

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

ESKİŞEHİR'DE KLİNİK ÖRNEKLERDE VE SULARDA  
*LEGİONELLA* SPP. ARAŞTIRILMASI

Dr. Mönire PINARBAŞLI

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR  
2011



T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

ESKİŞEHİR'DE KLİNİK ÖRNEKLERDE VE SULARDA  
*LEGİONELLA* SPP. ARAŞTIRILMASI

Dr. Mönire PINARBAŞLI

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI  
Prof.Dr.Yurdanur AKGÜN

ESKİŞEHİR  
2011

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Münire PINARBAŞLI'ya ait "Eskişehir'de Klinik Örneklerde ve Sularda *Legionella* spp. Araştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: ..... / ..... / 2011

Jüri Başkanı Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Tercan US  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun  
...../...../2011 Tarih ve ...../..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Necmi ATA  
Dekan

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, her konuda rahatlıkla ulaőıp danıőtıđım değerli hocam ve tez danıőmanım Prof.Dr. Yurdanur AKGÜN'e; uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım, Prof.Dr. Gül DURMAZ, Prof.Dr. Filiz AKŐİT, Prof.Dr. Nuri KİRAZ, Prof.Dr. Tercan US, Doç.Dr. Nihal DOĞAN, Doç.Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ, Yrd.Doç.Dr. Nilgün KAŐİFOĐLU ve Yrd.Doç.Dr. Yasemin ÖZ'e çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Pınarbaşı, M. Eskişehir'de Klinik Örneklerde ve Sularda *Legionella* spp. Araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2011.**

Legionellozis, asemptomatik enfeksiyondan, hayatı tehdit eden ölümcül hastalıklara varabilen önemli bir halk sağlığı sorunudur ve hastanelerin su sistemleri primer kaynaklardır. Su sistemlerinde kolonize olan bakteriler, immüdüşkün ve risk faktörleri bulunan duyarlı kişilerde enfeksiyona yol açabilmekte iken etkenin eradikasyonu ile enfeksiyonlar önlenmektedir. Bu çalışmada hastanelerdeki su sistemleri ile pnömoni tanısıyla izlenen hastalarda etken olarak *Legionella* araştırılması amaçlandı. Bu amaçla hastanelerdeki 100 musluktan toplam 200 su ve sürüntü örneği alınıp, doğrudan ve asitle muamele sonrasında 400 ekim yapıldı. MWY besiyerindeki koloni morfolojileri, mikroskopik görünümleri, kanlı agarda ürememesi ve *Legionella* lateks aglütinasyon testi ile 23 (%23) musluktan alınan 29 örnekte *Legionella* spp. izole edildi. İzolatların 23'ü *L.pneumophila* serogrup 2-14, 6'sı serogrup 1 idi. İzolatların 17'si immüdüşkün hastaların bulunduğu ünitelerde üredi. Sürüntü örneklerinde *Legionella* daha fazla izole edildi ve anlamlı bulundu. Su örneklerinde direkt ekim ile sürüntü örneklerinde ise asitle muamele sonrası *Legionella* daha fazla izole edildi ve anlamlı bulundu. Ayrıca pnömonili 50 hastada kültürde *Legionella* aranırken, idrarlarında *L.pneumophila* antijeni ve serumlarında *L.pneumophila* total antikor bakıldı. Hastaların hiçbirisinde kültürde üreme olmadı. 50 hastadan 1'inde idrar antijeni pozitif iken, bu hasta dahil 5 (%10) hastada *L.pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı seropozitiflik saptandı. Bu 5 hastada lejyonellozis için belirlenen risk faktörleri mevcuttu. Risk faktörlerinin varlığında pnömoni etiyolojisinde *Legionella* mutlaka araştırılmalıdır. *Legionella* tür ve serogruplarının dağılımına uygun, duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek tanı testlerinin geliştirilmesine ve daha fazla çalışma yapılmasına gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Hastane, *Legionella*, pnömoni, su

## ABSTRACT

**Pınarbaşı, M. An Investigation of *Legionella* spp. in Clinical Samples and Waters in Eskisehir. Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Medical Microbiology, Eskisehir, 2011.** Legionellosis is a public health problem ranging from asymptomatic to life-threatening infections and water distribution systems of the hospitals are the primary reservoirs. The bacteria colonizing in the water systems cause infection in immunocompromised or susceptible persons who have risk factors. We can prevent the infections with eradicating the causative agent. We aimed to investigate the presence of *Legionella* in the etiology of pneumonia and in the water systems of hospitals. 400 inoculations from 200 water and swab samples were done directly and after acid treatment from 100 faucets of hospitals. *Legionella* spp. were isolated in 29 samples taken from 23 (23%) faucets according to colony morphology in MWY agar, appearance with microscopy, not growing on blood agar and using *Legionella* latex agglutination method. Among isolates, 23 were *L.pneumophila* serogroup 2-14 and 6 were serogroup 1. 17 of 29 isolates were from departments where the immunocompromised patients are hospitalized. *Legionella* recovery rate in swab samples was higher and statistically significant. *Legionella* was recovered more frequently when inoculated directly in water samples and after acid treatment in swab samples with statistical significance. In 50 patients with pneumonia, culture was performed for *Legionella* and *Legionella* urinary antigen and total antibody were studied. None of the samples were culture positive. *Legionella* urinary antigen was positive in 1 of 50 patients and 5 (10%) patients including that patient were seropositive for *L.pneumophila*. Risk factors for legionellosis were detected in all of 5 patients. *Legionella* should be researched in the etiology of pneumonia when risk factors are present. Further studies are needed to develop more sensitive and specific tests appropriate for the distribution of *Legionella* species and serogroups.

Key Words: Hospital, *Legionella*, pneumonia, water

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Tanım ve Tarihçe	3
2.2.Sınıflandırma	4
2.3.Mikrobiyolojik Özellikleri	6
2.4.Epidemiyoloji	8
2.4.1.Ekoloji	8
2.4.2.Enfeksiyon Kaynağı	9
2.4.3.Bulaş Yolları	10
2.4.4.Prevalans	11
2.5.Patogenez	12
2.6.Klinik Belirtiler ve Bulgular	15
2.6.1.Lejyoner Hastalığı	15
2.6.2.Pontiac Ateşi	16
2.6.3.Akciğer dışı Hastalıkları	17
2.7.Mikrobiyolojik Tanı	17
2.7.1.Klinik Örneklerde <i>Legionella</i> Cinsi Bakteri İzolasyon Yöntemleri	17
2.7.2.Çevresel Örneklerde <i>Legionella</i> Cinsi Bakteri İzolasyon Yöntemleri	25
2.8. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Tür Tanısı ve Serogruplandırılması	28



	Sayfa
2.8.1.Lateks Aglütinasyon Testi	28
2.8.2.Direkt Floresan Antikor Testi	28
2.8.3.İzolatlara Tiplendirilmesinde Kullanılan Testler	29
2.9.Tedavi	31
2.10.Nozokomiyal Salgınlar,Korunma ve Kontrol	32
2.11.Su Dağıtım Sistemlerinin Dezenfeksiyonu	34
2.11.1.Termal Yöntem	34
2.11.2.Ultraviyole Işınlari	35
2.11.3.Serbest Klor	35
2.11.4.Bakır-Gümüş İyonizasyonu	35
2.11.5.Monokloramin	36
3.GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1.Gereçler	37
3.1.1.Cam ve Plastik Malzemeler	37
3.1.2.Cihazlar	38
3.1.3.Besiyerleri	39
3.1.4.Çözeltiler	41
3.2.Yöntemler	42
3.2.1.Su ve Sürüntü Örneklerinin Alınması ve Ekimi Öncesi İşlemler	42
3.2.2.Su ve Sürüntü Örneklerinin Kültürü ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi	43
3.2.3. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Tür ve Serogrup Düzeyinde Tanımlanması	43
3.2.4.İzolatlara Saklanması	45
3.2.5.Klinik Örneklerin İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler	45
3.3.İstatiksel Değerlendirme	49
4.BULGULAR	50
4.1.Su Kaynaklı Bulgular	50
4.2.Hasta Bulguları	59

	Sayfa
5.TARTIŞMA	65
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	79
EKLER	
EK 1:Hasta Formu	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ACES	N-2- Acetamido-2-amino-ethanesulfonic Asid
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BMPA	BCYE Agar Supplemented with Cefamandol-Polymyxin B-Anisomycin
CDC	Centers for Disease Control
DFA	Direct Fluorescent Antibody
DGVP	Dye-Glycine-Vancomycin-Polymyxin B
DIC	Dissemine Intravascular Coagulation
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EIA	Enzyme Immunoassay
EWGLI	European Working Group on <i>Legionella</i> Infection
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GVPC	Glycine-Vancomycin-Polymyxin B-Cycloheximide
GPAV	Glycine- Polymyxin B- Anisomycin-Vancomycin
IFA	İndirect Fluorescent Antibody
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
ISO	The International Standard Method
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
OD	Optik Dansite
Mab	Monoklonal Antikor
<i>Mip</i>	Macrophage İnhibitor Potentiator
MRA	Macrorestriction Analysis
MWY	Modifiye-Wadosky-Yee
NAA	Nucleic Acid Amplification
NK	Natural Killer

PAV	Polymyxin B-Anisomycin-Vancomycin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIA	Radioimmunoassay
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultraviole
VAMC	Veterans Affairs Medical Center

**ŞEKİLLER**

	Sayfa
4.1. BCYE besiyerinde üreyen <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin kolonileri	58
4.2. BCYE besiyerinde üreyen <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin kolonileri	58
4.3. Gram negatif çomaklar şeklindeki <i>Legionella</i> cinsi bakteriler	59
4.4. Su örneklerinde üreyen <i>Legionella</i> cinsi bakterilere uygulanan Lateks aglütinasyon testinin negatif ve pozitif sonuçları	59

**TABLolar**

	Sayfa
2.1. <i>Legionella</i> türleri ve serogrup sayıları	5
4.1. Musluklardan alınan su ve sürüntü örnekleri ve alındığı hastane birimleri	51
4.2. <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin izole edildiği örnekler ve alındığı hastane birimleri	52
4.3. <i>L.pneumophila</i> üretilen musluklar ve örnek cinsi	55
4.4. Su kaynaklı izole edilen <i>Legionella</i> türlerinin serogrup dağılımı	56
4.5. Örneklerin asitle muamele işlemine göre <i>Legionella</i> üretilme durumları	57
4.6. Pnömoni tanılı hastaların demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları	61
4.7. <i>Legionella</i> seropozitifliğine göre risk faktörlerinin karşılaştırılması	63
4.8. <i>Legionella</i> seropozitif hastaların klinik bulgularının dağılımı	64
4.9. <i>L.pneumophila</i> testlerinde pozitiflik saptanan hastaların test sonuçları ile risk faktörlerinin dağılımı	65

## 1.GİRİŞ

*Legionella* bakterileri solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkili, aerob, gram negatif basillerdir. İlk kez 1976 yılında Amerikan Lejyonerleri toplantısının yapıldığı Philadelphia'daki bir otelde çıkan pnömoni salgını sonucu tanımlanmıştır (1).

*Legionella* cinsi 50 tür ve 70 farklı serogruptan oluşmaktadır. Bu türlerin yaklaşık yarısı insan hastalıklarıyla ilişkili bulunmuştur (1). *L.pneumophila* en az 16 farklı serogrup içermektedir ve Lejyoner hastalığı olgularının %90'dan fazlasında etkendir (2,3).

*Legionella* spp. doğal su çevrelerinde (akarsular, nehirler, göller, göletler ve termal havuzlar), ve nemli topraklarda yaygın olarak bulunmaktadır. Mikroorganizma nemli ortamlarda, 0-68°C sıcaklıkta ve pH 5-8.5 aralığında uzun süre canlılığını koruyabilmektedir. Klor tolerans göstermesi nedeniyle su kaynağı sistemlerine girebilir ve kaplıca çevrelerinde, soğutma kulelerinin havalandırma sistemlerinde, sıcak su sistemlerinde, duş başlıkları, musluklar, jakuzilerde ve respiratuvar ventilatörlerde üreyebilir (4). Bu sistemlerdeki biyofilm tabakasında bulunabilmelerinin yanısıra serbest yaşayan protozoaların hücre içi paraziti olarak da yaşarlar. Su dağıtım sistemleri organizmanın yayılımında primer rezervuar olarak kabul edilmiştir (5).

*Legionella*'nın insanlara bulaşması aerosolleşme, aspirasyon veya entübasyon sırasında direkt olarak pulmoner sisteme giriş şeklinde olmaktadır. İnsandan insana bulaş gösterilememiştir (6,7). *Legionella*, pnömonili ateşli hastalık (Lejyoner hastalığı), pnömonisiz ateşli hastalık (Pontiac ateşi) ve asemptomatik enfeksiyonlara neden olmaktadır (8). Kan dolaşımı yoluyla mikroorganizmanın yayılımı, akciğer dışı enfeksiyonlara da yol açabilmektedir.

Sigara içiciliği, kronik akciğer hastalığı, kronik kalp hastalığı, ileri yaş ve immüdüşkönlük Lejyoner hastalığının başlıca risk faktörleridir. Aşırı alkol alımı, böbrek yetmezliği, hematolojik malignansiler, diyabet ve erkek cinsiyet de hastalığın risk faktörleri arasında sayılabilir (5).

Lejyoner hastalığına bağlı toplum kaynaklı pnömoni oranı %2-15 arasında değişmektedir. Nozokomiyal pnömoni vakalarının da %1-40'ında izole edilmektedir. Nozokomiyal pnömonilerde mortalite oranı %15-50 arasında değişmektedir (8). Tanısında; alt solunum yolu örneklerinin selektif besiyerinde kültürü, DFA testi, idrar antijen testi, antikor saptama testleri ve nükleik asit çoğaltma yöntemleri kullanılmaktadır (7,5). Ayrıca rezervuar aranmasında çevresel örneklerin (su ve sürüntü) selektif besiyerinde kültürü, DFA testi, nükleik asit çoğaltma yöntemleri de kullanılmaktadır.

Lejyoner hastalığının tedavisinde yeni makrolidler ve florokinolonlar tercih edilmektedir (5,6).

