

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**KLİNİK BELİRTİLİ KÖPEKLERDE LEGİONELLA
PNEUMOPHİLA SG 1 VARLIĞININ KÜLTÜR, PCR VE
ÜRİNER ANTİJEN ARANMASI YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

VET. HEKİM SEMİHA (AKSEL) YALÇIN

**DANIŞMAN
PROF. DR. ATİLLA ILGAZ**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

16 / 03 / 2010

Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Enstitü Müdürü (Vekil)

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Mikrobiyoloji Abd.
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji Abd.
Tez Sahibi : Semiha AKSEL YALÇIN
Tez Başlığı : Klinik Belirtili Köpeklerde Legionella Pneumophila SG I Varlığının Kültür, PCR ve Üriner Antijen Aranması Yöntemleri ile Araştırılması
Sınav Yeri : İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.
Sınav Tarihi : 17 / Şubat / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Atilla ILGAZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.) (Danışman)
2. Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN (Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.)
3. Prof. Dr. Seyyal AK (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.) (Tez İzleme Komitesi Üyesi)
4. Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.)
5. Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Abd.) (Tez İzleme Komitesi Üyesi)

BEYAN

iii

BEYAN

İTHAF

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

Bu tez çalışmamı, başta hayatımdaki en güzel hediyem canım oğlum Gökay'a, yetişmemde ve bu günlere gelmemde sonsuz emek veren annem Feriye AKSEL, babam Harun AKSEL, dedem Mehmet Sinan YALÇIN'a ithaf ediyorum.

Vet. Hekim Semiha (AKSEL) YALÇIN(İmza)



İTHAF

Bu tez çalışmamı, başta hayatımdaki en güzel hediyem canım oğlum Gökay'a, yetişmemde ve bu günlere gelmemde sonsuz emek veren annem Ferdane AKSEL, babam Harun AKSEL'e ve kardeşlerime, verdiği sonsuz destekten dolayı eşim Mehmet Sinan YALÇIN'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana olan desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sonsuz saygı duyduğum, değerli danışmanım Anabilim Dalı Başkanımız hocam Sn. Prof. Dr. Atilla ILGAZ' a,

Doktora eğitimim süresince birçok konuda yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocalarım Sn. Prof. Dr. Seyyal AK' a ve Sn. Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR' e,

Eğitimim süresince ilgi ve desteğini hep hissettiğim bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Sn. Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ'a,

Doktora eğitimim boyunca birçok konuda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sn. Doç. Dr. Serkan İKİZ'e ve Sn. Doç. Dr. A. Funda BAĞCIGİL'e,

Doktora eğitimim süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sn. Dr. Kemal METİNER' e, arkadaşlarım, Sn. Belgi DİREN SİĞİRCİ' ya, Sn. Sedat ÇAYUKLİ' ye, Sn. Seda MAVİLİ' ye, teknisyenimiz Sn. Gülten KARAKUZ' a,

Referans suşumu sağlayan, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Sn. Prof. Dr. Ayşin ÇOTUK başta olmak üzere Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine,

Hayatıma girdiği andan bu yana bana güç veren oğlum Gökay'a ve eğitimim süresince desteklerini benden esirgemeyen tüm aile bireylerime sonsuz teşekkür ederim.

Semiha (AKSEL) YALÇIN

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-99/15122006

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hastalığın Tanımı, Tarihçesi ve Etkenin Sınıflandırılması	3
2.2. Etken Özellikleri	5
2.3. Epizootiyoloji	8
2.4. Patogenez	16
2.5. Klinik Bulgular	18
2.6. Tanı	21
2.7. Koruma Kontrol ve Sağaltım	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. GEREÇ	27
3.1.1. ÖRNEKLER	27
3.1.1.1. Kan Örnekleri	27
3.1.1.2. Kan serumu örnekleri	27
3.1.1.3. İdrar örnekleri	27
3.1.2. Besiyerleri	28
3.1.2.1. Buffered charcoal yeast extract agar base	28
3.1.2.2. Besiyeri saplementleri	28
3.1.3. Referans Suş :	29
3.1.4. Legionella Latex Test	29
3.1.5. Pediatrik lizis izolatör tüp	29
3.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	30

3.1.6.1. QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kiti	30
3.1.6.2. <i>Legionella pneumophila</i> amplifikasyon kiti	30
3.1.6.3. Hot–start MB Taq DNA Polymerase enzimi	30
3.1.6.4. Diğer gereçler	30
3.1.7. ELISA	31
3.1.7.1. Üriner Antijen ELISA Kiti	31
3.1.7.2. ELISA okuyucusu	32
3.2. YÖNTEM	32
3.2.1. KÜLTÜR	32
3.2.1.1. İdentifikasyon çalışmaları	32
3.2.2. PCR	33
3.2.2.1. Serum örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	33
3.2.2.2. Pozitif kontrol hazırlanması	34
3.2.2.3. DNA amplifikasyonu	34
3.2.2.4. Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA'nın Saptanması	35
3.2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi	35
3.2.3. ELISA	35
3.2.3.1. Sonuçların değerlendirilmesi	36
4. BULGULAR	44
4.1. Kültür Bulguları	44
4.2. PCR Bulguları	44
4.3. ELISA Bulguları	45
5. TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	53
ETİK KURUL KARARI	62
ÖZGEÇMİŞ	63

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1: Örneklerin alındığı yerler, köpeklerin sahiplilik durumu, yaş, ırk, cinsiyetleri ve klinik bulguları	37
---	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2-1: *Legionella pneumophila* sg1 ATCC 33152 mikroskopik görünümü ... 8
- Şekil 4-1: *Legionella pneumophila* sg1 ATCC 33152 mikroskopik görünümü .. 44
- Şekil 4-2: PCR sonrası elektroforezde şekillenen bantların görüntüsü..... 45

ÖZET

(AKSEL) YALÇIN, S. Klinik Belirtili Köpeklerde *Legionella pneumophila* SG1 Varlığının Kültür, PCR ve Üriner Antijen Aranması Yöntemleri İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2010

Bu çalışmada, solunum yolu semptomları olan köpeklerde *L. pneumophila* serogrup 1 etkeninin varlığı Türkiye’de ilk kez araştırıldı.

Solunum sistemi hastalığı semptomları gösteren 96 adet köpekten bakteriyolojik, PCR ve ELISA incelemeleri yapmak için sırasıyla kan, serum ve idrar örnekleri alındı. Kültür amacıyla pediatrik lizis izolatör (Oxoid) tüplere alınan kanlardan BCYE agara ekimler yapıldı. Etken identifikasyonu amacıyla legionella lateks aglütinasyon kiti (Oxoid) kullanıldı. Serum örneklerinden DNA ekstraksiyonları QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kiti (Qiagen) ile yapıldı ve örnekler bakterinin *mip* geni varlığı yönünden PCR yöntemiyle incelendi. İdrar örneklerinde bakteriyel antijen varlığı ELISA kiti (Diagnostic Automation,INC) ile incelendi. İncelenen tüm örneklerin kültür, PCR ve ELISA testleri sonucunda negatif olarak saptandı.

Legionellozis, legionella türleri içerisinde özellikle *Legionella pneumophila* serogrup 1 tarafından oluşturulan, başta insanlar olmak üzere hayvanlarda da görülebilen bakteriyel bir enfeksiyondur.

Hayvanlarda Legionelloz enfeksiyonlarının varlığı hakkında oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada İncelenen örneklerde negatif sonuçların bulunmasında, örnek sayısı, örnek türü, mevsim faktörünün etkili olabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde özellikle pet hayvanlarında bu konu hakkında daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği, kliniklere solunum sistemi sorunları ile getirilen, etkeni belirlenemeyen olgularda legionellozisin de araştırılmasının hastalığın varlığının belirlenmesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Legionella pneumophila*, Köpek, PCR, ELISA, Kültür

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-99/15122006

ABSTRACT

(AKSEL) YALÇIN, S. The Investigation of *Legionella pneumophila* SG1 presence in Clinical symptomed dogs by Culture, PCR, and Urinary Antigen methods. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Microbiology, Doctorate Thesis. İstanbul. 2010.

In this study, dogs with respiratory symptoms were examined for the precense of *L. pneumophila* serogrup 1, for the first time in Turkey.

Blood, sera and urine samples were collected from 96 dogs with respiratory symptoms for bacteriological, PCR, and ELISA examinations, respectively. For culture, blood samples collected with pediatric lysis isolator tubes (Oxoid) were inoculated to BCYE agar. Latex agglutination kit (Oxoid) was used for the identification. The DNA extraction was made from serum samples by using QIAamp DNA Mini extraction kit (Qiagen) then the samples were examined for the presence of Mip gene by PCR. The presence of bacterial antigen in urine samples were examined with a ELISA kit (Diagnostic Automation,INC). As the results of culture, PCR and ELISA tests all the samples were found to be negative.

Legionellosis is a bacterial infection which is generated especially by *Legionella pneumophila* serogroup 1 among all legionella species and can be seen particularly in humans and also in animals.

There are very limited studies on the occurrence of Legionellosis in animals. The number and type of the samples collected and seasonal factors might have been played a role for the negative result obtained in this study. In conclusion, it seems like further studies on this disease are needed especially for pet animals, and for the determination of the disease status in our country each case including respiratory symptoms and indeterminate infectious agents should be examined for the presence of legionella species.

Key Words: *Legionella pneumophila*, Dog, PCR, ELISA, Culture

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. T-99/15122006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Legionella infeksiyonları, başta insanlar olmak üzere hayvanlarda da görülen akut, infeksiyöz karakterde bir hastalıktır. Legionellozis yüksek ateş, halsizlik, kilo kaybı ve genel pneumoni ile karakterize olup, etkeni *Legionellaceae* familyası içinde yer alan *Legionella pneumophila*'dır. Özellikle immun sistemi baskılanmış bireylerde infeksiyona yol açan etken, başta su kaynakları olmak üzere doğal çevrede yaygın olarak bulunmaktadır.

1940'lı yıllarda Riketsiya benzeri mikroorganizmalar olarak bilinen legionella cinsi mikroorganizmalar, 1976 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Philadelphia'da bir otelde Amerikan Lejyoner askerlerinin yaptığı bir toplantı sırasında ortaya çıkan salgından sonra, toplantıya katılan Lejyonerlerden "Legionellozis" adını almış, etkenin adı da *Legionella pneumophila* olarak belirlenmiştir.

L. pneumophila özellikle immun sistemi baskılanmış bireylerde bakteriyel pneumoniye yol açan etkenlerden biridir. Etken özellikle doğal su ekosistemlerinde; tatlı sularda, akarsu ve göllerde bulunmakla birlikte tüm doğal çevrede sıklıkla bulunur. Bu su kaynaklarında bulunan mavi-yeşil alglerde, amipler ve siliyalı protozoonlar içerisinde intrasellüler olarak üreyebilir. Bu sayede ısıya, asiditeye, yüksek osmolariteye karşı daha dayanıklıdır. Bunun yanında etken, havalandırma ve soğutma sistemlerinden, duş başlıkları ve musluklar gibi su dağıtım sistemlerinden de birçok kez izole edilmiştir. İnsan yapı sistemlerinde özellikle zamanla oluşan biyofilm tabakası içerisinde daha yoğun konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bulaşma hava yoluyla etrafa dağılan legionella ile kontamine su zerreciklerinin inhalasyonu ya da kontamine sıvıların aspire edilmesi ile meydana gelir. Ayrıca, etkenle kontamine sularla teması sonrasında oluşan yara infeksiyonları, nadiren kan yoluyla bulaşma ve sindirim sistemi infeksiyonları varlığı da bildirilmiştir.

Legionella etkenlerinin doğada ve su ortamlarında yaygın olarak bulunması yurt dışında birkaç araştırmacıyı farklı hayvan türlerinin infeksiyona karşı duyarlı olabileceği düşüncesine yöneltmiştir. Araştırmalar, evcil hayvanlardan at, sığır, domuz, koyun, keçi, köpek ve tavşanda, yabani

hayvanlardan da antilop su bufalosu, deve ve güvercinlerde infeksiyonu serolojik olarak ortaya çıkarmıştır. İtalya'da bir buzağıda görülen ve etkeni *L. pneumophila* olarak belirlenen Legionellozis olgusunda şekillenen klinik ve patolojik bulguların, insanlarda görülen hastalık tablosunda şekillenen bulgularla çok benzer olduğu bildirilmiştir.

Türkiye'de yapılan araştırmalarda bu etkenin sadece beşeri hekimlik ve çevresel izolatları üzerinde durulmuştur. Ülkemizde beşeri hekimlik açısından *L. pneumophila* üzerine birçok çalışma yapılmasına karşın bu konuda veteriner hekimlik ve hayvan sağlığı açısından yapılan herhangi bir araştırma mevcut değildir. Bu nedenle hayvanlarda görülen pneumoni olgularında bu infeksiyon akla gelmediği gibi sağaltımı amacıyla da herhangi bir uygulama yapılmamaktadır. Çalışmamızda köpeklerde görülen pneumoni olgularında *L. pneumophila* varlığının kültür, PCR ve üriner antijen aranması yöntemleriyle araştırılması ve bu tanı yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastalığın Tanımı, Tarihçesi ve Etkenin Sınıflandırılması

Legionelloz başta insanlar olmak üzere hayvanlarda da görülebilen, pneumoni tablosundan ölüme kadar gidebilen, başta *Legionella pneumophila* olmak üzere diğer legionella türlerinin de oluşturduğu, akut karakterde, bakteriyel bir enfeksiyondur (33,51,90).

Legionella'lar 1940'lı yıllarda Riketsiya benzeri mikroorganizmalar olarak bilinmekteydi (75,90). Joseph Mcdade ve arkadaşları 1947 yılında solunum yetmezliği bulunan bir hastadan izole ettikleri, Riketsiya benzeri mikroorganizma olarak adlandırdıkları ve sınıflandırılmayan etkenin legionella cinsi ile aynı özellikleri taşıdığını 1979 yılında bir dergide rapor halinde yayınlamışlardır (45,59). Legionella ilk olarak 21-24 Temmuz 1976 tarihinde Philadelphia'da 70 yıllık geçmişi olan The Bellevue Stratford Hotel'de gerçekleşen Amerikan Lejyonları Pensilvanya Departmanı'nın 58. geleneksel yıllık toplantısı esnasında ortaya çıkan zatürre salgınından sonra tanımlanmıştır (19,45,85). Toplantıya yaklaşık 4400 üye katılmış, salgına yakalanan 182 kişiden 147'si (%81) hastaneye kaldırılmış, hastaneye kaldırılanlardan 29 kişi (%16) hayatını kaybetmiştir. Uzun incelemeler sonucu salgından yaklaşık 6 ay sonra etken, Center of Disease Control'de çalışan Dr. Joseph Mcdade ve arkadaşları tarafından ölen kişilerin akciğerlerinden izole edilmiştir (35,45,87). Hastalık, bu toplantıya katılan Lejyoner'lerden dolayı Legionellozis olarak isimlendirilmiş ve etken adı da *Legionella pneumophila* olarak belirlenmiştir (73,78,90). "Legion" kelimesi Amerikan Lejyonlarından, "pneumo" Yunanca akciğer kelimesinden, "philos" ise Yunanca seven kelimesinden gelmektedir (86).

Broad caddesinde bulunan Bellevue Stratford Hotel'de ortaya çıkan bu salgından sonra 1 Temmuz-18 Ağustos tarihleri arasında, otel ile çok yakın ilişkisi olmayan ve epidemi sırasında otel binasına giriş çıkışı olmamış, otel binasına bir blok mesafelik alanda bulunan 39 farklı kişide de Legionellozis şekillenmiştir. O dönemde bu hastalığa Broad Street Pneumoni'si de denmiş, Philadelphia halkı arasında hastalık büyük yankı uyandırmıştır (85).

Geriye dönük yapılan çalışmalarda; 1965 yılında Washington'da bir psikiyatri hastahanesinde 51 kişinin akciğer hastalığına yakalanıp 15'inin ölmesiyle sonuçlanan salgında, hastaların %85'inde etkenin *L. pneumophila* olduğu belirlenmiştir. Bu bilinen ilk legionella salgınıdır. Ayrıca 1968 yılında Michigan eyaletinde 144 kişi, legionella etkenlerinin neden olduğu belirlenen pontiac ateşine yakalanmış, ölüm olgusu görülmemiştir. Bu olguların dışında İngiltere'de bir hastanede 1985 yılında görülen pneumoni salgınında ise hastalığa yakalanan 68 kişiden 22'si hayatını kaybetmiştir. Yine Madrid'in Alcala de Henares şehrinde 11 Eylül-18 Ekim 1996 tarihleri arasında meydana gelen salgında etkenin *L. pneumophila* serogrup 1 ve kaynağının çevredeki soğutma kuleleri olduğu belirlenmiştir. Bu salgında 197 kişi pneumoniye yakalanmış, 11 kişi hayatını kaybetmiştir. Bir çok kişi de hastalığı grip benzeri bulgularla seyreden pontiac ateşi formunda geçirmiştir. Bu salgın Avrupa'da meydana gelen en büyük legionella salgınıdır (45).

Legionella pneumophila, *Protobacteria* sınıfının, gamma-2 alt grubunun, *Legionellales* takımının, *Legionellaceae* familyasında, *Legionella* cinsine ait bir türdür (64,86). *Legionellaceae* familyasında legionella cinsine ait 50'den fazla tür, en az 70 serogrup bulunmaktadır (55,64,83). Klinik araştırmalar temel alınarak bunlardan 20'den fazla legionella türünün insanlarda enfeksiyona neden olduğu saptanmıştır (83). Son yıllarda yapılan DNA-DNA hibridizasyon analizleri ve elektroforetik enzim değişkenliği çalışmalarına dayanarak *L. pneumophila*'nın; *L. pneumophila subsp. pneumophila*, *L. pneumophila subsp. fraseri* ve *L. pneumophila subsp. pascullei* olmak üzere 3 alt türü belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan serolojik çalışmalarla *L. pneumophila*'nın, çoğu *L. pneumophila subsp. pneumophila* alt türüne ait olan 15 serogrubu bulunduğu belirlenmiştir (49).

