele edilerek ekim yapılmıştır. Filtrasyon işleminde kullanılan membran filtre (Sartorius stedim) sellüloz-asetat yapısında; 0,2 µm por çapında ve 47-50 mm çapındadır. Direkt ekimi yapılacak su numunelerinden 0,1’er mL alınmış olup BCYE ve DGVP besiyerlerine ekimi gerçekleştirilmiştir [60].

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan su numunelerinin alındığı yere göre sayısal dağılımı

| Su numunelerinin alındığı yerler | Su numunelerini alındığı yere göre sayısal dağılımı |
|----------------------------------|---|
| Su deposu | 4 |
| Musluk başlığı | 14 |
| Su tankı | 1 |
| Duş başlığı | 25 |
| Soğutma kulesi | 18 |
| Su kulesi | 2 |
| Toplam | 64 |

Filtre sonrası asit ile muamele edilecek su numuneleri sırasıyla 50 mL su numunesi filtrasyon cihazında (Sartorius stedim) yer alan filtreden süzdürülmüştür. Ardından filtre kâğıtları 5 mL su içeren tüplere konulmuştur. Filtre üzerindeki mikroorganizmaların suya geçişi için 30 saniye boyunca tüpler vortekslenmiştir. Daha sonra asitle muamele işlemi için filtreyi içeren tüplerin su içeriğinden 2 mL miktarında su alınmış ve içerisinde 2 mL HCL- KCL (pH 2,2) bulunduran tüplere eklenmiştir. Tüpler vortekslenmiş ve 3 dakika bekletilmiştir. 3 dakikanın ardından asit-su karışımını bulunduran tüpler tekrar vortekslenmiştir. Bu tüplerden alınan 0,1'er mL su numuneleri BCYE ve DGVP besiyerlerine ekilmiştir [60].

Doğrudan asit ile muamele edilecek olan su numunelerinden sırasıyla 2 mL su numunesi alınarak içerisinde 2 mL HCL-KCL (pH 2,2) bulunan tüplere aktarılmıştır. Daha sonra tüpler vortekslenmiş ve 3 dakika bekletilmiştir. Ardından bu tüplerden alınan 0,1'er mL su numuneleri BCYE ve DGVP besiyerlerine ekilmiştir. Tüm örnekler 37°C aerob şartlarda inkübe edilmiştir. Nem sağlaması için etüv içine bir kap ve kabın içine de düzenli olarak su eklenmiştir [60].

Bakterilerin sayımı

Üremenin olduğu plaklar koloni mikroskobu (Olympus) ile incelenmiştir. Mikroskopta yeşil buzlu cam görüntüsüne sahip yahut yuvarlak gri koloniler *Legionella* açısından şüpheli koloniler olarak inceleme altına alınmıştır.

Daha sonra BCYE ve DGVP besiyerlerinde üremiş şüpheli kolonilerin BCYE ve %5 kanlı agara ekimi gerçekleştirilmiştir. 24-48 saat süren inkübasyon sonrası incelenmeye alınmıştır. Kanlı agarda üremenin olmadığı ancak BCYE besiyerinde üremenin görüldüğü plaklarda yer alan koloniler, çeşitli kaynaklardan alınan örneklerin *Legionella* spp. tür ve serogruplarının tanımlanmasında kullanılan bir test olan *Legionella* Lateks Aglutinasyon Testine (Oxoid, DR0800, İngiltere) alınmıştır. Bu test sonucu bulunan *Legionella* bakterilerinin plak üzerinde sayımı gerçekleştirilir. Sayılan koloni sayı Çizelge 3.2’de yer alan değerlere göre hesaplanmıştır [11].

Çizelge 3.2. Koloni sayımının ekim yöntemine göre hesaplanması

| | Direkt Ekim | Filtre İşlemi + Asit | Asitle Muamele |
|--|---------------------|----------------------|---------------------|
| 1 mL suda <i>Legionella</i> sayısı (koloni/mL) | Sayılan Koloni x 10 | Sayılan Koloni x 2 | Sayılan Koloni x 20 |

Lateks aglutinasyon kiti çalışma yapılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiş, ardından plaklarda yer alan şüpheli koloniler lateks kartlarda yer alan yuvarlak kısım içine sürülmüştür. Daha sonra süspansiyon tamponu ile reajenlerden 1’er damla lateks kartlar içerisinde yer alan yuvarlak kısmın içine damlatılmış ve bir öze yardımıyla yuvarlak kısım içinde karıştırılmıştır. Yaklaşık olarak 5 dakika boyunca lateks kartlar el yardımıyla çevrilmiştir. Ardından lateks kartlarda gözlenen çökme durumlarına göre sonuç verilmiştir. Bu reajenlere Lateks aglutinasyon kiti (Oxoid) ile yapılan çalışmalarda şüpheli koloniler *L. pneumophila* serogrup 1, *L. pneumophila* serogrup 2-14 ve *L. pneumophila* spp. açısından ileri identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Real-time PCR yöntemi

Su numunelerinden DNA ekstraksiyonu

Su numunelerinden DNA ekstraksiyonu yaparken diğer bakteriyel DNA ekstraksiyonlarından farklı olarak membran filtrasyon yöntemi de DNA ekstraksiyonun işlemi içerisinde yer almaktadır. DNA ekstraksiyonu işleminde uygulanan basamaklar şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Su numunelerinden 100 mL alınarak, numune 25 mm çap ve 0,4 µm gözenek hacmine sahip polikarbonat yapıları membran filtreden (Sartorius stedim) süzölmüştür.
- DNaz-I içerikli ölü hücre eliminasyon tamponundan 1000 µL alınmış ve tüm filtre yüzey alanına nüfuz etmesi bakımından yakın mesafeden filtre üzerine bırakılmıştır.
- 7 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Ardından membran filtreden 20 mL HPLC ölçekli su süzdürölmüştür.
- Membran filtre, steril bir pens yardımı aracılığıyla alınarak 2 mL hacimli boş bir mikrosantrifüj tüpünün içine konulmuştur. Bundan sonraki işlemler biyogüvenlik kabini (Metisafe) içerisinde gerçekleştirilmiştir.
- Tüp içerisinde yer alan filtre üzerine, 580 µL Triton™ X-100 içeren Tris-EDTA tamponu ve 20 µL lizozim solüsyonu eklenmiş ve vorteks aracılığıyla 2 dakika süresince karıştırılıp kısa süreli santrifüj uygulanmıştır.
- 37°C'de 15 dakika ısıtıcı blok içerisinde bekletilmiştir.
- Örnek tüpüne 25 µL Proteinaz K (öncesinde çözülmüş) eklenmiştir.
- Örnek tüpü 10 saniye vortekslenerek karıştırılmıştır. Ardından örnek tüpü 60°C'de 15 dakika boyunca ısıtıcı blok içerisinde bekletilmiştir.
- Isıtıcı bloktan alınan tüplere 600 µL Guanidinyum Tiosiyanat - 0,05 M Tris-Cl pH 8,0 (GIT) eklenmiştir.
- Vorteks aracılığıyla 2 dakika boyunca karıştırılmış ve kısa süreli santrifüj uygulanmıştır.
- 95°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Tüp içeriği vorteks ile hafifçe karıştırıldıktan sonra 14 000 g'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır.
- Süpernatant (tüm sıvı) yeni ve temiz bir mikrosantrifüj tüpe aktarılmış, dipte kalanlar tüple birlikte atılmıştır.
- Yeni tüpteki süpernatanta 600 µL izopropil alkol (IP) eklenmiş ve numune pipetaj uygulanarak iyice karıştırılmıştır.
- Boş bir toplama tüpüne spin kolon yerleştirilmiş ve numunenin yaklaşık 600 µL'si bu DNA kolonuna aktarılmıştır.
- 14 000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpünde biriken filtrat atılmıştır.
- Numunenin geri kalanı tükenene kadar bu işleme devam edilerek numunenin tümü kolondan geçirilmiştir.

- Ön yıkama işleminde kullanılmak üzere kolona 500 µL 1,5 M Guanidinyum Tiosiyanat, 0,025 M Tris-Cl, %50 2-Propanol eklenmiştir. 14 000 g'de 1 dakika santrifüj uygulanmış, filtreden süzölmüş olan kısım atılmıştır.
- Yıkama işlemini için kolona 500 µL yıkama tamponu eklenmiştir. Ardından 14 000 g'de 1 dakika santrifüj işlemin uygulanmıştır.
- Filtre edilmiş kısım atılmış ve DNA kolonuna 500 µL daha yıkama tamponu eklenerek tekrar 14 000 g'de 1 dakika santrifüj uygulanmıştır.
- Toplama tüpünde filtreden süzölmüş kısım atılmıştır.
- Kolon yüzeyindeki alkolü uzaklaştırmak amacıyla, DNA bağlanmış kolon boş halde temiz bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 14 000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kurutulmuş kolon, 1,5 mL'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpü üzerine yerleştirilmiştir. 100 µL elüsyon tamponu, DNA kolonuna konulmuştur.
- Elüsyon sıvısının tüm kolon yüzeyine yayılması için yaklaşık 1-2 dakika beklenmiştir.
- 14 000 g'de 1 dakika santrifüj işlemin uygulanmıştır. Elde edilen DNA'lar – 20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

DNA amplifikasyonu

Real-time PCR miksin hazırlanışı ve DNA amplifikasyonu kit içeriğinde yer alan üretici firmanın belirlediği yönetme göre yapılmıştır. Çalışmaya başlanmadan hemen önce kit bileşenleri ve ekstraktlar -20 °C'den oda ısısına getirilmiştir. Kite hazır olarak verilen 2X qPCR (enzim ve tampon içermektedir). Temiz oda içerisinde PCR striplerine sırayla 2X qPCR miks ve her bir etkenin oligo miksi (primer ve prob içermektedir) eklenmiştir. 2X qPCR miksinden 5 µL stripe eklendikten sonra bunun üzerine 2 µL oligo mikslere (FAM işaretli prob içermektedir) sırasıyla eklenmiştir. PCR striplerine kirli oda içerisinde 2 mL DNA ve 2 mL pozitif kontrol eklendikten sonra stripler kapakları ile kapatılmış ve Real-time PCR cihazına yüklenmiştir. Bilgisayar aracılığıyla ve Real-time için özel geliştirilmiş yazılım ile çalışılacak olan PCR protokolü seçilmiştir. Bu çalışmada bio-eksen'e ait "Su Örneklerinde ve Klinik Numunelerde Canlı *Legionella* spp., *Legionella pneumophila* ve *L. pneumophila* serogrup-1 Tespit Kiti" kullanım kılavuzunda yer alan PCR protokolü uygulanmıştır. (Çizelge 3.3). Bu protokol Herpers ve ark. (2003)'ün çalışmalarında kullandığı protokolün modifiye edilmiş halidir [45].