Hastaneler Lejyoner hastalığının bulaşması için ideal ortamlardır. Hastanelerde riskli bireylerin çok sayıda olması, su tesisatının sıklıkla eski ve kompleks olması Lejyoner hastalığına zemin hazırlamaktadır. Hastanelerde *Legionella*'nın kaynağı olarak, sıcak su sistemleri, duş başlıkları, musluklar, respiratuvar ventilatörler, nazogastrik tüpler, nemlendiriciler ve soğutma kuleleri gösterilmektedir (4,7). Legionellozisin, bakterinin belirlenmiş rezervuarlardan kontrolü ve eliminasyonu yoluyla önlenilebilir bir hastalık olduğu düşünülmektedir (4). *Legionella* için riskli hastaların bulunduğu kurumlarda rutin çevre kültürlerinin yapılması, kontamine su sistemlerinin dekontaminasyonu ve tesisatın bakım çalışmaları ile *Legionella* salgınlarının önüne geçileceği düşünülmektedir (1).

Çalışmamızda fakültemiz hastanesi ile Eskişehir'deki bazı hastanelerin çeşitli bölümlerinden alınan su ve sürüntü örneklerinde *Legionella* cinsi bakterilerin bulunuş sıklığı ve kaynaklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca pnömoni tanılı hastalardan örnek alınarak *Legionella* spp.'nin pnömoni etyolojisindeki yeri de saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla hastanelerin 18 farklı bölümünden su ve sürüntü örnekleri alınarak selektif besiyerinde kültürü yapılmıştır. Hastalardan alınan solunum yolu örneklerinin selektif besiyerinde kültürü yapılmış, ayrıca EIA yöntemi ile idrar örneklerinde *Legionella* antijeni ve serum örneklerinde *L.pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı total antikor (IgG/IgM/IgA) aranmıştır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tanım ve Tarihçe

1976 yılında Amerikan Lejyonerleri toplantısının yapıldığı Philadelphia'daki bir otelde bir pnömoni salgını ortaya çıkmıştır (1,5). Toplam 221 kişide pnömoni gözlenmiş ve bunların 34'ü ölümlerle sonuçlanmıştır (5). Yaklaşık 6 ay sonra, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'den Joseph McDade ve Charles Shepard adlı iki araştırmacı, bir müşkülpesent gram negatif basil olan etyolojik ajanı keşfettiklerini duyurmuşlardır (9). Bu yeni keşfedilen bakteri *Legionellaceae* ailesi, *Legionella* cinsi ve *pneumophila* (akciğerleri seven) türüne dahil edilmiştir (10).

1974 yılında Philadelphia'daki aynı otelde yapılan Oddfellow toplantısına katılan 11 üyenin de Lejyoner hastalığına yakalandığı ortaya çıkmıştır (5). *Legionella pneumophila*'nın keşfinden sonra bu salgının farkına varılmıştır.

Bilinen ilk Lejyoner hastalığı salgını 1965 yılında Washington DC'deki bir psikiyatri hastanesinde olmuştur. 81 hastada solunum yolu enfeksiyonu gözlenmiş ve bunlardan 15'i ölmüştür. Hastalardan toplanan serum örneklerinde 12 yıl sonra yapılan retrospektif serolojik çalışmalarda hastaların %85'inde *L.pneumophila* antikor serokonversiyonu saptanmıştır (5).

Ateşli solunum yolu hastalığına yakalanmış bir hastanın kanının kobaya inokülasyonu yoluyla 1947 yılında izole edilen bir bakterinin, 30 yıl sonra yapılan çalışmalarla *L.pneumophila* olduğu kabul edilmiştir (5).

Etiyolojisi aydınlatılamamış bir pnömonisiz ateşli hastalık salgınının da *Legionella* bakterisinin bulaşması sonucu olduğu bulunmuş ve bu hastalığa meydana geldiği yer olan Pontiac'dan( Michigan) dolayı Pontiac ateşi adı verilmiştir (4).

*L.pneumophila*'nın tanımlanmasından iki yıl sonra ikinci bir *Legionella* türü, *L.micdadei* keşfedilmiştir (11). Bunu izleyen yıllarda üreme ve zenginleştirme besiyerlerinin keşfi ile klinik ve çevre çalışmaları sonucu çok sayıda *Legionella* türü keşfedilmiştir

Tobin ve arkadaşları 1980 yılında hastane kaynaklı Lejyoner hastalığı görülen bir hastanın odasında bulunan duş başlığından etkeni izole

etmeyi başarmışlardır. Bu tarihten sonra pek çok hastanenin kullanım suyunda *Legionella* bakterilerinin varlığı araştırılmış ve nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkisi ortaya konmuştur (12).

## 2.2.Sınıflandırma

DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları 1976 pnömoni salgınına sebep olan bakterinin yeni bir tür olarak sınıflandırılmasına dikkat çekmiştir. 1979 yılında Brenner, Steigerwalt ve McDade Philadelphia'daki Lejyoner hastalığı etkeni olan *L.pneumophila* bakterisini *Legionellaceae* ailesi içine dahil etmiştir (13).

*Legionellaceae* ailesi en çok *Coxiellaceae* ailesi ile ilişkilidir. Her iki aile, *Proteobacteria* bölümü ve *Gammaproteobacteria* sınıfı altında "Legionellales" takımını oluştururlar. Q ateşi etkeni *Coxiella burnetii*, *L.pneumophila* ile hücre içi parazitlik ve bazı virulans genlerinde birçok benzer noktalar taşırlar (1,3,14).

Bazı araştırmacılar *Legionellaceae* ailesi içinde *Tatlockia* ve *Fluoribacter* adı altında ek cins isimlerinin kullanılmasını önermişlerse de, yapılan 16S rRNA çalışmalarında *Legionellaceae* ailesinin tek cinsten oluştuğu kabul edilmiştir (3). Adı geçen cins isimleri, hiçbir zaman geniş kabul görmemiş ve sadece tarihsel açıdan ilgi uyandırmışlardır.

Yalnızca serbest yaşayan amipler içinde üreyebilen, rutin *Legionella* besiyerlerinde üretilmeyen bir grup *Legionella*-benzeri bakteri tanımlanmış ve LLAP (*Legionella*-like amoebal pathogen) şeklinde adlandırılmışlardır. LLAP'lerden *L.lytica*'nın insanlarda hastalık oluşturduğu gösterilmiş ve dört adet LLAP suşunun dört ayrı *Legionella* türü olduğu kabul edilmiştir (1,3).

Günümüzde *Legionellaceae* ailesi, *Legionella* adı verilen tek bir cins, bu cinse ait 50 tür ve 70 farklı serogruptan oluşmaktadır (Tablo 2.1). *L.pneumophila* en az 16 farklı serogrup içermektedir (2). *Legionella* türlerinin yaklaşık yarısı insan hastalıklarıyla ilişkili bulunmuştur (1).

*L.pneumophila*, Lejyoner hastalığı olgularının %90'dan fazlasında etkendir (3). İnsanda gözlenen enfeksiyonların çoğundan *L.pneumophila*

serogrup 1, 4 ve 6 sorumludur (8). *L.micdadei*, *L.bozemanii*, *L.dumoffii*, *L.feelei*, *L.longbeachae* ve diğer türler de aynı şekilde patojeniktir (7).

Tablo 2.1. *Legionella* Türleri ve Serogrup Sayıları

<i>Legionella</i> Türü	Serogrup Sayısı	Çevreden İzolasyon	İnsandan İzolasyon
<i>L.cherrii</i>	1	E	H
<i>L.erythra</i>	2	E	H
<i>L.jamestownensis</i>	1	E	H
<i>L.shakespearei</i>	1	E	H
<i>L.santicrucis</i>	1	E	H
<i>L.rubrilucens</i>	1	E	H
<i>L.geestiana</i>	1	E	H
<i>L.nautarum</i>	1	E	H
<i>L.londiniensis</i>	1	E	H
<i>L.worsleiensis</i>	1	E	H
<i>L.quateirensis</i>	1	E	H
<i>L.moravica</i>	1	E	H
<i>L.quiniivianii</i>	2	E	H
<i>L.spiritensis</i>	2	E	H
<i>L.gratiana</i>	1	E	H
<i>L.steigerwaltii</i>	1	E	H
<i>L.brunensis</i>	1	E	H
<i>L.adelaidensis</i>	1	E	H
<i>L.fairfieldensis</i>	1	E	H
<i>L.pneumophila</i>	16	E	E
<i>L.anisa</i>	1	E	E
<i>L.oakridgensis</i>	1	E	E
<i>L.maceachernii</i>	1	E	E
<i>L.longbeachae</i>	2	E	E
<i>L.sainthelensi</i>	2	E	E
<i>L.micdadei</i>	1	E	E
<i>L.jordanis</i>	1	E	E
<i>L.israelensis</i>	1	E	H
<i>L.gormanii</i>	1	E	E
<i>L.dumoffii</i>	1	E	E
<i>L.spiritensis</i>	2	E	H
<i>L.bozemanii</i>	2	E	E
<i>L.beliardensis</i>	1	E	H
<i>L.birminghamensis</i>	1	H	E
<i>L.busanensis</i>	1	E	H
<i>L.cincinnatiensis</i>	1	H	E
<i>L.feeleii</i>	2	E	E
<i>L.lansingensis</i>	1	H	E

Tablo 2.1. Legionella Türleri ve Serogrup Sayıları (devamı)

<i>L.parisiensis</i>	1	E	H
<i>L.tucsonensis</i>	1	H	E
<i>L.wadsworthii</i>	1	H	E
<i>L.hackeliae</i>	2	H	E
<i>L.fallonii</i>	1	E	H

### 2.3. Mikrobiyolojik Özellikleri

*Legionellaceae* ailesinin üyeleri 0.3-0.9 µm eninde ve 2-20 µm uzunluğunda gram negatif, aerop, sporsuz, kapsülsüz basillerdir. Dokuda ve klinik örneklerde, mikroorganizma 1-2 µm boyunda kokobasil şeklindedir. Bazı besiyerlerinde üredikten sonra uzun filamantöz formları görülebilir (5). Polar veya lateral flajelleriyle hareketli basillerdir (1).

Mikroorganizmanın klinik örneklerde Gram boyama ile görülmesi zordur, bazik fuksin safranından daha iyi boyama imkanı sağlar. Gimenez boyası ile mikroorganizma Gram boyama kadar hızlı ve daha etkili bir şekilde boyanır. Dieterle ve Warthin-Starry gibi gümüş boyaları parafinli doku kesitlerinde *Legionella*'nın görülmesine imkan tanır (5). *L.micdadei* dokularda zayıf olarak aside dirençlidir ve modifiye Kinyoun yöntemi ile en iyi boyanır (8).

Mikroorganizma besin gereksinimi açısından müşkülpeşenttir ve standart besiyerlerinde üremez. Bu mikroorganizmanın izolasyonunda kullanılan primer besiyeri pH 6.9'da tamponlanmış kömür ve maya ekstreli agar (BCYE) "buffered charcoal yeast extract" 'dir. L-sistein kültür için muhakkak gerekli bir içeriktir. Keto asitler ve demir iyonları ikisi birlikte üremeyi uyarır. Maya özündeki pürin ve pirimidin deriveleri aktif maddeler olup bunlar arasında en önemlisi de guanindir (5). Aktif kömür, yağ asitlerini ve oksijen radikallerini absorbe edip, toksik etkisini ortadan kaldırırken, sisteinin de oksidasyonunu engeller. BCYE besiyerine α-ketoglutarik asit ilavesi muhtemelen oksijen tutucu enzimlerin üretimini uyararak *Legionella*'nın üremesini arttırmaktadır (5).

Bakteriyel üremeyi sağlamada agarın pH'sı önemlidir. N-2-asetamino-2-aminoetansülfonik asit (ACES, N-2-acetamido-2-amino-

ethanesulfonic asid) ilave edilerek pH'sının 6.9'a ayarlanması gerekir. *Legionella* enerji kaynağı olarak proteinleri karbonhidratlara tercih eder.

Klinik olarak önemli *Legionella* türleri en iyi 35°C'de BCYE $\alpha$  besiyerine inokülasyon sonrası 2-5 gün içinde ürer. Az rastlanılan *Legionella* türlerinin izolasyonu için nadiren inkübasyon süresinin 10 güne uzatılması gerekebilir (4). Katı besiyerinde üremesi, nem oranının arttırılmasıyla kolaylaştırılır. İnkübasyonun %2-5 CO<sub>2</sub>'li ortamda gerçekleştirilmesi, bazı *Legionella* türlerinin üremesini kolaylaştırır da çoğu tür için bu geçerli değildir (3). BCYE besiyerinde ürediğinde gri-beyaz veya mavi-yeşil, konveks, yapışkan, yaklaşık 2-4 mm çapında koloniler oluşturur. Koloni mikroskopunda incelendiğinde genç kolonilerin ortası buzlu cam görünümünde, parlak gri ve granülerdir. Besiyerlerinin günlük değerlendirilmesi gerekir çünkü eski koloniler karakteristik özelliklerini kaybedip, diğer bakterilerle karıştırılabilir (8).

*L.pneumophila* ve *Legionellaceae* ailesinin diğer üyelerinin katalaz ve oksidaz reaksiyonu zayıf pozitifdir. *L.pneumophila* asakkarolitik, üreaz-negatif, nitrat-negatif ve jelatinaz-pozitifdir. Ailenin diğer üyeleri de nonfermentatif, üreaz ve nitrat negatifdir. *L.pneumophila* hippurati güçlü bir şekilde hidroliz eder (5). Klinik materyallerden izole edilen diğer *Legionella* türlerinin çoğunda sodyum hippurat hidroliz testi negatifdir. Sodyum hippurat hidroliz testi, *L.pneumophila* ve diğer *Legionella* türlerinin birbirinden olası ayırımında faydalı bir yöntemdir (13). *L.micdadei*, *L.maceachaernii* ve *L.feeleii* dışındaki çoğu tür  $\beta$ -laktamaz üretir (5).

*L.pneumophila* tirozin içeren besiyerinde dağılabilen melanin benzeri kahverengi pigment üretir. Uzun-dalga UV lamba ile bakıldığında ise oldukça açık sarı-yeşil renkte floresan verir. *Legionella*'nın bazı türlerinde ise UV ışık altında mavi-beyaz veya kırmızı ofloresan gözlenir (5).