Bir çok legionella türü insanlarda enfeksiyon oluşturabilmesine karşın bunların içinde en patojen tür *L. pneumophila*'dır (10,20,24,49,83). *L. pneumophila* enfeksiyonlarından ise en fazla *L. pneumophila* serogrup 1 sorumludur (1,20,48,77,83). Bunun yanında serogrup 1'den sonra en fazla serogrup 4 ve 6 (20) olmak üzere serogrup 2, 3 ve 5 tarafından da enfeksiyonlar şekillenebilmektedir (48). Yaklaşık olarak legionella enfeksiyonlarının %75'i

L. pneumophila serogrup 1 tarafından oluşturulurken, %20- 30'u *L. penumophilanın* diğer serogrupları tarafından oluşturulmaktadır. %5-10'u ise diğer legionella türleri tarafından oluşturulmaktadır. Birden fazla legionella türünün katıldığı infeksiyonlar da bildirilmiştir (55).

2.2. Etken Özellikleri

Legionella cinsi bakteriler, intraselüler olarak çoğalabilen, gram negatif, sporsuz, kapsülsüz, flagellaları sayesinde aktif hareketli, 0,3-0,9 µm kalınlığında ve 2-20 µm uzunluğunda kokobasillerdir (50,87). Mikroskopik olarak ilk izolasyonlarında ve dokulardan direkt olarak hazırlanan preparatlarda pleomorfik kısa çomaklar halinde, kültürden yapılan preparatlarda ise filamentöz yapıda daha uzun basiller olarak görünürler (87). Gram negatif bakterilerdir ancak Gram boyama ile zayıf boya alırlar. Gümüşleme (Silver impregnation, gümüş ile işleme) ve giemsa boyama teknikleri ile daha iyi boyanırlar (60,90). (Şekil 2.1.) *Legionella oakridgensis* hariç tüm legionella türleri hareketlidir. *L. pneumophila*'nın in vivo ve in vitro ortamlarda polar ve lateral flagellalar (90) ile fimbrialarının bulunduğu ve ruthenyum kırmızısı ile yapılan boyamalarla da ekstraselüler bir asit polisakkarit tabakasının varlığı saptanmıştır (87).

Legionellalar aerobik bakterilerdir. 35-37 °C'lerde üreyebilir (55) ancak optimal üreme ısıları 35 °C'dir ve %2,5-5 oranında CO₂ içeren nemli ortamlarda daha iyi üreme gösterirler (34,85). Etken 28-40 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişme özelliğine sahiptir ancak 20 °C'nin altında çoğalamaz ve 60 °C ve üzeri sıcaklıklarda inaktive olur (73).

Legionella pneumophila standart besiyerlerinde üremez. Üreyebilmesi için sistein ve demir tuzlarına gereksinimi vardır. Bakterinin izolasyonu için selektif bir besiyeri olan pH'sı 6,9'a tamponlanmış buffered charcoal yeast extract agar (BCYE α agar) kullanılır (24,32,34,86,90). Ayrıca iso vitale-x ve hemoglobin ile zenginleştirilmiş Müller Hinton agar da izolasyon amacıyla kullanılabilir (34,50,85). McDade ve arkadaşları tarafından *L. pneumophila* ilk olarak embriyolu tavuk yumurtası ve kobaylar kullanılarak üretilmiş, daha sonraları ise besiyeri olarak %1 hemoglobin ve %1 iso vitale-x ilave edilmiş Müller Hinton agar kullanılmıştır (34). Feeley ve arkadaşları (34), bu besiyerini analiz etmişler ve İso vitaleX ile hemoglobinin yerine L-sistein ve çözünebilir

ferric pyrophosphat kullanılabileceğini (F-G agar) ve *L. pneumophila*'nın en iyi pH 6,9, 35 °C'de %2,5 CO₂ içeren ortamlarda üreyebildiğini saptamışlardır. Sonraki çalışmalarında ise F-G agarda protein kaynağı olarak kullanılan kazeinin asit hidrolizati yerine yeast extract ve bunun yanında besiyerinde oluşabilecek süperoksit radikallerinin ve peroksit bileşiklerinin inhibe etme özelliğinden yararlanmak amacıyla aktive edilmiş kömür kullanarak charcoal yeast extract agar besiyerini geliştirmişlerdir. Bu yeni besiyeri sayesinde, standardize edilmiş doku örneklerinden yapılan ekimlerle kolonilerin makroskopik olarak görülebilir hale gelme süresinin kısaldığı ve koloni sayısının arttığı belirlenmiştir (34).

L. pneumophila yavaş üreyen bir bakteridir. Koloniler 35-37 °C'de nemli ortamda en az 3-5 günlük inkubasyondan sonra makroskopik olarak görülebilir (50,90). Örneklerden yapılan ilk ekimlerde inkubasyon süresi 10 güne kadar uzayabilir (55,85). *L. pneumophila* 3-5 mm çapında gri kaygan yapıda koloniler oluşturur. Bu koloniler stereo mikroskop altında ışığın düzensiz kırılması sonucunda tipik kesik cam şeklinde görülürler (55,90). *L. anisa*, *L. dumaffi*, *L. gormanii* ve *L. tucsonensis* gibi bazı legionella türleri kolonileri ultraviyole ışık altında otoflouresans gösterirler (60).

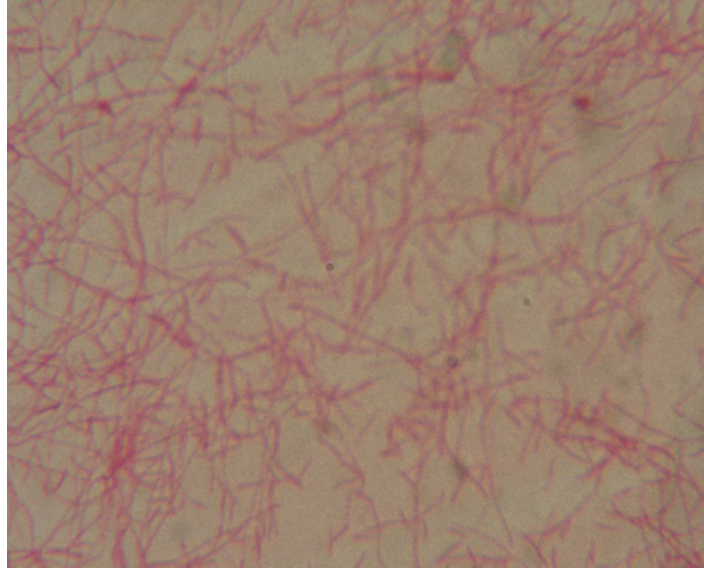
L. pneumophila katalaz enzimine sahiptir ancak zayıf reaksiyon verir. Oksidaz negatif ya da zayıf pozitif (45,85,90), üreaz ve nitrat negatiftir. Jelatinaz enzimine sahiptir ve jelatini eritir. Hippurati hidrolize eder ve bu özelliği ile diğer legionella türlerinden ayrılır. B-laktamaz aktivitesi vardır. Tirozin içeren yeast extract agar besiyerinde besiyeri üzerine yayılabilen melanin benzeri kahverengi pigment oluşturur (45,86). Karbonhidratları fermente etme yeteneği yoktur, nişastayı hidrolize eder (50,85). Kemoorganotropik bir bakteridir ve aminoasitleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanır (90). Legionella türleri hemolizin, proteaz, esteraz, endonükleaz, fosfataz ve aminopeptidaz gibi birçok enzim üretirler (86). Bunun yanında *L. pneumophila* çeşitli bakteriyel toksinlere de sahiptir (87).

L. pneumophila hücre içi bir patojendir. Etken lizozim enzimine dirençlidir ve Proteinaz ve sitotoksin üretir. Doğada amip ve protozoonlarda ve canlılarda makrofaj ve kanda bulunan monositlerde çoğalma yeteneğine sahiptir ve bu

yeteneği kazandıran çeşitli virülens faktörlerini içerir (52,65). Hortwitz (40), *L. pneumophila*'nın monositlerde fagozom-lizozom füzyonunu inhibe etme özelliğini saptamıştır (40). Yine Hortwitz ve Maxfield (41), *L. pneumophila*'nın fagozomun asit etkisini inhibe edici özelliğini belirlemişlerdir (41). *L. pneumophila*'nın fagositler içerisinde çoğalabilme yeteneği *macrophage infectivity potentiator (mip)* gen tarafından kodlanan virulens faktörüyle ilgilidir (68). Bu virulens faktörü 24 kDa'luk yüzey proteinidir ve bu proteinden yoksun suşlarda infeksiyon oluşturma yeteneğinde 80 kat azalma görülür (30,52). Son yapılan çalışmalarla *L. pneumophila*'nın bu toksin ve enzimlerinin yanısıra dotH, dotI, dotO, dotA (2), nudA (28), lvgA (27) adı verilen genler tarafından kodlanan ve hücre içerisinde gelişim yeteneğini artıran yeni virülens faktörlerini kazandığı da saptanmıştır.

L. pneumophila gram negatif bakterilerin karakteristik özelliği olan ve yapısal olarak bakterilere endotoksik etki özelliği kazandıran lipid A, serotip spesifitesini belirleyen O-antijenik yan zincir ve polisakkarit kısımlarından oluşan (67), ısıya oldukça dayanıklı lipopolisakkarit (LPS) antijenine sahiptir (60,87,90). Ancak bu lipopolisakkarit tabaka diğer gram negatif bakterilerin LPS tabakasından farklı özellik gösterir (44,67). *L. pneumophila*'nın LPS tabakasındaki dallanmış yağ asidi zincirleri baskın olmasına karşın, diğer gram negatif bakterilerde lipid A tabakasının genel yapısal komponentini oluşturan hidroksi yağ asitleri bulunmamaktadır yada çok düşük miktarlarda bulunmaktadır (67). LPS tabaka *L. pneumophila* serogrup 1'de majör dış membran proteinine (MOMP) sıkıca bağlanmış yapıdadır (87). Majör dış membran proteini *L. pneumophila*'da yaygın çapraz disülfid bağlarıyla şekillenmiştir ve bu özellik, bir intraselüler patojen olan *Chlamydia* türlerinde de görülmesiyle dikkat çeker (67,87).

Legionellalar aside dirençli değildir ve dezenfektanlara duyarlıdır ancak suda 4 ile 25 °C'lerde 4-5 ay ile bir yıla kadar canlılığını koruyabilir. Oda ısısında 7 ay saklanan toprakta *L. pneumophila*'ya rastlanmıştır (60).



Şekil 2-1: *Legionella pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 BCYE agarda oluşan kolonilerden yapılan giemsa boyama ile bakterinin mikroskopik görünümü

2.3. Epizootiyoloji

L. pneumophila nehirler ve göller gibi doğal su kaynaklarında ve soğutma kuleleri ve kaplıcalar gibi (42) insan yapımı su sistemlerinde yaygın olarak bulunan bir bakteridir (1,38,55). İnsan yapımı su sistemlerinde yüksek konsantrasyonlarda, doğal çevrede ise daha düşük konsantrasyonlarda bulunur (86).

L. pneumophila çevresel su kaynaklarında, su içerisinde serbest halde, mavi-yeşil algler ve amip ve protozoonlar içinde ve zamanla oluşan biyofilm tabakası içerisinde olmak üzere üç farklı şekilde bulunabilir (45). *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türleri dahil (72), amiplerin 15 türü ve silialı protozoonların *Tetrahymena sp.* ve *Cyclidium sp.* (87) olmak üzere 2 türü legionellalar için potansiyel bir konaktır (86). Etken mavi-yeşil algler ile amip ve kamçıllı protozoonların karbon ve enerji kaynaklarını kullanarak çoğalır, besin kaynağı azalınca ve sayıca belirli bir yoğunluğa ulaşıncaya bu canlıları parçalayarak serbest hale geçer (38,45). İntrasellüler bir bakteri olması ve amipler ve protozoonlar içerisinde simbiyotik yaşam sürdürebilmesi, asidite, yüksek osmolarite gibi olumsuz etkilere karşı *L. pneumophila*'yı daha dayanıklı kılmaktadır (45,55). Kirli sularda ve yeraltı sularında legionellalar daha çok

bulunmaktadır (60). Doğal kaynaklar yada insan yapımı su sistemlerinde zamanla oluşan kir, sediment ve bu tabaka içerisindeki besinsel birikimler ile çevresel mikroflora bakterinin yüzeylere tutunması ve çoğalabilmesi için uygun ortamı sağlamaktadır (86). Klorun ve biyositlerin bu biyofilm tabakası içerisine girişinin çok zayıf olması nedeniyle de bakteri bu maddelere karşı bir direnç geliştirmektedir (38,45).

Bulunduğu ortamın sıcaklığı *L. pneumophila*'nın gelişme ve çoğalma yeteneğini etkilemektedir. Etken, 0-20 °C'de üreyemez fakat canlılığını korumaktadır. Üreme özelliği 20-25 °C'de çok düşük orandadır. Bakterinin çoğalabilmesi için 25-42 °C'ler uygun ısılardır ve 37 °C'de uygun şartlarda oldukça hızlı çoğalmaktadır. Bakteri, 50 °C'de birkaç saat, 60 °C'de birkaç dakika canlılığını korur ve 70 °C'de ise korozyon, sistemin proje yapısı gibi ortamın şartlarına bağlı olmakla beraber yaşama şansı yoktur (45).

Legionellaların gelişimini etkileyen faktörler arasında ortam rutubet oranı da önem taşımaktadır. Yapılan araştırmalarla *L. pneumophila*'nın %55 alt sınır olmak üzere artan nem oranlarında canlılıklarını koruyabildikleri ve daha kolay geliştikleri saptanmıştır (60,90).

Doğal su kaynaklarında düşük konsantrasyonlarda bulunan legionellalar şebeke suyuna az sayıda geçmektedir fakat bulundukları su sistemlerinde suyun durgun olduğu bölgeler ve ölü boşluklar gibi üremeleri için uygun ortam bulduklarında sayıca artmaktadırlar (72). Buna bağlı olarak *L. pneumophila*, en fazla sıcak-soğuk su sistemleri, su tankları, sıcak su muslukları, duş başlıkları, oda nemlendiricileri, kaplıcalar, termal banyolar, çamurlar ile soğutma kuleleri ve klima cihazlarının suyunda bulunmaktadır ve etkenin yayılmasında bu su dağıtım sistemleri önemli rol oynamaktadır (45,73,86). Enfeksiyonun bulaşma şekli insanlarda görülen salgınlarda incelenmiştir (60). Bulaşma, *L. pneumophila* ile kontamine suyun su dağıtım ve soğutma sistemleriyle aerosolize hale gelerek ortama yayılması sonucu bakteriyi içeren su damlacıklarının inhalasyonu ya da aspirasyonu ile meydana gelmektedir (56,57,68,82). Bu su damlacıkları içerisinde legionellalar ortamda 2 saatten fazla kalabilirler (72). Etkeni içeren su damlacıklarının bulunduğu havanın solunum süresi de enfeksiyonun bulaşmasında önemli rol oynamaktadır (60). Fabbı ve arkadaşları

(33), 1997'de İtalya'da bir sığır sürüsünde bulunan yaklaşık 20 günlük olan bir buzağıda ortaya çıkardıkları *L. pneumophila* serogrup 1 ve serogrup 10'dan kaynaklanan legionella olgusunda kaynağın hayvanların beslenmesinde kullanılan elektrikli su ısıtıcısı olduğunu belirlemişlerdir. Bu ısıtıcıdan sağlanan su ile buzağıya verilen sütler sulandırılmış, bulaşmanın da bu su ile kontamine olmuş sütlerin buzağıya verilmesi esnasında aspirasyonu ile şekillendiği düşünülmüştür.

Hastalığın mortalite oranı bazı risk faktörlerine bağlı olarak %5-80 arasında değişmektedir (73). Bulaşmada da bu risk faktörleri önem taşımaktadır. Hastalığın erkeklerde görülme oranı kadınlara göre daha yüksektir. Yaş birlikte hastalığa yakalanma riski de artmaktadır (45,73). Hastalık çocuklarda nadiren görülmektedir ve olguların çoğunluğunu yenidoğanlar ve immunsuprese çocuklar oluşturmaktadır (84). Nagai ve arkadaşları (63), 1999'da Tokyo'da kişisel evinde suda doğum yapan bir annenin bebeğinde, *L. pneumophila* serogrup 6 tarafından oluşturulan Legionellozis olgusu saptamışlardır. Bu neonatal olguda 4 gün sonra genel hastalık semptomları görülmüş, 8. günde solunum ve kalp yetmezliğinden ölüm gerçekleşmiştir. Yine Kıbrısta 2008 yılında bir hastanede yenidoğan 8 bebekte *L. pneumophila*'nın neden olduğu Legionellozis olgusu bildirilmiştir (84). Bunların yanında, sigara ve alkol bağımlılığı, kronik akciğer ve kalp hastalığı, kortikosteroid gibi immunsupresif ilaç kullanımı ve immun yetmezlik, hairy-cell lösemi, organ nakilleri ve cerrahi girişimler de hastalığın oluşmasında predispoze edici faktörlerdendir (45). Saijo ve arkadaşları (79), 56 yaşında bir hastada invaziv aspergillozis olgusunu takiben şekillenen *L. pneumophila* olgusu bildirmişlerdir (79). Lück ve arkadaşları (56), 66 yaşında bir hastada böbrek transplantasyonu sonrasında şekillenen Legionellozis olgusu bildirmişlerdir. Ayrıca legionella ile kontamine aletlerle uygulanan entübasyon ve mekanik ventilasyon girişimleri de aspirasyon yoluyla hastalık oluşma riskini artırmaktadır (45,72). Legionella infeksiyonlarında insandan insana bulaşma saptanmamıştır (72).

Legionella ile ilgili salgınlar çoğunlukla yaz ve sonbahar aylarında görülmektedir (45). Olgular kaynağına göre hastane kaynaklı ve toplumdan kazanılmış olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Toplumdan kazanılmış

Legionellozis olguları seyahatle ilişkili ya da diğer yaşamsal yerlerden kaynaklanan olgulardır (45,55). Avrupa'da sadece 2006 yılında, çeşitli ülkelerde, seyahatle ilişkili toplam 921 Legionella olgusu bildirilmiştir (76).