Çizelge 3.3. Uygulanan real-time PCR protokolü

| | | | |
|-----------------------|--------------------|------------------|-------|
| Ön İnkübasyon-1 döngü | Çoğalma – 45 döngü | | |
| | Denatürasyon | Bağlama ve Uzama | |
| 95 °C – 5 dakika | 95°C – 15 saniye | 65°C – 40 saniye | Okuma |

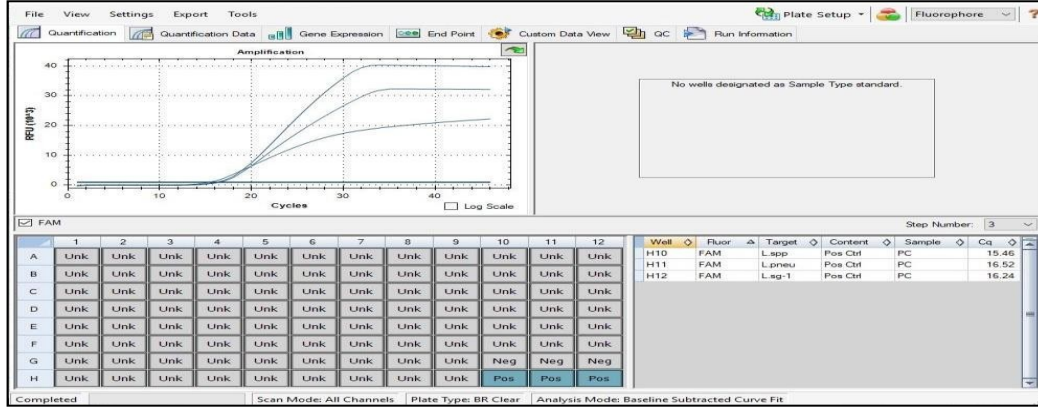
Real-time PCR sonuçlarının yorumlanması

Çalışma sonucu her bir numunenin oluşturduğu grafiğe ve miktar döngüsü (quantification cycle-cq) değerlerine bakarak çalışılan numunelere *Legionella* bakımından pozitif yahut negatif sonuç verilmiştir. Real-time PCR çalışması gerçekleştirilen bilgisayar ve real-time sistemi Resim 3.1’de verilmiştir.

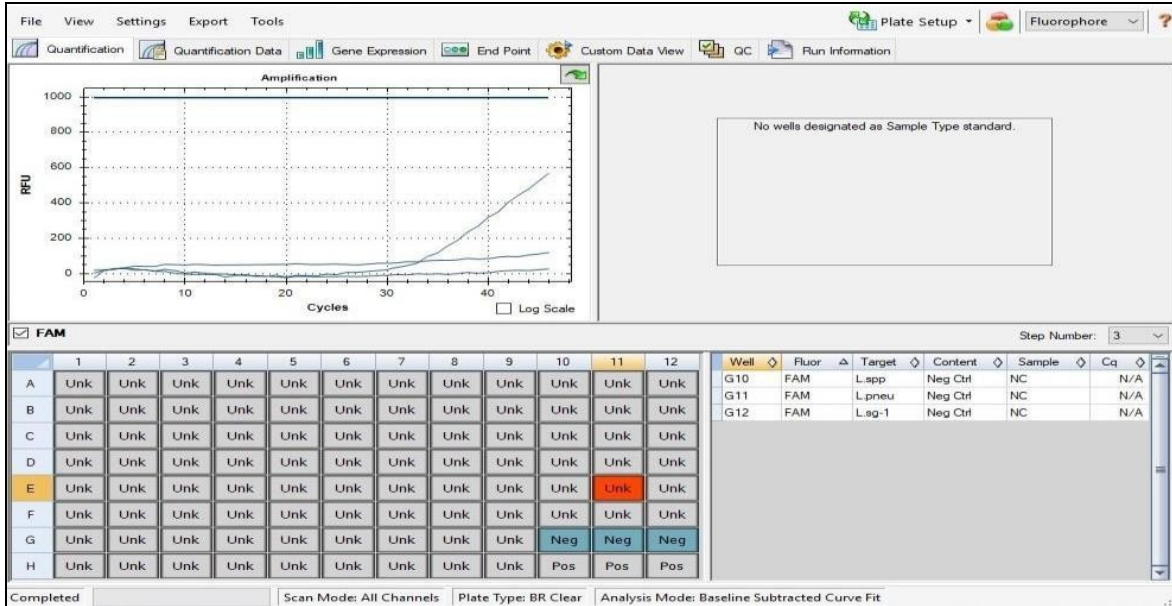


Resim 3.1. Real-time PCR cihazı (Biorad CFX 96 Real-time system) ve bilgisayar

Numune *Legionella* bakımından pozitif ise bilgisayar ekranında görülen grafiğin parabol şeklinde olması ve geçerli bir cq değerine sahip olması gerekmektedir. Şekil 3.1’de pozitif kontrol görüntüsü yer almaktadır. *Legionella* bakımından negatiflik söz konusu olduğunda ise parabol eğrisinin oluşmaması, doğrusal ya da doğrusala yakın bir şeklin gözlemlenmesi gerekmekte ve geçerli bir cq değeri elde edilememektedir. Şekil 3.2’de ise negatif kontrol görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 3.1. Real-time PCR çalışmasında pozitif kontrol görüntüsü



Şekil 3.2. Real-time PCR çalışmasında negatif kontrol görüntüsü

3.3. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizde IBM SPSS Statistics 22 kullanılmıştır. Su numunelerinde *Leigonella* varlığının tespitinde kullanılan kültür ve real-time yöntemleri arasında farklılığın anlamlı olup olmadığını belirlemek amacıyla student t-Testi ($p=0,05$) kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

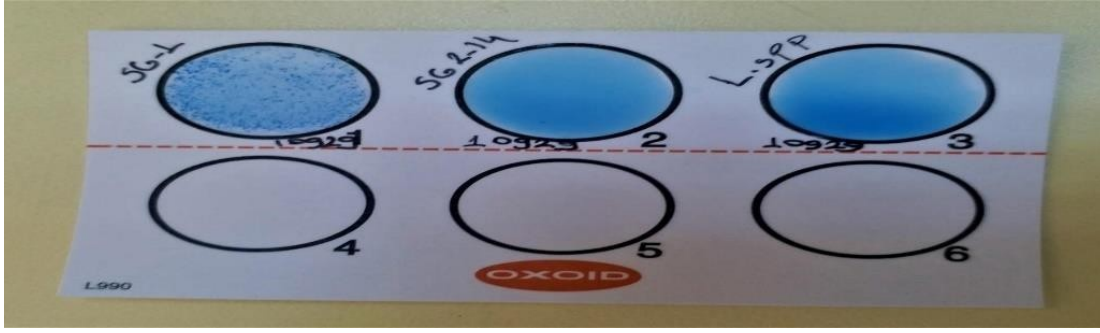
4.1. İzolasyon

Bu tez çalışmasında su tankları (soğuk ve sıcak), air-conditioning sistem soğutma kulesi, musluk ve duşlar gibi farklı alanlardan seçilen ve inceleme altına alınan 64 farklı su numunesi öncelikle BCYE ve DGVP besiyerlerine ekilmiştir. Üremenin olduğu plaklar koloni mikroskopu (Olympus) ile incelenmiştir. Mikroskopta yeşil buzlu cam görüntüsüne sahip yahut yuvarlak gri koloniler *Legionella* açısından şüpheli koloniler olarak değerlendirilmiştir. Şüpheli koloni görüntüsü Resim 4.1’de verilmiştir.



Resim 4.1. *Legionella* cinsi bakterilerin BCYE besiyerindeki görüntüsü

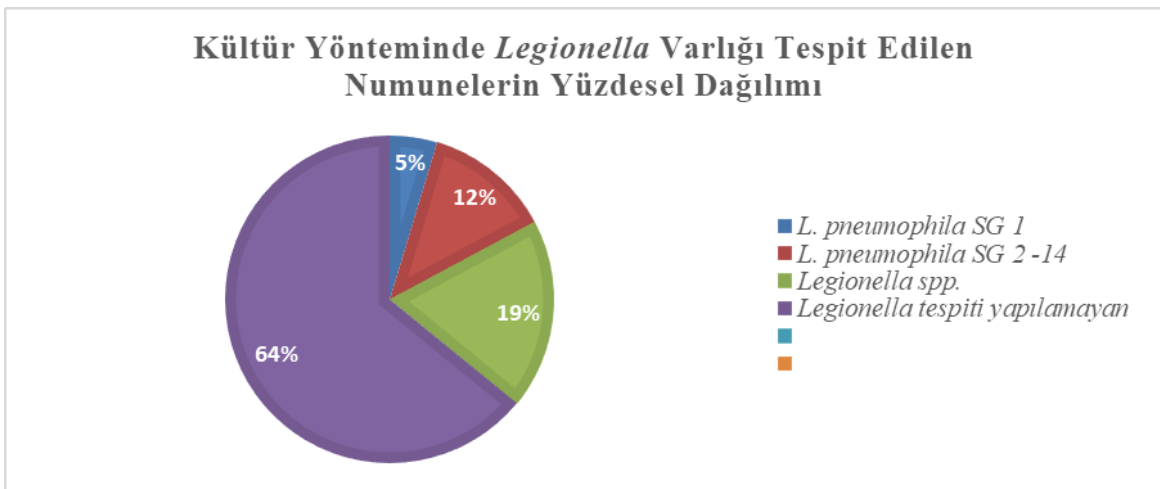
Daha sonra üreyen şüpheli koloniler BCYE ve %5 kanlı agara ekilmiştir. 24-48 saat sonra kanlı agarda üremenin olmadığı ancak BCYE besiyerinde üremenin görüldüğü plaklarda (kültür yöntemi) yer alan koloniler ileri tanımlamaları lateks aglütinasyon kiti (Oxoid) ile sağlanmıştır. Lateks aglütinasyon kiti (Oxoid) çalışma görüntüsü Resim 4.2’de gösterilmiştir.



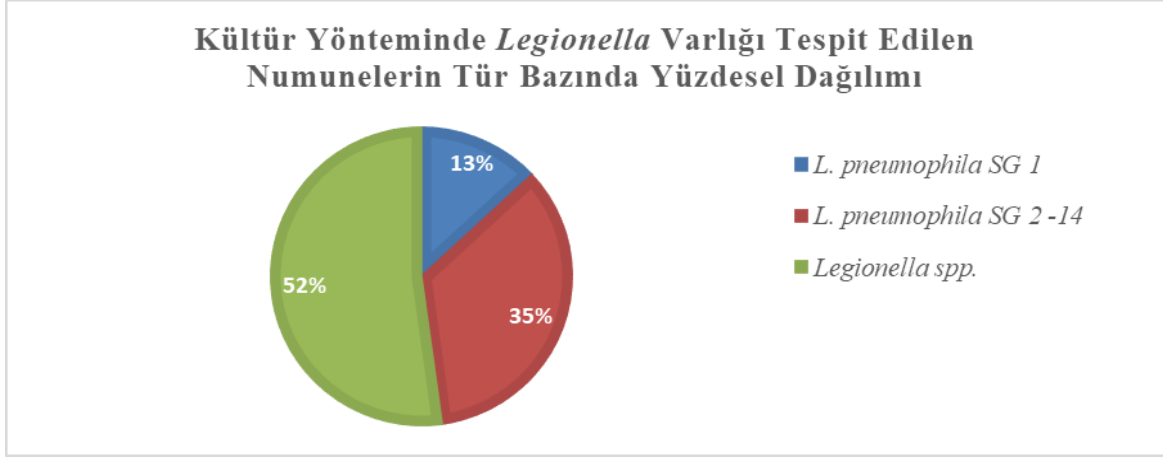
Resim 4.2. Lateks aglütinasyon kitinde *L. pneumophila* SG1 aglütinasyonu

4.2. Tanımlama

64 adet su numunesine uygulanan kültür yöntemi sonucunda 23 adet su numunesinde *Legionella* varlığına rastlanırken, 41 tanesinde *Legionella* bakterisine rastlanılmamıştır. 23 adet su numunesinden lateks aglütinasyon kiti ile yapılan tanımlamada 3 numunede *L. pneumophila* serogrup 1 (SG1), 8 numunede *L. pneumophila* serogrup 2 (SG 2-14), 12 numunede *Legionella* spp. tespit edilmiştir. Kültür yönteminde *Legionella* varlığı tespit edilen numunelerin yüzdesel dağılımı Şekil 4.1’de verilmiştir. Kültür yönteminde *Legionella* varlığı tespit edilen numunelerin tür bazında yüzdesel dağılımı ise Şekil 4.2’de verilmiştir. Kültür yöntemine göre; 13 nolu numunede (Açık devre musluk başlığı) besiyerinde geliştirildiğinde en fazla bakteri yoğunluğu (2176 koloni/mL) belirlenirken 41 numunede *Legionella* bakterisi belirlenememiştir.