İlk izolasyonda çoğu türde tek, polar flajel ya da çok sayıda fimbria bulunur. İç sitoplazmik membran, peptidoglikan tabaka ve dış sitoplazmik membrandan oluşan hücre duvar yapısı diğer gram-negatif basillerde olduğu gibidir. Polisakkarit kapsül bulunabilir (5). *L.pneumophila*, 24-29 kDa moleküler ağırlıkta bir dış membran proteini içerir. Bu protein lipit

membranlarla temas halindeki iyon-geçirgen kanalları oluşturur (5). *L.pneumophila* serogrup 1'in lipopolisakkariti bu proteine sıkıca bağlanmıştır. İndirekt immünfloresan yöntemi ile saptanan antikolar primer olarak lipopolisakkarite karşı oluşur (5). *Legionellaceae* ailesi üyelerinin hücre duvarları dallanmış yağ asidi zincirleri ve bol miktarda ubikinon içerir. Bu sayede gaz likit kromatografisi veya hücresel ubikinon analizleri ile ön identifikasyonları yapılabilir (15).

## 2.4.Epidemiyoloji

### 2.4.1. Ekoloji

*Legionella* spp. çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. Doğal su çevrelerinde (akarsular, nehirler, göller, göletler ve termal havuzlar), nemli topraklarda ve balçıkta bulunabilirler. Mikroorganizma nemli ortamlarda, 0-68°C sıcaklıkta ve pH 5-8.5 aralığında uzun süre canlılığını koruyabilir (4). *Legionella* spp. 2-8°C'de saklanmış su örneklerinde yıllarca canlı kalabilir (5).

Klor tolerans göstermesi nedeniyle su kaynağı sistemlerine girebilir, kaplıca çevrelerinde, soğutma kulelerinin havalandırma sistemlerinde, sıcak su sistemlerinde, duş başlıkları, musluklar, jakuzilerde ve respiratuvar ventilatörlerde üreyebilir. Mikroorganizma bu sistemlerin yüzeyindeki, klor ve biyositlerin etkilerine uzak kalmalarını sağlayan biyofilm tabakasında bulunabilirler (4). Binaların su sistemlerindeki biyofilm tabakasında canlılığını sürdürebilmesi nedeniyle *Legionella*'nın su yerine sürüntü örneklerinde daha kolay saptanabildiği düşünülmektedir (1,16). Doğal su çevrelerinde *Legionella* az sayıda bulunmaktadır. İnsan yapımı su sistemlerine girerken de az sayıdadır ancak uygun su sıcaklığı, fiziksel korunma ve besin maddeleri sayesinde çoğalır (5).

*Legionella*'nın optimal üremesi, içinde yaşayıp çoğalabildiği serbest yaşayan amipler ile birlikte yaşayıp, besin maddelerini sağladığı bazı su bakterileri gibi mikroorganizmalar yardımıyla olmaktadır. *Legionella* su ve nemli toprak çevrelerinde serbest yaşayan *Acanthamoeba*, *Naegleria* vb. protozoaların hücre içi paraziti olarak yaşar (4). Isısı değişen su çevreleri protozoa ve bakteri arasındaki dengeyi *Legionella*'nın hızla çoğalması

yönünde değiştirebilmektedir ve sonrasında konak rüptürü ile bakterinin dış ortama salındığı düşünülmektedir. Bir su çevresindeki bakterinin varlığı, ılık su sıcaklığı ve bakterinin çoğalmasına imkan sağlayan besin faktörlerinin varlığına bağlı olarak Lejyoner hastalığı riskini arttırmaktadır.

Diğer potansiyel patojen bakteri ve mantarlar gibi *Legionella* da, su dağıtım sistemlerinin yaygın bir kolonizan bakterisidir. Çoğu *Legionella* türü su dağıtım sistemlerinde kolonize olmakla birlikte sadece birkaç spesifik tür ve tip suya maruz kalan kişilerde hastalık oluşturabilir. Legionellozisin, bakterinin kesin rezervuarlarından eliminasyonu ve kontrolü yoluyla önlenebilir bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle binaların su sistemlerinden kaynaklanabilecek Legionellozis riskini en aza indirmek için kontrol stratejileri ve rehberler geliştirilmiştir (4).

#### **2.4.2.Enfeksiyon Kaynağı**

Soğutma kuleleri ve evaporatif klima sistemleri direkt su ile temas yoluyla ısıyı atmosfer havasına transfer etmektedir. Soğutma kuleleri ve klimalardan ortaya çıkan hava akımı aerosol formundadır. Kontamine aerosollerin duyarlı kişilere mikroorganizmayı bulaştırdığı tahmin edilmektedir (5).

Pontiac ateşi, evaporatif klima sistemleri, soğutma kuleleri, klimalar ve jakuzilerde bulunan etkenin aerosolleşmesine bağlanmıştır (5). Soğutma kulelerinin Lejyoner hastalığının bulaş kaynağı olmasıyla ilgili pek çok epidemiyolojik araştırma yapılmıştır. Birçok salgında soğutma kuleleri dezenfekte edildikten sonra da Lejyoner hastalığı olgularının devam ettiği bilinmektedir. Bu araştırmalar sırasında mikroorganizmanın su dağıtım sistemlerinde de var olduğu gösterilmiştir (5).

*L.pneumophila*'nın su dağıtım sistemlerini kolonize etmesinin keşfinden sonra su dağıtım sistemleri mikroorganizmanın yayılımında primer rezervuar olarak kabul edilmiştir (5). Yapılan çeşitli çalışmalarda kontamine hastane su dağıtım sistemleri ile nozokomiyal enfeksiyon olguları arasında epidemiyolojik bağlantı kurulmuştur.

Moleküler parmakizi “fingerprinting” yöntemleri ile *L.pneumophila*'nın alttıplemesi yapılarak çeşme suyu kaynaklarının mikroorganizmanın kaynağı olduğu ortaya çıkmıştır (5). Enfeksiyon kaynağının saptanmasında ayrıca monoklonal antikor panelleri, plazmid analizleri, elektroforetik alloenzim tiplendirme, pulse field gel electrophoresis (PFGE) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Polymerase chain reaction) ile moleküler serogrupsama yöntemleri kullanılmaktadır.

### 2.4.3. Bulaş Yolları

*Legionella*'nın insanlara bulaşması aerosolizasyon, aspirasyon veya entübasyon sırasında doğrudan pulmoner sisteme girişi şeklinde olabilir (6). İnsandan insana bulaşı destekleyen kanıt bulunamamıştır (7).

CDC'den araştırmacılar Memphis'deki hastane salgınında hazırladıkları raporla aerosolizasyon teorisini destekleyen ilk kanıt sunmuştur (5). Aerosolizasyonu destekleyen en büyük kanıt ise, 1968 yılındaki evaporatif klimadan yayılan aerosollerle kontamine merkezi havalandırma ünitesinin bulunduğu binadaki Pontiac ateşi salgınıdır. Bu havaya maruz bırakılan kobayların akciğerinde izole edilmiştir (5).

*L.pneumophila*'nın ilk çevresel izolasyonu duş başlığından yapıldığı için, duş aerosollerinin mikroorganizmanın yayılımından sorumlu olduğu düşünülmüştür (5,13). Yapılan çalışmalarda *Legionella*'nın duşlardan az sayıda ve kısa mesafede aerosolleştiği gösterilmiştir (5,17). Nebulizatör, nemlendiriciler ve mekanik ventilatör tüpleri gibi musluk suyu doldurulan solunum yolu ekipmanlarının da mikroorganizmayı aerosolleştirebildiği bilinmektedir (17). Bu ekipmanların temizliklerinin kontamine su ile yapılması da nozokomiyal Lejyoner hastalığı ile ilişkili bulunmuştur (13).

Yapılan çeşitli çalışmalarda çeşme suyu sistemlerinde *L.pneumophila* varlığı ile Lejyonellozis arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Lejyoner hastalığı salgınlarının çoğunun çeşme suyu sistemlerinin kontaminasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (8). Kontamine suların ve kolonize orofaringeal sekresyonların aspirasyonu ile de bulaşma olabilmektedir (18). Baş-boyun cerrahisi yapılan kanser hastalarında, sekel



aspirasyon nedeniyle nozokomiyal Lejyoner hastalığı insidansı yüksek bulunmuştur (9). Yapılan iki prospektif çalışmada nazogastrik tüplerin kontamine suyun mikroaspirasyonu yoluyla nozokomiyal Lejyoner hastalığına yol açtığı gösterilmiştir. Yara enfeksiyonları ise yaranın kontamine suyu emmesi sonucu oluşmaktadır (19). Birkaç çalışmada toprağın kazılması yoluyla aerosolizasyondan bahsedilmiş ancak bu hipotez doğrulanmamıştır (5).

#### 2.4.4.Prevalans

Lejyoner hastalığının prevalansı su kaynaklarının bu bakteri ile kontaminasyon derecesine, suyla temas eden kişilerin duyarlılığına ve temasın yoğunluğuna bağlıdır. Bununla birlikte enfeksiyonun tanısı, özel laboratuvar testlerinin enfekte hastalarda uygulanmasıyla mümkün olmaktadır (5). Yapılan çalışmalar bu testlerin rutin uygulamaya konmasından sonra şüphelenilmemiş olguların da su yüzüne çıktığını belgelemiştir. Hastalıktan şüphelenilmemesi ve klinik bulgularının diğer bakteriyel pnömonilerde görülen bulgularla benzer olması hastalığın tanısının konulamamasının önemli sebepleridir. Legionellozis dünyada birçok ülkede belgelenmekle birlikte, epidemilere ve sporadik olgulara bağlı morbidite ve mortalite halk sağlığı istatistiklerinde kayıt altına alınamamıştır. Lejyoner hastalığı ve Pontiac ateşi insidansını doğru bir şekilde saptamak için daha iyi sürveyans programlarına ihtiyaç duyulmaktadır (13).

Çeşitli çalışmalar *L.pneumophila*'yı toplum kaynaklı pnömonin en sık görülen dört mikrobiyal etkeni arasına koymaktadır (*Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella* spp.) (8). Nozokomiyal pnömoninin insidansı, legionella kolonizasyonunun derecesine, immüdüşkün konak sayısına ve hastanedeki kültür yöntemlerinin kullanılabilirliğine bağlıdır.

Sigara içiciliği, kronik akciğer hastalığı, kronik kalp hastalığı, ileri yaş ve immüdüşkünlük başlıca risk faktörleridir (8). Aşırı alkol alımı ve böbrek yetmezliği, hematolojik malignansiler, diyabet ve erkek cinsiyet de bazı

çalışmalarda risk faktörleri arasında gösterilmiştir. Organ nakli alıcılarındaki nozokomiyal enfeksiyonlarda, cerrahi en önemli hazırlayıcı faktördür (5).

Nozokomiyal pediyatrik olgular; yenidoğanlar, immüdüşkün ve altta yatan pulmoner hastalığı olan çocuklar olarak bildirilmiştir. *Legionella* enfeksiyonu AIDS'li hastalarda artan bir şekilde tanımlanmaktadır ve bu hastalar ilerleyici enfeksiyonlara, akciğer dışı bulgulara, bakteriyemi ve akciğer abselerine meyillidir (5).

Genel olarak pnömoni olgularının %1-5'inden azında *Legionella* spp.'nin etken olduğu tahmin edilmektedir. Lejyoner hastalığı salgınlarında, yüksek riskli popülasyonda atak oranları %30'a yükselmektedir (13). Hastaneye yatırılan olgularda yapılan etiyoloji çalışmalarında ise Lejyoner hastalığına bağlı toplum kaynaklı pnömoni oranı %2-15 arasında değişmektedir. CDC her yıl ABD'de 10.000-20.000 arasında değişen Lejyoner hastalığına ait olgu tahmininde bulunmaktadır (20). Genel popülasyonda Pontiac ateşinin insidansı bilinmemektedir (13).

*Legionella* enfeksiyonlarının yaklaşık %75'inden *L.pneumophila* serogrup 1 sorumlu iken, %20-30'u diğer *L.pneumophila* serogrupları ile, %5-10'u diğer *Legionella* türleri ile ortaya çıkmaktadır (21-24). Toplum kökenli ve seyahat ilişkili lejyonellozis olgularında Mab 2 ve Mab 3-1 pozitif suşların prevalansı yüksek bulunmuştur. Bu suşların daha virulan olduğuna inanılmaktadır. Yapılan son çalışmalarda olguların çoğundan Mab 3-1 pozitif suşların sorumlu olduğu ve diğer serogrupların suşlarının virulansının daha düşük olduğu düşünölmektedir (25,26). *Legionella* tür ve serogruplarının dağılımı tanı yöntemlerinin duyarlılığını ve dolayısıyla Legionellozis prevalansını etkilemektedir.

## 2.5.Patogenez

*Legionella* spp. serbest yaşayan amiplerin bazı türlerinde, siliyalı protozoalarda ve biofilm içinde yaşayıp çoğalabilmektedir. Bu yeteneği *Legionella*'nın çevrede yaşamını sürdürmesinde önemlidir.

*L.pneumophila*'nın Hela hücrelerinde morfolojik olarak iki farklı formda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu formlar oldukça enfektif, metabolik olarak

dorman, antibiyotiklere ve deterjan lizisine dirençli olan yüksek differansiye kist-benzeri formu ile replikatif hücre içi formudur. Bu kist-benzeri formunun *L.pneumophila*'nın konakta uzun süre yaşamını sürdürmesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir (27).

Mikroorganizmanın akciğere girişi orofaringeal kolonizasyon sonrası aspirasyonla, direkt inhalasyonla, ya da başka bir enfeksiyon odağından hematojen yayılımla olmaktadır. Mikroorganizma ilk olarak üst solunum yoluna girdiğinde solunum yolu epitel hücrelerindeki siliyer engelle karşılaşır. Bu bariyer, mikroorganizmanın solunum yolu epitel hücrelerine pilileri ile aderensi yoluyla aşılır. Sigara içicileri, kronik akciğer hastalığı olanlar ve alkoliklerdeki bozulmuş mukosilyer temizleme mekanizması ile artmış Lejyoner hastalığı riski arasında bağlantı kurulmuştur (5). Bakteri alveollere ulaştığında enfeksiyonun sonucu, mikroorganizmanın virulansına ve konağın immünesine bağlıdır. Konak savunmasından sorumlu ana komponent alveolar makrofajlardır. Özgül opsonizan antikörlerin varlığında *Legionella* alveolar makrofajlarca kolaylıkla fagosite edilir (5).