Legionellozis sıklıkla sporadik olgular şeklinde ortaya çıkmasına karşın, kaplıcalar, hastane ve otel duşları gibi ortak kaynaklar nedeniyle büyük salgınlar da ortaya çıkabilir. Örneğin soğutma kuleleri uzak mesafelere bile kontamine aerosoller yayabilmektedir (82). Sonder ve arkadaşları (82), 2006 yılında Hollanda Amsterdam'da 31 kişinin hastalandığı ve kaynağının çevredeki soğutma kuleleri olduğu bir legionella salgınına rapor etmişlerdir. Bu salgında hastalığa yakalanan kişilerin büyük çoğunluğunun şehir merkezinde, merkez tren yolu istasyonunun yaklaşık 500 m doğusunda, 2,5-3 km'lik alanı kapsayan bir bölgede yaşamakta oldukları belirtilmiştir. Etienne ve arkadaşları (66), Belçika'da 41 farklı kreşte bulunan su ısıtıcılarından aldıkları su örneklerini incelemişler, 12 örnekten *L. pneumophila* serogrup 1, 14 örnekten serogrup 2-14, 2 örnekten ise *L. pneumophila* serogrup 1 ve serogrup 2-14 izole etmişlerdir ve ortak yaşam alanlarından biri olan çocuk kreşlerinin de hastaneler gibi bir infeksiyon kaynağı olabileceğini bildirmişlerdir.

Legionella infeksiyonlarıyla ilgili Türkiye'de hayvanlar üzerine yapılmış herhangi bir araştırma mevcut değildir. İnsanlar üzerine yapılan araştırmalar da sınırlı sayıdadır. Erdoğan ve Arslan (31), Türkiye'de 29 farklı otelden topladıkları su ve swab örneklerinden ekimler yapmışlar, 136 su örneğinin 26'sında (%19,1), 111 swab örneğinin 24'ünde (%21,6), yüksek oranda *L. pneumophila* (tüm izolatların %50'si *L. pneumophila* serogrup 6) olmak üzere çeşitli legionella türleri saptamışlardır. Türkiye'de insanlarda seyahatle ilişkili legionella olguları daha önce rapor edilmesine karşın ilk hastane kaynaklı legionella salgını Özerol ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (68). Özerol ve arkadaşları (68), Malatya'da merkezi bir havalandırma sistemine sahip olan ve salgın esnasında hiçbir dezenfeksiyon programı olmayan 8 yıllık geçmişe sahip bir eğitim hastanesinde, 4'ünün hastane personeli olduğu 6 kişide legionella olgusu bildirmişler ve hastanenin su sistemlerinden aldıkları örneklerden de *L. pneumophila* izole etmişlerdir. Yine Türkiye'de Bağdatlı ve arkadaşları (4) tarafından, hemodiyaliz hastalarından alınan serum örneklerinde indirekt

flouresan antikor yöntemiyle *L. pneumophila* antikorlarının prevalansı araştırılmış ve hemodiyaliz hastalarında görülen yüksek antikor pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

L. pneumophila sadece insanlara özgü bir patojen değildir ve bu etkenle farelerde ve kobaylarda infeksiyon oluşturulmuş ve infeksiyon sonrası ölümler görülmüştür (78). İnfeksiyon ilk olarak 1977'de McDade ve arkadaşları tarafından kobaylarda oluşturulmuştur. Kobayların da inhalasyon yoluyla infeksiyona karşı duyarlı oldukları belirlenmiş ve deneysel infeksiyon modellerinde kobaylar sıklıkla kullanılmıştır. İnfeksiyon daha sonraları maymunlarda, ratlarda ve farelerde de oluşturulmuştur (51).

Legionella bakterilerinin doğada ve çevresel kaynaklarda yaygın olarak bulunması ve insanlarda görülen legionella olguları yurt dışındaki bazı araştırmacıları hayvanların da *Legionella spp.* ile infekte olabileceği düşüncesine yöneltmiştir (6,18). İlk olarak 1978'de Page ve Lattimer (69) tarafından, komplement fikzasyon yöntemiyle sığır, koyun, at ve kobaylarda clamidya ve legionella antikorları araştırılmış, clamidya ve *Legionella pneumophila* antikorları arasında kross reaksiyon olup olmadığı incelenmiştir. Çalışma sonucunda atlarda düşük seviyede (%6) legionella antikorları saptanmış ve clamidya ve legionella arasında önemli derecede kross reaksiyon görülmemiştir. 1980 yılında Pritchard ve arkadaşları tarafından indirekt flouresan antikor test yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada 164 sığır ve 112 domuz serumunda legionella antikorlarına rastlanmamıştır (18). Collins ve arkadaşları (18) tarafından 1981 yılında, hayvan populasyonları içerisinde *Legionella pneumophila*'ya karşı oluşmuş antikorların prevalansını saptamak amacıyla farklı hayvan türlerinden alınan toplamda 2586 serum örneği mikroaglutinasyon test yöntemiyle incelenmiş ve atlarda %31,4, sığırlarda %5,1, domuzlarda %2,9, koyunlarda %1,9, köpeklerde %1,9, keçilerde %0,5 ve vahşi hayvanlarda %0 oranlarında seropozitiflik belirlenmiştir. Ayrıca insanlardan alınan 2800'den fazla serum örneğinde de %0,4 oranında pozitiflik saptanmıştır. Evcil hayvanlarla beraber kanatlılarda da infeksiyon varlığı mikroaglutinasyon testlerle serolojik olarak ortaya çıkarılmıştır (70).

Barth ve arkadaşları (6) tarafından, 50'si sığır, 50'si domuz, 48'i koyun ve 48'i at olmak üzere 196 hayvan serumunda flouresan antikor tekniğiyle, *L. pneumophila* serogrup 1-5, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii* ve *L. micdadeii*'ye karşı oluşmuş antikorları saptamak üzere yapılan araştırmada yüksek titrelerde antikor seviyeleri bulunmuştur. Çalışmada domuz serumlarının tümünde, at serum örneklerinin %88'inde, en azından bir serogrup yada türe karşı 1/16 yada daha yüksek oranlarda antikor seviyesi saptanmıştır. Koyun serum örneklerinin %100'ünde 1/32, %96'sında 1/64 dilusyonlarda, en azından bir serogrup yada türe karşı oluşmuş antikorlar belirlenmiştir. Sığır serum örnekleri ise en düşük antikor titresine sahip grubu oluşturmuştur; sığır serumlarının %38'i 1/16 ve üzeri titre göstermiş, 2 sığırdan ise (%4) en yüksek antikor seviyesi olan 1/64 titre bulunmuştur.

Daha önceki çalışmalarda atlarda görülen yüksek antikor seviyeleri, 1983 yılında Cho ve arkadaşları'nı (14) atların da *L. pneumophila* için bir konakçı olabileceği yönünde düşündürmüştür. Bundan yola çıkarak atlarda, *L. pneumophila* Philadelphia 1 ve Bloomington 2 suşlarıyla, aerosolizasyon yoluyla, deneysel infeksiyon oluşturulmuş ve şekillenen klinik bulgular gözlemlenmiştir. Klinik bulgu olarak atlarda geçici ateş, inokulasyondan 2 gün sonra lenfosit sirkülasyonunda geçici bir azalma görülmüştür. Nekropside orta derecede generalize lenfadenopati saptanmıştır. Histolojik olarak akciğerlerde alveoler çeper hücrelerinde fokal proliferasyon, birkaç nötrofil ve eozinofille karakterize hafif yangısal bir yanıt belirlenmiştir. Dokulardan yapılan boyamalarda etken görülmesine karşın, kan, nasal ve faringeal swablar ile dokulardan yapılan kültürlerden etken izole edilememiştir. Bunun yanında atlarda inokulasyondan 3-4 gün sonra *L. pneumophila* serogrup 1'e karşı şekillenen aglütinan antikorlarda artış görülmüştür. Bu çalışmada doğal olarak infeksiyona yakalanma yönünde bir kanıt olmamakla birlikte *L. pneumophila* serogrup 1 ve 3'ün atlarda patojenitesinin düşük olduğu belirtilmiştir. 1984 yılında yine Cho ve arkadaşları (15) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, serum havuzundan rastgele seçilen 106 adet at serumu örnekleri indirekt flouresan antikor testi yöntemiyle ve mikroaglütinasyon yoluyla *L. pneumophila* antikorları yönünden incelenmiş ve bu iki farklı test sonuçları arasında yüksek korelasyon ($r=0,89$) saptanmıştır. Bu çalışmada araştırma çiftliğinde bulunan

156 attan da kan serumu örnekleri alınmış ve *L. pneumophila*'nın 1'den 4'e kadar olan serogruplarına karşı oluşan antikor oranları mikroagglütinasyon testiyle incelenmiş, 29 atta (%19) en azından 1 serogruba karşı yanıt olduğu belirlenmiştir. Cho ve arkadaşları bu çalışmanın atların da legionella'ya doğal yollarla maruz kalabileceğinin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir.

Cohen ve arkadaşları (17) tarafından, İsrail'de 139'u ölü, 29'u kesime gönderilmiş sığırlardan alınan akciğer örneklerinde, kültür ve direkt immunofloresan yöntemiyle legionella varlığı yönünde araştırma yapılmış ve direk floresan antikor testiyle kadavralarda %17, kesime gönderilmiş hayvanlarda ise %4 oranında pozitiflik saptanmıştır. İki kadavranın akciğerinden ise *L. pneumophila* serogrup 1 izole edilmiştir. Ayrıca Boldur ve arkadaşları (11) tarafından farklı hayvan türlerinde indirekt floresan antikor testiyle yapılan araştırmada, süt sığırlarında %10, et sığırlarında %5, koyunlarda %4, antiloplarda %22, atlarda %35, bufalolarda %36 ve laboratuvar tavşanlarında %0 oranlarında ortalama 64 ve üzeri antikor titreleri belirlenmiştir.

Phakkey ve arkadaşları (71) tarafından Kenya'da yapılan bir araştırmada ise evcil ve vahşi hayvanlardan alınan kan serumu örnekleri mikroagglütinasyon testi yöntemiyle farklı legionella türleri ve 14 farklı serogruba karşı oluşan antikor varlığı yönünden incelenmiş, iki sığırdan *L. pneumophila* serogrup 6'ya karşı, bir köpek ve iki sığırdan *L. bozemanii* Mi-15 suşuna karşı oldukça yüksek antikor titreleri (1/256 ve üzeri) saptanmıştır. Bunun yanında keçi, sığır, domuz ve köpeklerde farklı türlere karşı oluşan antikorlar da belirlenmiştir.

Bazovská ve arkadaşları (7), 420 evcil hayvandan aldıkları serum örneklerinde mikroagglütinasyon testiyle antilegionella antikorlarının varlığını araştırmışlar, atlarda *L. pneumophila* serogrup 1-14'e karşı %36,2, diğer 19 tür legionella'ya karşı %47,8, domuzlarda %16,2 ve %21,1, sığırlarda %3,8 ve %29,5, koyunlarda %7,5 ve %11,3 oranlarında pozitif ve laboratuvar tavşanlarında ise negatif sonuçlar elde etmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla sığır, at, domuz, koyun, keçi, köpek, antilop, su bufalosu, deve ve güvercinlerde legionella infeksiyonları serolojik olarak ortaya çıkarılmıştır. Tüm hayvanlar arasında ise legionella'ya karşı en yüksek antikor prevalansı atlarda belirlenmiştir. 1987 yılında Boldur ve

arkadaşları etiolojisi bilinmeyen bir hastalıktan ölen iki sığırın akciğerlerinden *L. pneumophila* serogrup 1 izole etmişler ancak hastalıkla ilgili akciğerlerde makroskopik lezyonlar gözlemlenememiş ve hastalığın *L. pneumophila* serogrup 1'den kaynaklanıp kaynaklanmadığı belirlenememiştir. Bu olguda sığırların koma esnasında kontamine materyali aspire etmiş olabileceği de düşünülmüştür. Legionella bakterilerinin identifikasyonu ve izolasyonu güç olması, özel laboratuvar ekipmanlarının gerekliliği ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların devam etmesi nedeniyle rutin veteriner laboratuvarlarında genellikle örnekler üzerinde legionellalar ile ilgili incelemeler yapılmamaktadır. Ancak İtalya Pavia'da Zooprofilattico Sperimentale enstitüsünde hayvanlarda görülen pneumoni olgularında tanı amacıyla legionellalara özel besiyerleri rutinde kullanıma girmiştir (33).

Hayvanlarda doğal olarak ortaya çıkan, klinik belirtileri ve çevresel incelemeleri de içeren ilk olgu Fabbı ve arkadaşları (33) tarafından 20 günlük bir buzağıda bildirilmiştir. Bu olguda kuzey İtalya'da 112 başlık bir İtalyan-Fresian ırkı süt sığırı sürüsünde bir önceki kış döneminden bu yana yüksek oranda buzağı ölümleri görülmüştür. Buzağuların %40'ı zayıf olarak doğmuş ve birçoğunda pulmoner ve enterik hastalıklardan dolayı ölümler şekillenmiş, hayatta kalanlarda ise çoğunlukla düşük kondisyonlar gözlemlenmiştir. Yapılan incelemelerde sürünün zayıf hijyenik koşullarda, vitamin ve mikroelementlerden yoksun düşük proteinli bir diyet uygulamasıyla yetiştirildiği belirlenmiştir. İki gün süren şiddetli diyare, dispnea, ateş, anoreksi, zayıflık ve aşırı derecede halsizlikle karakterize klinik bulguları bulunan 20 günlük buzağıya intramuskular yolla penisilin ve streptomisin uygulaması yapılmış ancak birkaç saat sonra ölüm şekillenmiştir. Yapılan nekropside postmortem bulgu olarak akciğerlerin büyük oranda kranial loblerinde yoğun lobuler pneumoni tablosu, pulmonik bölgelerde fibrinöz pleuritis, kesit yüzeylerinde kırmızı, havasız, 0,5-1,5 cm çapında nekrotik odaklar gözlemlenmiştir. Diğer organlarda patolojik değişiklikler saptanmamıştır. Burada belirlenen histolojik ve patolojik bulguların insanlarda görülen bulgularla çok benzediği belirlenmiştir. Buzağının akciğerlerinden *L. pneumophila* serogrup 1 ve serogrup 10, karaciğerinden ise serogrup 1 izole edilmiştir. Ayrıca akciğerlerde immunoflouresans boyama ve immunohistokimyasal yöntemlerle *L. pneumophila* serogrup 1 varlığı

saptanmıştır. Aynı sürüden 112 sığır ve 30 buzağıya ait serum örnekleri alınarak *L. pneumophila* serogrup 1 yönünden indirekt flouresan antikor testi uygulanmış, IFA sonuçlarına göre 3 sığırda 1/32, 1 buzağıda 1/64, 1 sığırda 1/248 ve 1 sığırda 1/2048 oranında antikor titreleri belirlenmiştir. Görünüşte sağlıklı olan ve 1/2048 gibi yüksek bir antikor titresi gösteren 3 yaşındaki hayvanın kesimi yapılmıştır. Bu sığırda da akciğerlerde çoğunlukla kraniyal loblarda yerleşen hafif kronik pleuritisle beraber karaciğer apseleri, multifokal kronik intersitisyel nefrit tablosu gözlemlenmiş, ancak kültür ve immunohistokimyasal yolla legionella saptanmamıştır. Bu bulguların geçirilmiş bir enfeksiyondan kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Sürüde araştırmalar yapılırken çiftlikteki sıcak ve soğuk su sistemlerinden de örnekler alınarak ekimler yapılmıştır. 12 m derinliğinde bir kuyudan sağlanan suyun kullanıldığı ve içindeki suyun ısısının 43 derece olduğu elektrikli bir su ısıtıcısından alınan su örneğinden *L. pneumophila* serogrup 1 izole edilmiştir. Enfeksiyonun bulaşmasının, lezyonların çoğunlukla akciğerlerin kraniyal loblarında yerleşmiş olmasından yola çıkarak, bu ısıtıcıdan sağlanan sularla buzağuların beslenmesinde kullanılan sütlerin sulandırılarak hayvanlara verilmesi sırasında kontamine sütlerin aspirasyonu ile meydana geldiği düşünülmüştür. Ancak kobaylarda gastrointestinal sistem ve portal yolla etkenin vücuda girebildiği daha önceleri gösterilmiş olduğundan buzağının karaciğerlerinden legionella izole edilmesi portal bir girişi de düşündürmüştür. Bunların yanında alınan su örneklerinde *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türü amipler de üretilmiştir (33).

2.4. Patogenez

İnfeksiyon, solunum yoluyla, legionella ile kontamine su damlacıklarının inhalasyonu ya da kontamine suların aspirasyonu sonucu meydana gelmektedir. Mikroorganizma, ilk önce solunum yollarının ilk koruyucu mekanizması olan ve özellikle kronik akciğer hastalığı, sigara içiciliği, alkolizm gibi etkilerle yapısı bozulan mukosiliyer tabakayı epitel hücrelerine de adere olarak atlatmakta ve akciğerlerin daha alt bölümlerine geçmektedir (45,86). Alveollere kadar ulaşan mikroorganizmalar burada bulunan ve konağın birincil savunma mekanizması olan alveoler makrofajlarla karşılaşmakta ve makrofajlar

tarafından fagosite edilmektedir (2,45,86). Makrofajlar tarafından fagositoya uğrayan mikroorganizma, hücre içerisinde ribozomla ilişkili, özelleşmiş ve çevresi basit bir membranla kuşatılmış fagozomlar içerisinde alınır (86). Bu fagozomlara replikativ fagozom adı verilir ve virulent *L. pneumophila*'yı içeren fagozomlar non patojenik bakterileri içerenlere oranla daha az asidiktir (2). Bunun yanında normal endositik yolda oluşan fagozom-lizozom füzyonu gerçekleşmez böylece mikroorganizma lizozomların mikrobisidal etkisinden kurtulur (2,86). Bu sayede intraselüler parazit özelliği gösteren *L. pneumophila* makrofajlar içerisinde kolaylıkla çoğalır ve hücreleri parçalar. Makrofajları parçalayarak serbest hale geçen mikroorganizmalar, yeni hücreler tarafından fagosite edilir ve bu hücreler de *L. pneumophila* tarafından infekte edilir (45,72,86). Salgılanan toksinler ve sitokinlerin etkisiyle infeksiyon bölgesine sürekli fagositler ve T lenfositler çekilir ancak mikroorganizmalar öldürülemez ve üremelerine devam eder (72). *L. pneumophila*'ya karşı primer konak savunma mekanizması hücresel bağışıklık olduğundan kortikosteroid tedavisi gören, organ nakli uygulanan, AIDS ve hairy-cell lösemi gibi hücresel bağışıklığı baskılayan hastalıklara sahip olanlarda Legionellozis daha sıklıkla görülmektedir (86).