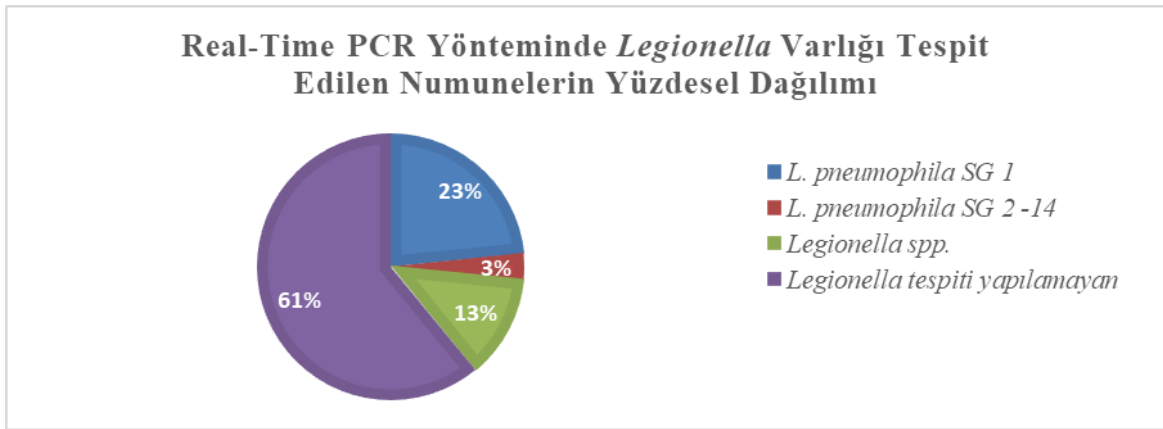


Şekil 4.1. Kültürde *Legionella* varlığı tespit edilen numunelerin yüzdesel dağılımı

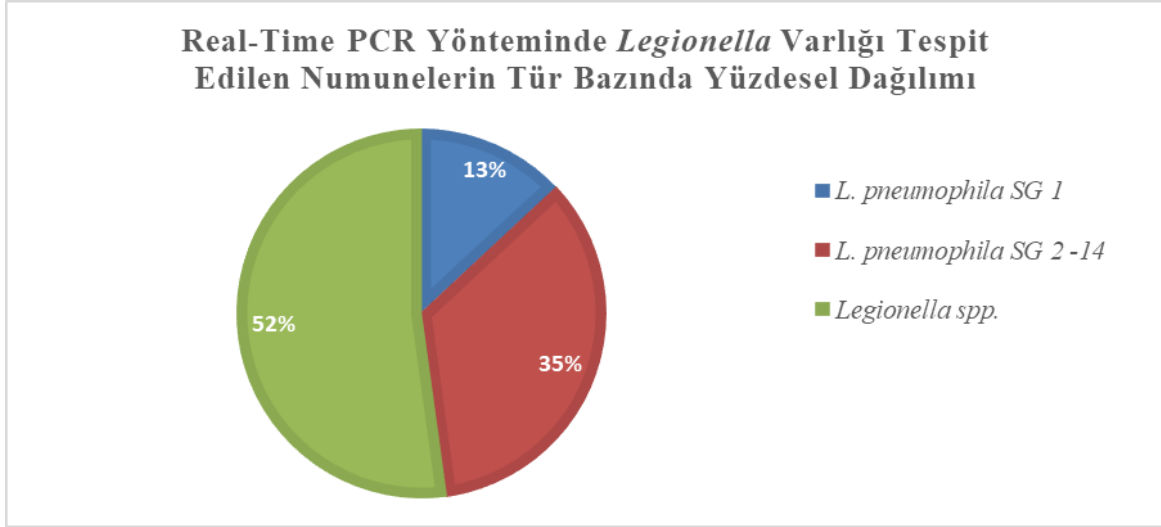


Şekil 4.2. Kültürde tespit edilen numunlerin tür bazında yüzdesel dağılımı

Legionella cinsi bakteri varlığı açısından analizi yapılmış su numunelerine uygulanan ikinci yöntem ise real-time PCR yöntemidir. Real-time PCR çalışmasında kullanılan kit, *L. pneumophila* SG1, *L. pneumophila* ve *Legionella* spp. varlığında pozitiflik vermektedir. *L. pneumophila* SG 2-14 varlığını tespit etmektedir, ancak daha genel bir şekilde kit *L. pneumophila* SG 2-14'ü *Legionella* spp. içerisinde göstermektedir. Real-time PCR yönteminde inceleme altına alınan su numunelerinin PCR sonucunda; 15 numunede *L. pneumophila* SG1 pozitif, 2 numunede *L. pneumophila* SG 2-14 pozitif, 8 numunede *L. pneumophila* pozitif ve 39 numunede negatif sonuç tespit edilmiştir. Real-time PCR yönteminde *Legionella* varlığı tespit edilen numunelerin yüzdesel dağılımı Şekil 4.3'de verilmiştir. Real-time PCR yönteminde *Legionella* varlığı tespit edilen numunelerin tür bazında yüzdesel dağılımı ise Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Real-time PCR ile *Legionella* varlığı tespit edilen numunlerin yüzdesel dağılımı



Şekil 4.4. Real-time PCRda tespit edilen numunelerin tür bazında yüzdesele dağılımı

Kültür-lateks aglütinasyon ve PCR sonuçlarını karşılaştırıldığında bazı numunelerde her iki çalışmada da aynı sonuçlar çıkarken, bazı numunelerde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Su numunelerinin kültür ve Real-time PCR sonuçları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan su numunelerinin kültür ve real-time PCR sonuçları

| Numune No | Su numunesinin alındığı bölge | Kültür – lateks aglütinasyon testi sonucu | Real-time PCR sonucu |
|-----------|---|---|----------------------------|
| 1 | Su deposu (Hastane) | - | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 2 | Kullanma suyu depo çıkışı | - | - |
| 3 | Kullanma suyu depo çıkışı | - | - |
| 4 | Kullanma suyu depo çıkışı | - | - |
| 5 | Sıcak su tankı (Hastane) | - | - |
| 6 | Sert soğuk su musluk başlığı (Hastane) | - | - |
| 7 | Sert sıcak su musluk başlığı (Hastane) | - | - |
| 8 | Yumuşak sıcak su musluk başlığı (Hastane) | - | - |
| 9 | Yumuşak soğuk su musluk başlığı (Hastane) | - | - |
| 10 | Soyunma odası musluk başlığı (Hastane) | 76 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 1 | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 11 | Ark ocağı musluk başlığı | 512 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 | <i>Legionella</i> spp. |
| 12 | Alfa laval musluk başlığı | 6 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 13 | Açık devre musluk başlığı | 2176 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |

Çizelge 4.1. (devam) Çalışmada kullanılan su numunelerinin kültür ve real-time PCR sonuçları

| | | | |
|----|--|--|-------------------------------|
| 14 | Oksijen küçük musluk başlığı | 63 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 15 | Oksijen büyük musluk başlığı | 14 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 | <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 |
| 16 | Kapalı devre musluk başlığı | 430 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 17 | Toz toplama musluk başlığı | 307 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 18 | Yeni büfe musluk başlığı | - | - |
| 19 | Mutfak musluk başlığı (Hastane) | - | - |
| 20 | Fabrika su kulesi | 10 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 1 | <i>Legionella</i> spp. |
| 21 | Fabrika su kulesi | - | - |
| 22 | Soğutma kulesi (Hastane) | - | - |
| 23 | Soğutma kulesi (kazan) | - | - |
| 24 | Soğutma kulesi (motor) | 15 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 25 | Soğutma kulesi (aktarma) | 20 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>Legionella</i> spp. |
| 26 | Soğutma kulesi (kep kaynak) | - | - |
| 27 | Soğutma kulesi (ısıt işlem) | - | - |
| 28 | Soğutma kulesi (ısıt işlem) | - | - |
| 29 | Soğutma kulesi (kazan) | - | - |
| 30 | Soğutma kulesi (motor) | - | - |
| 31 | Soğutma kulesi (aktarma) | 40 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 32 | Soğutma kulesi (kep kaynak) | - | - |
| 33 | Soğutma kulesi (aktarma) | 250 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>Legionella</i> spp. |
| 34 | Soğutma kulesi (aktarma) | - | <i>Legionella</i> spp. |
| 35 | Soğutma kulesi (kazan) | - | - |
| 36 | Soğutma kulesi (motor) | 10 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 37 | Soğutma kulesi (aktarma) | 290 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | - |
| 38 | Soğutma kulesi (kep kaynak) | 340 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 39 | Soğutma kulesi (ısıt işlem) | 15 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 40 | Kit ünitesi duş başlığı sıcak su (Hastane) | - | - |

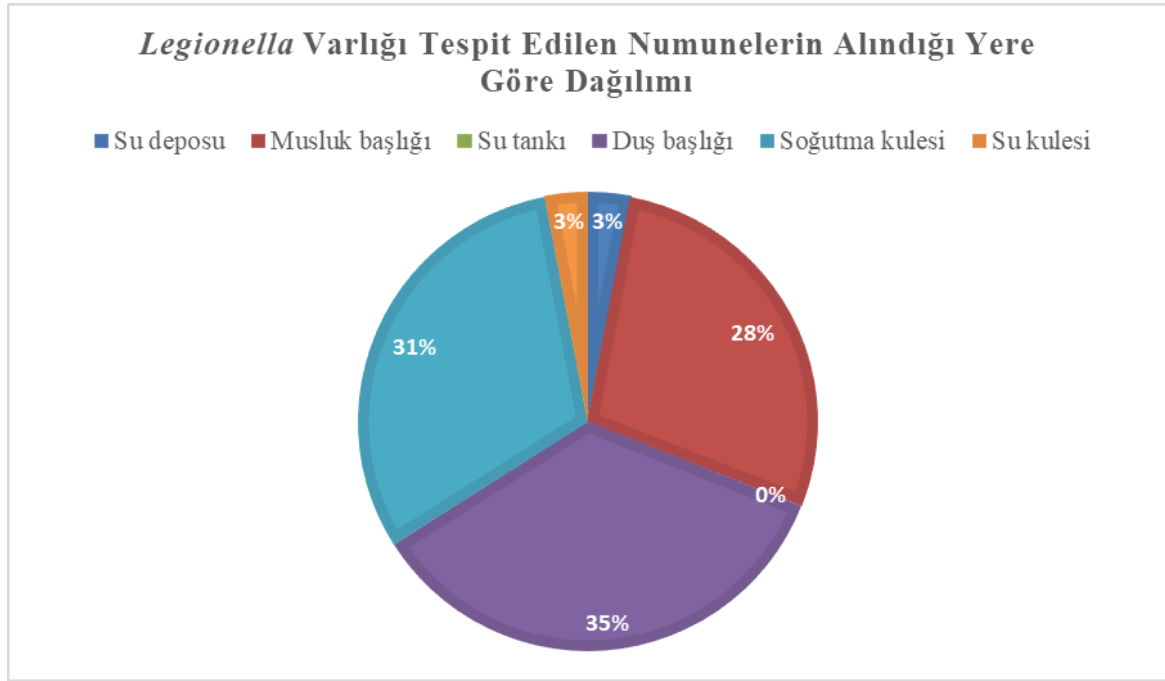
Çizelge 4.1. (devam) Çalışmada kullanılan su numunelerinin kültür ve real-time PCR sonuçları