*L.pneumophila*'da "macrofage infectivity potentiator" (*mip*) olarak tanımlanmış 24 kDa'luk bir dış zar proteini bulunmaktadır. Bu protein hücrelerin enfekte olmasını kolaylaştırır. *Mip*-mutantlarının, amipleri, silialı protozoonları ve akciğer epitel hücrelerini enfekte etme yeteneklerini kaybettikleri gösterilmiştir. *Mip*, *L.pneumophila*'ya özgü bir protein olarak tanımlanmıştır. Ancak diğer *Legionella* türlerinin de *mip*'e benzeyen 24-30 kDa'luk proteinleri vardır (28). Fosfolipaz C, asit fosfataz, protein kinazlar ve süperoksit dismutaz gibi enzimleri bakterinin hücre içinde yaşamasını kolaylaştırmaktadır. Bu bakterinin proteazları akciğer hasarına yol açmaktadır.

*L.pneumophila*, makrofaj içine girdikten sonra fagozomla kaplanır ancak mikroorganizmayı içine alan fagozom lizozomla birleşemez ve mikroorganizmanın fagolizozomdaki mikrobisidal mekanizmalardan kaçmasına olanak sağlanır. Mikroorganizma, hücre rüptüre olana kadar çoğalır ve sonunda makrofajı patlatarak yeni fagositer hücrelerde aynı döngüyü gerçekleştirmek üzere ortama yayılır (5).

Nötrofil lökositlerin *Legionella*'ya karşı konak savunmasındaki rolü net değildir. Nötropenik hastalarda Lejyoner hastalığına aşırı bir eğilim görülmemiştir. *L.pneumophila* oksijen-bağımlı mikrobisidal sistemlere in vitro duyarlı olmakla birlikte, nötrofil lökositlerce öldürülmeye dirençlidir (5).

Yapılan in vitro çalışmalar, humoral immünitinin konak savunmasında sekonder rol oynadığını düşündürmektedir. Oluşan antikolar *L.pneumophila*'nın komplemanla öldürülmesine öncülük etmez, sadece fagositlerce öldürülmesini kolaylaştırır. Ancak monositler ve alveolar makrofajlar içinde bakterinin çoğalmasını inhibe edemez. Öte yandan Lejyoner hastalığı olan kişilerin serumlarında enfeksiyonun ilk birkaç haftası içinde, serotipe-spesifik anti-*Legionella* antikoları (öncelikle IgM takiben IgG) ölçülebilmektedir (5).

Diğer hücre içi patojenlerde (*Listeria*, *Mycobacterium* ve *Toxoplasma*) olduğu gibi, *Legionella*'ya karşı da hücreyel immünitinin primer konak savunmasında önemli olduğu düşünülmektedir. Lejyoner hastalığı, transplant hastaları, kortikosteroid alan hastalar ve AIDS hastalarının da dahil olduğu hücreyel immünite bozukluklarında daha sık ve ciddi olarak görülmektedir. (5). Ayrıca monosit disfonksiyonu ile giden saçlı hücreli lösemili hastalarda da Lejyoner hastalığı önemli sıklıkta görülmektedir (5,6). Hücreyel immünite, lenfosit proliferasyonu ve enfeksiyonun ilk iki haftası içinde *L.pneumophila* antijenlerine karşı oluşmuş gecikmiş tip cilt aşırı duyarlılığı şeklinde ortaya çıkar.

Enfekte insan ve hayvanlarda *L.pneumophila* antijenlerine karşı makrofaj yanıtı; proliferasyon ve IFN- $\gamma$ , IL-1 ve TNF gibi makrofaj aktive edici sitokinlerin salınımı şeklindedir. IFN- $\gamma$ 'nın aktive ettiği makrofajlar mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu demir alımını sınırlayarak *Legionella*'nın çoğalmasını azaltmaktadır. NK-benzeri hücrelerin IL-2 tarafından tetiklenerek *L.pneumophila* ile enfekte makrofajları öldürdüğü gösterilmiştir (5).

## 2.6.Klinik Belirtiler ve Bulgular

*Legionella* enfeksiyonları, pnömonili ateşli hastalık (Lejyoner hastalığı), pnömonisiz ateşli hastalık (Pontiac ateşi) ve asemptomatik enfeksiyonlar şeklindedir. Bulaş yolu ve inokulumdaki mikroorganizma sayısı klinik tablonun ortaya çıkmasında rol oynar. Ayrıca immüdüşkünlük, kronik akciğer hastalığı, alkolizm, sigara içiciliği gibi konak faktörleri de Lejyoner hastalığı için hazırlayıcı faktördür (8).

### 2.6.1.Lejyoner Hastalığı

Lejyoner hastalığında tipik olarak üç ana patern gözlenir; birincisi en yaygın olan ve toplumda en sık görülen sporadik olgular, ikincisi kısa süreli ve düşük atak hızı ile karakterize epidemik salgınlar ve üçüncüsü immün düşkün hasta popülasyonunda görülen nozokomiyal salgınlar şeklindedir (8).

Lejyoner hastalığının belirgin klinik bulgusu pnömonidir. Hastalık kuru öksürük ve hafif ateşten yaygın pulmoner infiltratlar ve çoklu organ yetmezliğine varan geniş bir spektruma sahiptir.

İnkübasyon süresi 2-10 gündür. Hastalığın başlangıç döneminde halsizlik, ateş, iştahsızlık, myalji ve baş ağrısı gibi özgül olmayan semptomlar gözlenir (6). Öksürük genellikle hafif ve nonprodüktif olup, nadiren hemoptizi görülür. Bazı hastalarda gözlenen plöretik ya da plöretik olmayan göğüs ağrısı hemoptizi ile birlikte değerlendirildiğinde pulmoner emboli tanısı konmasına neden olabilir (5,6). Hastaların %25-50'sinde sulu ishal, %10-20'sinde ise bulantı, kusma ve karın ağrısı görülmektedir. Baş ağrısı ve letarjiden ensefalopatiye değişen nörolojik semptomlar görülebilir. Mental durum değişikliği en sık görülen nörolojik anormalliktir (6).

Fizik muayenede erken dönemde raller ve konsolidasyon bulguları mevcuttur. Ateş hemen daima mevcut bir bulgudur. Pnömoninin ileri safhalarında üşüme-titreme hastalarda sıklıkla görülür. *Legionella* pnömonisinin klinik belirtileri, diğer etkenlerin sebep olduğu pnömoni belirtilerinden ayırt edilemez (5).

Karaciğer fonksiyon testlerindeki bozukluklar, hipofosfatemi, hematüri ve hematolojik anormallikler sık olmakla birlikte diğer etkenlerin neden olduğu

pnömonilerden farklı değildir. Ancak hiponatremi, lejyoner hastalığında diğer etkenlere göre anlamlı derecede sık görülmektedir (5).

Klinik bulgular nonspesifik olmakla beraber, tanı konulamamış pnömonilerde bazı ipuçları Lejyoner hastalığı olasılığını düşündürmektedir. Bunlar; 1-Balgam yaymasında bol parçalı nötrofil görülürken, mikroorganizma gösterilememesi, 2-Hiponatremi (serum sodyum <130meq/l), 3-Önceden verilen beta-laktam veya aminoglikozid antibiyotiklere yanıtızlık, 4-Hastanın bulunduğu hastane veya diğer ortamların kullanma suyunun *Legionella* ile kontamine olduğunun bilinmesidir (6).

Hastaların çoğunun akciğer radyolojisinde anormallik saptanır. Genellikle hastalığın 3. gününde akciğer bulguları ortaya çıkar. Bulguların başlangıcı genellikle tek taraflı ve alt loba dır. İnfiltrasyonlar alveolar, segmental-lobar ya da diffüz veya yamalı olabilir. İnfiltrasyonlar günler içinde yaygın konsolidasyonlara dönüşür. Plevral effüzyonlar sıktır. Kortikosteroid alan immün düşkünlerde kavitasyon ve abseler görülebilir (29). Uygun antibiyotik tedavisine rağmen infiltrasyon artışı sıktır. Klinik iyileşmeye karşın grafide infiltratların kaybolması 1-4 ay süre gerektirir.

Lejyoner hastalığında mortalite %15-30'dur. Nozokomiyal pnömonili hastalarda tanı erken konulmazsa bu oran %50'ye ulaşabilir. Olguların çoğundan *L.pneumophila* serogrup 1 sorumludur. Serogrup 4, 6 ve *L.micdadei* de klinik enfeksiyonlarda diğer *Legionella* spp.'den daha sık saptanmaktadır (8).

### **2.6.2.Pontiac Ateşi**

*Legionella* enfeksiyonunun pnömonisiz şeklidir. İlk defa 1968'de Pontiac'da ( Michigan) görülen halk sağlığı bölümündeki salgından adını almıştır (7). Akut, kendini sınırlayan, grip benzeri hastalık şeklinde seyredir. İnkübasyon süresi yaklaşık 2 gündür. Öncesinde sağlıklı olan kişilerde, 2-5 gün süren, ateş, baş ağrısı, halsizlik, nonproduktif öksürük ve bulantı-kusma ile seyredabilen, spontan olarak iyileşen bir hastalıktır. Akciğer radyolojik bulgusu yoktur ve sadece semptomatik tedavi gerektirir (5,8). Genel

populasyondaki insidansı bilinmemektedir. Çoğu olgudan *L.pneumophila* sorumlu tutulmuştur.

### 2.6.3.Akciğer Dışı Hastalıkları

Kan dolaşımı yoluyla mikroorganizmanın yayılımı, pnömonili ya da pnömonisiz akciğer dışı enfeksiyonlara yol açabilir. İmmün düşkün hastalarda selülit, sinüzit, perirektal abse, perikardit, pyelonefrit, pankreatit ve endokardite sebep olabilir. Yara enfeksiyonları, yaranın *Legionella* ile kontaminasyonu ile olmaktadır. Altta yatan hastalığa, ilaç tedavilerinin yan etkisine ve enfeksiyonun ciddiyetine bağlı olarak prostetik kapak endokarditi, dissemine intravasküler koagülasyon (DIC, dissemine intravascular coagulation), trombositopeni, glomerülit, rabdomiyolizis, nöropatiler ve karaciğer yetmezliği klinik tabloya eklenebilir.

## 2.7. Mikrobiyolojik Tanı

### 2.7.1.Klinik Örneklerden *Legionella* Cinsi Bakteri İzolasyon

#### Yöntemleri

#### Örneklerin Toplanması, Saklanması ve Taşınması:

Kültür için tercih edilen örnekler; solunum yolu sekresyonları (balgam, bronşiyal ve trakeal aspirat, ve bronşiyal yıkamalar), bronkoalveolar lavaj (BAL), steril vücut sıvıları (plevral, perikardiyal, peritoneal), akciğer dokusu, diğer dokular ve yara örnekleridir.

*Legionella* primer olarak alveollerdeki makrofajlarda çoğalan hücre içi patojeni olması nedeniyle diğer hücre içi patojenlerde olduğu gibi her balgam örneğinde olmayabilir ya da az sayıda bulunabilir. Lejyonellozisli çoğu hasta balgam çıkaramadığından, çok sayıda solunum yolu örneğinin incelenmesi faydalıdır (30). Lejyoner hastalığı olgularında pürülan balgam ve sekresyon oluşumu kısıtlı olduğu için balgam örneklerinin kültüre uygunluğu için kullanılan mikroskopik skorlama kriterleri uygulanmamalıdır. Bu kriterler uygulandığında, *Legionella* spp. için kültür pozitifliği saptanacak örneklerin %80'inin laboratuvara kabul edilmediği hesaplanmıştır (3).

Balgam ve diğer solunum yolu örnekleri, steril kaplara toplanarak oda sıcaklığında en geç iki saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örnek ekilmeden önce birkaç saat geçeceği öngörülüyorsa 2-5 °C'de 48 saate kadar saklanabilir. Örneklerin uzun süreli saklanması en iyi -70 °C'de sağlanmaktadır (13). Ancak başlangıç örneğinde bakteri konsantrasyonu düşük ya da örnek sulu ise dondurma sonrası bakteri konsantrasyonu saptama sınırı altına düşebilmektedir. Tekrarlayan dondurma, çözme işlemi bakteriye zarar verir.

Antijen testi için idrar örnekleri steril kapaklı bir kaba alınmalı ve 24 saat içinde çalışılmalıdır. Test daha sonra çalışılacak ise, örnekler 2-8 °C'de birkaç gün, -20 °C'de ise uzun süre saklanabilir (8).

Serumda antikor saptanması için akut dönem kan örnekleri, standart tüplere alınarak oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılır. Dondurma-çözme işlemleri antikor düzeyini azalttığından, uzun süreli saklanması birkaç tüpe bölünmüş şekilde -20 °C'de yapılmalıdır. IFA (İndirect Fluorescent Antibody) testi için 2-6 hafta sonra tekrar kan örneği alınarak titre artışına bakılmalıdır.

### **Kültür:**

*Legionella* enfeksiyonunun tanısında kullanılan en kesin yöntem mikroorganizmanın solunum yolu örneklerinden izolasyonudur (5). *Legionella* türlerinin izolasyonu % 100 özgüllükte olup, tanıda altın standart olarak kabul edilmektedir (4). Lejyoner hastalığı tanısında kültürün duyarlılığı, referans laboratuvarlarda yapılan retrospektif çalışmalarla %11-65 olarak tahmin edilmektedir (31-33). Rutin laboratuvarlarda prospektif yapılan çalışmalarda, pozitif kültür yüzdesi düşük bulunmuştur (34,35). Solunum yolu örneklerinde bakterinin canlılığını sürdürmesi zayıf olduğu için örneklerin bir an önce kültürünün yapılması gerekmektedir. Örneklerin çabuk bozulması ve değerlendirmede deneyim gereksinimi *Legionella* kültürünün duyarlılığını etkileyen önemli faktörlerdir (1,36). Kültür sonuçları hastalığın şiddeti ile de bağlantılı bulunmuştur; orta şiddette pnömonide pozitif sonuçların yüzdesi düşük (%15-25) iken, ciddi pnömonide daha yüksek yüzdelere (>%90) ulaşılmıştır (4).