Yapılan çalışmalarla da humoral bağışıklığın konak savunmasında sekonder rol oynadığı gösterilmiştir (86). Bunun yanında gama interferonlarla aktive edilmiş makrofajların insanlarda *L. pneumophila*'nın hücre içi çoğalma özelliğini inhibe ettiği belirlenmiştir. Kobaylarda da formalin ile öldürülmüş *L. pneumophila*'ya karşı gecikmiş tip deri reaksiyonları şekillendiği ve makrofaj aktivasyonunun intraselüler üremeyi inhibe ettiği belirlenmiştir (65). Bunun yanında interferon gama, interleukin 12 ve interleukin 18 gibi Th1 sitokinlerinin de *L. pneumophila* ile oluşturulan infeksiyon modellerinde savunmada önemli rol oynadıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (36). Nikaido ve arkadaşları (65) tarafından yapılan bir çalışmada, subletal dozlarla *L. pneumophila* ile infekte edilmiş kobaylarda, infeksiyonun erken periyodunda, savunmada T hücrelerine bağlı immunitenin de rol oynadığı belirtilmiştir. Shinozawa ve arkadaşları (81) tarafından interferon gamadan yoksun fareler ile normal kontrol grubu fareler kullanılarak yapılan deneysel çalışmada histopatolojik olarak farklı bulgular elde etmişlerdir. Histopatolojik olarak kontrol grubunda orta derecede pneumoni tablosu gözlemlenirken, IFN-gama negatif farelerde şiddetli

pneumoni tablosu gözlemlenmiştir. IFN-gama negatif farelerde daha şiddetli olmak üzere akciğerlerde nötrofil ve lenfosit infiltrasyonu ile karakterize pulmoner lezyonlar saptanmıştır. Bu çalışmada interferon gamanın eksikliğinde yangısal immün yanıtın geciktiği ve bakteri gelişiminin arttığı ve pneumoni tablosunun oluştuğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarla deneysel infeksiyonlarda *L. pneumophila*'nın kobaylarda lobuler pneumoni oluşturduğu ve bu tablonun kısa sürede yaygınlaştığı görülmüştür (60). İnsanlarda akciğerler makroskopik olarak incelendiğinde multifokal pneumoni ile karakterize yaygın lezyonlar görülür. Akciğerlerdeki eksudat granüler yapıda ve büyük oranda fibrin içermektedir. Mikroskopik bakıda ise çoğu olguda distal alveoller ve bronşiyollerde fazla miktarda yangısal bir eksudatın olduğu görülür. Bu eksudat içerisinde polimorf nükleer nötrofiller ve makrofajlar yoğunlaşmıştır (87). Akciğer dokusunda ise yine polimorf nükleer nötrofil, makrofaj, monosit hücreleriyle karakterize, nekrotizan özellikte yangısal bir tablo şekillenmektedir. Ayrıca apse oluşumları da gözlenebilmektedir (72).

Fabbi ve arkadaşları (33) tarafından rapor edilen 20 günlük buzağıdaki *L. pneumophila* olgusunda ise histopatolojik olarak akciğerlerde akut fibrinöz ve nekrotik pneumoni tablosu gözlemlenmiş, alveollerin çoğunlukla nötrofil ve makrofajlardan oluşan yangısal hücrelerle birlikte fibrinöz bir materyalle dolu olduğu saptanmıştır. Bu olguda bronşiyol boşlukların da nötrofil ve nekrotik materyalle dolu olduğu ve bronşların etkilenmediği belirlenmiştir. Dalak ve karaciğerde ise histolojik bulgular gözlemlenmemiştir.

2.5. Klinik Bulgular

İnsanlarda *L. pneumophila*'dan kaynaklanan hastalık olguları pontiac ateşi ve pneumonik form (Legionellozis) olmak üzere iki farklı klinik tablo ile karşımıza çıkmaktadır (19,77,87). Bunların yanında pneumonik tablo ortaya çıkmaksızın sadece serumda antikor varlığı ile karakterize olan subklinik infeksiyonlar da görülmektedir (55,72).

Hastalığın pontiac ateşi formu, inkubasyon periyodu 24-48 saat olan, akut seyirli, ateş, halsizlik, baş ağrısı, kas ağrıları gibi grip benzeri bulgularla seyreden, antibiyotik tedavisi uygulanmadan yaklaşık bir hafta içerisinde kendi

kendine iyileşen formudur. Balgamsız hafif öksürük görülebilmekte ancak pneumoni tablosu görülmemekte ve akciğer radyografisinde patolojik değişiklikler bulunmamaktadır. Pontiac ateşi, legionella infeksiyonları arasında %90 ve üzeri oranlarda görülmektedir (45,73,86). Hastalığın bu hafif formunun oluşmasında, konağın bakteriye düşük konsantrasyonlarda maruz kalmış olması ya da bakteride fagositik hücrelerde çoğalabilme yetersizliğinin etkili olduğu düşünülmektedir (86). Modi ve arkadaşları (61) tarafından 2008 yılında İngilterede yüzme havuzu, kaplıca ve saunası bulunan bir otelde 6 kişide ortaya çıkan pontiac ateşi salgını bildirilmiştir. Bu salgında hastalığa yakalananların aynı tarihler arasında spa havuzunu kullandıkları belirlenmiştir. Hastalarda baş ağrısı, kas ağrıları ve ateş gibi grip benzeri smptomlar görülmüştür. Bu olguda spa havuzu tankından alınan örnekte çok düşük seviyede (1×10^2 cfu/L) *Legionella spp.* izole edilmiştir.

İnfeksiyonun ikinci ve en ciddi formu olan Legionellozis olgusunda en önemli klinik bulgu pneumoni tablosudur ve hastalığın inkubasyon periyodu 2 ile 10 gün arasında değişmektedir. Hastalık yüksek ateş, halsizlik, kas ağrıları, iştahsızlık ve hafif öksürükle başlar (45,73,86). Başlangıçta kuru olan öksürük hastalık ilerledikçe purulent balgamlı hale geçebilir (72,73). Atılan balgamda çizgi şeklinde kan görülebilir ancak yoğun kan nadiren görülür ve hastalarda göğüs ağrıları oluşabilir (73,86). Çoğu olguda hastalık, 40 °C ve üzeri ateşle seyreder (55,73). Legionellozis olgusunda gastrointestinal sisteme ait semptomlar da yaygın olarak görülmektedir. Bulantı, kusma, olguların %25-50'sinde sulu, nadiren kanlı bir diyare, %10-20 olguda da karın ağrısı görülmektedir (19,45,86). Hastalığın, yaş, immun yetmezlik, kronik akciğer hastalığı gibi predispoze edici faktörlere bağlı olarak %5-80 arasında değişen bir mortalite oranı vardır (73).

Hastalıkta baş ağrısı, letarji, mental durum değişiklikleri hatta ensefalopati gibi nörolojik belirtiler de görülmektedir (45,73,86). Nörolojik bulgulardan kofüzyon, kollaps (19), periferik nöropati ve serebellar ataksiler (45) de rapor edilmiştir. *L. pneumophila*'nın yol açtığı ve merkezi sinir sistemine ait bulgularla karakterize bir olgu ilk defa Imai ve arkadaşları (43) tarafından rapor edilmiştir. Bu olguda hastada baş ağrısı hafıza kaybı, bilateral tremor ve yön

bulamama gibi bulgular görülmüş ve yapılan beyin MR'I sonrasında corpus collosumda aşırı yoğun bölgeler belirlenmiş ve yapılan diğer testlerle de serebellum ve frontal loblarda anormal değişiklikler belirlenmiştir. Az sayıda hastada sistemik yangısal yanıt ve çoklu organ yetmezliği tablosu oluşmaktadır (19). Radyolojik bakıda göğüs grafisinde tek yada çift taraflı olarak, bir yada daha fazla lobda yoğun infiltratla karakterize konsolidasyon bulguları gözlenmektedir. Bazı fungal infeksiyonlarda görülen nodullere benzeyen olgular da görülebilmektedir. Hafif pleural efüzyonlar görülebilir ancak yaygın efüzyonlar ve empiyem nadirdir. Yapılan otopsilerde akciğerlerde apse oluşumları bulunabilir ancak radyografide çok sıklıkla tanımlanamamaktadır (87).

Hastaların laboratuvar bulgularında bazı nonspesifik değişiklikler yaygındır. Laboratuvar testlerinde renal ve hepatik disfonksiyon bulguları, trombositopeni, lökositosis (19), hematolojik değerlerde anormallikler, hematüri, hipofosfatemi (45) tablosu gözlenebilmektedir. Ancak Legionellozis olgularında hiponatremi tablosu diğer pneumoni olgularına göre daha fazla görülmektedir (45,86).

Nadir olarak legionella infeksiyonlarına bağlı ekstrapulmoner olgular da görülebilmektedir (45,73). En yaygın ekstrapulmoner olgular yetişkinlerde kalpte, çocuklarda ise karaciğer, beyin, dalak ve lenf nodullerinde görülmektedir (73). Ekstrapulmoner infeksiyonlarda primer kaynak hematojen yolla yayılmadır (54,72) ve bu olgular genellikle pneumoni olgusundan sonra gelişmektedir. Pneumoni tablosu olmadan gelişen az sayıda olgular da bildirilmiştir (72). Peritonit, sinüzit, selülit, piyelonefrit, pankreatit, lenfadenopati, prostetik kapak endokarditi, miyokardit, perikardit olguları *L. pneumophila* infeksiyonlarına bağlı ekstrapulmoner olgulardandır (45,54,73). Nadiren legionella ile kontamine sularla temizlik sonrasında oluşan yara ve yanık infeksiyonları da bildirilmiştir (45). Bemer ve arkadaşları (8) tarafından immunsuprese bir hastada şekillenen akut purulent artrit olgusunda artiküler sıvıdan *L. pneumophila* serogrup 1 izole edilmiştir. Ayrıca Linscott ve arkadaşları (54) tarafından da farklı bir hastada siyovial dokudan *L. pneumophila* serogrup 4 izole edilmiştir.

L. pneumophila'dan başka *L. cincinnatiensis* ve *L. micdadei*'den kaynaklanan yumuşak doku infeksiyonları da bildirilmiştir.

Fabbi ve arkadaşları tarafından tanımlanan 20 günlük buzağıda ortaya çıkan *L. pneumophila* serogrup 1'den kaynaklanan olguda 2 gündür devam eden şiddetli diyare, anoreksi, zayıflık ve solunum güçlüğü ve sonrasında dispne şekillenmiş ve birkaç saat içinde ölüm meydana gelmiştir. Bu bulguların spesifik olmamakla birlikte sığırlarda enterik ve respiratorik diğer hastalıklarda görülen klinik bulgulara da benzediği belirtilmiştir. Ancak patolojik ve histolojik bulguların insanlardaki legionellozis bulgularıyla oldukça benzer olduğu belirtilmiştir (33).

2.6. Tanı

Legionella hastalıklarında diğer pneumoni olgularında da görülebilen klinik ve radyolojik bulguların görülmesi ve semptomların spesifik olmaması nedeniyle özel laboratuvar yöntemleriyle tanı konabilmektedir. Laboratuvar tanı yöntemleri arasında en yaygın olarak kullanılmakta olan, selektif besiyerlerinde kültür yöntemi, üriner antijen aranması, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), indirekt flouresan antikör testi (IFA), ELISA, direk immunoflouresan test (DFA), solid faz radioimmunoassay (SPRIA), DNA hibridizasyonu ve mikroaglutinasyon testleri yer almaktadır (45,86).

Tanı metodları arasında kültür yöntemi %100 özgüllüğe sahip en güvenilir tanı aracıdır (72) ve legionella infeksiyonlarının tanısında "altın standart" olarak kabul edilmektedir (3,55). Mikroorganizma, standart besiyerlerinde üremediği için selektif bir besiyeri olan ve içerisine yeast ekstrakt, alfa ketoglutarat, L-sistein, çözünebilir ferric pirofosfat, aktive edilmiş kömür ve çeşitli antibiyotiklerin ilave edildiği buffered charcoal yeast extract (BCYE- α) agar kültür amacıyla kullanılmaktadır. Kültür için en uygun materyaller özellikle bronkoalveoler lavaj sıvısı, bronşiyal aspiratlar, akciğer biyopsi materyali ve post mortem doku örnekleri başta olmak üzere, kan ve balgam örnekleridir (20,55,72). Laboratuvara getirilen örneklerden BCYE- α agara ekimleri yapıldıktan sonra 35-37 °C'de, %2-5 CO₂'li ve nemli ortamda (72) en az 10 gün inkubasyona bırakılır. Legionella kolonileri 3-5 gün sonra görünür hale gelmektedir (55). Koloniler gri beyaz renkte, mukoid karakterde ve yuvarlak

görünümündedir. Gram ve giemza boyamalar yapılarak bakterinin mikroskopik morfolojisi belirlendikten sonra şüpheli kolonilerden sistine gereksinim duymadıklarını belirlemek amacıyla BCYE agar ile birlikte antibiyotik ve sistin içermeyen koyun kanlı agar ya da çikolata agar gibi standart besiyerlerinden birine pasajları yapılır. Legionellalar standart besiyerlerinde üremezler. Biyokimyasal aktiviteleri zayıf olduğundan biyokimyasal testlerle tür ayrımı yapılması zordur. Tür ayrımı daha çok serolojik yöntemlerle yapılmaktadır. Şüpheli kolonilerin poliklonal ya da monoklonal antiserumlarla test edilmesiyle tür ayrımına gidilebilmektedir (55,72). Legionella türlerinin identifikasyonu amacıyla, latex molekülleriyle kaplanmış ya da flourescein ile konjuge edilmiş poliklonal antiserum kitleri ticari olarak geliştirilmiştir. Ancak bu poliklonal serumlar *Pseudomonas spp.*, *Bacteroides fargilis*, *Corynebacterium spp.*, *Francisella tularensis* ve *Bordetella spp.* bakterileri ile kross reaksiyonlar verebilmektedir. Bu durumda bakterinin koloni morfolojisi ve sistine gereksinim özelliğine bakılmaktadır. Bunun yanında bazı özel laboratuvarlarda, izolatlardan tür ve serogrup tayini monoklonal antikor, DNA sequence analizleri, restriction fragment length polymorphsim (RFLP), enzim elektroforez ve PCR gibi yöntemlerle de yapılabilmektedir (55).

Serolojik yöntem olarak, serumda oluşan IgM, IgG ve IgA antikorlarından yararlanılarak, en fazla ELISA, IFA ve mikroaglutinasyon yöntemleri kullanılmaktadır (72). Bu yöntemler daha çok geriye dönük tanıya yönelik çalışmalarda epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır (19,72).

DFA testi direkt solunum yolları örneklerinden legionella antijenlerinin saptanması için kullanılan 2-4 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınabilen spesifitesi yüksek bir tanı yöntemidir. *Pseudomonas* türleriyle kross reaksiyon çok ender görülür (73). Bu testte ticari olarak legionella türleri ve serogruplarının dış membran proteinine karşı elde edilmiş flourecein ile konjuge monoklonal antikorlar kullanılmaktadır (55,72).

İdrarda legionella antijenlerinin aranması amacıyla ELISA, lateks aglutinasyon ve RIA yöntemleri kullanılmaktadır (72). Çok kısa sürelerde tanıya gidilebilen ve özel ekipman gerektirmeyen ticari kitler geliştirilmiştir (55). İnfeksiyondan sonra yaklaşık 1 yıla kadar idrarda legionella antijeninin

saptandığı olgular da bildirilmiştir (47). Bu nedenle üriner antijen varlığı akut infeksiyonun göstergesi olarak görülmemektedir. Yöntemin dezavantajı ise sadece *L. pneumophila* serogrup 1'in saptanabilmesidir (19,72). Wever ve arkadaşları (88), idrarda immunokromatografik teknikle *L. pneumophila* serogrup 1 antijeninin saptanması amacıyla geliştirilmiş ticari bir kiti kullanarak bronkoalveoler lavaj örneğinden de etkeni saptayabilmişlerdir (88).

PCR yöntemiyle tanıda ise kan (3), serum (21,22,23,53), solunum yolları örnekleri (16,58,89) ve idrarda (62) direkt olarak legionella DNA'sı saptanabilmektedir. PCR yönteminde genellikle mikroorganizmanın 5S rRNA, 16S rRNA ve *mip* genleri hedef gen olarak seçilmektedir (72).

Sedgwick ve Tilton (80) tarafından solunum yolları sekresyon örneklerinden *L. pneumophila* serogrup 1'den 6'ya kadar identifikasyonu sağlayan latex aglütinasyon test yöntemi geliştirilmiştir. Bunun yanında ilk kez Wilkinson ve arkadaşları tarafından lam aglütinasyon test metoduyla *L. pneumophila* serogrup 1'den 4'e kadar olan tür ayrımı yapılabilmektedir. Yine Wilkinson ve arkadaşları tarafından legionella antijenlerinin identifikasyonu için stafilokokkal koagülasyon metodu da rapor edilmiştir.

2.7. Koruma Kontrol ve Sağaltım

Legionellaların intraselüler çoğalma özelliğine sahip bir mikroorganizma olması nedeniyle tedavide yüksek intraselüler konsantrasyona ulaşabilen antibiyotiklerin seçilmesi önemlidir (55). Tedavide genellikle eritromisin preparatları kullanılmaktadır (60,86). Son yıllarda diğer makrolidlerden klaritromisin, azitromisin, roksitromisin preparatları ile perfloksasin (86), siprofloksasin, levofloksasin, doksisiklin ve tetrasiklin grubu antibiyotikler de sağaltım amacıyla kullanılmaktadır (45). Rifampisin'in de eritromisinle kombine olarak kullanıldığında oldukça etkili olduğu görülmüştür (55). Ayrıca hayati tehlike içeren durumlarda kinolon grubu bir antibiyotik olan trovofloksasin de kullanılmaktadır (86). Tedavi süresi, immunsupresif hastalarda 21 gün, diğer hastalarda ise 15 gün kadardır (45). Bunların yanında sülfomethoxazole-trimethoprim kombinasyonu da tedavi amaçlı kullanılabilmektedir (73).