| | | | |
|----|--|---|-------------------------------|
| 41 | Yoğun bakım duş başlığı sıcak su (Hastane) | 800 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 1 | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 42 | Bayan soyunma odası duş başlığı (Hastane) | - | - |
| 43 | Oda duş başlığı (Hastane) | - | - |
| 44 | Oda sıcak suyu duş başlığı (Misafirhane) | 6 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 |
| 45 | Oda duş başlığı (Hastane) | - | <i>Legionella</i> spp. |
| 46 | Oda duş başlığı (Hastane) | 10 koloni/mL <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 | - |
| 47 | Oda sıcak suyu duş başlığı (Misafirhane) | 2 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | - |
| 48 | Motor alan prefabrik bina duş başlığı | - | - |
| 49 | İdari bina erkekler duş başlığı | - | - |
| 50 | Isıl işlem sıcak suyu duş başlığı | - | - |
| 51 | Kep kaynak üst kat duş başlığı | - | - |
| 52 | Kamyon alan erkekler duş başlığı | 2 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | <i>Legionella</i> spp. |
| 53 | RTM sıcak suyu duş başlığı | - | - |
| 54 | Kamyon alan bayanlar duş başlığı | - | - |
| 55 | Yeni boyahane sıcak suyu bay duş başlığı | - | - |
| 56 | Yeni boyahane sıcak suyu bayan duş başlığı | - | - |
| 57 | Aritma tesisi sıcak suyu duş başlığı | - | - |
| 58 | Ürün geliştirme sıcak suyu duş başlığı | - | - |
| 59 | Kamyon alan erkekler duş başlığı | - | <i>Legionella</i> spp. |
| 60 | Sıcak su duş başlığı (Misafirhane) | - | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 61 | Banyo duş başlığı (Hastane) | - | - |
| 62 | Bayan soyunma odası duş başlığı (Hastane) | - | - |
| 63 | Oda duş başlığı (Hastane) | - | <i>L. pneumophila</i> SG 1 |
| 64 | Oda sıcak suyu duş başlığı (Misafirhane) | 15 koloni/mL <i>Legionella</i> spp. | - |

Alınan su örneklerinden 14 musluk başlığı numunesinin 6'sının hem kültür-lateks aglütinasyon testinde hem de real-time PCR sonucunda *Legionella* varlığına rastlanılmamıştır. 4 su deposu numunesinden sadece 1 numunede (numune numarası 1) real-time PCR ile *L. pneumophila* SG 1 tespit edilmiştir.

1 tane olan sıcak su tank numunesinde, kullanılan her iki yöntemde de *Legionella* bakterisi pozitif sonuç vermemiştir. 25 tane duş başlığı numunesine uygulanan her iki yöntem sonucu

10 adet numunede *Legionella* varlığı tespit edilmiştir. 15 numunede ise *Legionella* varlığı tespit edilememiştir. 18 adet soğutma kulesi numunesine uygulanan her iki yöntem sonucu 9 adet numunede *Legionella* varlığı belirlenirken 9 numunede ise *Legionella* varlığı belirlenememiştir. 2 adet su kulesi numunesine uygulanan kültür – lateks aglütinasyon ve real-time PCR yöntemlerinde; 1 adet numunede *Legionella* varlığı görülürken, 1 numunede ise *Legionella* varlığı görülmemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *Legionella* varlığı tespit edilen numunelerin alındığı yerlere göre yüzdesel dağılımı



5. TARTIŞMA

Legionella spp.; doğal su habitatlarının florasında ve nem miktarı fazla olan toprak habitatlarında yoğun miktarda bulunabilmektedirler. Bu çok özel canlılar nemin yüksek olduğu yaşam alanlarında, aşırı sıcaklıkta ve farklı pH seviyelerinde yaşamlarını idame ettirerek, bütün ekstrem koşullara karşın kendilerini muhafaza etmekte çok başarılıdırlar. Bunun dışında aşırı miktarda kloro karşı direnç gösterebildiklerinden çeşitli su kaynak yapılarına düzenli bir şekilde uygulanan klorlama prosesi de bu canlıların yaşamsal faaliyetlerini durduramaz [21]. Bu ekstrem koşullara dayanabilmesinin en büyük sebebi; yapay su sistemlerinde bulunan biyofilm katmanı içerisinde yaşamlarını devam ettirerek, çoğalabilmeleridir. Ayrıca bunlar dışında serbest bir şekilde yaşamını sürdüren protozoaların hücre içi paraziti olarak da yaşamlarını devam ettirip enfeksiyon kaynağı olabilmektedirler [12]. *Legionella* mikroorganizmalarının yapay su sistemleri içerisinde koloni oluşturmasında; suyun akış hızı, sıcaklığı, çevresel mikrobiota, sedimentlerin birikmesi ve biyofilm yapısının varlığı büyük bir etken olarak yer almaktadır [61, 62].

Binaların yapısal özellikleri, yapay su sisteminin yapısal özellikleri, suyun içerdiği etkenler ve farklı coğrafi konumlar gibi faktörler, günümüze dek gerçekleştirilen araştırmaların neticesinde elde edilen verilerin değişken özellik göstermesinde en büyük nedenler olarak kabul edilmektedir [27].

Çalışmalar sonucunda soğutma kuleleri ve klimaların aerosol oluşturarak hava akımıyla beraber başta *Legionella* spp. olmak üzere bütün mikroorganizmaları 1,6 km'den daha fazla bir hızla yaşam alanlarına kattığı bildirilmiştir [63]. Aerosolizasyon vasıtasıyla bulaşan *Legionella* spp. barındıran suyun aerosol partikülleri 1-5 µm boyut aralığında olmalıdır. *Legionella* spp. aerosol içerisinde bulunan partiküller ile birlikte en az iki saat canlılığını koruyabilmektedir [64, 65].

Legionella türleri arasında insanlarda hastalık etkeni olarak en sık görülen tür *L. pneumophila*, bütün toplum kökenli pnömonilerin % 2-16'sında rol oynamaktadır [66]. *Legionella* enfeksiyonlarının %85'inde sebep olarak *L. pneumophila* gösterilmektedir ve insanda görülen enfeksiyonların %80'den fazlası serogrup 1'den kaynaklanmaktadır [11].

Bunun dışında *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. wadsworthii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. feeleii* ve *L. oakridgensis* primer derecede enfeksiyon açısından dikkate alınması gereken diğer türlerdir [36].

Martson ve ark. (1997)'nin gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda sigara içiciliğinin, kronik akciğer hastalığına sahip olmanın, kronik kalp rahatsızlığının, yaşlılığın ve zayıf bağışıklık sistemine sahip olmanın bu hastalık için risk etkeni olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunlarla beraber alkol tüketiminin fazla olması, böbrek rahatsızlıkları, hematolojik malignansiler, şeker hastalığı ve cinsiyet olarak erkek olmak da bu pnömoni enfeksiyonları açısından risk etmenleri olarak ifade edilmektedir [67]. Bu nedenle *Legionella* cinsi bakterilerin varlığının tespit edilmesi çok önemlidir. Bu amaçla bu tez çalışmasında farklı su numunelerinde *Legionella* cinsi bakterinin tespitinde kültür ve real-time PCR yöntemleri kullanılmıştır.

Legionella enfeksiyonlarının teşhis amacıyla kullanılan yöntemler içerisinde kültür yöntemi altın standart olarak kabul görmüştür [16]. Referans laboratuvarlarda gerçekleştirilen geçmişe yönelik incelemelerde dahi, lejyoner hastalığı teşhisinde kültür yönteminin duyarlılığı %11-65 aralığında ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber seçici besiyeri gereksinimi, besiyeri plağı için uygun koşulların oluşturulması zorunluluğu ve bunlar dışında *Legionella*'yı izole etmek için kullanılan birçok cihaz (koloni mikroskobu, su filtrasyon cihazı vb.) ihtiyacı kültür yönteminin başlıca zorluklarından [68].

ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC); su numuneleri alınırken musluk ve duş başlıklarından hem su hem de sürüntü numunelerinin beraber alınmasını tavsiye etmektedir. Aynı zamanda en başta sürüntü numunesinin elde edilmesi ardından su numunesinin alınmasını ve su numunesinin 15 dakika boyunca asitle muamele edilmesini tavsiye olarak sunmaktadır. Hijyen enstitüsü (Hygiene Institut-HI) ise, yalnızca su numunesinin elde edilmesini ve numunelerin 15 dakika boyunca asit ile muamele yapıldıktan sonra BCYE ve GVPC besiyerleri plaklarına ekilmesini tavsiye etmektedir. CDC ve HI'nın her ikisinin de protokolleri numunelerin içerisinde mikroorganizmayı yoğun bir şekilde elde etmek amacıyla filtrasyon işlemi uygulamaktadır [69]. Hijyen enstitüsü'nün önerdiği tavsiyeye uyararak, bu tez çalışmasında BCYE ve GVPC besiyerleri aynı anda kullanılmıştır. Bunun dışında CDC ve HI'nın tavsiyeleri dikkate

alınarak su numunelerine filtrasyon işlemi uygulanmıştır. Böylelikle bakteriyi daha yoğun bir şekilde besiyeri plağında gözlemlemek amaçlanmıştır.

Gazi Olayları Sağlık Merkezi (Veterans Affair Medical Center-VAMC) ise, sürüntü ile alınan numunenin tek başına alınmasını kafi görmekte fakat su numunesi de alınacaksa eğer santrifüj işlemiyle bakteri yoğunluğunun artırılması tavsiye edilmektedir. Numuneler 3 dakika boyunca asit ile muamele edilerek, diğer çevresel biotanın elemine edilmesiyle, BCYE ve DGVP besiyerleri plaklarına ekim yapılması gerektiği bildirilmektedir [69]. Bu tez çalışmasında su numunelerinin asit ile muamelesi işleminde VAMC'nın bu tavsiyesi dikkate alınmıştır. Tez çalışmasında, kültür yöntemi ile *Legionella* varlığının tespit edilmeye çalışıldığı 64 numuneden 23 tanesinde *Legionella* tespit edilmiştir. *Legionella* varlığı tespit edilen numunelerde %52 oranında *Legionella* spp., %35 oranında *L. pneumophila* sero-grup 2-14 ve %13 oranında *L. pneumophila* sero-grup 1 gözlenmiştir.

Reinthal ve diğerlerinin (1993) gerçekleştirdiği araştırmalarda su numunelerinin içerisindeki bakteri miktarını filtrasyon sonucu daha yoğun bir şekilde elde etmişler ve direkt olarak, ısı ve asit ile muameleyle bırakılan numuneler, Modifiye wadosky yee (MWY), BMPAα ve bir kısmı ayrıca GVPC besiyerine ekilmiştir. Bunun sonucunda tercih edilen bu besiyerleri arasında anlamlı bir fark ortaya çıkmamış fakat filtrasyon ile konsantre işlemi uygulanan numunelerin asitle muamelesi sonucunda, GVPC besiyerinin tercih edilmesinin suda bulunan diğer mikroorganizmaları ortadan kaldırmada daha fazla yarar sağladığı belirtilmiştir [70].