*Legionella* kültürü için standart olarak  $\alpha$ -ketoglutarat ilave edilmiş BCYE besiyeri (BCYE $\alpha$ ) (antibiyotik ilaveli/ilavesiz) kullanılır (4). *Legionella*'nın üremesini inhibe edebilecek diğer mikroorganizmaların ve normal floranın aşırı üremesini önlemek için BCYE $\alpha$  besiyeri ile beraber bir ya da daha fazla selektif besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Bu amaçla BCYE $\alpha$  besiyerine antibiyotikler ilave edilir (13). En yaygın kullanılan antibiyotikler, gram negatiflere karşı polimiksin, mayalara karşı anizomisin ve gram pozitiflere karşı sefamandol veya vankomisin'dir. *L.pneumophila* dışındaki türler söz konusu olduğunda, sefamandolün beta-laktamaz üretemeyen diğer *Legionella* spp.'yi inhibe etmesi nedeniyle, vankomisin tercih edilmelidir (4).

Sıklıkla kullanılan selektif besiyerleri; BCYE $\alpha$  besiyerine, sefamandol, polimiksin B ve anizomisin ilavesiyle hazırlanan BMPA $\alpha$  (PAC) (BCYE agar supplemented with cefamandol-polymyxin B-anisomycin) ile glisin, vankomisin, polimiksin B ve anizomisin ilavesiyle hazırlanan MWY (Modified Wadowsky-Yee) besiyerleridir (13). *Legionella* kültürü için bütün örneklerin sınıf II biyogüvenlik kabini içinde işleme alınması gerekmektedir.

Steril olmayan vücut bölgelerinden alınan örneklerin selektif besiyerine kültürü yapılmalıdır. Örneğin hidroklorik asitle muamale edilmesi kistik fibrozisli hastalar dışında önerilmemektedir. Doku örneklerinin homojenize edildikten sonra kültürü yapılmalı, steril vücut sıvıları ise 4000xg'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra sedimenti vortekslenerek ekilmelidir. BAL örnekleri dilüe olduğu için santrifügasyonla konsantre edildikten sonra kültürü yapılmalıdır (27).

İnoküle edilen besiyerleri 35-37°C'de, nemli ortamda en az 7 gün inkübe edilmelidir. *Legionella* kolonileri genellikle 3-5 gün içinde görünür hale gelir. Plaklar günlük olarak incelenmelidir. BCYE besiyerinde ürediğinde, 2-4 mm çapında, gri-beyaz ya da mavi-yeşil, konveks, yapışkan koloniler oluşturur. Koloni mikroskopunda bakıldığında buzlu-cam görünümünde koloniler dikkat çeker (8). Gram boyama yapıldığında ince, gram negatif, zor boyanan basiller görülür. Uzun-dalga UV lamba ile bakıldığında bazı *Legionella* türleri otofloresan verir.

*Legionella* açısından şüpheli koloniler BCYE $\alpha$  ve kanlı agara pasajlandığında, sistein içeren BCYE $\alpha$  besiyerinde ürerken, kanlı agarda üreyememesi ön tanıda kullanılmaktadır (13). Bu izolatların daha sonra DFA ve lateks aglütinasyon testleri ile doğrulanması gerekmektedir.

### **İdrar Antijen Testi:**

*Legionella* antijenürisinin saptanması, Philadelphia salgınından kısa süre sonra kullanıma girmiştir. Bu testle enfekte hastaların idrarlarından atılan çözünür haldeki *Legionella* serogrup 1'e spesifik lipopolisakkarit antijenleri saptanmaktadır. İdrarla atılan antijen yaklaşık 10 kDa ağırlığında, ısıya dayanıklı ve enzimatik yıkıma dirençlidir.

İdrar antijen testleri hızlı sonuç vermesine ilaveten kabul edilebilir duyarlılık ve yüksek özgüllüğe sahip testlerdir (37-39). İdrar örneklerinin kolay alınması ve tekrarlanabilir olması, antijenürinin erken dönemde saptanabilmesi ve *Legionella* enfeksiyonları için sıklıkla ilk kanıt olması, idrar antijen testlerinin diğer önemli avantajlarıdır. Pnömonisiz Pontiac ateşi olgularında da pozitif idrar antijen sonuçları alınabilmektedir (40).

Çoğu idrar antijen testi *L.pneumophila* serogrup 1'in Pontiac (Mab 2+) monoklonal antikör pozitif tipini saptamada oldukça duyarlı (>%90) iken *L.pneumophila* serogrup 1'in diğer monoklonal antikör tiplerini saptamada duyarlılığı daha düşük (%60) bulunmuştur. *L.pneumophila*'nın diğer serogrupları ile diğer *Legionella* türlerinin saptanmasında duyarlılıklarının çok düşük (%5) olması bu testlerin en önemli dezavantajıdır (41,42) ve negatif sonuçlar *Legionella* enfeksiyonunu ekarte ettirmez (37,43).

Bu testlerin duyarlılığı *L.pneumophila* için, yoğunlaştırılmış idrarda nispeten yüksek bulunmuştur (37,44,45). Ancak konsantrasyon basamağının uzun ve emek yoğun olması nedeniyle sadece şüpheli pozitif sonuçlar alındığında bu yöntem başvurulması önerilmektedir (46). Bir çok çalışmada idrar antijen testlerinin duyarlılığının hastalığın şiddeti ve altta yatan hastalıkların varlığı ile korele olduğu bildirilmiştir (41,34,35). Antijen yükünün ciddi olgularda daha yüksek bulunması ve antijenin işlenmesinin kişinin immün durumuna bağlı olması bu durum için açıklayıcı görünmektedir

(41,45). İdrar antijen testlerin duyarlılığı ile çalışmaya alınan altgruplar arasındada bağlantı kurulmuştur. Yapılan bir çalışmada Mab 2-pozitif suşların baskın olarak neden olduğu seyahat ilişkili enfeksiyonlar ile toplum kökenli enfeksiyonlarda EIA testlerinin duyarlılığı daha yüksek (sırasıyla %94 ve %86-87) iken nozokomiyal enfeksiyonlarda bu oran %44-46 olarak saptanmıştır (47). Bu oranların farklı altgrupların farklı serotip dağılımından kaynaklandığı düşünülmektedir (4).

*Legionella* antijenürisi, semptomların başlangıcından en erken bir gün sonra saptanabilir ve günlerce, haftalarca saptanmaya devam edebilir (4). Hastaların çoğunda antijenüri 10-14 günde sona ermekle birlikte uygun tedaviye rağmen yaklaşık %50'sinde 1. ayda, %25'inde ise 2.ayda pozitiflik devam etmektedir (37). Antijenürinin devam etmesi tedavi başarısızlığını göstermez ise de immünsupresif tedavi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (48,49).

*Legionella* antijenürisinin saptanmasında, RIA (radioimmunoassay) ve EIA (enzyme immunoassay) yıllardır kullanılan ve benzer performansa sahip yöntemlerdir (1). Diğer etkenlerin neden olduğu pnömoni veya idrar yolu enfeksiyonu olan hastaların idrar örnekleri test edilerek değerlendirildiğinde, mevcut *Legionella* idrar antijen EIA yöntemlerinin özgüllüğü >%99.9 bulunmuştur (50,51). Aglütinasyon yöntemleri ise yeterli duyarlılık ve özgüllükte olmadığı için kabul görmemiştir (52). Geliştirilen immünokromatografik yöntemler (53,54) de EIA yöntemine benzer duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir ve kısa sürede sonuç vermeleri avantaj sağlamaktadır (4).

### **Serumda Özgül Antikor Saptama Testleri:**

Philadelphia salgınında hastalarda özgül antikor saptamak için indirekt immünofloresan antikor yöntemi (IFA, indirect fluorescent antibody) kullanılmış ve o zamandan beri *Legionella* spp.'ye karşı oluşan özgül antikorları saptamada çeşitli serolojik yöntemler geliştirilmiştir.

IFA ve EIA en sık kullanılan yöntemlerdir. Antikor saptama yöntemleri arasında standardize edilen sadece IFA yöntemidir ancak EIA daha az subjektif olması, daha hızlı çalışılması ve otomatize olması nedeniyle pek çok

laboratuvarında tercih edilmektedir (32,56). EIA testlerinin özgüllüğü daha düşük bulunmuştur ancak bu epidemik çalışmalar için kabul edilebilir düzeydedir (55-57). Sporadik olgular araştırılırken ise bu testlerin daha dikkatli kullanılması gerekmektedir.

IFA ile tanı, antikor titresinde dört kat titre artışı ile konulmaktadır. Çoğu olguda titre artışının 3-4 haftada görülmesi, bazı olgularda ise 10 haftayı bulabilmesi nedeniyle seroloji, epidemiyolojik çalışmalar için yardımcı iken, akut hastalığın tanısının konulmasında klinisyene daha az yardımcı olmaktadır (4)

Tek serumda 1:256 ve üstünde titre saptanmasının, Lejyoner hastalığı tanısı koydurduğu ifade edilse de, toplum kökenli pnömoni nedeniyle yatırılan hastalarda yapılan son çalışmalarda, 1:256 ve üstündeki tek titrenin diğer etkenlere bağlı pnömoniler ile Lejyoner hastalığı arasında farklılık göstermediği gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada antikor titresinde dört kat artış bulunan ya da kültürle doğrulanmış Lejyoner hastalığı olan 68 hastanın sadece %10'unda, diğer etkenlerin neden olduğu pnömoni 636 hastanın ise %6'sında 1:256 ve üzeri titreler saptanmıştır (58). Yüksek titreler uzun süre devam edebildiğinden aktif hastalığın belirlenmesinde tek başına yüksek antikor titresini tanı kriteri olarak kullanılamamaktadır (37). Ayrıca IFA ile yüksek anti-*Legionella* antikor titrelerinin normal popülasyondaki sıklığının % 1-36 arasında değiştiğinin saptanması da (10), IFA ile tek serumda yüksek titre bulunmasının tanıdaki değerinin sınırlı olduğunu düşündürmektedir.

Serolojinin duyarlılığı, enfeksiyonun seyri sırasında oluşan saptanabilir antikor yanıtının süresine bağlı olarak değişebilmektedir. Hastaların yaklaşık olarak %25-40'ında hastalığın ilk haftasında %10-15'inde ise hastalığın başlangıcından 6-9 hafta kadar sonra serokonversiyon saptanmaktadır. Hastaların yaklaşık %20-30'unda ise uzun süre sonra bile antikor yanıtı alınamayabilmektedir. Bu varyasyonlar nedeniyle serolojik yöntemlerin duyarlılığı %70-80 olarak sınırlandırılmıştır (10). Öte yandan IFA yönteminde *L.pneumophila* serogrup 1 antijeni kullanıldığında özgüllük yaklaşık olarak %99 bulunmuştur (4).

*Legionella* enfeksiyonlarının seyri sırasında immün yanıt, farklı sınıflardan immünglobulinlerle olabildiğinden, *Legionella* serolojisinde genel olarak IgG, IgM ve IgA antikörlerini saptayan polivalan konjugatların kullanılması önerilmektedir. IgM-spesifik IFA testlerinin özgüllüğü sınırlı olduğu için kullanılmamaktadır (43).

Serolojinin gerçek duyarlılığı ve özgüllüğü, *L.pneumophila* serogrup 1 antijeninin kullanıldığı IFA testleri için değerlendirilmiştir. *L.pneumophila*'nın diğer serogrupları ve *pneumophila*-dışı *Legionella* antijenleri kullanıldığında, antikor saptama testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü tam olarak belirlenememiştir ve serogrup 1 için olduğundan daha düşük değerler olduğu tahmin edilmektedir (21). Birçok laboratuvarında, *Legionella* serolojisi için farklı antijenleri içeren havuzlar tarama amaçlı olarak sıklıkla kullanılmaktadır, ancak havuz antijenleriyle ortaya çıkan özgül olmayan reaksiyonlar nedeniyle pozitif reaksiyonların monovalan antijenlerle doğrulanması gerekmektedir.

IFA testlerinde, *Legionella* dışı etkenlerin neden olduğu pnömoniler ile bakteriyemilerde, *Legionella* spp.'ye karşı yalancı pozitif titreler saptanmıştır. *Bacteroides fragilis*, *C.psittaci*, *Pseudomonas aeruginosa*, mikoplazmalar, mikobakteriler, *Campylobacter* spp. , *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Haemophilus influenzae*, *Coxiella burnetti*, *Rickettsia typhi* ve *Proteus vulgaris* enfeksiyonları yalancı pozitifliğe neden olabilmektedir. Çarpraz reaksiyonlar *L.pneumophila* dışı türlerle daha sık oluşmaktadır (1).

### **Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri:**

Nükleik asit saptanması, klinik örneklerden *Legionella* identifikasyonunda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Kullanılan primerlere bağlı olarak PCR yöntemi ya sadece *L.pneumophila*, ya da *Legionella* türlerinin birkaçını ya da tümünü saptayabilmektedir (32). Konvansiyonel ve real-time PCR yöntemleri kullanılabilir. *Legionella* insan normal flora üyesi olmadığı için kantitatif ölçüm yapılmadan, örnekte *Legionella* DNA varlığı ya da yokluğunun saptanmasının yeterli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte jel elektroforezi, hibridizasyon ve PCR ürünlerinin sekanslanması gibi

PCR-sonrası çalışma basamaklarına gereksinim olmaması, real-time PCR'ın konvansiyonel PCR'a üstünlükleridir. Real-time PCR'da, PCR ürünleri hızlı ve özgül olarak saptanabilmekte ve ürünlerin çalışılması sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riski kalkmaktadır.

PCR oldukça duyarlı olup, solunum yolu sekresyonlarında *Legionella* türlerinin saptanmasında duyarlılığının kültüre eşdeğer ya da daha yüksek olduğu düşünülmektedir (31,32,49,59-62). Bazı araştırmacılar PCR'ın balgam çıkarabilen hastalar için seçilebilecek bir test olduğunu düşünmektedirler. Balgam çıkaramayan hastalarda ise idrar, serum gibi solunum yolu dışındaki örneklerde PCR kullanılması kısmen faydalı görünmektedir (59).

İdrar örneklerinde *Legionella* DNA saptanması amacıyla PCR kullanılabilmeyle birlikte duyarlılığının idrar antijen testlerinden üstün olmadığı düşünülmektedir. Duyarlılığı çeşitli çalışmalarda %17-72 bulunmuştur. Bununla birlikte serogrup düzeyinde özgüllüğün artırıldığı primer sistemlerinin kullanılması tanıda avantaj sağlayabilmektedir (35, 63,64). Serum örneklerinde de *Legionella* DNA saptanabilmektedir (4,35). Lejyoner hastalarının serum örneklerinde *Legionella* DNA saptamada PCR'ın duyarlılığı nispeten düşük (%50-60) bulunmakla birlikte ciddi hastalıkla yükselebildiği (%70-90) düşünülmektedir (65,66).