Brieland ve arkadaşları (12) tarafından yeni tanımlanmış everninomisin adlı antibiyotiğin immunsuprese A/J farelerinde *L. pneumophila* enfeksiyonu üzerinde etkinliği araştırılmış ve bakterinin akciğerlerde ölümcül oranda çoğalma özelliğini inhibe ettiği belirlenmiştir.

Edelstein ve arkadaşları (29) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise yeni tanımlanan bir des-fluoro(6) kinolon antibiyotiğinin (BMS-284756(T-3811ME)) deneysel olarak kobaylarda oluşturulan *L. pneumophila* enfeksiyonunda etkinliği araştırılmış bu antibiyotiğin enfekte makrofajlar üzerindeki etkinliğinin eritromisinden daha iyi olduğu görülmüştür.

Hastalığın aşısı yoktur. Koruma amaçlı olarak, etkenle kontamine ve bulaşmanın birincil kaynağı olan su sistemlerinde uygun yöntemlerle legionella bakterilerinin ortadan kaldırılması gerekmektedir (60). Su hijyeninin sağlanması amacıyla sıcak ve soğuk su sistemlerinin düzenli olarak mikrobiyolojik kontrollerinin ve temizliklerinin yapılması gereklidir (45,90). Özellikle sıcak su tanklarında dipte oluşan tortular düzenli aralıklarla temizlenmelidir. Bunun yanında klimalar, duş başlıkları, armatürler, soğutma kuleleri ve soğuk su tankları gibi ekipmanlar da düzenli aralıklarla temizliğe tabi tutulmalıdır. Temizlik işlemlerinin yanısıra su aracılığıyla yayılabilen hastalıkların önlenmesi için sisteme uygun dezenfeksiyon yöntemleri belirlenmeli ve belirli periyotlarla uygulanmalıdır. Legionella dezenfeksiyonu su sistemlerinde, termik dezenfeksiyon, ultraviyole ışık ile muamele, gümüş ve bakır iyonizasyon yöntemi, klorlama, monokloraminle muamele gibi yöntemlerle yapılabilmektedir. Bu yöntemler içerisinde birçok avantaja sahip olması açısından klorlama seçeneği en uygun yöntem olarak görülmektedir (45).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasında gereç ve yöntem aşağıdaki plana göre uygulanmıştır.

3.1.GEREÇ

3.1.1. ÖRNEKLER

3.1.1.1. Kan örnekleri

3.1.1.2. Kan serumu örnekleri

3.1.1.3. İdrar örnekleri

3.1.2. BESİYERLERİ

3.1.2.1. Buffered charcoal yeast extract agar base

3.1.2.2. Besiyeri supplementleri

3.1.3. REFERANS SUŞ

3.1.4. LEGİONELLA LATEX TEST (OXOID)

3.1.5. PEDIATRİK LİZİS İSOLATÖR TÜP

3.1.6. PCR

3.1.6.1. QIAamp DNA Mini Extraksiyon Kiti

3.1.6.2. Legionella pneumophila amplifikasyon kiti

3.1.6.3. Hot-start MB Taq DNA Polymerase

3.1.6.4. Diğer gereçler

3.1.7. ELISA

3.1.7.1. Legionella Üriner Antijen ELISA Kit

3.1.7.2. ELISA Okuyucusu

3.2. YÖNTEM

3.2.1. KÜLTÜR

3.2.1.1. İdentifikasyon çalışmaları

3.2.2. PCR

3.2.2.1. DNA ekstraksiyonu

3.2.2.2. Pozitif kontrol hazırlanması

3.2.2.3. DNA amplifikasyonu

3.2.2.4. DNA'nın saptanması

3.2.2.5. Sonuçların değerlendirilmesi

3.2.3. ELISA

3.2.3.1. Sonuçların değerlendirilmesi

3.1. GEREÇ

3.1.1. ÖRNEKLER

İstanbul'da köpeklerde *Legionella pneumophila* infeksiyonunun tahmini prevalansı %50 kabul edilerek, %95 güven düzeyi ve %10 absolt kesinliğe göre solunum bozukluğu semptomları gösteren 96 köpekten örnek alındı (25). Örneklerin alınması kasım ve mart ayları arasında gerçekleştirildi. Her bir köpekten, kültürde kullanılmak üzere kan, PCR için kan serumu ve üriner antijen aranması için ELISA'da kullanılmak üzere idrar örnekleri alındı. Örnek alınan köpeklerin bilgileri tablo 3.1'de gösterilmiştir.

3.1.1.1. Kan Örnekleri

Kan kültüründe kullanmak amacıyla, 96 adet köpekten, vakumlu izolatör tüplerin içine direkt olarak kan alındı. Bunun için ilk önce hayvanın boyun bölgesi traş edilerek %70'lik alkol ile dezenfekte edildi. Ayrıca tüplerin ağız kısmı, kullanım klavuzunda belirtildiği gibi %10'luk iyot solusyonuyla dezenfekte edildi. Çift taraflı iğne ile vena jugularise girildi ve iğnenin diğer ucuna izolatör tüp yerleştirilerek tüpün 1,5 ml kan ile dolması beklendi. Alınan örnekler izolatör tüpün kullanım kitapçığına uygun olarak laboratuvara getirildi ve ekimleri yapıldı.

3.1.1.2. Kan serumu örnekleri

Köpeklerden PCR'da kullanılmak üzere, içerisinde antikoagulan bulunmayan farklı tüplere kan örnekleri alındı ve soğuk zincir altında Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. Santrifüje edilerek serumları ayrıldı. Serumlar steril mikrosantrifüj tüplerine alınarak PCR'da kullanılmak üzere – 20 °C'de saklandı.

3.1.1.3. İdrar örnekleri

ELISA'da üriner antijen aranması amacıyla alındı. İdrar alımı sistosentez yöntemiyle gerçekleştirildi. Bunun için hayvanın göbek deliğinin yaklaşık iki parmak aşağısında idrarın alınacağı bölge %70'lik alkol ile dezenfekte edildi ve bu bölgeden steril bir enjektör yardımıyla direkt olarak idrar alımı gerçekleştirildi. Örnekler soğuk zincir altında Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi.

Steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak ELISA'da kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.1.2. Besiyerleri

3.1.2.1. Buffered charcoal yeast extract agar base

(HIMEDIA, M813 Lot no: ZH170)

Besiyerinin içeriği

- ACES buffer
- Yeast extract
- α - Ketoglutarate , monopotassium salt
- Charcoal activated
- Agar

3.1.2.2. Besiyeri saplementleri

a- Legionella selective supplement IV (HIMEDIA, FD040)

İçeriği

- polymyxin B sulphate
- glycine
- anisomycine
- vancomycine
- bromo thymol blue
- bromo creosol purpule

b- Legionella supplement (HIMEDIA, FD041)

İçeriği

- L-cysteine hydrochloride
- Ferric pyrophosphate , soluble

Besiyerinin hazırlanışı :

500 ml besiyeri için ; Buffered charcoal yeast extract agar base 20 gr miktarında tartıldı. 500 ml distile su eklendi. Besiyeri suda tamamen çözününceye kadar benmari usulü kaynatıldı. Besiyerinin pH'sı 6.9 ± 0.2 olarak ayarlandı ve 121°C 'de 15 dk otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 50°C 'ye kadar soğutulduktan sonra aseptik koşullarda, legionella selektive supplement (FD040) ve legionella supplement (FD041) eklenerek iyice karıştırıldı. Steril petri kutularına 25'er ml miktarlarında döküldü.

3.1.3. Referans Suş :

Legionella pneumophila serogrup 1 (ATCC 33152) referans suş olarak kullanılmak üzere İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edildi.

3.1.4. Legionella Latex Test

İzolasyon besiyerinde üreyen kolonilerden legionella cins ve tür tayini yapmak amacıyla kullanıldı (OXOID, DR0800M).

Kitin içeriği

- *Legionella pneumophila* sg1 latex reagent (lot no P934310)
- *Legionella pneumophila* sg 2-14 latex reagent (lot no P934410)
- *Legionella* species latex reagent (lot no P934510)
- Pozitif kontrol (lot no P934610)
- Negatif kontrol (lot no P934710)
- *Legionella* kontrol latex (lot no P934810)
- Diluent buffer (lot no P934910)

3.1.5. Pediatrik lizis izolatör tüp

Köpeklerden kültür için kan örneği alınmasında kullanıldı (wampole isolator 1.5, OXOID BC505C).

Tüp içeriği

- polypropylen glycol

- sodium polyanetholsulphonate
- purified saponin

3.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.1.6.1. QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kiti

Serum örneklerinden total DNA'nın elde edilmesi amacıyla kullanıldı (QIAGEN, Lot No: 127138929).

Ekstraksiyon kitinin içeriği

- Proteinaz K
- AL Buffer (lisis buffer)
- AW1 Buffer (wash buffer)
- AW2 Buffer (wash buffer)
- AE Buffer (elution buffer)
- QIAamp Spin Kolonları
- Toplama tüpleri

3.1.6.2. *Legionella pneumophila* amplifikasyon kiti

(Aqua Screen, Minerva Biolabs 34-1025, Lot No 341S1067)

Amplifikasyon kitinin içeriği

- Primer Nucleotid karışımı
- PCR reaction buffer
- Pozitif kontrol DNA (non enfeksiyöz-liyofilize)
- İnternal kontrol DNA (non enfeksiyöz liyofilize)

3.1.6.3. Hot–start MB Taq DNA Polymerase enzimi

(Aqua Screen, Minerva Biolabs Lot No: 530P1067)

3.1.6.4. Diğer gereçler

- 0.2 ml'lik ince duvarlı PCR tüpü (axygen, lot no 321-02-051)
- TBE buffer (BIOBASIC INC, lot no 070220)

- %95'lik Ethanol
- Agarose (Applichem, cat no: 9012-36-6)
- RNase – DNase free su (BIOBASIC INC, product no: D0121)
- 1,5 ml ve 2 ml'lik kapaklı RNase – DNase free mikrosantrifüj tüpleri (BIOBASIC INC, lot no:060924)
- Ethidium bromide (BIOBASIC INC, product no: D0197)
- 100 bp DNA ladder (Genemark GM100, Lot no: F00913)
- DNA loading dye (Genemark DL02, Lot no: F01211)
- 10 µl RNase – DNase free filtreli pipet uçları (Ratiolab)
- 100 µl RNase – DNase free filtreli pipet uçları (Ratiolab)
- 100 µl RNase – DNase free filtreli pipet uçları (Ratiolab)
- Vorteks
- Mikrosantrifüj (Denville Scientific Inc.)
- Thermocycler (Techne TC-312 Thermal cycler)
- Agaroz jel elektroforez tankı (Scie-plas) ve güç kaynağı (Biometra-Power pack P25)
- UV transmilatör (Biometra)

3.1.7. ELISA

3.1.7.1. Üriner Antijen ELISA Kiti

İdrar örneklerinde *Legionella pneumophila* serogroup 1 antijeninin aranması amacıyla kullanıldı (Diagnostic Automation,INC. Lot no: RD817).

ELISA kitinin içeriği

- 96 kuyucuklu plate
- Negatif kontrol serum
- Pozitif kontrol serum
- Wash buffer (20x konsantre)

- Enzim conjugat (horseradish peroxidase - conjugated rabbit anti-*Legionella pneumophila* serogroup 1 antibodies)
- Chromogen solusyon (tetramethylbenzidine ve peroxide)
- Stop solusyon

3.1.7.2. ELISA okuyucusu

ELISA sonuçları µQUANT MQX200 marka ELISA okuyucusu ile değerlendirildi.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. KÜLTÜR

L. pneumophila'nın izolasyonu amacıyla 96 köpekten (tablo 3,1) vakumlu izolatör tüplere 1,5 ml miktarında alınan kan örneklerinden 0,1 ml alınarak BCYE-α agara yayma ekim yöntemiyle ekimleri yapılarak 35 °C'de, %5 CO₂'li ortamda 14 gün süreyle inkubasyona bırakıldı. Besiyerleri üreme yönünden her gün düzenli olarak kontrol edildi. Birinci günde oluşan üremeler dikkate alınmadı. İkinci günden sonra görülen üremeler *Legionella pneumophila* yönünden incelendi. Koloniler makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmeye tabi tutuldu. Şüpheli kolonilerden Gram ve Giemsa boyamalar yapılarak mikroskopik olarak incelendi.

L. pneumophila serogrup 1 ATCC 33152 suşundan kontrol amacıyla BCYE-α agara ekim yapıldı ve inceleme örnekleriyle aynı koşullarda inkubasyona bırakıldı.

3.2.1.1. İdentifikasyon çalışmaları

İkinci günden sonra üreyen şüpheli koloniler ve kontrol amacıyla ekimi yapılan *L. pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 referans suş kolonileri identifikasyon amacıyla makroskopik olarak ve Gram ve Giemsa boyamalar ile mikroskopik olarak incelendi. Biyokimyasal olarak katalaz ve oksidaz testleri yapıldı. Referans suştan hazırlanan kültürde üreyen kolonilerden bakterinin sisteine gereksinim duyup duymadığını belirlemek amacıyla BCYE-α agarla birlikte sistein içermeyen koyun kanlı agara paralel pasajlar yapıldı ve besiyerleri tekrar aynı koşullarda inkubasyona bırakıldı. İki günlük inkubasyondan sonra BCYE-α agarda üremeler görülürken koyun kanlı agarda

hiçbir üreme saptanmadı. İdentifikasyon amacıyla kolonilerden öze yardımıyla bir parça alındı ve Legionella latex test (Oxoid) ile cins, tür ve serogrup tayini yapıldı. Sonuç olarak bakterinin *L. pneumophila* serogrup 1 antiserumuyla aglütinasyon verdiği saptandı. Bakteri *L. pneumophila* serogrup 1 olarak tekrar identifiye edildi. 14 gün sonunda koloni oluşumu gözlenmeyen kültürler negatif olarak değerlendirildi.

3.2.2. PCR

3.2.2.1. Serum örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Serum örneklerinden Legionella DNA'sının ekstraksiyonu, QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kiti yöntemine göre yapıldı. -20 °C'de saklanan serum örnekleri oda ısısına getirildi. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 20 µl proteinase K, üzerine de 200 µl serum örnekleri eklendi ve 200 µl buffer AL eklenerek 15 saniye karıştırıldı. 56 °C'de 10 dakika inkubasyona bırakıldı. Lizatlar, mikrosantrifüj cihazında 3-4 saniye süreyle santrifüj edildi. Lizatların üzerine 200'er µl etanol eklendi ve 15 saniye süreyle karıştırıldı. Tüpler, tüpün kenarlarında olabilecek sıvıların toplanması amacıyla tekrar kısa süreli santrifüj edildi. 2'şer ml'lik toplama tüplerine spin kolonlar yerleştirildi. Lizatlar spin kolon tüplerine aktarıldı. Tüpler 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Filtratları içeren toplama tüpleri atıldı. Spin kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Spin kolonlara 500 µl buffer AW1 eklendi. Tüpler 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Filtratları içeren toplama tüpleri atıldı. Spin kolonlar tekrar 2'şer ml'lik temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerlerine 500 µl buffer AW2 eklendi ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Filtratları içeren toplama tüpleri atıldıktan sonra spin kolonlar yeni 2 ml'lik kapaksız toplama tüplerine yerleştirildi. 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı ve spin kolonlar 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine 200 µl buffer AE eklendi. 1 dk süreyle oda ısısında inkube edildikten sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüplerinin kapakları kapatıldı ve elde edilen DNA'lar amplifikasyonda kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Ekstrakte edilen DNA'ların 5 µl'si PCR amplifikasyonunda kullanıldı.

3.2.2.2. Pozitif kontrol hazırlanması

Pozitif kontrol amacıyla kullanılan *Legionella pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 suşundan , BCYE- α agara ekim yapıldı. 35 °C'de 3-5 gün inkubasyondan sonra üreyen kolonilerden , aseptik koşullarda , öze yardımıyla alınarak , sağlıklı bir köpekten alınan kan serumuna karıştırıldı ve yoğunluk Mac Farland 0,5'e göre ayarlandı. Bu serumdan Legionella DNA'sının elde edilmesi amacıyla da yukarıdaki yöntem kullanıldı.

3.2.2.3. DNA amplifikasyonu

Ekstraktlardan DNA amplifikasyonu kit içeriğinde üretici firma tarafından belirlenen yöntemle göre yapıldı. Kit bileşenleri ve ekstraktlar -20 °C'den oda ısısına getirildi. Kite hazır olarak verilen ve liyofilize halde bulunan primer/nucleotid karışımı, pozitif kontrol ve internal kontrol, 5 sn süreyle maksimum hızda santrifüj edildikten sonra belirtilen miktarlarda deiyonize DNA-free su ile sulandırıldı ve 5 dk oda ısısında inkübe edildi. Vorteks yardımı ile karıştırıldıktan sonra tekrar santrifüj edildi.

Master mix'in hazırlanması :

	<u>1 reaksiyon için</u>	<u>25 reaksiyon için</u>
10X reaksiyon buffer	2,5 μ l	62,5 μ l
Primer/nucleotid mix	2,5 μ l	62,5 μ l
İnternal kontrol	2,5 μ l	62,5 μ l
Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l	5 μ l
Deiyonize DNA free su	12,3 μ l	307,5 μ l
TOPLAM	20 μ l	500 μ l

Kross kontaminasyonu önlemek amacıyla ilk önce ekstraktlardan ve negatif kontrol olarak deiyonize DNA free sudan 5'er μ l alınarak her biri 0,2 ml'lik PCR tüplerine konuldu. Daha sonra kit içerisinde verilen pozitif kontrolden ve *Legionella pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 suşundan hazırlanan

pozitif kontrol ekstraktından 5'er µl alınarak , 0,2 ml'lik PCR tüplerine konuldu. Her bir PCR tüpüne 20'şer µl master mix eklendi. Tüm PCR tüpleri thermocycler'a yerleştirildi. DNA amplifikasyonu 94 °C'de 2 dakika (1 siklus), sırayla 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 30 saniye (35 siklus) süreyle gerçekleştirildi. Tüpler kullanılıncaya kadar thermocycler içerisinde 4 °C'de bekletildi.