Literatürde su kaynaklı *Legionella* enfeksiyonları daha sık yer almıştır. Türetgen ve diğerleri (2009) İstanbul ilinde 41 diş biriminde kullanılmakta olan el aletleri, şırıngalar ve su kaynaklarından alınan toplamda 123 numuneyi inceleme altına almışlar ve 41 diş biriminin 5 tanesinde *L. pneumophila* serogrup 2-14 varlığı tespit edilmiştir [71]. Nakipoğlu ve Gürler (2000) araştırmaların da İstanbul Tıp Fakültesinin 20 farklı alanından 70'i duş başlığı ve 30'u duştan alınan su numunesiyle beraber toplamda 100 numuneyi inceleme altına almışlar ve *Legionella* türü mikroorganizmalar varlığı bakımından araştırmışlardır. Duş başlığından alınan sürüntü ve duş musluğundan akan suyun oluşturduğu numunelerin üçünde dört farklı *Legionella* (*L. jordanis*, *L. feeleeii*, *L. micdadei* ve *Legionella* spp.) ve su depolarından elde edilen numunelerin ikisinde iki farklı *Legionella* (*L. jordanis* ve *Legionella* spp.) türüyle beraber toplam olarak birbirinden farklı altı suş tespit edilmiştir. İncelenen 100 numunede

Legionella türünden bakterilerin koloni oluşturma oranı %5 ve *Legionella* izolasyon oranı %6 olarak belirlenmiştir [72]. Bu tez çalışmasında *Legionella* izolasyon oranı ise yaklaşık olarak %36 olarak ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda incelenen suların içerisinde depo, kule ve su tankı gibi durağan su noktalarının olması *Legionella* izolasyon oranını artıran bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kuzey Hindistan'da bulunan organ nakli ve kanser tedavi ünitelerini içeren bir üçüncü basamak sağlık kuruluşunun su yapılarında *L. pneumophila* serogroup 1 varlığının araştırıldığı bir çalışmada, 79 su numunesine CDC'nin önerileri doğrultusunda konsantrasyon ve dekontaminasyon işlemleri yapılmıştır. Çalışma sonunda kültür yöntemi ile 79 su örneğinin 12'sinde (%15,2) bu patojenik serogrup izolasyonu sağlanmıştır [73]. Bizim çalışmamızda ise kültür yöntemiyle 64 numunenin 3'ünde (%4,68) *L. pneumophila* serogroup 1 olduğu belirlenmiştir. İtalya Palermo'da gerçekleştirilen bir diğer çalışmada 93 su numunesini kültür yöntemiyle incelemişler ve 93 su numunesinden 49'u (%52,7) *L. pneumophila* mevcudiyeti açısından negatif, 44'ü (%47,3) pozitif çıkmıştır [74]. Bizim çalışmamızda ise 64 su numunesinden 41'i (%64,07) *L. pneumophila* varlığı açısından negatifken 23 (%35,93) numunede *L. pneumophila* varlığı tespit edilmiştir.

İğnak (2007) araştırmasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine ait su yapılarında *Legionella* türü mikroorganizmaların varlığını, ne sıklıkla bulduklarını ve su sistemine nereden ve nasıl geçtiklerini kültür yöntemiyle incelemiştir. İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nin 15 ayrı yerinden ve idare birimlerinden 92 adet duş başlığı ve musluk suyu, 8 depo suyu numunesini alarak 100 su numunesi elde etmiş ve *Legionella* varlığı bakımından inceleme altına almış ve yedi örnekte *Legionella* spp. varlığı tespit etmiştir [75]. Erandaç ve Elaldı (2001) ise Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde farklı alanlarda musluk ve duş sularından numune almışlar ve bu su numunelerini *Legionella* varlığı bakımından kültür yöntemiyle incelemişlerdir. İnceleme için 93 adet su numunesi alınmış ve numunelerde *Legionella* varlığı tespit edilememiştir [76]. Katalonya'da (İspanya) Sabria ve diğerlerinin (2004) gerçekleştirdikleri ve 5 yıl süren ileriye dönük araştırmalarında, 20 hastaneden 196 su numunesi elde edilmiş ve 73'ünde (%37,2) *Legionella* varlığını ortaya çıkarılmıştır [77]. Bu tez çalışmada ise hastanelerden alınan 18 adet su numunesinin 3'ünde (%16,67) *Legionella* varlığı tespit edilmiştir.

Alanya içerisinde yer alan otellerin su sistemlerinde *Legionella* türlerinin yaygınlığı Erdoğan ve Aslan (2007) tarafından araştırılmıştır. İnceleme altına alınan 491 adet su ve sürüntü numunesinin 93'ünde (%18,9) *Legionella* türü tespit edilmiş ve tespit edilen türler arasında da %92,5'inin *L. pneumophila* olduğu bildirilmiştir [78]. Bu tez çalışmasında ise farklı bina su sistemlerinin farklı noktalarından alınan su numunelerinde *Legionella* varlığı tespit edilmiş ve farklı türler izole edilmiştir. 64 adet su numunesine uygulanan kültür yöntemi sonucu 3 numunede *L. pneumophila* SG1, 8 numunede *L. pneumophila* SG 2-14, 12 numunede *Legionella* spp. bakterileri izole edilmiştir.

Türetgen ve diğerleri (2005) gerçekleştirdiği kültür yöntemine dayalı çalışmalarda, mevsimin etkisini ve *L. pneumophila* ekolojisini açıklamak amacıyla İstanbul içerisinde bulunan 50 soğutma kulesinden 103 adet su numunesi olarak beş yıl boyunca araştırmışlardır. Elde edilen bakteriler içinde *L. pneumophila* serogrup 1'in bulunma yüzdesinin %44 olduğunu rapor etmişlerdir [79]. Bu tez çalışmasında incelenen soğutma kulelerinde ise *L. pneumophila* serogrup 1 varlığı tespit edilmezken, incelenen soğutma kulelerine ait 18 numunenin 8'inde (%44,44) *Legionella* spp. varlığı tespit edilmiştir.

Ülkemizde klimanın başrol oynadığı *Legionella* enfeksiyonları da incelenmiş, farklı yerlerden bulaş etkeni teşhis edilmiştir. Polat ve diğerleri (2007) mesleği gereği klima ve onun neden olduğu hava akımına doğrudan ve sürekli maruz kalan 79 kişide (63 otobüs şoförü ve 16 şoför yardımcısı) *L. pneumophila* seropozitifliğini incelemişler ve olguların %15,2'sinde etkeni teşhis etmişlerdir [80]. Su sistemleri klimalardan daha fazla *Legionella* mikroorganizmasını içerse bile klimalar *Legionella* mikroorganizmalarının hızla yayılmasına neden olmaktadır.

2002 yılında Alim ve diğerleri İç Anadolu Bölgesi sınırları içerisinde yer alan 36 kaplıca ve 69 termal havuzdan 209 su numunesini toplamışlar ve bu numunelerde *Legionella* etkenini araştırmışlardır. Toplanan 209 su numunesinin 24'ünde (%15,5) *L. pneumophila* varlığını tespit etmişlerdir. Ayrıca kaplıcalardan alınan 36 örneğinin 8'inde (%22,2) ve termal su havuzlarından alınan 69 su örneğinin %14,5'inde *L. pneumophila* varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmalarında *L. pneumophila*'nın koloni oluşumunun termal su havuzlarında, kaplıcalarda ve sucul alanlarda endemik bir şekilde yer aldığını belirtmişlerdir [81]. İzmir iline bağlı 6 ilçede bulunan farklı 24 otelden alınan 168 sıcak su numunesinin incelemeye alındığı çalışmada, bu otellerden alınan su numunelerinin 22'sinde *L. pneumophila* varlığı

rapor etmişlerdir [82]. Bu tez çalışmasında ise 5 numaralı su numunesi sıcak su tankına ait bir numunedir. Bu numuneden *Legionella* varlığı tespit edilememiştir. Bunun nedeni su numunesinin sıcaklığının *Legionella* bakterilerinin yaşamı için gerekli olan sıcaklıktan daha yüksek bir değere sahip olması olabilir. Yahut bu numunede *Legioenella* varlığı hiç bulunmamaktadır.

Afacan ve diğerleri (2006) yaptıkları çalışmalarda Ege bölgesinde yer alan turizm ile alakalı bina yapılarının su tesisatlarından elde edilen *L. pneumophila* serogrup 1 ve *L. pneumophila* 2-14 izolatlarının kültür yöntemiyle sero-gruplandırmasını ortaya koyarak lokal bir serogrup dağılımı elde etmişlerdir. Bu serogrup dağılımına göre *L. pneumophila* serogrup 1 oranının %79, *L. pneumophila* 2-14 oranı ise %4,53 olduğu bildirilmiştir [83]. Bu tez çalışmasında ise *L. pneumophila* serogrup 1 oranı %4,68 iken *L. pneumophila* serogrup 2-14 oranı %12,5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca *Legionella* spp. oranı %18,75 olarak ortaya çıkmıştır. İnsanlarda görülen enfeksiyonların çoğunda *L.pneumophila* SG 1 sorumludur. Bu tez çalışmasında uygulanan kültür yönteminin sonuçlarına göre, *L. pneumophila* SG 1 oranının düşük çıkmasının enfeksiyon oluşturma olasılığını düşüren bir etmen olarak değerlendirilmiştir.

Collins ve diğerlerinin (2018) yaptıkları çalışmalarda soğutma kuleleri, sıcak ve soğuk su tankları, spa havuzları ve gemi sularından elde ettikleri 2002 adet numuneyi inceleme altına almışlardır. Bu numunelere kültür yöntemiyle beraber real-time PCR yöntemi uygulamışlar ve *Legionella* spp. ile *L. pneumophila* varlığını tespit etmeyi amaçlamışlardır. Çalışmaları sonucu 2002 su numunesinin kültüründe 282 tanesinde *Legionella* spp. ile izole etmişler, real-time PCR yönteminde ise 1464 adet numunede *Legionella* spp. pozitifliği elde edilmiştir. Aynı çalışmada kültür yöntemiyle 186 adet numunede *L. pneumophila* izolasyonu sağlanmış, real-time PCR yöntemi ile 564 adet numunede *L. pneumophila* pozitifliği elde edilmiştir [84]. Çalışmalarının sonucu veriler değerlendirildiğinde real-time PCR yönteminin kültür yönteminden daha fazla *Legionella* etkeninin varlığını ortaya koyduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasında ise 64 su numunesine uygulanan kültür yöntemi sonucu 12 adet su numunesinde *Legionella* spp. izole edilmiş, 11 adet su numunesinden de *L. pneumophila* izolasyonu sağlanmıştır. Yine bu çalışmamızda uygulanan diğer bir yöntem olan real-time PCR yöntemi ile 8 adet numunede *Legionella* spp. pozitifliği elde edilmiş, 17 adet numunede ise *L. pneumophila* pozitifliği elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında da ortaya çıkan veriler real-time PCR'ın kültür yöntemine göre daha çok *Legionella* etkeninin varlığını ortaya koyduğunu

göstermiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında tercih edilen kültür yöntemi ve real-time PCR yöntemlerinin beraber kullanımı ülkemiz genelinde gerçekleştirilen çalışmaların ilk örneklerdendir.

Zeybek ve diğerleri 2009 yılında gerçekleştirdikleri araştırmalarında rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemiyle İstanbul'da bulunan değişik binalarda tespit edilmiş sekiz *L. pneumophila* serogroup 1 ve serogroup 2-14 suşlarının fenotipik yapılarını incelemişlerdir. Bunun sonucunda birbirlerine buldukları konum itibarıyla yakın olan (yaklaşık 500 m) binalardan elde edilen sekiz *L. pneumophila* suşunun RAPD yöntemiyle elde edilmiş sonuçlarının benzer olduğunu belirtmişlerdir [85].

115 su numunesine real-time PCR yönteminin uygulandığı ve *L. pneumophila* varlığının araştırıldığı bir çalışmada, örneklerin %80'inde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Pozitif olarak bulunan su numunelerinin %87'sini ise *L. pneumophila* SG 1 oluşturduğu rapor edilmiştir [86]. Bu tez çalışmasında ise 64 su numunesine uygulanan real-time PCR yöntemi sonucu 64 numunenin %39,06'sı pozitif çıkmıştır. Pozitif sonuçların ise sadece %60'ı *L. pneumophila* SG 1 bulunmuştur.