Real-time PCR yönteminde 16S rRNA genleri, 23S-5S spacer bölge, 5S rDNA veya macrophage inhibitor potentiator (*mip*) gen gibi spesifik bölgeler hedeflenmiştir (61,67,68). Nükleik asit çoğaltma yöntemleri her ne kadar yaygın değilse de gelecekte tercih edilen bir yöntem olacağı düşünülmektedir.

Solunum sekresyonlarında bulunan inhibitörler, yalancı negatif sonuçlara neden olabildiklerinden tüm örneklerin yine de kültürü yapılmalıdır (37). Ayrıca yalancı pozitif sonuçlar da rapor edilebilmektedir (1,60). Yalancı pozitif sonuçların varlığında referans yöntemin başarısız olabildiğinin de göz önüne alınmasının gerekliliği düşünülmektedir. Az görülen *Legionella* türleri geleneksel yöntemlerle saptanamayabilmektedir. Etiyolojisi bilinmeyen pnömonili hastalarda *Legionella* PCR'ın gerçek duyarlılığı ve özgüllüğünü belirleyen yeterli çalışma bulunmamaktadır (4). Laboratuvarların kalite

kontrol çalışmalarını sürdürmesi ve nükleik asit amplifikasyon (NAA, Nucleic acid amplification) testlerinin standardize edilmesi gerekmektedir.

### 2.7.2.Çevresel Örneklerde *Legionella* Cinsi Bakteri İzolasyon

#### Yöntemleri

##### Kültür

##### Su Örneklerinin Toplanması ve Dekontaminasyonu:

Çevre örneklerinden *Legionella* spp.'nin izolasyonu ile ilgili yöntemler henüz standardize edilmemiştir. Farklı kuruluşlar örneklerin toplanması, yoğunlaştırılması, asitle muamelesi ve besiyeri seçimi konularında farklı yöntemler uygulamaktadır. Aşağıda bu yöntemlere örnekler verilmiştir.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ; su ve sürüntü örneklerinin birlikte alınmasını önermektedir. Musluk ve duş başlıklarından sürüntü örneği alındıktan sonra su örneğinin alınması ve 15 dakika asitle muamele edildikten sonra örneklerin BCYE, GPAV (Glycine- polymyxin B-anisomycin-vancomycin) ve PAV ( Polymyxin B-anisomycin-vancomycin) besiyerlerine ekilmesi gerekmektedir.

Hijyen Enstitüsü'nün (The Hygiene Institute) yönteminde, sadece su örneği alınması önerilmektedir. Örnekler 15 dakika asit ile muamele edildikten sonra BCYE ve GVPC (Glycine-vancomycin-polymyxin B-cycloheximide) besiyerlerine ekilir. Her iki protokolde de örneklerin konsantrasyonu için filtrasyon yöntemi kullanılır.

Veterans Affairs Medical Center'ın (VAMC) uygulamasında, tek başına sürüntü örneğinin alınması yeterli bulunmaktadır. Su örneği alındığında santrifügasyonla konsantrasyon önerilmektedir. Örnekler 3 dakika asit işlemi ile dekontamine edilip, BCYE ve DGVP (Dye-Glycine-Vancomycin-Polymyxin B) besiyerlerine ekilmektedir (69).

The International Standart Method'a göre örneklerin asit veya ısı muamelesi ile dekontaminasyonu ve sonrasında BCYE ve GVPC besiyerlerine ekilmesi istenmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda *Legionella* spp.'nin izolasyonunda, su örneklerinin filtrasyonla konsantrasyonunun, santrifügasyon yöntemine göre

daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mikrobiyal floranın azaltılmasında 3 dakika asitle muamelenin en etkili olduğu ve glisin içeren selektif besiyerlerinden biri kullanılarak çeşme suyu sistemlerindeki *Legionella* dışı mikroorganizmaların inhibe edildiği gösterilmiştir (69).

Yapılan çalışmalarda *Legionella* spp.'nin izolasyonunda VAMC'in sürüntü örnekleme yönteminin, su örnekleme yöntemlerinden daha başarılı olduğu da gösterilmiştir (70).

### ***Legionella* Besiyerleri:**

*L.pneumophila*'nın izolasyonunda kullanılan ilk besiyeri %1 IsoVitalex ve %1 hemoglobinle zenginleştirilmiş Mueller-Hinton agardır. İzolatlar çukulatamsı agarda da çok yavaş üreyebilirler(1,13).

Feeley ve arkadaşları tarafından geliştirilen Charcoal Yeast Extract (CYE) agar; L-sistein, ferrik pirofosfat, maya özütü ve aktive edilmiş kömür içermektedir (1).

Pascullo ve arkadaşları, CYE agara ACES ilave ederek BCYE agarı tarif etmişlerdir. Bu besiyerinde *Legionella* türlerinin üremesi için agar pH'sı 6.9'a ayarlanmıştır.

BCYE $\alpha$  besiyeri, en iyi ve hızlı identifikasyonu sağlayan besiyeridir ve BCYE besiyerine  $\alpha$ -ketoglutarat eklenerek hazırlanmıştır. BCYE besiyerine bromtimol mavisi, bromkrezol moru gibi boyaların katılmasıyla indikatörlü BCYE besiyeri hazırlanmaktadır. Bu besiyerinde bazı *Legionella* türlerinin renkli koloniler oluşturarak tanınması kolaylaştırılmıştır (3).

Ayrıca BCYE $\alpha$  besiyerine antibiyotik ilavesi ile selektif besiyerleri hazırlanmaktadır. Bunlardan BMPA besiyeri; BCYE $\alpha$ 'ya sefamandol, polimiksin ve anizomisin ilavesiyle, MWY besiyeri; vankomisin, polimiksin B, anizomisin ve glisin ilavesiyle, PAV besiyeri; vankomisin, polimiksin B, ve anizomisin ilavesiyle, GVPC besiyeri ise vankomisin, glisin, sikloheksimid, polimiksin B ilavesiyle hazırlanmaktadır (3).



### **Kültür Sonuçlarının Değerlendirilmesi:**

Su ve sürüntü örnekleri BCYE $\alpha$  ve selektif besiyerine ekildikten sonra nemli ortamda 35°C'de 10 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyon için %2-5 CO<sub>2</sub>'li etüv kullanılabilir. Plaklar 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni mikroskobu yardımıyla günlük olarak değerlendirilmelidir.

Koloni mikroskobunda gri-beyaz, buzlu cam görünümünde koloniler aranır. Şüpheli her bir koloniden BCYE ve kanlı agara pasaj yapılır ve 48 saat inkübe edilir. Pasajlarda, *Legionella* türlerinin sistein içeren BCYE agarda ürediği, kanlı agarda üremediği görülür. Ancak bazı *Legionella* türlerinin ilk izolasyonda sisteine gereksinim gösterirken, sonradan kanlı agarda üremeye adapte olabildiği de göz ardı edilmemelidir (3).

Yavaş üreyen (3-5 gün) koloniler, makroskobik olarak 1-4 mm çapında, gri-beyaz, yapışkan ve konveksdirler. *L.pneumophila* dışındaki bazı türler parlak mavi-beyaz ya da parlak kırmızı otofloresan verebilirler (3). Safranin yerine bazik fuksin kullanılarak yapılan Gram boyamada, küçük, ince gram negatif, 0.5µm eninde, 1-2 µm boyunda, bazen pleomorfik ve 20 µm'ye erişebilen basiller görülür.

*Legionella* açısından şüpheli koloniler doğrulama yöntemleri ile doğrulanmalıdır (30). Tür düzeyinde tanımlamada kullanılan DFA (Direct Fluorescent Antibody), IFA (İndirect Fluorescent Antibody) ve lateks aglütinasyon testlerinin yokluğunda, biyokimyasal testlerle ön identifikasyondan sonra izolatlar bir referans laboratuvarına gönderilmelidir.

### **Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri:**

PCR çevresel su örneklerindeki *Legionella* spp.'nin saptanması amacıyla epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (13). *Legionella* cinsi için 5S ve 16S rRNA gen bölgeleri, *L.pneumophila* türü içinse *mip* geni hedef alınmaktadır.

Bu yöntem yavaş ve zor üreyen diğer bakteriler gibi *Legionella* için de kültüre iyi bir alternatif olmaktadır. PCR yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmakla birlikte yalancı-pozitif reaksiyonlar görülebilmektedir (1).

## 2.8. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Tür Tanısı ve Serogruplandırılması

*Legionella* cinsi bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında, biyokimyasal, morfolojik ve enzimatik testler faydalı olsa da değerleri sınırlıdır. Cins düzeyindeki identifikasyona kıyasla, tür tayini sorunludur ve genellikle referans laboratuvarlar tarafından yapılmaktadır. Kültürde üreyen şüpheli kolonilerin doğrulanması ve tür tanısının yapılmasında DFA ve/veya lateks aglütinasyon testleri kullanılmaktadır (70).

### 2.8.1. Lateks Aglütinasyon Yöntemi

*Legionella* hücre duvarı antijenlerine karşı tavşandan elde edilen özgül antikorlarla aynı serogruptan olan *Legionella* bakterilerinin aglütinasyon vermesi esasına dayanmaktadır.

### 2.8.2. Direkt Floresan Antikor Yöntemi

DFA yöntemi, CDC'den Cherry ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (13). Alt solunum yolu örneklerinde en sık görülen *Legionella* türlerinin saptanmasında kullanılan hızlı bir yöntemdir (8,13,43). Bu yöntemde *Legionella* tür ve serogruplarına karşı hazırlanan monoklonal tavşan antikorları, fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge edilerek kullanılmaktadır. Antikorlar, *Legionella* türlerinin hücre duvar antijenleri ile bağlandığında, antijen-antikor kompleksleri UV ışık altında gözle görülebilir hale gelirler. Floresan mikroskopla bakıldığında bakteri, parlak sarı-yeşil floresan veren kokobasil veya kısa basiller olarak görülür (8).

DFA yöntemi, kültürde üreyen *Legionella* izolatlarının identifikasyonunda sıklıkla kullanılır. DFA aynı zamanda klinik örneklerdeki *Legionella*'yı da saptamada kullanılabilir ancak bu işlemin duyarlılığı, örneğin tipine, kullanılan teknik malzeme ile laboratuvar personelinin deneyimi ve becerisine bağlı olarak değişebilmektedir (30,43).

Kültür ile karşılaştırıldığında direkt örneklerde DFA'nın duyarlılığı düşük bulunmuştur (%25-70). Bu nedenle DFA negatif sonuçlar *Legionella* enfeksiyonunu ekarte ettirmez. Pozitif sonuçlar, örnekte çok sayıda mikroorganizmanın varlığına bağlıdır. Bununla birlikte deneyimli bir

mikrobiyolog tarafından, iyi bir floresan mikroskopla çalışıldığında özgülüğü %95'in üstüne çıkabilmektedir (13).

Stafilokoklar (stafilokokal protein A nedeniyle), pnömokoklar ve streptokokların bazı türleri, konjugattaki doğal antikorlar nedeniyle ya da hücre duvar yapılarına karşı spesifik olmayan Ig G reaksiyonu nedeniyle floresan verebilmektedir (13). *Pseudomonas*, *Bacteriodes*, *Corynebacterium*'un bazı türleri ve diğer bakteriler polivalan konjugatlarla çarpaz reaksiyon verebilmektedir (8). Ancak yalancı pozitiflikler daha çok laboratuvar tekniğine ve reagentlerin kontaminasyonuna bağlı olarak görülmektedir. Yeni monoklonal reagentler, poliklonal reagentlerden daha üstündür ve uygulaması kolaydır. Duyarlılıkları benzer olmakla beraber, monoklonal testlerin pahalı olması dezavantajdır (5).

### 2.8.3. İzolatların Tiplendirilmesinde Kullanılan Testler

Lejyoner hastalığı olgularının çevresel kaynaklarının tanımlanması için *L.pneumophila*'nın genotiplendirilmesinin gerektiği düşünülmektedir (1,4). *L.pneumophila* serogrup 1'in çevrede yaygın bulunması nedeniyle epidemiyolojik çalışmalar için kaynak araştırılmasında DFA reagentleriyle serogruplemanın yararı sınırlıdır. Bu nedenle araştırmacılar *L.pneumophila*'nın farklı suşlarının tiplendirilmesi için yöntemler geliştirmiştir.

Monoklonal antikorlarla (Mab) *L.pneumophila* suşlarının alttiplendirilmesi epidemiyolojik araştırmalarda kullanılan ilk yöntemdir. Teknik olarak basit ve hızlı olması en önemli avantajlarıdır. Mab tiplendirmenin en önemli dezavantajları ise pahalı olması ve antijen dağılımlarının veya alt tip sayısının sınırlı olmasıdır. Mab alttiplendirmesi ile *L.pneumophila* serogrup 1'in 12 alt tipi birbirinden ayrılabilir (22). Altgrup spesifik antikorların kullanılması ile *L.pneumophila* serogrup 2-15 suşlarının alttiplendirilmesi de yapılabilmektedir. Bütün Mab alt tipleri referans suşlara göre isimlendirilmiştir. Klinik izolatın Mab tipi ile çevresel suşları uyuşmadığında bu rezervuarların enfeksiyonun kaynağı olmadığı düşünülmektedir (43).

Pulsed field gel electrophoresis yöntemi ile makrorestriksiyon analizinin (MRA, macrorestriction analysis by pulsed field gel electrophoresis) *L.pneumophila* suşlarının tiplendirilmesinde 15 yılı aşkın süredir altın standart olduğu düşünülmektedir (71).

Elektroforetik alloenzim tiplendirme (electrophoretic alloenzyme typing=multilocus enzyme typing), *L.pneumophila*'yı 40'dan fazla alttıpe ayırabilmektedir. Bu yöntem ayrıca *L.pneumophila* serogrup 1'in Philadelphia 1 monoklonal altgrubunun 5 elektroforetik tipe ayrılmasında kullanılmaktadır (1).

Plazmid analizleri ile farklı kaynaklardan, farklı izolatların plazmid içerikleri saptanabilmektedir ancak bu yöntemin kullanımının sınırlı olduğu düşünülmektedir (1).