3.2.2.4. Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA'nın Saptanması

1X TBE buffer hazırlandı. 100 ml TBE buffer'a 1,5 gr agaroz katılarak %1,5 oranında jel hazırlandı. DNA'sı amplifiye edilmiş ürünlerden 5 µl alınarak 1 µl yükleme solusyonu ile karıştırıldı. Boyalı karışımların her biri agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk ve son kuyucuğa 2 µl 100 bp'lik DNA ladder yüklendi. ikinci kuyucuğa negatif kontrol, üçüncü kuyucuğa kitle birlikte verilen pozitif kontrol ve dördüncü kuyucuğa da *Legionella pneumophila* serogrup 1 ATCC33152 ile hazırlanan pozitif kontrol yüklendi. daha sonraki kuyucuklara da sırayla amplifikasyonu yapılan örnekler konuldu. Elektroforez işlemi 100 voltta 30-45 dakika süreyle (yaklaşık 2,5 cm yürütülecek şekilde) gerçekleştirildi. Elektroforez sonunda jel tanktan alınarak ethidium bromide solusyonunda bant oluşumu net görününceye kadar yaklaşık 45 dk süreyle boyandı. DNA bantlarının oluşumu UV transilatör kullanılarak gözlemlendi.

3.2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforez sonucunda, 275 bp moleküler ağırlığında bant oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Negatif kontrolde 191 bp, pozitif kontrollerde 191 bp ve 275 bp moleküler ağırlığında bant oluşumu testin uygulama doğruluğunu belirledi.

3.2.3. ELISA

Üretici firma tarafından kitte belirtilen yöntemle göre yapıldı. İdrar örnekleri ve kit bileşenleri oda ısısına getirildi. 25 ml'lik 20X yıkama solusyonu 500 ml distile suyla sulandırılarak hazır hale getirildi. A1 kuyucuğuna 2 damla (yaklaşık 100 µl) negatif kontrol ve B1 kuyucuğuna 2 damla pozitif kontrol konuldu. Sırasıyla C1,D1,E1 ve diğer kuyucuklara test edilecek idrar örneklerinden 100'er µl konuldu ve plakanın üzeri kapatıldı. Oda ısısında 30

dakika inkube edildikten sonra her bir kuyucuk 300'er µl yıkama solusyonu ile 3 kez yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 2'şer damla konjugat ilave edildi ve plakanın üzeri kapatılarak oda ısısında 10 dk inkube edildi. Kuyucuklar 3 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 2'şer damla kromojen solusyonundan eklendi ve oda ısısında 5 dakika inkubasyondan sonra her bir kuyucuğa 2'şer damla stop solusyonundan ilave edildi.

3.2.3.1. Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçlar ELISA okuyucusu ile 620 nm dalga boyunda okutularak değerlendirildi. OD değerlerine göre 0,15'in altındaki değerler negatif, 0,15'in üstündeki değerler pozitif olarak değerlendirildi. Testin geçerli olup olmadığı negatif ve pozitif kontrollerin değerlerine bakılarak kontrol edildi. Pozitif kontrollerin en az 0,5 OD değerinde, negatif kontrollerin 0,15 OD değerinden az olması testin çalıştığını gösterdi.

Tablo 3-1: Örneklerin alındığı yerler, köpeklerin sahiplilik durumu, yaş, ırk, cinsiyetleri ve klinik bulguları

Kaynak	Köpek No	Sahipli/sahipsiz	Yaş (yıl)	İrk	Cinsiyet	Klinik Bulgular
Bakırköy Hayvan Barınağı	1	Sahipsiz	4 Ay	Melez	♀	Ateş, iştahsızlık, hırıltılı solunum, öksürük, burun akıntısı
	2	Sahipsiz	4 Ay	Melez	♀	İştahsızlık, öksürük, burun akıntısı
	3	Sahipsiz	3,5 Ay	Melez	♀	Burun akıntısı, hırıltılı solunum, öksürük
	4	Sahipsiz	6-7 Ay	Melez	♀	Ateş, kaşektik vücut, burun akıntısı, zor nefes alıp verme, hafif ishal
	5	Sahipsiz	5-6 Ay	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı, öksürük
Küçükçekmece hayvan kısırlaştırma merkezi	6	Sahipsiz	1	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı, öksürük
	7	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♂	Öksürük, burun akıntısı
	8	Sahipsiz	1,5-2	Melez	♂	Ateş, öksürük, burun akıntısı, hırıltılı solunum
	9	Sahipsiz	1,5-2	Melez	♂	Burun akıntısı, öksürük
	10	Sahipsiz	3	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı, hırıltılı solunum
	11	Sahipsiz	2	Melez	♀	Ateş, öksürük, burun akıntısı

Küçükçekmece hayvan kısırlaştırma merkezi	12	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♂	Ateş, öksürük, burun akıntısı
	13	Sahipsiz	3-3,5	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı
	14	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı
Özel veteriner kliniği	15	Sahipli	10	Rot weiler	♂	Ateş, güçlüğü, yetmezliği solunum böbrek
Bakırköy Hayvan Barınağı	16	Sahipsiz	1	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı
Özel veteriner kliniği	17	Sahipli	1	Pitbull	♂	Ateş, iştahsızlık, burun akıntısı
Küçükçekmece hayvan kısırlaştırma merkezi	18	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♀	İştahsızlık, halsizlik, burun akıntısı
	19	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♂	Ateş, hırıltılı solunum, burun akıntısı
Özel veteriner kliniği	20	Sahipli	3	Rot weiler	♀	Ateş, iştahsızlık, halsizlik, burun akıntısı
	21	Sahipli	2	Pitbull	♀	Ateş, iştahsızlık, burun akıntısı
Küçükçekmece hayvan kısırlaştırma merkezi	22	Sahipsiz	2,5-3	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı, öksürük
	23	Sahipsiz	3-3,5	Melez	♀	Burun akıntısı, halsizlik, öksürük
	24	Sahipsiz	3,5-4	Melez	♀	Ateş, öksürük, solunum iştahsızlık, hırıltılı
	25	Sahipsiz	3-3,5	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı

Küçükçekmece hayvan kısırlaştırma merkezi	26	Sahipsiz	2,5-3	Melez	♂	Ateş, iştahsızlık, burun akıntısı
	27	Sahipsiz	1	Melez	♀	Ateş, hırıltılı solunum, halsizlik, iştahsızlık
	28	Sahipsiz	1-2	Melez	♀	Öksürük, hırıltılı solunum
	29	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♂	Ateş, öksürük, hırıltılı solunum
	30	Sahipsiz	1	Melez	♀	Solunum güçlüğü, öksürük, halsizlik, iştahsızlık
	31	Sahipsiz	3	Melez	♀	Ateş, halsizlik, iştahsızlık
	32	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♂	Öksürük, hırıltılı solunum
	33	Sahipsiz	2-3	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı, iştahsızlık
	34	Sahipsiz	3-4	Melez	♀	Ateş, hırıltılı solunum
	35	Sahipsiz	3-3,5	Melez	♀	Burun akıntısı, hırıltılı solunum
	36	Sahipsiz	6-8 Ay	Melez	♂	Ateş, iştahsızlık, burun akıntısı
Özel veteriner kliniği	37	Sahipli	3	Kangal	♂	Ateş, hırıltılı solunum, iştahsızlık
Bakırköy Hayvan Barınağı	38	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♂	Hırıltılı solunum, öksürük, hafif ishal
Özel veteriner kliniği	39	Sahipli	3	Doberman	♀	Ateş, iştahsızlık, hırıltılı solunum
Küçükçekmece hayvan kısırlaştırma merkezi	40	Sahipsiz	2-,2,5	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı, iştahsızlık

Küçükçekmece hayvan kısırlaştırma merkezi	41	Sahipsiz	3-4	Melez	♀	Burun akıntısı, öksürük
Özel veteriner kliniği	42	Sahipli	2	Pincher	♀	Ateş, hırıltılı solunum, iştahsızlık, burun akıntısı
	43	Sahipli	2	Kurt kırması	♂	Ateş, solunum güçlüğü, iştahsızlık, hafif ishal
Küçükçekmece hayvan kısırlaştırma merkezi	44	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı, kaşektik vucut
	45	Sahipsiz	1,5-2	Melez	♂	Ateş, hırıltılı solunum, öksürük
	46	Sahipsiz	3-4	Melez	♀	Burun akıntısı, öksürük
	47	Sahipsiz	2-3	Melez	♂	Öksürük, burun akıntısı
	48	Sahipsiz	2-3	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı
	49	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı, öksürük
	50	Sahipsiz	2,5-3	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı, öksürük
	51	Sahipsiz	1	Melez	♀	Ateş, solunum güçlüğü, iştahsızlık
	52	Sahipsiz	1	Melez	♀	Ateş, hırıltılı solunum
	53	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♀	Solunum güçlüğü, zayıflık, halsizlik
Özel veteriner kliniği	54	Sahipli	3	Kurt kırması	♀	Ateş, iştahsızlık öksürük,

Altınşehir hayvan barınağı	55	Sahipsiz	3-4	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı
	56	Sahipsiz	4-5	Melez	♂	Öksürük, hırıltılı solunum
	57	Sahipsiz	2-3	Melez	♀	Ateş, halsizlik, öksürük, burun akıntısı
	58	Sahipsiz	3-4	Melez	♂	Ateş, hırıltılı solunum, öksürük
	59	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♀	Ateş, iştahsızlık, öksürük
	60	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♂	Öksürük, hırıltılı solunum
	61	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♀	Ateş, halsizlik, burun akıntısı
	62	Sahipsiz	3	Melez	♀	Ateş, öksürük, hırıltılı solunum
	63	Sahipsiz	5-6	Melez	♀	Ateş, iştahsızlık, öksürük, burun akıntısı,
	64	Sahipsiz	4-5	Melez	♀	Öksürük, hırıltılı solunum
	65	Sahipsiz	2	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı
Özel veteriner kliniği	66	Sahipli	8	Terrier	♀	Ateş, iştahsızlık, halsizlik, hırıltılı solunum
	67	Sahipli	4	Cocker	♀	Ateş, burun akıntısı
Altınşehir hayvan barınağı	68	Sahipsiz	6-7	Melez	♀	Hırıltılı solunum, halsizlik, iştahsızlık
	69	Sahipsiz	1	Melez	♂	Ateş, öksürük

Altınşehir hayvan barınağı	70	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♂	Öksürük, burun akıntısı, ishal
	71	Sahipsiz	1	Melez	♂	Ateş, halsizlik, iştahsızlık
	72	Sahipsiz	6-7 Ay	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı, ishal
	73	Sahipsiz	5	Melez	♂	Ateş, öksürük, hırıltılı solunum
	74	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♀	Ateş, hırıltılı solunum, öksürük
Özel veteriner kliniği	75	Sahipli	8 Ay	Rot weiler	♂	Ateş, burun akıntısı, iştahsızlık
Altınşehir hayvan barınağı	76	Sahipsiz	6-7	Melez	♀	Öksürük, burun akıntısı
	77	Sahipsiz	8-9 Ay	Melez	♀	Ateş, iştahsızlık, hırıltılı solunum, öksürük, burun akıntısı
	78	Sahipsiz	1,5-2	Melez	♀	Ateş, iştahsızlık, burun akıntısı
	79	Sahipsiz	4-5	Melez	♀	Öksürük, hırıltılı solunum
	80	Sahipsiz	3	Melez	♀	Ateş, öksürük, hırıltılı solunum
	81	Sahipsiz	1-1,5	Melez	♂	Ateş, öksürük, hırıltılı solunum
	82	Sahipsiz	2	Melez	♀	Ateş, burun akıntısı, öksürük
	83	Sahipsiz	4-5	Melez	♂	Ateş, öksürük, burun akıntısı
	84	Sahipsiz	4-5	Melez	♀	Ateş, iştahsızlık, burun akıntısı, zayıflık

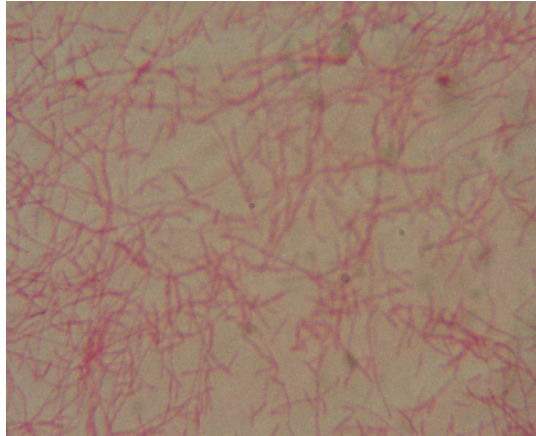
Altınşehir hayvan barınağı	85	Sahipsiz	3-4	Melez	♂	Öksürük, hırıltılı solunum, ishal
	86	Sahipsiz	5-6	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı, öksürük
	87	Sahipsiz	1,5-2	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı, öksürük
	88	Sahipsiz	3	Melez	♂	Ateş, öksürük, hırıltılı solunum
	89	Sahipsiz	2	Melez	♀	Öksürük, hırıltılı solunum,
	90	Sahipsiz	2-2,5	Melez	♂	Ateş, burun akıntısı, iştahsızlık
	91	Sahipsiz	1	Melez	♂	Burun akıntısı, öksürük
	92	Sahipsiz	1,5-2	Melez	♀	Ateş, halsizlik, burun akıntısı
	93	Sahipsiz	1,5-2	Melez	♀	Öksürük, hırıltılı solunum
	94	Sahipsiz	4	Melez	♀	Ateş, öksürük, solunum güçlüğü
Özel veteriner kliniği	95	Sahipli	6 Ay	Terrier	♀	Ateş, iştahsızlık, burun akıntısı
	96	Sahipli	1	Setter	♀	Ateş, iştahsızlık, hırıltılı solunum

4. BULGULAR

4.1. Kültür Bulguları

Kan rneklerinin BCYE- α agarda on dört günlük inkubasyonları sonucunda *Legionella spp.* ve *L. pneumophila* izole edilmedi.

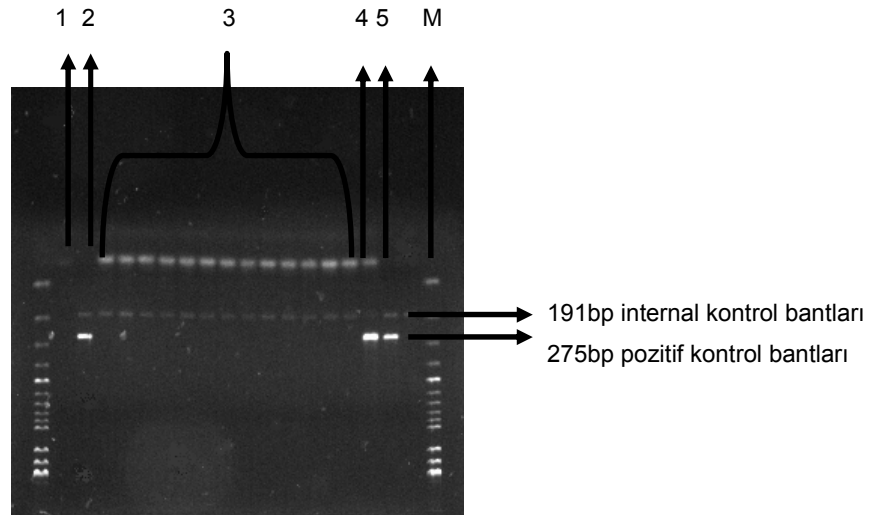
Referans suş olarak kullanılmak üzere İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen *L. pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 suşundan kontrol amacıyla BCYE- α agara yapılan ekimler sonucunda etken tekrar üretildi ve identifiye edildi. Üreyen kolonilerden giemsa boyama yöntemi ile yapılan boyama sonucu bakterinin mikroskobik görünümü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4-1: *Legionella pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 mikroskobik görünümü

4.2. PCR Bulguları

Toplam 96 köpeğe ait kan serumu örneklerinde *L. pneumophila* DNA'sına ait bant oluşumu saptanmadı. Negatif kontrolde 191 bp moleküler ağırlığında internal kontrol bantları, kit içerisinde bulunan pozitif kontrol ve *L. pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 referans suşundan hazırladığımız pozitif kontrolde 191 bp ve 275 bp moleküler ağırlığında bantlar saptandı (şekil 4.2).



1- (-) kontrol, 2- (+) kontrol, 3- serum örnekleri, 4- *L. pneumophila* ATCC33152 ile hazırlanan (+) kontrol, 5- (+) kontrol, M- 100 bp'lik DNA marker.

Şekil 4-2: PCR sonrası elektroforezde şekillenen bantların görüntüsü

4.3. ELISA Bulguları

Tüm idrar örneklerinde 0,15 OD değerinin altında değerler saptandı. Toplanan idrarlar *L. pneumophila* serogrup 1 antijeni yönünden negatif bulundu.

5. TARTIŞMA

Philadelphia'da bir otelde ortaya çıkan salgının incelenmesiyle 1977'de bir pneumoni etkeni olarak adı konulan *Legionella pneumophila* (35) üzerine dünyada çok sayıda araştırma yapılmış ancak Türkiyede bu etken üzerinde yeteri kadar durulmamıştır. Dünyada ise bu infeksiyonla ilgili hayvanlar üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir.

Legionella infeksiyonlarının tanı metodları arasında kültür altın standart olarak yerini almıştır. Kültür amacıyla insanlardan bronkoalveoler lavaj sıvısı, bronşiyal aspiratlar, akciğer biyopsi materyalleri, balgam örnekleri alınarak ekimler yapılmaktadır. *Legionella* infeksiyonlarında bakteriyemi olguları görüldüğünden kültür amacıyla kan örneği de alınabilmektedir (55). Ancak *Legionellaların* izolasyonu amacıyla geliştirilen optimal bir kan kültür metodu bildirilmemiştir (55,74). Fabbi ve arkadaşları (33) tarafından 20 günlük bir buzağıda ortaya çıkarılan *L. pneumophila* infeksiyonu olgusunda kültür amacıyla akciğer, karaciğer, dalak ve böbrek otopsi materyallerinden aseptik koşullarda alınan doku örneklerinden, BCYE agar yüzeyine yayılarak direkt ekimler yapılmıştır. Bu ekimler sonucunda akciğer ve karaciğerden *L. pneumophila* izole edilmiştir.