Birçok araştırmada kültür yöntemi ile real-time PCR yönteminin beraber kullanıldığı görülmektedir. 64 adet alt solunum yolundan elde edilen numunelerle Nazarian ve diğerlerinin 2008 yılında gerçekleştirdikleri araştırmada, real-time PCR yöntemiyle *Legionella* pozitif sonuç verilen 15 numunenin yalnızca ikisinde kültür yöntemi ile etken mikroorganizma tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, içerisinde *L. pneumophila* varlığı bilinen 140 adet çevresel su numunesi incelenmiştir. Bu 140 adet numunenin 138 (%98,6) adedi real-time PCR çalışmasında pozitif çıkmıştır. Kültür yöntemi sonucu 140 adet numunenin 99 (%70,7) adedinden *L. pneumophila* izole edilmiştir. 140 adet numunenin 97'sinde (%69,3) hem kültür hem de real-time PCR sonuçları pozitif çıkmıştır. 41 örnekte (%29,3) real-time PCR sonuçları pozitif çıkarken, kültür yönteminde sonuçlar negatif olarak rapor edilmiştir. 2 numunede (%1,4) real-time PCR sonuçları negatif, kültür çalışmalarında ise *L. pneumophila* oldukları bildirilmiştir [87]. Tez çalışmasında 64 adet numunenin 25'i (%39,06) real-time PCR çalışmasında pozitif çıkmış, kültür yönteminde ise örneklerin %35,94'ünde (23 adet) *L. pneumophila* varlığı tespit edilmiştir. 64 adet örneğin %29,69'unda (19 adet) hem kültür hem de real-time PCR da *Legionella* varlığı gözlenmiştir. Numunelerin %9,38'i (6 adet) real-time PCR da pozitif sonuç verirken, kültür yöntemi negatif sonuç

vermiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada real-time PCR yönteminin, kültür yönteminin tespit edemediği etkenleri tespit ettiği anlaşılmıştır. Kültür yöntemi ile tespit edilen etkenin real-time PCR yöntemi ile tespit edilemediği örnekler varsa da yüzdesel olarak küçük (%6,25) bir orandadır. Bu tez çalışmasında ortaya çıkan sonuçlara göre real-time PCR yönteminin duyarlılığı kültür yöntemine göre daha yüksek bir orana sahiptir. Yapılan bir çalışmada PCR yönteminin kültür yönteminden daha duyarlı olduğu ortaya konulmuştur [88].

Bu çalışmada, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı'na rutin çevresel sürveyans kapsamında gönderilen su numunelerinin 64'ü *L. pneumophila* varlığı yönünden kültür ve real-time PCR yöntemleri ile inceleme altına alınmıştır. Soğuk su deposu, lavabo musluğu ve duş başlığı gibi farklı noktalardan alınan su numunelerine hem filtrasyon hem de direkt ekim yöntemi uygulanmış, takiben selektif besiyerlerine ekim yapılmıştır. İnkübasyonun ardından şüpheli *Legionella* kolonileri, lateks aglütinasyon testi ile sero-gruplandırılmıştır. Kültür yöntemi sonucu, 64 adet su numunesinin üçünde *L. pneumophila* SG1, sekizinde *L. pneumophila* SG 2-14, onikisinde *Legionella* spp. tespit edilmiştir. Diğer 41 su numunesinin kültürlerinde *Legionella* izolasyonu yapılamamıştır. Real-time PCR yöntemi ile yapılan çalışma sonucunda ortaya çıkan sonuçlar ise 15 numunede *L. pneumophila* SG1 pozitifliği, iki numunede *L. pneumophila* SG 2-14 pozitifliği, sekiz numunede *L. pneumophila* pozitifliği belirlenirken 39 numunede PCR'ın negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan yöntemler kültür ve real-time PCR yöntemleridir. Kullanılan bu iki yöntemin verileri karşılaştırıldığında %64,06 oranında uyumlu olsa da bazı uyumsuzluklar görülmektedir. Bunlar;

Hem kültür yöntemi hem de real-time PCR yönteminde 10, 15, 25, 33, 41 ve 52 numaralı numuneler aynı sonucu vermiştir.

Kültür yönteminde *Legioenella* varlığı ortaya konulamamış fakat real-time PCR çalışmasında pozitiflik yakalanmış numuneler olmuştur (numune no: 1, 34, 45, 59, 60 ve 63). Bu durum, su içerisinde canlı *Legionella* bakterisi olmamakla beraber DNA'sının numunede varlığı bu çalışmada PCR'ın pozitif sonuç vermesine neden olmuş olabileceği veya su içerisinde yer alan çevresel bioatanın çok yoğun olması ve *Legionella* bakterilerini baskılamış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Kültür yöntemi ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarda *L. pneumophila* SG 2-14 bulunan numuneler, real-time PCR sonucunda *L. pneumophila* SG 1 (numune no: 12, 13, 14, 16 ve 17) olarak tespit edilmiştir. 11 nolu numunede *Legionella* varlığı, kültür yönteminde *L. pneumophila* SG 2-14 bulunurken, real-time PCR sonucunda *Legionella* spp. olarak tespit edilmiştir. 20 numaralı örnekte kültür yöntemi ile *L. pneumophila* SG 1 olarak tanımlama yapılırken, real-time PCR sonucunda örnekte *Legionella* spp. olduğu belirlenmiştir. Numune numarası 24, 31, 36, 38, 39 olan su örneklerinde kültür yönteminde *Legionella* spp. olarak tespit edilen bakteriler real-time PCR yönteminde *L. pneumophila* SG 1 olarak tespit edilmiştir. Son olarak, 44 nolu su numunesinde ise kültür yönteminde bakteri *Legionella* spp. olarak adlandırılırken real-time PCR yönteminde *L. pneumophila* SG 2-14 olarak adlandırılmıştır. Kültürde başka *Legionella* türü ve serogrubu teşhis edilirken real-time PCR yönteminde farklı bir tür ve serogrup pozitifliğinin nedenleri, real-time PCR çalışmasından kaynaklı çapraz reaksiyon olma ihtimali olabileceği veya iki tür veya serogrubun beraber bulunma ihtimalinin olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmada, kültür yönteminde *Legionella* üremesi gerçekleşen ama PCR çalışması sonucu negatif olan numunelerde (46, 47 ve 64 numaralı su numuneleri) görülmüştür. Kültürde *Legionella* üremesi gerçekleşip, real-time PCR yöntemiyle pozitiflik vermeyen sular içerisinde inhibitör madde varlığından şüphelenilmiştir. Bu inhibitör madde real-time PCR çalışmasını inhibe ederek sonucun negatif çıkmasına yol açmış olabilir. Diğer bir ihtimal ise su içeriğinde *Legionella* bakterisinin çok düşük konsantrasyonlarda bulunmasından dolayı yeterli DNA miktarının elde edilememesi nedeniyle real-time PCR sonucu negatif çıkmış olabilir.

Legionella türleri doğada yaygın bulunabilen ve su sistemlerine geçişi mümkün olabilen bir mikroorganizma grubudur. Ekstrem koşullarda canlılığını devam ettirebilmesi sebep olduğu hastalıkların görülme sıklığını artırmaktadır. Bu yüzden su sistemlerinin dezenfeksiyonunun sürekli ve sürdürülebilir olması, üstünde durulması gereken bir konudur. Bunların dışında *Legionella* kaynaklı hastalıkların erken tanısı ve tedavisi çok önemlidir. Bilinenden daha çok *Legionella* vakasının olduğu düşünülmekte, fakat tanıda yaşanan problemlerden dolayı teşhis konulamamaktadır. Bu sebeple *Legionella* şüpheli olgularda birden çok yöntemin kullanılması doğru ve hızlı sonuç almamızda etkin bir rol oynayacaktır.

Bu tez çalışmasında altın standart olarak kabul gören kültür yöntemi ve yapılan çalışmalarda duyarlılığı en yüksek oranda sonuçlar vermiş real-time PCR yöntemi tercih edilmiş, böylelikle hızlı ve kesin tanı vermek mümkün olabilmektedir. Kültür yönteminin uzun sürede sonuçlanması, meşakkatli olması ve yetkin personel gerektirmesi bu yöntemin dezavantajlarından. PCR yönteminin hızlı ve kolay uygulanabilir olması ise real-time PCR yönteminin avantajları olarak karşımıza çıkmaktadır.

Su numunelerinden *Legionella* analizi amacıyla yapılan araştırmalarda genellikle kültür yöntemi tercih edilmişse de son yıllarda moleküler yöntemler de daha sık kullanılmaya başlanmıştır. Bununla beraber *Legionella* tür ve serogruplarının tanısı bakımından, duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek ve hızlı tanı koyabilen testlerin geliştirilmesine ve daha çok araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı'na 2017 Mayıs – 2019 Şubat tarihleri arasında rutin çevresel sürveyans kapsamında ulaşılan su numunelerinin 64'ü *Legionella pneumophila* varlığı yönünden iki farklı yöntem (kültür yöntemi ve PCR yöntemi) ile araştırılmıştır. Kültür yöntemi sonucu 64 adet su numunesi inceleme altına alınmıştır. Bu numuneler BCYE ve DGVP besiyerlerine ekilmiş, bu ekim sonucu şüpheli koloniler koyun kanlı agar ve BCYE agara alınmıştır. Koyun kanlı agarda üremeyip, BCYE agarda üreyen koloniler ile tanımlamaya devam edilmiştir. Bu su numunelerinden 23'ünde *Legionella* varlığı tespit edilmiş, ileri identifikasyonu lateks aglütinasyon testi ile yapılmıştır. Geriye kalan 41 adet su numunesinde ise *Legionella* varlığı tespit edilememiştir. İleri identifikasyon sonucu;

- 3 numunede, *L. pneumophila* SG1,
- 8 numunede, *L. pneumophila* SG 2-14,
- 12 numunede, *Legionella* spp. tespit edilmiştir.

Yüzdesel olarak hesapladığımızda;

- % 4,68 *L. pneumophila* SG1,
- % 12,5 *L. pneumophila* SG 2-14,
- % 18,75 *Legionella* spp. varlığı tespit edilirken
- % 64,07 *Legionella* varlığı tespit edilememiştir.

İzole edilen *Legionella* türlerinin kendi aralarındaki dağılımı yüzdesel olarak hesapladığımızda;

- % 13,04 *L. pneumophila* SG1,
- % 34,78 *L. pneumophila* SG 2-14,
- % 52,17 *Legionella* spp. oranında olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda en sık görülen *Legionella* etkeni *L. pneumophila* SG1 olmasına karşın bizim çalışmalarımızın sonucunda inceleme altına aldığımız su numunelerinden en çok *Legionella* spp. izole edilmiş olmakla beraber onu *L. pneumophila* SG 2-14 izlemektedir.

En düşük oranda izole ettiğimiz etken *L. pneumophila* SG1 olarak karşımıza çıkmıştır. Bunun sebebinin rastgele seçim yöntemi sonucu elimizdeki numunelerin farklı konumlardan gelmiş olması ve dar bir spektrum içerisinde seçilmiş olmaları olarak yorumlanmıştır.

İnceleme altına aldığımız su numunelerine uyguladığımız diğer metot ise Real-time PCR yöntemidir. Real-time PCR çalışması gerçekleştirilen su numunelerinde pozitif sonuçlar;

- 15 numunede, *L. pneumophila* SG1 pozitifliği,
- 2 numunede, *L. pneumophila* SG 2-14 pozitifliği,
- 8 numunede, *Legionella* spp. pozitifliği şeklindedir.
- 39 numunenin PCR sonucu ise negatif sonuçlanmıştır.