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analizi ile alttıplendirme European Group on *Legionella* Infection (EWGLI) tarafından standardize edilen ilk tiplendirme sistemidir (72,73). Bu yöntem PCR ile amplifikasyon ve endonükleaz ile DNA restriksiyonunun kombinasyonundan oluşmaktadır (43).

DNA probları kullanılarak yapılan restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi en son geliştirilen tekniklerdendir (13). 16S-23S spacer region gibi spesifik bir gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu, takiben restriksiyon enzimi ile digestion ve ürünlerin agaroz jel elektroforezi ile ayrılması şeklinde modifiye edilmiştir (1).

*L.pneumophila*'nın sekans bazlı tiplendirmesinde (SBT, Sequence-based typing) altı gen sekansı kullanılmaktadır (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*) (43,74). Tiplendirmede 7. allel olarak *neuA* kullanılması indeksi genişletmiştir (75). Bu yöntemlerin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmasının faydaları araştırılmalıdır (13).

## 2.9.Tedavi

Kullanılan besiyerlerinde üreme zorluğu nedeniyle *Legionella* için antibiyotik duyarlık testleri yapılamamaktadır. Ayrıca in vitro duyarlı görülen bazı antibiyotikler de tedavide etkisiz kalmaktadır. Bu noktada antibiyotiğin, *Legionella*'nın saklandığı ve çoğaldığı makrofajlara giremediği düşünülmektedir (37).

Lejyoner hastalığı yüksek mortaliteye sahiptir. Hastalık antibiyotik tedavisi verilmeyen hastalarda ciddi seyretmektedir. Erken tanı, erken ampirik tedavi ve hızlı tanı testlerinin geliştirilmesi ile mortalite düşmektedir. Tedaviye geç kalınması artmış mortalite ile ilişkili bulunmuştur (4). Bu nedenle ciddi toplum kökenli pnömonilerde anti-*Legionella* antibiyotiklerin ampirik tedaviye erken dahil edilmesi önerilmektedir (43). Bakterinin hücre içi yerleşimi antimikrobiyal ilaçların etkinliğini belirlemektedir. Hücre içi konsantrasyonu minimal inhibitör konsantrasyonundan (MIC, minimal inhibitory concentration) yüksek olan ilaçlar hücre içine geçişi zayıf olanlardan daha etkili bulunmuştur (76).

Lejyoner hastalığının tedavisinde klasik olarak kullanılan ilaç eritromisindir (6) ancak yeni makrolidler tedavide eritromisinin yerini almıştır. Klinik deneyimler yeni makrolidlerin (azitromisin, klaritromisin gibi) ve florokinolonların (siprofloksasin ve levofloksasin gibi) *Legionella* enfeksiyonlarının tedavisinde daha etkili olduğunu göstermiştir. Azitromisin en etkili makrolid olup hücre içi *L.pneumophila*'ya karşı etkinliği eritromisinden daha yüksek bulunmuştur (77,78). Lejyoner hastalığı tedavisinde levofloksasin ile azitromisin dışındaki makrolidlerin karşılaştırıldığı üç çalışmada, orta şiddette pnömonide gruplar arasında fark bulunmazken, ciddi pnömonide levofloksasinin daha etkili olduğu bulunmuştur (79,80).Yeni makrolidler ile kinolonların yan etkilerinin de eritromisinden daha az olduğu düşünülmektedir (4).

Beta-laktam antibiyotikler pek çok izolatın beta-laktamaz üretmesi ve bu antibiyotiklerin makrofajlara girememeleri nedeniyle tedavide etkisizdir (37). Doksisisilin ve trimetoprim-sulfometaksazol tedavide kullanılabilir

diğer alternatif ilaçlardır (8). Kinolon tedavisine rifampisin eklenmesinin tedaviye ek fayda sağlamadığı ve yan etkileri arttırdığı düşünülmektedir (43)

Lejyoner hastalığında 7-14 günlük tedavi çoğu hastada yeterli olmakla birlikte, akciğer absesi, ampiyem, endokardit veya toraks dışı enfeksiyonları olan hastalarda tedavi süresinin daha uzun tutulması gerektiği düşünülmektedir (4). Tedavinin immün düşük hastalarda üç hafta olması gerektiği belirtilmektedir (6).

## 2.10. Nozokomiyal Salgınlar, Korunma ve Kontrol

Lejyoner hastalığı, halen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hastaneler Lejyoner hastalığının bulaşması için ideal ortamlardır. Hastanelerde riskli bireylerin çok sayıda olması, su tesisatının sıklıkla eski ve kompleks olması, oluşabilecek yanıkları önlemek üzere tesisattaki suyun sıcaklığının düşük tutulması Lejyoner hastalığına uygun bir zemin oluşturmaktadır.

Sağlık kurumlarında Lejyoner hastalığının bulaşma riskini en aza indirmek için CDC; su sistemlerinin bakımı, nozokomiyal pnömonili hastaların test edilmesi ve bulaşın gösterildiği durumlarda yapılacaklarla ilgili çeşitli stratejiler geliştirmiştir (1).

CDC ve diğer otoriteler, mikroorganizmanın su çevrelerinde yaygın bulunması nedeniyle sadece Lejyoner hastalığı olguları görüldüğünde çevresel kaynaklardan kültür yapılmasında hemfikirdirler. Ancak Pittsburgh'dan araştırmacılar hastane ve bakım evi gibi *Legionella* için riskli hastaların bulunduğu kurumlarda çevre kültürlerinin yapılması gerektiğini düşünmektedir (5).

CDC'nin raporuna göre; nozokomiyal Lejyoner hastalığından korunma ve kontrol için alınacak önlemler birincil ve ikincil önlemler olarak ikiye ayrılmaktadır:

Birincil önlemler; personel eğitimi, enfeksiyon ve çevre sürveyansı ile tıbbi araç ve gereçlerin kullanımı ile ilgilidir. Klinisyenlerin Lejyoner hastalığı şüpheli olgularda, uygun tanı yöntemlerini kullanımı konusunda eğitilmesi, Legionellozisin önlenmesi ve kontrolü konusunda yardımcı personelin eğitimi, transplantasyon ünitelerinde *Legionella* için su örneklerinin rutin kültürünün

yapılması, riskli hastaların bulunmadığı diğer ünitelerde rutin su kültürünün yapılmaması gibi öneriler bulunmaktadır (81).

Ayrıca nebulizatör ve diğer yarı-kritik respiratuvar ekipmanların temizlenmesinde steril su kullanımı ve nebulizatörlerin rezervuarına sadece steril su doldurulması önerilmektedir. Geniş hacimli hava nemlendiricilerinin kullanılmaması ya da günlük sterilizasyon veya yüksek düzey dezenfeksiyon yapılarak kullanılması gerekmektedir (81).

Özellikle yüksek risk grubundaki hastaların bulunduğu birimlerin kullanım suyu çıkışlarının  $\geq 51^{\circ}\text{C}$  ya da  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  olması gerekmektedir. Kullanım suyu  $\geq 51^{\circ}\text{C}$  ise yanmayı önlemek için termostatik karıştırıcı valvler kullanılması önerilir. Suyun klor dioksit, ağır metal iyonları, ozon ve UV ile muamelesi önerilmemektedir. Hastanelerde *Legionella*'nın kontrolünde monokloramin ile muamele edilmiş suyun kullanımı başarılı bulunmuştur (81).

Bir transplant ünitesindeki kullanım suyunda *Legionella* saptandığında su kaynağının dekontamine edilmesi, immün düşük hastaların duş almasının engellenmesi, diş fırçalama, içme suyu vb. için steril su kullanılması önerilmektedir (81).

İkincil önlemler, sağlık birimi ile ilişkili doğrulanmış Lejyonellozis olgusu varlığında uygulanmaktadır.

CDC bir transplant ünitesinde laboratuvarca doğrulanmış olgu varlığında (yatışının 10. gününden sonra), ya da 6 ay arayla 2 veya daha fazla doğrulanmış olgu varlığında, yerel sağlık kuruluşu ya da kendisiyle bağlantıya geçilmesini istemektedir.

*Legionella* spp.'nin kaynağının bulunması için kombine epidemiyolojik ve çevresel araştırmalar yapılmalı ve kaynak tespit edildiğinde dekontamine edilmelidir. Önceki olguların tanımlanması için retrospektif olarak mikrobiyolojik, serolojik ve postmortem veriler toplanarak epidemiyolojik araştırmalar yapılmalı ve ayrıca yeni Lejyoner hastalığı olgularının prospektif sürveyansına devam edilmelidir (81) .

Nozokomiyal bulaşın devam etmediğine dair kanıt olsa bile sürveyansın başladığı tarihten itibaren 2 ay daha prospektif çalışmalara devam edilmelidir. Bulaşın devam ettiği kanıtlanırsa *Legionella* spp.'nin

kaynağını bulmak için çevre araştırması yapılır ve çevre ve hastadan soyutlanan *Legionella* spp.'nin alttiplendirmesi yapılmalıdır.

Kaynak bulunamazsa, 2 aydan uzun süre yeni olguların sürveyansına devam edilir. Salgının kapsamına göre ya hastanede özellikle salgının olduğu özel bölgelerde su dağıtım sisteminin dekontaminasyonuna ya da kaynak ortaya çıkana kadar dekontaminasyonun ertelenmesine karar verilebilir (81).

Sıcak su sisteminde bulaş varsa, süper ısıtma ya da hiperklorlama yapılarak sıcak su sistemi dekontamine edilir. Süper ısıtmada sıcak su sıcaklığı 71-77°C'ye çıkarılır ve sistemdeki bütün çıkışlardan en az 5 dakika akıtılır. Yanıkları önlemek için hastalara, personele ve ziyaretçilere uyarıda bulunmak gereklidir.

Termal şok uygulamasının yapılamadığı sistemlerde alternatif olarak hiperklorlama yapılabilir. Serbest klor kalıntısı  $\geq 2$  mg/l olacak şekilde sisteme klor eklenir. Sıcak su tankları ve su ısıtıcılarındaki kalıntılar uzaklaştırılmalıdır. Soğutma kulerinde bulaş varsa dekontamine edilmelidir (81).

3 ay boyunca iki hafta aralarla örnek toplanır. Bu süre içinde *Legionella* spp. kültürde saptanmazsa sonraki 3 ay, ayda bir kültür yapılır. Bir ya da daha fazla kültürde *Legionella* spp. saptanırsa kontrol ölçütleri tekrar gözden geçirilir, modifiye edilir ve dekontaminasyon tekrar edilir. Aynı tekniğin daha yoğun kullanılması ya da süper ısıtma ve hiperklorlama kombinasyonu uygulanabilir (81).

## **2.11.Su Dağıtım Sistemlerinin Dezenfeksiyonu**

### **2.11.1.Termal Yöntem**

Su sıcaklığının 65°C'nin üstüne çıkarılması ve bütün çıkışlardan birkaç dakika akıtılması (superheat-and-flush) kısa süreliğine *Legionella* miktarının azaltılmasında etkilidir.

Bu yöntem düzenli olarak uygulanmazsa bakteri birkaç hafta içinde tekrar üreyecektir. Bu yöntem zaman alıcıdır ve su ısıtıcılarının kapasitesi ile sınırlıdır. Uzun dönem etkinlik için sıcak su sıcaklığı sürekli 50-60°C'nin üstünde tutulmalıdır.



Bu yöntemin dezavantajı yanık riskidir. Ayrıca sıcak su sıcaklığının artırılması, iki sistem arasındaki ısı alışverişinden dolayı soğuk su tarafını ılıklaştırabilir. Sonuçta soğuk su ilişkili *Legionella* bulaş riski artabilir (82).

### **2.11.2.Ultraviyole Işınları**

Hücresel DNA hasarına yol açarak *Legionella*'yı öldürür. Bu sistemler lokalize dezenfeksiyonda etkili bulunmuştur. Ultraviyole ışınlar kalıntı bırakmadığı için distal bölgeler süper ısıtma ve akıtma yöntemiyle dezenfekte edilmelidir. Gümüş-bakır iyonizasyonu ve klorlama ile beraber etkin olduğu gösterilmiştir. Ultraviyole ışık kaynağında tortu birikimini engellemek için önfiltrasyon gereklidir (5).

### **2.11.3.Serbest Klor**

İçme suyu sistemlerine standart serbest klor (<0.5 mg/l) ilavesi biyofilm ilişkili *Legionella* ve *Legionella*-benzeri mikroorganizmaların öldürülmesinde etkili değildir. Standart düzeydeki klor, biyofilm tabakasına, periferel bölgelere ve su tesisatındaki durağan bölgelere ulaşamaz. Serbest klor konsantrasyonu arttırılırsa, dağıtım sistemindeki bütün bölgelere ulaşarak etkinliği sağlanabilir. CDC'nin önerisiyle serbest klor konsantrasyonu en az 1mg/l olmalıdır. Ayrıca serbest klor yüksek pH'da daha az etkili olmaktadır. Yüksek klor konsantrasyonunun en önemli dezavantajı su tesisatında korozyona yol açmasıdır. Serbest klorla dezenfeksiyon sonucu ortaya çıkan ürünlerin potansiyel karsinojenik etkisi halen tartışmalıdır (82).

### **2.11.4.Bakır-Gümüş İyonizasyonu**

Bakır-gümüş iyonizasyon üniteleri, metalik iyonları ortaya çıkaran elektrotlar kullanılarak bakteri hücre duvarına hasar veren, hücre lizisi ve ölümüne yol açan sistemlerdir. Bu üniteler su dağıtım sistemlerinde kalıntı bırakarak koruyuculuk sağlar. *Legionella* spp. öldürüldüğü için rekolonizasyon ihtimali minimaldir. Yapılan çalışmalarda bu sistemin *L.pneumophila* eradikasyonunda yüksek etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir.

Ultraviyole ışık ve klorla birlikte kullanılabilir. Ancak emek-yoğun ve pahalı bir yöntemdir (5).

### 2.11.5.Monokloramin

Amonyak ve serbest klorun suda doğru oranda ( $Cl_2/NH_3=3-5$ ) karıştırılması ile oluşturulmuştur. Biyofilm tabakasına serbest klordan daha iyi penetre olur ve *Pseudomonas* gibi biyofilm içindeki bakterilerin öldürülmesinde daha iyidir.

İçme suyu dezenfeksiyonunda 1916'dan beri kullanılmaktadır. İçme sularının dezenfeksiyonunda; başlangıç dezenfeksiyonu ve dağıtım sistemindeki biyosidal aktivitenin devamını sağlayan rezidüel dezenfeksiyon olmak üzere iki aşama bulunmaktadır (82).