Legionellaların üremeleri için L-sistein ve demire gereksinimi vardır ancak Chester ve arkadaşları (13) tarafından yapılan bir çalışmada 72 yaşında bir hastadan alınan kan örneği, L-sistein ve ferric pirofosfat içermeyen standart kan kültürü şişelerine ekilmiş ve radyometrik olarak pozitiflik veren şişelerden BCYE agara pasajları yapılan örnekten *L. pneumophila* izole edilmiştir. Çalışmacılar hastanın kanında *L. pneumophila*'nın hayatta kalmasını sağlayacak miktarda yeterli demir ve L-sistein varlığından dolayı etkenin izole edilmiş olabileceğini belirtmişlerdir. Rihs ve arkadaşları tarafından (75) solunum yollarına ait örneklerden *L. pneumophila* serogrup 1 izolasyonu yapılmış 16 hastadan aldıkları kan örneklerinden BACTEC kan kültürü sistemini kullanarak ekimler yapmışlar, 7. gün sonunda kan kültürü şişelerinden BCYE agara pasajları yapılan örneklerin 6'sından (%38) *L. pneumophila* izole etmişlerdir.

Aoki ve arkadaşları (3) spesifik patojen free A/J farelerini kullanarak oluşturdıkları *L. pneumophila*'nın deneysel infeksiyon modelinde farelerden bronkoalveoler lavaj sıvısı ve kan örnekleri alarak BCYE agar üzerine direkt ekimler yapmışlar infeksiyon belirtilerinin görülmesinden infeksiyonun 2. gününe kadar kandan, 3. gününe kadar bronkoalveoler lavaj sıvısından etkeni izole etmişlerdir.

Reinhardt ve arkadaşları (74) kobaylarda *L. pneumophila* ile oluşturdıkları deneysel infeksiyon modelinde bifazik BCYE (agar-broth) yöntemi, pediatrik izolator tüp yöntemi, buffy coat ekimi ve direkt ekim olmak üzere dört farklı kan kültürü metodunu karşılaştırmalı olarak incelemişler, 15 kobayın tamamında bu yöntemlerle kandan *L. pneumophila* serogrup 1 izole etmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar ilk önce izolator metodun *L. pneumophila* üzerine inhibitör etkisinin bulunup bulunmadığını W82-063A standart *L. pneumophila* serogrup 1 suşunu kullanarak araştırmışlar ve fizyolojik tuzlu su ile sulandırılmış *L. pneumophila* serogrup 1 süspansiyonunun izolator tüp metoduyla kültüre edilmesi sonucunda üremede önemli derecede inhibitör etkinin görülmediğini belirtmişlerdir. Baron ve arkadaşları (5) tarafından insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise endokarditisli hastalardan alınan 11 kan örneği izolator tüplerde işlendikten sonra BCYE agara ekimleri yapılmış, 10'undan *Legionella* türleri izole edilmiştir. Bu çalışmada standart kan kültürü besiyerlerinden BCYE agara subkültürleri yapılan 6 örnekten *Legionella* türleri izole edilmesine karşın çalışmayı yürüten araştırmacılar tarafından en iyi üremenin izolator tüpler kullanılarak sedimentin BCYE agara inokulasyonu ile elde edildiğini belirtmişlerdir.

Bu araştırmada da, Reinhardt ve arkadaşlarının (74) uyguladığı izolator tüp yöntemi kullanıldı. Noninvasiv bir yöntem olması, örnek alım işleminin özel bir ekipman gerektirmemesi, aseptik koşullara uyulması koşuluyla her türlü ortamda örnek toplanabilmesi nedenleriyle kan örneği alımı tercih edildi ve *L. pneumophila* serogrup 1'in izolasyonu amacıyla solunum yolları hastalığı semptomları bulunan 96 köpeğe ait kan örneği bakteriyolojik yönden incelendi. Ancak 14 gün inkubasyon süresi sonunda hiçbir örnekte *Legionella spp.* ve *L. pneumophila* türüne ait üremeler şekillenmedi.

Reinhardt ve arkadaşları *L. pneumophila*'nın üremesinin kan komponentleriyle inhibe edildiğini ve buna bağlı olarak kanın direkt BCYE agara ekilmesi yönteminde sulandırılarak ekilmesinden 10 kat daha düşük bakteri üremesi görüldüğünü belirtmişlerdir. Sulandırma yönteminde kandaki inhibitör maddelerin aktif konsantrasyonlarının da azalmış olması nedeniye üremenin artabileceğini belirtmişlerdir. Legionella infeksiyonlarında görülen bakteriyemi olgularında kandaki gerçek bakteri konsantrasyonu bilinmemekte, ancak 10-700 cfu/ml arasında değiştiği düşünülmektedir. Araştırmacılar kandaki bakteri konsantrasyonunun 50-100 cfu/ml'den az olması durumunda etkeni saptamanın daha zor olabileceğini belirtmişler ve kültür amacıyla daha çok konsantre edilmiş yada amplifiye edilmiş kan örneklerinin tercih edilmesinin yararlı olabileceğini belirtmişlerdir (74). Dorn ve Barnes (26), Legionellozis olgularında *L. pneumophila*'nın kandaki konsantrasyonunun bilinmediğini, pneumoni ile ilişkili bir infeksiyon olduğundan hastalığın akut döneminde bakterinin kanda değişen konsantrasyonlarda bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Reinhardt ve arkadaşları (74), kobaylardan aldıkları kardiyak kan örneklerini kültür amacıyla kullanmışlar ve tüm hayvanlardan etkeni 4 farklı yöntemle de izole etmişlerdir. Ancak araştırmacılar bu izolasyonun bakteriyemiye bağlı olmasının yanı sıra manipulasyonu oldukça dikkatli uygulamalarına karşın kalpten kan alımı sırasında bir miktar perikardiyal apse içeriğinin de alınmış olabileceğinden söz etmişlerdir. Bu şekilde nonhematojen *L. pneumophila* ile bilinmeyen bir kontaminasyonun oluşması durumunda da sonuçların değişebileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada vena jugularisten alınan kanlar izolatör tüplere aktarıldı. Besiyerlerinin inkubasyonu sonrasında sıklıkla *Staphylococcus spp.* kontaminasyonu görüldü. Bunun nedeninin köpeklerde örnek alımı anında bu etkenin yol açtığı yara ya da farklı bir aktif infeksiyonun neden olduğu bakteriyemi varlığı olabileceği düşünüldü. Reinhardt ve arkadaşlarının (74) yaptıkları çalışmada en fazla kontaminasyonun izolatör metotta görüldüğünü fakat bu durumun istatistiksel olarak sonucu etkilemediğini belirtilmişlerdir.

L. pneumophila infeksiyonlarında bir diğer tanı metodu idrarla atılan ve ana komponentinin liposakkarit yapıda olduğu bilinen, çözülebilir

L. pneumophila serogrup 1 antijenlerinin ELISA ile aranması yöntemidir. Bu amaçla birçok ticari kit geliştirilmiştir (9,37,39).

Legionella pneumonisi rutin laboratuvar yöntemleriyle tanısı zor olan, özellikle yaşlı ve immun sistemi baskılanmış bireylerde ölümle sonuçlanabilen şiddetli pneumoniye yol açabilen, bu nedenle hızlı tanı yöntemleri ve bir an önce antibiyotik tedavisi gerektiren bir enfeksiyondur (46). Bu nedenle idrarda antijen aranması yöntemi, erken ve hızlı bir şekilde tanıya ulaşılabilmesi ve bir an önce antibiyotik tedavisine karar verme açısından yararlı bir test yöntemidir (37).

Aoki ve arkadaşları (3) tarafından yapılan çalışmada, 8 haftalık spesifik patojen free farelerde oluşturulan deneysel enfeksiyon modelinde idrar örnekleri metabolik kafesler kullanılarak alınmış ve örnekler *L. pneumophila* serogrup 1 yönünden ticari ELISA kitleri ile test edilmiştir. Sonuç olarak farelerde enfeksiyonun olduğu birinci günden 12. güne kadar pozitiflik saptanmış, üriner antijen atılımının 30 gün kadar artarak devam ettiği belirtilmiştir. Bu çalışmada farelere oral yolla da *L. pneumophila* verilmiş, inokulasyondan 6 saat sonra üriner antijen pozitif bulunduğu ve 2 hafta süresince pozitifliğin devam ettiği belirtilmiştir. Bu farelerin kan PCR sonuçları ise test periyodu süresince negatif bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonuca dayanarak *Legionella* ile kontamine su içen insanlarda da hastalık belirtileri görülme bile üriner antijen saptanabilme ihtimalinin olabileceğinden söz etmişlerdir.

Diğer tanı metodlarıyla karşılaştırıldığında, örneklerin kolay sağlanabilmesi, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir test olması ve pontiac ateşi gibi nonpneumonik olguların da saptanabilmesi bakımından üriner antijen aranması yönteminin birçok avantajı bulunmaktadır (55).

Bizim çalışmamızda, köpeklerden idrar örnekleri, dış ortamdan şekillenebilecek herhangi bir kontaminasyonu önlemek amacıyla sistosentez yöntemiyle alındı. İdrarın alınacağı bölge alkolle temizlendi ve steril enjektör yardımıyla direkt olarak idrar kesesinden idrar alımı gerçekleştirildi. Alınan idrar örnekleri *L. pneumophila* antijenlerinin varlığı yönünden ELISA yöntemi ile incelendi. Ancak 96 idrar örneğinin hiçbirinde *L. pneumophila* serogrup 1 yönünden pozitiflik saptanmadı.

Legionella infeksiyonlarında PCR ile tanı yöntemi de son yıllarda sıklıkla uygulanmaktadır. Bu amaçla hastalardan bronkoalveoler lavaj sıvısı, balgam, idrar ve serum örnekleri alınmaktadır. Çok sayıda literatürde Legionellaların tanısında kullanılan farklı PCR protokolleri rapor edilmiştir (19,55). Aoki ve arkadaşları (3) tarafından yapılan deneysel bir çalışmada kan örneklerinden de PCR ile Legionella genetik materyali saptanmıştır. Bu çalışmada A/J farelerinde deneysel yolla *L. pneumophila* serogrup 1 pneumonisi oluşturulmuş, 16S rRNA geni hedef alınarak yapılan PCR testiyle infeksiyon belirtilerinin başlamasından 8. güne kadar kanda pozitiflik saptanmıştır. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla farelerden bronkoalveoler lavaj sıvısı da alınmış, bu örneklerden yapılan PCR'da infeksiyonun 4. gününde sonuçlar negatif olmaya başlamıştır. Araştırmacılar kan örnekleri kullanılarak yapılan PCR'ın noninvaziv bir metod olması ve infeksiyonun 8. gününe kadar saptanabilmesi bakımından yararlı bir yöntem olabileceğini belirtmişlerdir.

Legionella infeksiyonlarının PCR ile tanısında tüm legionella türlerinin saptanması amacıyla 5S rRNA, 16S rRNA , *L. pneumophila*'nın saptanması amacıyla da *mip* (macrophage infectivity potentiator) genleri hedef alınmaktadır. Su örneklerinden Legionella DNA'sını saptamak amacıyla Perkin-Elmer Corporation tarafından ticari olarak geliştirilmiş EnviroAmp Legionella kiti ile solunum yolu örneklerinden de Legionella genetik materyali başarıyla saptanabilmiştir (55). Matsiota-Bernard ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (58) hastalardan balgam, bronşiyal aspirat ve bronkoalveoler lavaj sıvısı örnekleri alınmış ve bu ticari kit ile ekstakte ve amplifiye edilmiştir. Araştırmacılar bu ticari kitin bronkoalveoler lavaj sıvı örneğinde de uygulanabileceğini ve uygulama kolaylığı ve 1 günde sonuç alınabilmesi bakımından kültür metoduna alternatif olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada ELISA için idrar ve kültür için kan örnekleri alınan 96 köpekten ayrıca PCR ile bakterinin genetik materyalini aramak amacıyla serum örnekleri alındı. Örneklerden DNA ekstraksiyonu QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kiti ile serum protokolüne göre yapıldı. *L. pneumophila*'yı saptamak amacıyla bakterinin *mip* genini hedef alan su örnekleri için ticari olarak geliştirilmiş Aqua Screen Minerva Biolabs konvansiyonel PCR amplifikasyon kiti

kullanıldı. PCR sonuçlarına göre serum örneklerinde *L. pneumophila* genetik materyaline rastlanmadı. Ancak kitle verilen kontrol dışında *L. pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 suşu ile hazırladığımız ve aynı yöntemle ekstraksiyon ve amplifikasyon işlemleri yapılan serum örneğinde jel elektroforez sonucunda bakteri genetik materyali saptanabilmiştir. Lindsay ve arkadaşları (53) serum örnekleri kullanarak yaptıkları PCR çalışmasında hastalığın erken dönemlerinde ve birden çok örnek alınmasının testin sensitivitesini artırması yönünde yararlı olabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan araştırmalarla da legionella infeksiyonlarının tanısında serum örnekleri kullanılarak uygulanan PCR yöntemiyle özellikle hastalığın akut döneminde olmak üzere iyileşme döneminde de etkenin saptanabildiği belirlenmiştir (22,55).

Sonuç ve öneriler :

İstanbul ilinde farklı barınaklardan ve solunum sistemi rahatsızlığı nedeniyle kliniklere getirilen 96 köpekten alınan kan, idrar ve serum örneklerinden yapılan incelemeler sonucunda köpeklerde kandan yapılan kültür sonuçlarında Legionella türlerine ait üremeler şekillenmemiş, serum örnekleri kullanılarak yapılan konvansiyonel PCR çalışmaları sonuçlarında *L. pneumophila* DNA'sı yönünden pozitiflik saptanmamış ve idrar örnekleri kullanılarak yapılan ELISA çalışmaları sonucunda da *L. pneumophila* serogrup 1 antijeni belirlenmemiştir. Buna karşın araştırmada kullandığımız referans suşun aynı yöntemlerle yapılan izolasyon çalışmalarında olumlu sonuç vermesi ve istenilen düzeyde üreme elde edilmesi ayrıca PCR çalışmasında da *L. pneumophila* DNA'sının belirlenmesi yaptığımız çalışmanın herhangi bir yöntem hatası olmadığına kanıt olduğunu belirlemiştir.

Dünyada bu güne kadar beşeri hekimlik, veteriner hekimlik açısından ve çevresel kaynaklardan birçok Legionella türü izole edilmiştir. Türkiye'de ise bu etkenin sadece beşeri hekimlik ve çevresel izolatları üzerinde durulmuştur. Dünyada bu infeksiyonun hayvanlardaki durumu hakkında bazı çalışmalar yapılmış ve birtakım önemli bulgular elde edilmiş olmasına karşın, ülkemizde bu konu veteriner hekimlik ve hayvan sağlığı açısından henüz ele alınmamıştır. Bu nedenle ülkemizde hayvanlarda legionella infeksiyonunun varlığı üzerine yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma hayvanlar arasında

L. pneumophila infeksiyonunun varlığının araştırılması üzerine Türkiye’de yapılmış ilk çalışmadır.

Bu çalışmada solunum yolu hastalığı semptomları gösteren köpeklerde *L. pneumophila* infeksiyonunun varlığının araştırılması amacıyla, dünyada insanlar ve deney hayvanları üzerinde sıklıkla uygulanan kültür, PCR ve üriner antijen aranması olmak üzere üç farklı tanı yöntemi kullanıldı. Örnek toplama aşamasında invaziv metodlara gerek duyulmaması, solunum yolları örneklerinde ihtiyaç duyulan araçlar gibi özel ekipman gerektirmemesi ve örneklerin antemortem dönemde alınabilmesi açısından noninvaziv yöntemlerle sağlanan kan, serum ve idrar örnekleri tercih edildi.

Bizim çalışmamızda genel olarak pneumoni ve solunum yolları hastalığı belirtileri gösteren köpekler seçildi. Örnekler kasım ve mart ayları arasında toplandı. İnsanlar arasındaki legionella salgınlarının daha çok yaz aylarında görüldüğü göz önüne alındığında yaz aylarında da solunum yolu hastalığı bulunan köpeklerden örneklerin alınmasının infeksiyonun varlığının belirlenmesi bakımından yararlı olabileceği düşünüldü.

Dünyada hayvanlar arasında ilk klinik şüpheyile gelen ve izolasyon yapılan *L. pneumophila* infeksiyonu olgusu Fabbı ve arkadaşları (33) tarafından 20 günlük bir buzağıda bildirilmiştir. Bu olgu hayvanlar arasında şu ana kadar bildirilen tek klinik olgudur. Araştırmacılar yaptıkları serolojik çalışmalarda evcil hayvanlardan at, sığır, domuz, koyun, köpek, keçi (18) ve kanatlılarda (70) legionella antikorlarına rastladıklarını belirtmişlerdir. Ancak bu konuda yapılan çalışmaların yeterli olmadığı gerçektir. Bu konuda klinik bulgu gösteren hayvanların *L. pneumophila* yönünden değerlendirilmesi solunum yolları ve bronşiyal eksudat örneklerinin alınması yanısıra kan ve kan serumu örneklerinden seroepidemiolojik çalışmalar yapılmasının infeksiyonun varlığının ortaya konması açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmaların köpekler dışında diğer evcil hayvanlarda da olabileceği düşünülmelidir. İnsanlarda yapılan çalışmalar göz önüne alındığında etken izolasyonu ve seroepidemiolojik tanıdaki başarının sağlanabilmesinde örnek sayısının ve mevsim faktörünün de önemli olduğu göz ardı edilmemelidir.