Yüzdesel olarak hesapladığımızda;

- % 23,43 *L. pneumophila* SG1,
- % 3,13 *L. pneumophila* SG 2-14,
- % 12,5 *Legionella* spp. varlığı tespit edilirken,
- % 60,94 *Legionella* varlığı tespit edilememiştir.

Real-time PCR çalışmasında pozitif sonuç veren *Legionella* türlerinin kendi aralarındaki dağılımı yüzdesel olarak hesaplandığında;

- % 60 *L. pneumophila* SG1,
- % 8 *L. pneumophila* SG 2-14,
- % 32 *Legionella* spp. oranı ortaya çıkmaktadır.

Çalışılan bu iki yöntem karşılaştırıldığında PCR yönteminin kültür yönteminden biraz daha fazla *Legionella* varlığı tespit ettiği ortaya çıkmıştır. Fakat serogruplandırma aşamalarında kültür yönteminin daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür.

Bu çalışmada kültür ve PCR olmak üzere iki farklı tanı yöntemi kullanılmıştır. Birebir aynı sonuçlar doğurmasa da her iki çalışma sonucunda birbirlerine yakın veriler elde edilmiştir. Kültür ve PCR yöntemlerinin sonuçları karşılaştırıldığında uyumlu sonuçların yüzdesi

%64,06 olarak karşımıza çıkmaktadır. Tercih ettiğimiz Real-time PCR yönteminde duyarlılık kültüre göre biraz daha fazla olsa da tür ve serogrup tayinin de daha fazla geliştirilmeye ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Kültür yöntemiyle serogrup tayini için daha net sonuçlar elde edilmiştir. Bu sebeple PCR yöntemi ile birlikte kültür yönteminde mutlaka çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Ülkemizde “Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı” kapsamında takip edilen lejyoner hastalığı; bildirim zorunlu bir hastalıktır. Hastane kaynaklı ve seyahat ilişkili formlarının en kısa sürede saptanması; vaka ihbarı açısından önem taşımaktadır. Vaka bildirilen konaklama birimlerinde patojen odağın belirlenmesinde çevresel sürveyans yapılması gereklidir. Bu noktada duyarlılığı, özgülüğü, tanısal doğruluğu yüksek yöntemler önem kazanmaktadır. Kültür yöntemi altın standart olmakla birlikte kesin sonuç için en az bir hafta gerekmesi nedeniyle daha kısa sürede sonuç verecek moleküler yöntemlerin uygulanması gündemdedir. Lejyoner hastalığının, çevresel sürveyansı ve geçerli tanı yöntemleri hakkında farkındalığın artırılması ve su numunelerinin moleküler çalışmalar içerisinde daha fazla yer alması gerektiğini düşünmekteyiz.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmalar sonucu bir takım öneriler sunmaktayız. Bunlar; Birçok hastane, okul, bina gibi birçok yerin su sistemleri düzenli bir şekilde kontrol edilmeli ve belli aralıklarla buralardan alınan numuneler *Legionella* varlığı açısından incelenmelidir, özellikle hastane, kreş ve okul gibi bağışıklık sistemi zayıf bireyleri içeren yapıların su sistemlerinin kontrolü daha önemli bir hal almaktadır. Söz konusu yapıların su sistemlerinde *Legioenella* varlığı tespit edilirse, bir an önce su sisteminin dekontamasyonu sağlanmalıdır. *Legionella* varlığı tespit edilen su sistemlerine bağlı havalandırma ve klima benzeri cihazların etken mikroorganizmanın hızlı bir şekilde yayılmasına sebep olabileceğinden bu cihazların bakımı ve temizliği bir an evvel yapılmalıdır.

Legionella varlığı tespit edilen bina su sistemlerinde etken mikroorganizmayı dezenfeksiyonun kullanılabilir en etkili yöntemlerden birisi bakır-gümüş iyonizasyonudur. Bu yöntemim insan sağlığı üzerinde olumsuz bir etki bırakmaması, bu yöntemi daha çok tercih edilebilir kılmaktadır.

Legionella'nın etken olduğu hastalıklardan *Legionella*'dan şüphelenilmemesi bu hastalığın insidansını düşük göstermektedir. Bundan dolayı bu hastalığın belirtileri daha iyi bilinmeli,

ön tanı testleri daha fazla uygulanmalı ve bu etken üzerine çalışılan testlerin daha geliştirilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte ek tanı testlerinin beraber çalışılması tanıda kesinlik ve zaman kazandıran bir unsur olacaktır.

Su numuneleri içerisinde yaşamını sürdüren *Legionella* bakterilerini daha yoğun bir şekilde kültürde üretmek için filtrasyonla konsantrasyon işlemi uygulanmalıdır. Kültür yönteminde *Legionella* üremesini artırmanın diğer bir yolu ise çevre biyotayı baskılayan asitle muamele işleminin uygulanması olduğu sonucuna varılmıştır.

Sigara içiciliği, alkol tüketimi, yaşlılık ve immün sistemi baskılanmış bireyler *Legioenella* açısından riskli grupta yer almaktadırlar. Bu riski taşıyan bireylerin etkenin kaynağından mümkün oldukça uzak durmaları ve bu etkene karşı dikkatli davranmaları önerilmektedir.

Hızlı ve doğru tanı sonucunda hastalığın teşhisi ile doğru antibiyotik kullanımı hastalığın seyrini olumlu yönde etkileyen bir unsur olmaktadır. Bu amaçla hastalığın tedavi süreci doğru yönetilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Alary, M. and Joly, J. R. (1992). Factors contributing to the contamination of hospital water distributin on systems by *Journal of Infectious Diseases*, 165(3), 565-569.
2. Vural, T. ve Köse, E. (2004). Lejyonella hastalığı ve Turizm, *Ankem Dergisi*, 18(3), 184-187.
3. Kumpers, P., Tiede, A., Kirschner, P., Girke, J., Ganser, A. and Peest, D. (2008). Legionnaires' disease in immunocompromised patients: a case report of *Legionella longbeachae* pneumonia and review of the literature. *Journal of Medical Microbiology*, 57(3), 384-387.
4. Yalçın, S. (2010). *Klinik belirtili köpeklerde Lejyonella pneumophila SG 1 varlığı kültür, PCR ve üriner antijen aranması yöntemleri ile araştırılması*. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 3-21.
5. Fitzhenry, R., Weiss, D., Cimini, D., Balter, S., Boyd, C., Alleyne, L. and Rubinstein, (2017). Legionnaires' disease outbreaks and cooling towers. *Emerging Infectious Diseases*, 23(11), 1769.
6. Vural, T. (1997). *Legionella* İnfeksiyonlarında Tanı Sorunu. Tekeli, E. Willke, A. (editörler). 8. *Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Program ve Özet Kitabı*, 315-325, Ankara.
7. Pınar, A. (2002). Doğa kaynaklı insan patojeni *Legionella*; tanı ve korunma yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 93-98.
8. Blazquez, R. M., Espinosa, F. J., Martinez-Toldos, C. M., Alemany, L., Garcia-Orenes, C. and Segovia, M. (2005). Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large outbreak of *Legionella pneumonia* in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(7), 488-491.
9. Luck, P. C., Von, B. H., Helbig, J. H. and Marre, R. (2006). *The usefulness of microbiological diagnostic methods for the detection of Legionella infections in Legionella-State of the art 30 years of its recognition*. Cianciotto, N. P., Abukwaik, Y., Edelstein, P. H., Fields, B. S., Geary. D. F., Harrison, T. G., Joseph, C. A., Ratcliff, R. M., Stout, J. E., Swanson, M. S., (eds). Washington DC: ASM Press, 15-21.
10. Den, Boer., J, W. and Yzerman, E, P, F. (2004). Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(12), 871-878.
11. Pınarbaşı, M. (2011). *Eskişehirde klinik örneklerde ve sular da Legionella spp. araştırılması*. Yayımlanmamış Tıpta Uzmanlık Tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
12. Yu, V, L. (2000). *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). In: Mandell G, L., Bennett J, E., Dolin R. (eds). *Principles and Practise of Infectious Diseases*. 5th ed. US: Churchill Livingstone, 2424-2435.

13. Edelstein, P. H. (2009). *Legionella*. In: Murray P. R. (ed). Pınar. A. (editörler). *Klinik Mikrobiyoloji*. (9. Baskı). Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti. 1(53), 835-849.
14. Eberly, B.J. and Whelen, A.C. (2007). *Legionella*. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. (eds). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Elsevier, 485-493.
15. Bell, M. (2001). *Legionella*. In: Wilson. WR, Sande. MA. (eds). *Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease*. International ed. Lange Medical Books. Mc Graw-Hill Inc. 58, 614-619.
16. Luck, P. C., Helbig, J. H. and Schuppler, M. (2002). Epidemiology and laboratory diagnosis of *Legionella* infections, *Laboratoriums Medizin*, 26(3/4), 174-182.
17. Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Review*, 15(3), 506-526.
18. Türkmen, A. (2012). *İstanbul'daki yüzme havuzlarından alınan su ve biyofilm örneklerinin mikrobiyolojik analizi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 6, İstanbul.
19. Vatansever, C. (2011). *Mikrobiyal biyofilm tabakası üzerine farklı fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 12, İstanbul.
20. Harrison, T. G. and Saunders, N. A. (1994). Taxonomy and typing of *Legionellae*. *Reviews in Medical Microbiology*, 5(2), 79-90.
21. Diederer, B.M. (2008). *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection*, 56(1), 1-12.
22. Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W.M., Koneman, E. W., Procop, G., Schreckenberger, P. C. and Woods, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th edition. Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins, 549-565.
23. Mutaf, S. (2013). *Gaziantep il merkezindeki çeşitli soğutma sistemleri ve su sistemlerinde Legionella pneumophila varlığının araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2-20.
24. Cramer, M. (2003). Legionnaire's disease: A case study, *American Journal of Critical Care*, 12(3), 234-238.
25. Mülazimoğlu, L. (2002). *Legionella* (Lejyoner Hastalığı). In: A.W. Topçu, G. Söyletir M. Doğanay (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri, 2, 1667-1670.
26. Gilmour, M. W., Bernard, K., Tracz, D. M., Olson, A. B., Corbett, C. R., Burdz, T. and Tang, P. (2007). Molecular typing of a *Legionella pneumophila* outbreak in Ontario, Canada. *Journal of Medical Microbiology*, 56(3), 336-341.