KAYNAKLAR

- 1- Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan from a distinct genetic cluster. *Microbiol Immunol* 2005; **49**(12): 1027-1033
- 2- Andrews HL, Vogel JP, Isberg RR. Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect Immun* 1998; **66**(3): 950-958
- 3- Aoki S, Hirakata Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Tomono K ve ark. Detection of *Legionella* DNA by PCR of whole-blood samples in a mouse model. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 325-329
- 4- Bağdatlı D, Vural T, Metin DY. Hemodiyaliz hastalarında *Legionella pneumophila* antikorlarının araştırılması. *Turkish journal of infection* 2004; **18**(4): 407-416
- 5- Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from Standard automated blood cultures. *Clin Infect dis* 2005; **41**:1677-1680
- 6- Barth TC, Renner ED, Gabrielson DA. A survey of domestic animals to detect serological responses against *Legionella* spp. By indirect fluorescent antibody. *Can J Comp Med* 1983; **47**: 341-346
- 7- Bazovská S, Awad-Masalmeh M, Kmety E, Spaleková M. *legionella* antibodies in domestic animals. *Cesk Epidemiol Microbiol Immunol.* 1992; **41**(5): 268-273
- 8- Bemer P, Leautez S, Ninin E, Jarraud S, Raffi F, Drugeon H. *Legionella pneumophila* arthritis: use of medium specific for Mycobacteria for isolation of *L. pneumophila* in culture of articular fluid specimens. *Clin Infect dis* 2002; **35**: 6-7
- 9- Benson RB, Tang PW, Fields BS. Evaluation of the binax and biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(7): 2763-2765

- 10-Blander SJ, Horwitz MA. Vaccination with the major secretory protein of *Legionella pneumophila* induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of legionnaires' disease. *J Exp Med* 1989; **169**: 691-705
- 11-Boldur I, Cohen A, Tamarin-Landau R, Sompolinky D. Isolation of *Legionella pneumophila* from calves and the prevalence of antibodies in cattle, sheep, horses, antelopes, buffaloes and rabbits. *Vet Microbiol.* 1987; **13**(4): 313-320
- 12-Brieland JK, Loebenberg D, Menzel F, Hare RS. Efficacy of SCH27899 in animal model of Legionnaires' disease using immunocompromised A/J mice. *Antimicrob Agents Ch* 2000; **44** (5): 1333-1336
- 13-Chester B, Poulos EG, Demaray MJ, Ablin E, Prilucik T. Isolation of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from blood with nonsupplemented blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1983; **17**(2): 195-197
- 14-Cho SN, Collins MT, Reif JS, McChesney AE. Experimental infections of horses with *Legionella pneumophila*. *Am J Vet Res* 1983; **44**(4): 662-668
- 15-Cho SN, Collins MT, Reif JS. Serologic evidence of *Legionella* infection in horses. *Am J Vet Res* 1984;**45**(12): 2600-2602
- 16-Cloud JL, Carrol KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(5): 1709-1712
- 17-Cohen A, Boldur I, Tamarin-Landau R, Sompolinky D. Legionellosis in animals in israel. *Isr J Med Sci* 1986; **22**(9): 674-677
- 18-Collins MT, Cho SN, Reif JS. Prevalence of antibodies to *Legionella pneumophila* in animal populations. *J Clin Microbiol* 1982; **15**(1): 130-136
- 19-Darby J, Buising K. Could it be *Legionella*?. Australian Family Physician 2008, **37**:812-815 Erişim 21.03.2009, The Royal Australian College of General Practitioners
http://www.racgp.org.au/afp/200810/200810darby_legon.pdf
- 20-Den Boer JW, Yzerman EPF. Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol* 2004; **23**: 871-878
- 21-Diederer BMW, Bruin JP, W den Boer J, Peeters MF, Yzerman EPF. Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity. *J Med Microbiol* 2007; **56**(9): 1255

- 22-Diederer BMW, De Jong CMA, Kluytmans JAJW, Van Der Zee A, Peeters MF. Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of the literature. *J Med Microbiol* 2006; **55**: 639-642
- 23-Diederer BMW, De Jong CMA, Marmouk F, Kluytmans JAJW, Peeters MF, Van der Zee A. Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 94-101
- 24-Diederer BMW, Kluytmans JAJV, Vandenbroucke-Grauls CM, Peeters MF. Utility of real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. *J Clin Microbiol* 2008; **46**(5): 671-677
- 25-Diker KS. Epidemiyoloji A.Ü. Veteriner Fakültesi öğrenci ders notu. 1994.
- 26-Dorn GL, Barnes WR. Rapid isolation *Legionella pneumophila* from seeded donor blood. *J Clin Microbiol* 1979; **10**(1): 114-115
- 27-Edelstein PH, Hu B, Higa F, Edelstein MAC. IvgA, a novel *Legionella pneumophila* virulence factor. *Infect Immun* 2003; **71**(5): 2394-2403
- 28-Edelstein PH, Hu B, Shinzato T, Edelstein MAC, Xu W, Bessman MJ. *Legionella pneumophila* Nud A is a nudix hydrolase and virulence factor. *Infect Immun* 2005; **73**(10): 6567-6576
- 29-Edelstein PH, Shinzato T, Edelstein MAC. BMS-284756 (T-3811ME) a new fluoroquinolone: in vitro activity against *Legionella*, efficacy in a guinea pig model of *L. pneumophila* pneumonia and pharmacokinetics in guinea pigs. *J Antimicrob Chemoth* 2001; **48**: 667-675
- 30-Engleberg NC, Carter C, Weber DR, Cianciotto NP, Eisenstein BI. DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* 1989; **57**(4):1263-1270
- 31-Erdoğan H, Arslan H. *Colonization of Legionella species in hotel water system in Turkey*. European Working Group for Legionella Infections 20. annual meeteng 16-17 Mayıs 2005. Erişim 24.03.2009, Istituto Superiore Di Sanità: <http://www.iss.it/binary/publ/publi/05-C2.1115128370.pdf>
- 32-Ewann F, Hoffman PS. Cysteine metabolism in *Legionella pneumophila*: Characterization of an L- cystine-utilizing mutant. *Appl Environ Microb* 2006; **72**(6): 3993-4000

- 33-Fabbi M, Pastoris MC, Scanziani E, Magnino S, Matteo LD. Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(7): 1942-1947
- 34-Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rsheed JK, Mackel DC ve ark. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 1979; **10**(4): 437-441
- 35-Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham J, Sharrar RG ve ark. Legionnaires'disease-description of an epidemic of pneumonia. *New Engl J Med* 1977; **297**(22): 1189-1197
- 36-Fuse ET, Tateda K, Kikuchi Y, Matsumoto T, Gondaira F, Azuma A. Role of toll-like receptor 2 in recognition of *Legionella pneumophila* in a murine pneumonia model. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 305-312
- 37-Guerrero C, Toldos CM, Yagüe G, Ramírez C, Rodríguez T, Segovia M. Comparision of diagnostic sensitivities of three assay (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromotographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(1): 467-468
- 38-Hindré T, Brüggemann H, Buchrieser C, Héchard Y. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology+* 2008; **154**: 30-41
- 39-Horn J, Benson RF, Fields BS. Binax and biotest *Legionella* urinary antigen kits. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(4): 1682
- 40-Hortwitz MA. The legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 1983;**158**: 2108-2126
- 41-Hortwitz MA ve Maxfield FR. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* 1984;**99**: 1936-1943
- 42-Huang B, Heron BA, Gray BR, Eglezos S, Bates JR, Savill J. A predominant and virulent *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain detected in isolates from patients and water in Queensland, AAustralia, by an amplified fragment lenght polymorphism protocol and virulence gene-based PCR assay. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(9): 4164-4168

- 43-Imai N, Yagi N, Konishi T, Serizawa M, Kobari M. Legionnaires' disease with hypoperfusion in the cerebellum and frontal lobe on single photon emission computed tomography. *Internal Med* 2008; **47**: 1263-1266
- 44-Jürgens D, Fehrenbach FJ. Identification of *Legionella* species by lipopolysaccharide antigen pattern. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(12): 3054-3057
- 45-Kayabek CY. *Legionella* İnfeksiyonları Lejyoner Hastalığı ve Turizm Çevresel Önlemler ve Korunma Yöntemleri *Legionella* Dezenfeksiyonu. 2002.
- 46-Kim MJ, Sohn JW, Park DW, Park SC, Chun BC. Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(7): 2974-2979
- 47-Kohler RB, Washington C W JR, Wheat LJ. Onset and duration of urinary antigen excretion in legionnaires disease. *J Clin Microbiol* 1984; **20** (4): 605-607
- 48-Koide M, Furugen M, Haranaga S, Higa F, Tateyama M, Yamane N ve ark. Characteristics of *Legionella pneumophila* serogroup 2 strains by colony morphology. *Jpn J Infect Dis* 2008; **61**: 487-489
- 49-Ko KS, Lee HK, Park MY, Park MS, Lee KH, Woo SY ve ark. Population Genetic Structure of *Legionella pneumophila* Inferred from RNA Polymerase Gene (*rpoB*) and DotA Gene (*dotA*) Sequences. *J Bacteriol* 2002; **184**(8): 2123-2130
- 50-*Legionella pneumophila*. (internette) 2008, Aralık. Erişim 21.03.2009, [www.mikrobiyoloji.org: http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/943103700.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/943103700.pdf)
- 51-*Legionella* 1 (internette) Erişim 30.03.2009, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob4.pdf
- 52-Lindsay DSJ, Abraham WH, Fallon RJ. Detection of mip gene by PCR for diagnosis of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 1994; **32**(12): 3068-3069
- 53-Lindsay DSJ, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GFS. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella*

- pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol* 2004; **53**: 183-187
- 54-Linscott AJ, Poulter MD, Ward K, Bruckner DA. *Legionella pneumophila* serogroup 4 isolated from joint tissue. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(3): 1365-1366
- 55-Lück PC, Helbig JH, Schuppler M. Epidemiology and laboratory diagnosis of *Legionella* infections. *Lab Med* 2002; **26**(3/4): 174-182
- 56-Lück PC, Schneider T, Wagner J, Walther I, Reif U, Weber S ve ark. Community-acquired legionnaires disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10 linked to the private home. *J Med Microbiol* 2008; **57**: 240-243
- 57-Malan AK, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR, Litwin CM. comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(7): 3060-3063
- 58-Matsiota-Bernard P, Pitsouni E, Legakis N, Nauciel C. Evaluation of commercial amplification kit for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994; **32**(6): 1503-1505
- 59-McDade JE, Brenner DJ, Bozeman FM, Legionnaires' Disease Bacterium Isolated in 1947. *Ann Intern Med* 1979; **90**(4): 659-661
- 60-Minbay A. Legionellaceae familyası. içinde *Özel Mikrobiyoloji (epidemioloji, bakteriyel ve mikotik infeksiyonlar)*;
- 61-Modi A, Gardner J, Lighton L, Coetzee N. Pontiac fever outbreak associated with a spa-pool, United Kingdom, April 2008. *Euro Surveill.* 2008; **13**(30):18934. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18934>
- 62-Murdoch DR, Chambers ST. Detection of *Legionella* DNA in peripheral Leukocytes, serum, and urine from a patient with pneumonia caused by *Legionella dumoffi*. *Clin Infect Dis* 2000; **30**:382-383
- 63-Nagai T, Sobajima H, Iwasa M, Tsuzuki T, Kura F, Amemura-Maekawa J ve ark. Neonatal sudden death due to *Legionella* pneumonia associated with water birth in a domestic spa bath. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(5): 2227-2229

- 64-National Center For Biotechnology Information (NCBI). Erişim 01.04.2009, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 65-Nikaido Y, Yoshida SI, Goto Y, Mizuguchi Y, Kuroiwa A. Macrophage-activating T-cell factor(s) produced in an early phase of *Legionella pneumophila* infection in guinea pigs. *Infect Immun* 1989; **57**(11): 3458-3465
- 66-Noël E, Roger M, Servais D, Delemare N. *Children exposure to Legionella pneumophila in day nurseries in the province of Hainaut (Belgium)*. European Working Group for Legionella Infections 20. annual meeteng 16-17 Mayıs 2005. Erişim 24.03.2009, Istituto Superiore Di Sanità: <http://www.iss.it/binary/publi/publi/05-C2.1115128370.pdf>
- 67-Nolte FS, Conlin CA, Motley MA. Electrophoretic and serological characterization of the lipopolysaccharides of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1986; **52**(3): 676-681
- 68-Özerol IH, Bayraktar M, Çizmecı Z, Durmaz R, Akbaş E, Yıldırım Z ve ark. Legionnaire's disease: a nosocomial outbreak in Turkey. *J Hosp Infect* 2006; **62**: 50-57
- 69-Page LA ve Lattimer GL. Detection of complement-fixing antibodies to Legionnaires' disease bacterium and *Chlamydia* in animal and human sera. *Curr Microbiol* 1978; **1**:331-334
- 70-Pan X, Yang X. a serological investigation of *Legionella* infection in six-species poultries and domestic animals in Luzhou city, Sichuan province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 1999; **20**(2): 108-110
- 71-Phakkey A, Lindqvist KJ, Omland T, Berdal BP. *Legionella* antibodies in human and animal populations in Kenya. *APMIS*. 1990; **98**(1): 43-49
- 72-Pınar A. doğa kaynaklı insan patojeni *Legionella*; tanı ve korunma yaklaşımları. *Hacettepe tıp dergisi* 2002; **33**(2):93-98
- 73-Rathore M. *Legionella infection*. 08.08.2007. Erişim 28.03.2009, emedicine: <http://www.eid.ac.cn/MirrorResources/2089/topic1288.htm.1.1.html#section~AuthorsandEditors>
- 74-Reinhardt JF, Nakahama C, Eldestein PH. Comparison of blood culture methods for recovery of *Legionella pneumophila* from the blood of guinea pigs with experimental infection. *J Clin Microbiol* 1987; **25**(4): 719-721

- 75-Rihs JD, Yu VL, Zuravleff JJ, Goetz A, Muder RR. Isolation of *Legionella pneumophila* from blood with the BACTEC system: a prospective study yielding positive results. *J Clin Microbiol* 1985; **22**(3): 422-424
- 76-Ritcketts KD, Yadav R, Joseph CA. Travel-associated Legionnaires' disease in Europe: 2006. *Euro Suveill.* 2008;**13**(29):18930. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18930>
- 77-Rojas A, Navarro MD, Fornés FE, Serra E, Simarro E, Rojas J ve ark. Value of serological testing for diagnosis of Legionellosis in outbreak patients. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(8): 4022-4025
- 78-Rolstad B, Berdal BP. Immune defenses against *Legionella pneumophila* in rats. *Infect Immun* 1981; **32**(2): 805-812
- 79-Saijo T, Izumikawa K, Takazono T, Kosai K, Kurihara S, Nakamura S ve ark. A case of *Legionella pneumophila* pneumonia followed by invasive aspergillosis. *Jpn J Infect Dis* 2008; **61**: 379-381
- 80-Sedgwick AK, Tilton RC. Identification of *Legionella pneumophila* by latex agglutination. *J Clin Microbiol* 1983; **17** (2): 365-368
- 81-Shinozawa Y, Matsumoto T, Uchida K, Tsujimoto S, Iwakura Y, Yamaguchi K. Role of interferon-gamma inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*. *J Med Microbiol* 2002; **51**: 225-230
- 82-Sonder GJ, van den Hoek JA, Bovee LP, Aanhanne FE, Worp J, Du Ry van Beest Holle ve ark. Changes in prevention and outbreak management of Legionnaires' disease in the Netherlands between two large outbreaks in 1999 and 2006. *Euro Surveill.* 2008;**13**(38): 18983 Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18983>
- 83-Stølhaug A, Berg K. Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella spp.* With real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing. *Appl Environ Microb* 2006; **72**(9): 6394-6398
- 84-Unit for Surveillance and Control of Communicable Diseases. Legionnaires' disease in a neonatal unit of a private hospital, Cyprus, December 2008: preliminary outbreak report. *Euro Surveill.* 2009;**14**(2):pii=19090. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19090>

- 85-Vella CEE. Legionnaires' disease: a review. *J Roy Soc Med* 1978; **71**: 361-368
- 86-Vural T, Köse EO. Lejyoner hastalığı ve turizm. *ANKEM derg* 2004; **18**(3): 184-187
- 87-Washington C W JR. Legionnaires disease: historical perspective. *Clin Microbiol Rev* 1988; **1**(1): 60-81
- 88-Wever PC, Notermans DW, Tulevski II, Schattenkerk JKME, Jong MD. (Letters to the Editor) Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in bronchoalveolar lavage fluid by an immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol* 2003; **41** (5): 2265
- 89-Wilson D, Lieberman BY, Reischl U, Warshawsky I, Procop GW. Comparision of five methods for extraction of *Legionella pneumophila* from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(12): 5913-5916
- 90-Yardımcı H. Legionella infeksiyonları içinde *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*; 2006. pp.215-217

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ ETİK KURULU İstanbul University Veterinary Faculty Ethic Committee

Karar No:2006/159

30.05.2006

İlgi: İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlığı'nın 2685 sayı ve 30.05.2006 tarihli yazısı;

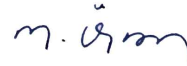
Fakültemiz Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Atilla ILGAZ'ın danışmanlığı altında doktora eğitimini yapan Veteriner Hekim Semiha AKSEL'in hazırlamış olduğu **“İstanbul Yöresindeki Klinik Belirtili Köpeklerde, Legionella Pneumophila SGI Varlığının Kültür PCR ve Üriner Antijen Aranması Yöntemleriyle Araştırılması”** başlıklı araştırma projesi kurulumuz tarafından incelenmiş ve **“Etik Kurul İlkelerine Uygun Bulunmuştur”**.



Prof.Dr. Tamer DODURKA
Başkan



Prof.Dr. Oya KELEŞ
Başkan Yardımcısı



Doç.Dr. Mustafa ÖZCAN
Raportör

Doç.Dr. Ayşen ALTINER
Üye


Yard.Doç.Dr.Dr. Altan ARMUTAK
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SEMİHA	Soyadı	AKSEL YALÇIN
Doğ.Yeri	BOZKIR	Doğ.Tar.	10.02.1982
Uyruğu	TC	TC Kim No	54568243782
Email	vetsemiha@yahoo.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ MİKROBİYOLOJİ ABD	-
Yük.Lis.	İ.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ	2003
Lisans	İ.Ü. VETERİNER FAKÜLTESİ	2003
Lise	KÜÇÜKÇEKMECE LİSESİ	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Veteriner Hekimi	Gıda kurumu	2006-2009
2.	Veteriner Hekimi	Pet kliniği	2006-2006
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	iyi	63.750	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
ALES Puanı	69	72	76

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows office programları	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri: Mili Eğitim Bakanlığı onaylı yabancı dil kurs sertifikası, İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü uygulamalı deney hayvanları kurs katılım belgesi, TÜV-TSENISOIEC/17025:2005 Deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için iç tetkikçi eğitim sertifikası