27. Dağlı, S. (2018). *Kahramanmaraş il merkezindeki çeşitli soğutma sistemleri ve su kaynaklarından Legionella cinsi bakterilerin tanımlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 10-44.
28. Türetgen, İ. (1998). *Soğutma kulelerinin suyunda lejyonella cinsi bakterilerin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
29. T.C. Sağlık Bakanlığı, (2015). *Lejyoner hastalığı kontrol programı rehberi*, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
30. Tijet, N., Tang, P., Romilowych, M., Duncan, C., Ng, V., Fisman, D. N. and Guyard, C. (2010). New endemic *Legionella pneumophila* serogroup I clones, Ontario, Canada. *Emerging infectious diseases*, 16(3), 447-453.
31. Eberly, B. J., Whelen, A. C., *Legionella*. In: Mahon. C. R., Lehman, D. C., Manuselis. G. (eds).(2007). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Elsevier, 485- 493.
32. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S. and Pfaller, M. A. (eds). (2002). *Medical Microbiology*. 4th ed. US: Mosby, Inc; 35, 325-329.
33. Akbal, E. (1996). *Legionellaceae; İntrasellüler parazitizm*. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 30(3), 313-322.
34. Abigail, A., Whitt, S., Whitt, D. D. (1994). Legionnaires' Disease, In A. Abigail, S. Whitt, D. D. Whitt (eds), *Bacterial Pathogenesis; A Molecular Approach*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 301-306.
35. Erdem, B. (1999). *Legionella*. In: Ş. Ustaçelebi (ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi: 559-566.
36. Tuğrul, H. M. (2000). *Legionella* türleri. İçinde D. Serter, E. Ertem, D. Gökengin, (editörler). *Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları*. İzmir: Nobel Tıp Kitabevleri, 308-312.
37. Winn Jr, W. C. (1995). *Legionella*. In: P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.; 533-44.
38. Whiley, H., Keegan, A., Fallowfield, H. and Ross, K. (2014). Uncertainties associated with assessing the public health risk from *Legionella*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 501.
39. Cunha, B. A., Burillo, A., and Bouza, E. (2016). Legionnaires' disease. *The Lancet*, 387(10016), 376-385.
40. Lowry, P. W., Blankenship, R. J., Gridley, W., Troup, N. J., and Tompkins, L. S. (1991). A cluster of *Legionella* sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. *New England Journal of Medicine*, 324(2), 109-113.

41. Linscott, A. J., Poulter, M. D., Ward, K. and Bruckner, D. A. (2004). *Legionella pneumophila* serogroup 4 isolated from joint tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1365-1366.
42. Vergis, E. N., Akbas, E. and Victor, L. Y. (2000). *Legionella* as a cause of severe pneumonia. In *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 21(4), 295-304.
43. Akbaş, E. (2013). Hastane Su Sistemlerinde *Legionella* Araştırılmasında Temel Prensipler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 43(1), 1-13.
44. Barutçu, E. (2018). *Adana ilinde üretilen bazı sucuklarda ELISA ve gerçek zamanlı PCR teknikleri kullanılarak tavuk eti varlığının incelenmesi ve sucukların bazı fizikokimyasal özelliklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 11-12.
45. Gökboro, S. (2018). *İşlenmiş sığır eti ürünlerinde çoklu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (gz-pzr) yöntemi ile tek tırnaklı hayvan etinin belirlenmesi için metot geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 10.
46. Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Sillekens, P., Crielaard, J. W., van Dam, A. P., Goossens, H. and Claas, E. C. (2003). Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4016-4021.
47. Herpers, B. L., de Jongh, B. M., van der Zwaluw, K. and van Hannen, E. J. (2003). Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), 4815-4816.
48. Ratcliff, R. M., Lanser, J. A., Manning, P. A. and Heuzenroeder, M. W. (1998). Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), 1560-1567.
49. Kubista, M., Andrade, M., Bengtsson, J.M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. and Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.
50. Başustaoglu, A.C. (çev ed). (2010). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6th ed. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic.Ltd. Şti.; 37, 365-369. Horn, J. (2001). Binax and Biotest *Legionella* urinary antigen kits. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1682.
51. Cloud, J. L., Carroll, K. C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D. R. (2000). Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1709-1712.
52. Bartie, C., Venter, S. N. and Nel, L. H. (2003). Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Research*, 37(6), 1362-1370.
53. İğnak, S., ve Gürler, B. (2012). Bir Üniversite Hastanesi Su Sistemlerinde *Legionella* Türlerinin Araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 42(3), 110-114.

54. Tablon, O. C., Anderson, L. J., Besser, R. E., Bridges, C. B. and Hajjeh, R. A. (2003). Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003; recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Report*, 53, 1-36.
55. Kim, B. R., Anderson, J. E., Mueller, S. A., Gaines, W. A. and Kendall, A. M. (2002). Literature review-efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research*, 36(18), 4433-4444.
56. Franzin, L., Cabodi, D. and Fantino, C. (2002). Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by *Legionella*. *Journal of Hospital Infection*, 51(4), 269-274.
57. Kool, J. L. (2002). Control of *Legionella* in drinking water systems: impact of monochloramine. In *Legionella* (pp. 411-418). American Society for Microbiology.
58. Kantaroğlu, Ö. (2006). Sıhhi tesisat sistemlerinde lejyonella hastalığı. *Tesisat Mühendisliği Dergisi*. 93, 53-58.
59. Maiwald, M., Helbig, J. H. and Luck, P. C. (1998). Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *Journal of Microbiological Methods*, 33(1), 59- 79.
60. Sağlık Bakanlığı. (2014). *Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Suda Legionella Türlerinin Tanımlanması*. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Yayın No:965, Ankara.
61. Kwaik, Y. A., Gao, L. Y., Stone, B. J., Venkataraman, C. and Harb, O. S. (1998). Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied Environmental Microbiology*, 64(9), 3127-3133.
62. Surman-Lee, S., Fields, B., Hornei, B., Ewig, S., Exner, M., Tartakovsky, I. and Fourrier, P. (2007). Ecology and environmental sources of *Legionella*. *Legionella and the Prevention of Legionellosis*, 29-38.
63. Hlady, W. G., Mullen, R. C., Mintz, C. S., Shelton, B. G., Hopkins, R. S. and Daikos, G. L. (1993). Outbreak of Legionnaire's disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology. *American Journal of Epidemiology*, 138(8), 555-562.
64. Memish, Z. A., Oxley, C., Contant, J. and Garber, G. E. (1992). Plumbing system shock absorbers as a source of *Legionella pneumophila*. *American Journal of Infection Control*, 20(6), 305-309.
65. Baskerville, A., Fitzgeorge, R. B., Broster, M. and Hambleton, P. (1983). Histopathology of experimental Legionnaires' disease in guinea pigs, rhesus monkeys and marmosets. *The Journal of pathology*, 139(3), 349-362.
66. Salyers, A. A. and Whitt, D. D. (1994). Legionnaires disease. *Bacterial Pathogenesis*. American Society for Microbiology, 301-305.
67. Marston, B. J., Lipman, H. B. and Breiman, R. F. (1994). Surveillance for Legionnaires' disease: risk factors for morbidity and mortality. *Archives of Internal Medicine*, 154(21), 2417-2422.

68. Hayden, R. T., Uhl, J. R., Qian, X., Hopkins, M. K., Aubry, M. C., Limper, A. H. and Cockerill, F. R. (2001). Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2618-2626.
69. Ta, A. C., Stout, J. E., Yu, V. L. and Wagener, M. M. (1995). Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2118-2123.
70. Reinthaler, F. F., Sattler, J., Schaffler-Dullnig, K., Weinmayr, B. and Marth, E. (1993). Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1213-1216.
71. Türetgen, I., Göksay, D. and Cotuk, A. (2009). Comparison of the microbial load of incoming and distal outlet waters from dental unit water systems in Istanbul. *Environmental Monitoring and Assessment*, 158(1-4), 9-14.
72. Nakipoğlu, Y. ve Gürler, B. (2000). İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde kullanılan sularda *Legionella* cinsi bakterilerin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30, 97-104.
73. Chaudhry, R., Sreenath, K., Arvind, V., Vinayaraj, E. and Tanu, S. (2017). *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in the Water Facilities of a Tertiary Healthcare Center, India. *Emerging Infectious Diseases*, 23(11), 1924-1925.
74. Teresa, F., Chiara, M., Salvatore, A., D., Cinzia, C., Giuseppina, C., Angela, R., Paola, D., C., Mario, P. and Anna, G. (2019). Article Cluster of Legionnaires' Disease in an Italian Prison, 16(11), 2062.
75. İğnak, Ş. (2007). İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi su sistemlerinde *Legionella* cinsi bakterilerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
76. Erandaç, M. ve Elaldı, N. (2001). Hastane musluk ve duş sularında *Legionella* cinsi bakterilerin araştırılması. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 23(2), 81-83.
77. Sabrià, M., Mòdol, J. M., Garcia-Nunez, M., Reynaga, E., Pedro-Botet, M. L., Sopena, N. and Rey-Joly, C. (2004). Environmental cultures and hospital-acquired Legionnaires' disease: a 5-year prospective study in 20 hospitals in Catalonia, Spain. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 25(12), 1072-1076.
78. Erdogan, H. ve Arslan, H. (2007). Colonization of *Legionella* species in hotel water systems in Turkey. *Journal of Travel medicine*, 14(6), 369-373.
79. Türetgen, I., Sungur, E. I. and Cotuk, A. (2005). Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 100(1-3), 53-58.

79. Polat, Y., Ergin, C., Kaleli, I. ve Pinar, A. (2007). Investigation of *Legionella pneumophila* seropositivity in the professional long distance drivers as a risky occupation. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 41(2), 211-217.
80. Alim, A., Hakgüdener, Y. ve Poyraz, O. (2002). *Legionella pneumophila* in thermal pools of hot springs in the central Anatolian district. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 36(3-4), 237-246.
81. Uzel, A., Uçar, F. and Hameş-Kocabaş, E. E. (2005). Prevalence of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water distribution systems in Izmir province of Turkey. *Apmis*, 113(10), 664-669.
82. Afacan, G., Yumuk, Z., Baskın, Y. ve Balıkçı, E. (2006). Turistik bölgelerden alınan su örneklerinde *Legionella pneumophila* serogrup 2-14 sıklığı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 36(4), 214-218.
83. Collins, S., Stevenson, D., Walker J. and Bennett, A. (2018). Evaluation of *Legionella* real-time PCR against traditional culture for routine and public health testing of water samples, *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1692-1703.
84. Zeybek, Z., Türetgen, I., Erdem, A. K., Filoğlu, G. and Çotuk, A. (2009). Profiling of environmental *Legionella pneumophila* strains by randomly amplified polymorphic DNA method isolated from geographically nearby buildings. *Environmental Monitoring and Assessment*, 149(1-4), 323-327.
85. William, J. J., Patrick, K., Jjemba, Z. B. and Mark, W. L. (2018). Occurrence of *Legionella* in Nonpotable Reclaimed Water, *Journal American Water Works Association*, 15-27.
86. Nazarian, E. J., Bopp, D. J., Saylor, A., Limberger, R. J. and Musser, K. A. (2008). Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(2), 125-132.
87. Elverdal, P. L., Jørgensen, C. S., Krogfelt, K. A. and Uldum, S. A. (2013). Two years' performance of an in- house ELISA for diagnosis of Legionnaires' disease: Detection of specific IgM and IgG antibodies against *Legionella pneumophila* serogroup 1, 3 and 6 in human serum. *Journal of Microbiology Methods*, 94(2), 94- 97.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : HEDEF, Hakan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 02.10.1987, Ankara
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 554 738 54 84
 e-mail : hakanhedef@hotmail.com



Eğitim

| Derece | Eğitim Birimi | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|------------------------------|------------------|
| Yüksek Lisans | Gazi Üniversitesi / Biyoloji | Devam ediyor |
| Lisans | Gazi Üniversitesi / Biyoloji | 2010 |
| Lise | Rauf Denктаş Lisesi / | 2004 |

İş Deneyimi

| Yıl | Yer | Görev |
|------------|------------------------------|---------------------|
| 2014-Halen | Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü | Araştırma Görevlisi |
| 2013-2015 | Muş Halk Sağlığı Müdürlüğü | Proje Asistanı |

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- Hedef, H. ve Yüksekdağ, Z. (2019, Nisan 20-23). Bina Su Sistemlerinde *Legionella* Bakteri Kolonizasyonunun Kültür Ve Realtime PCR Yöntemiyle Araştırılması. *1.Uluslararası 23 Nisan Multidisipliner Çalışmalar Kongresi Kitabı*, 386-387, Ankara.

Hobiler

Koşu, Sinema, Kamp



GAZİ GELECEKTİR..