Monokloraminin başlangıç dezenfeksiyonu serbest klordan daha yavaştır ancak dağıtım sisteminin uzak mesafelerine kadar dezenfeksiyon kalıntısını götürebilir. Dezenfeksiyon ürünleri, serbest klordan daha az karsinogeniktir. Diğer bir avantajı da daha az tat ve koku problemine yol açmasıdır.

Dezavantajları ise bazı balıklar için toksik olması ve diyaliz suyunda kullanıldığında febril reaksiyona yol açmasıdır. Korozyona yol açmaz. Granüler aktive karbon filtreleri ile sudan uzaklaştırılabilir ya da askorbik asit ve tiyosülfat ile nötralize edilebilir (82). 1.5-2.5 mg/l arasında değişen konsantrasyonlarda dezenfektan olarak kullanılır. 4 ppm monokloraminin *Legionella*'nın ortadan kaldırılmasında çok etkili olduğu gösterilmiştir.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 4/12/2008 tarih ve 04 sayılı kararı ile onay alındı. Çalışma Etik kurul ve ilgili bölümler tarafından belirtilen öneriler doğrultusunda düzenlendi.

Çalışmamızda Nisan 2010 – Aralık 2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Eskişehir'deki bazı hastanelerin çeşitli bölümlerinde bulunan 100 adet musluktan hem su ve hem de sürüntü olmak üzere toplam 200 adet örnek alınıp, *Legionella* cinsi bakteri varlığı yönünden incelendi.

Ayrıca Kasım 2009 – Kasım 2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine ve şehrimizdeki bazı hastanelerin Göğüs Hastalıkları ve Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine ya da Acil Servise başvurup, pnömoni tanısı ile izlenen 50 hasta da çalışmaya alındı. Hastaların herbirine ait kişisel bilgiler, klinik bulgular, akciğer radyolojik bulguları, risk faktörleri ve alınan mikrobiyolojik örnekler ve sonuçlarını içeren birer form dolduruldu (Bkz. Ek 1).

Çalışmaya alınan her hastadan akut dönem kan örnekleri, alt solunum yolu örnekleri ve idrar örnekleri alındı. Vacutainer (Becton Dickinson) jelli tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri ile idrar ve balgam örnekleri de daha sonra çalışılmak üzere 2 ml'lik eppendorf tüplerine konarak -20°C'de saklandı. Su ve sürüntü örnekleri, alındıktan sonra aynı gün içinde besiyerlerine inoküle edildi.

#### 3.1.Gereçler

##### 3.1.1.Cam ve Plastik Malzemeler

- 1) Steril cam tüpler
- 2) Steril eküvyon çubukları
- 3) Steril plastik özeler (10µl ölçülü)
- 4) Steril plastik petri kutuları (90 mm)
- 5) Steril enjektör (5 ve 10 ml)
- 6) 500 ve 1000 ml'lik steril cam balonlar
- 7) Eppendorf tüpleri ( 1.5 ve 2 ml)

- 8) Steril idrar kabı
- 9) Plastik su şişesi (250 ml)
- 10) Falkon tüpleri (15 ve 50 ml)
- 11) Jelli kan tüpleri
- 12) Steril mikropipet uçları
- 13) Mikropleyt
- 14) Vidalı kapaklı tüpler (2 ml)
- 15) Membran filtre (enjektör tipi)
- 16) Steril cam balon

### **3.1.2.Cihazlar**

- 1) Vorteks (karıştırıcı)
- 2) Etüv
- 3) pH metre
- 4) Mikropipet
- 5) Otomatik yıkayıcı
- 6) Otomatik EIA fotometrik okuma cihazı
- 7) Laboratuvar saati ( dijital zaman alarmlı)
- 8) Buzdolabı
- 9) Derin dondurucu (-20, -70 °C)
- 10) Manyetik karıştırıcı
- 11) Otoklav
- 12) Su banyosu
- 13) Biyogüvenlik kabini (sınıf 2)

### 3.1.3.Besiyerleri

#### BCYE Besiyeri:

*Legionella* CYE agar ve üreme katkı maddelerinin birleşiminden oluşmaktadır.

CYE agarın (Oxoid, CM 655, İngiltere) içeriği:

Aktif kömür	2.0 g/l
Agar	13.0 g/l
Maya ekstraktı	10.0 g/l

*Legionella* BCYE üreme katkı maddeleri:

Alfa-ketoglutarik asit	1.0 g/l
ACES tamponu	10.0 g/l
L-sistein HCl	0.40 g/l
Ferrik pirofosfat	0.25 g/l
KOH	2.4 g/l (55ml 1N KOH)

1L BCYE besiyeri hazırlamak için 1L'lik steril cam balona 700 ml deiyonize su konuldu, bir manyetik balık atıldı ve 50°C'ye ayarlı manyetik karıştırıcı üzerine oturtuldu. ACES tamponu tartıldı ve balondaki suya ilave edilip, karıştırıldı ve tamamen eriyene kadar beklenildi. CYE agardan ( Oxoid, CM 655) 29 g tartıldı, alfa-ketoglutarik asit tartıldı ve balona ilave edilip, karıştırıldı. Yavaş, yavaş 55 ml 1N KOH ilave edilip, iyice karışması sağlandı. Sonra pH ölçüldü; 6.9-6.97 aralığının altında ise yavaş yavaş 1N KOH eklenerek ayarlandı. Ulaşılan toplam volüm hesaplanarak, 986 ml'ye tamamlamak üzere deiyonize su ilave edildi. Balonun ağzı kapatılıp otoklava konuldu ve 121°C'de 20 dakika steril edildi. Besiyeri otoklavlanırken, 2 adet steril falkon tüpüne 10'ar ml deiyonize su ile içlerine L-sistein ve ferrik pirofosfat tartılarak konuldu ve oda ısısında 1 saat erimeye bırakıldı. Sonra her biri membran filtreden (enjektör tipi) geçirilerek steril tüplere aktarıldı. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 55°C'ye ısıtılmış su banyosuna konuldu ve soğuması beklenildi. İçine kabarcık oluşturulmadan 4ml L-sisteinden ve 10 ml ferrik pirofosfat solüsyonundan eklendi. Tekrar pH kontrolü yapıldıktan sonra

bek alevinin yanında besiyeri steril petri kaplarına döküldü. Besiyerleri döküldükten sonra oda ısısında nemin fazlası uzaklaşana kadar bekletildi ve sonra buzdolabında 4 haftaya kadar muhafaza edildi (83).

#### **MWY Besiyeri (Selektif *Legionella* Besiyeri):**

500 ml besiyeri hazırlamak için gerekli MWY (Oxoid, SR 118B) supplement içeriği:

Glisin	1.5 g
Vankomisin	0.5 mg
Polimiksin B	25.000 IU
Bromtimol mavisi	5 mg
Bromkrezol moru	5 mg

MWY besiyeri için bu antibiyotik supplementin 1 viyali 10 ml distile suda çözüldü ve otoklav sonrası 500 ml BCYE besiyerine ilave edildi.

#### ***Legionella* Üremesinin (besiyerinin) Kontrolü:**

Taze kültürden *L.pneumophila* serogrup 1 pozitif kontrol suşunun (ATCC 43111) steril distile suda, 0.5 McFarland yoğunlukta standart bakteri süspansiyonu hazırlandı ve steril fosfat tamponlu su ile 1:100 oranında dilüe edildi. Dilüe süspansiyon 10µl'lik ölçülü öze ile her plağa  $10^3$ - $10^4$  CFU bakteri olacak şekilde inoküle edildi. Plaklar 35°C'de inkübe edildi. Kullanılan besiyerleri *Legionella* cinsi bakterilerin üremesi için uygunsa koloniler 2-3 günde görünür hale geldi (84).

#### **Kanlı Agar:**

*Legionella* besiyerinde üreyen şüpheli kolonilerin kontrolünde kullanıldı. Şüpheli kolonilerden kanlı agar ve BCYE besiyerine pasaj yapıldı. BCYE'de üreyip, kanlı agarda üremeyen bakteriler olası *Legionella* spp. olarak düşünüldü.

Kanlı agar toz besiyerinin (Oxoid CM0055) içeriği:

'Lab-Lemco' Powder	10 g/l
Pepton	10 g/l

Sodyum klorid	5 g/l
Agar	15 g/l

37 gr kanlı agar toz besiyeri 1L distile suda çözülerek 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. 50°C'ye soğutuldu ve sonra üzerine 50 ml defibrine kan ilave edilerek steril petrilere dağıtıldı.

### **STGG Besiyeri:**

İzole edilen *Legionella* cinsi bakterilerin saklanabilmesi amacıyla hazırlandı.

Besiyerinin içeriği:

Skim milk powder	2.0 g
Tripton soya buyyon	3.0 g
Glukoz	0.5 g
Gliserol	10 ml

Bu içerik 100 ml distile suda çözüldü. 2 ml'lik vida kapaklı tüplere 1-1.5 ml dağıtılarak 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Soğuduktan sonra +4°C'de 6 ay saklandı.

### **3.1.4.Çözeltiler**

#### **Asit Tampon Çözeltisi:**

Aside duyarlı diğer bakterilerin üremesini baskılayarak, *Legionella* spp.'nin izolasyonu amacıyla kullanılan bir çözeltilidir. Asit ile muamele yönteminde *Legionella* spp.'nin aside dirençlilik özelliğinden yararlanıldı (84).

0.2 M HCl çözeltisi: 1 M HCl'nin 2 ml'si 8 ml distile suya eklendi

0.2 M KCl çözeltisi: 1.5 g KCl 100 ml distile suda çözüldü.

0.2 M HCl çözeltisinin 3.9 ml'sine, 0.2 M KCl çözeltisinden 25 ml eklenerek, pH 2.2±0.1'e ayarlanarak asit tampon çözeltisi oluşturuldu (84). Aseptik şartlarda 2 ml'lik eppendorflara 0.9'ar ml ve 15 ml'lik falkon tüplerine 2'şer ml dağıtılarak oda ısısında saklandı.

### 3.2.Yöntemler

#### 3.2.1. Su ve Sürüntü Örneklerinin Alınması ve Ekim Öncesi İşlemler

##### **Su ve Sürüntü Örneklerinin Alınması:**

Musluktan birkaç damla su akıtılması suretiyle musluk başı ıslatıldı. Daha sonra, iki adet steril eküvyon musluk ağzından içeri sokuldu ve kuvvetlice birkaç kez döndürülerek sürüntü örnekleri alındı. Daha sonra vana hafifçe açılarak 2-10 ml su tüp içine akıtıldı, eküvyonlar tüpün içine daldırıldı ve tüpün kapağı kapatıldı. Sürüntü örneği alındıktan sonra sıcak su vanası açılarak 100 ml su steril plastik su şişelerine alındı. Şişenin ve tüpün üstüne alındığı yer kaydedildi (83).

##### **Su Örneklerinin Santrifügasyonu:**

Su örneklerinin 50 ml'si steril falkon tüpüne (50 ml'lik) alındı ve 6000 g'de 10 dakika süreyle 25°C sıcaklıkta santrifüj edildi. Üst faz aseptik olarak uzaklaştırıldı. Santrifüj tüpündeki tortu, distile suda tekrar süspansiyon hale getirildi (85). Suyun kalan 50 ml'si şahit numune olarak saklandı.

##### **Su ve Sürüntü Örneklerinin Dekontaminasyonu:**

Santrifüj edilip resüspansiyon edilen su örneklerinin 0.1ml'si, 0.9ml asit tampon çözeltisi bulunan falkon tüpüne alındı. İyice vortekslendikten sonra 3 dakika asit ile muamele edildi. Sürenin sonunda tüp tekrar vortekslendi ve 0.1'er ml örnek BCYE ve MWY besiyerlerine ekildi.

Sürüntü örneklerinin dekontaminasyonu; eküvyonlar örnek alma tüpünden çıkarılarak 2ml HCl-KCl asit tampon çözeltisi içeren falkon tüpüne daldırıldı. Pamuklu ucu kuvvetlice tüp içindeki asitle karıştırıldı. Eküvyonlar tüpün kenarından süzdürülerek çıkarıldı. Tüp vortekslenerek, 3 dakika asit ile muamele edildi. Süre dolduğunda tüp tekrar vortekslendi ve içinden 0.1ml örnek alınarak BCYE ve MWY besiyerlerine ekildi.

Su ve sürüntü örnekleri, ayrıca asit ile dekontamine edilmeden de direkt olarak BCYE ve MWY besiyerlerine ekildi



### 3.2.2.Su ve Sürüntü Örneklerinin Kültürü ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ekim yapılan plaklar kapakları üste gelecek şekilde ters çevrilerek 35°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 14 gün süreyle inkübe edildi. Kültürler 72 saatlik inkübasyonun ardından günlük olarak incelendi. Koloni morfolojisi *Legionella* spp. ile uyumlu kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram-boyamada safranin yerine karbol fuksin kullanıldı. Preparatta küçük, ince, soluk boyanan gram negatif basillerin görülmesi *Legionella* spp.'yi düşündürdü (83,84). Mikroskopik görünümleri de uyumlu olan her bir koloniden kanlı agara ve eş zamanlı BCYE besiyerine pasaj yapıldı. 24-48 saat inkübasyon sonrası, BCYE'de üreyip, kanlı agarda üremeyen bakteriler yüksek olasılıkla *Legionella* spp. olarak değerlendirildi, olası *Legionella* kolonileri sayılarak kaydedildi ve tür ve serogrup düzeyinde tanımlanması için lateks aglütinasyon testi uygulandı. Plaktaki diğer mikroorganizmalara ait koloniler ise *Legionella*-dışı bakteri olarak kaydedildi ve kabaca koloni sayıları yazıldı (83).

### 3.2.3.Legionella Cinsi Bakterilerin Tür ve Serogrup Düzeyinde Tanımlanması

#### Lateks Aglütinasyon Testi:

*Legionella* Lateks Aglütinasyon Testi (Oxoid, DR0800, İngiltere) çevresel kaynaklardan veya Lejyonellozis şüpheli hastalardan alınan örneklerin kültüründe üretilmiş baskın *Legionella* türlerinin identifikasyonunda kullanılan bir testtir. Bu test *Legionella pneumophila* serogrup 1 ve serogrup 2-14'ün identifikasyonuna, ayrıca insan hastalıklarından sorumlu tutulan diğer 7 *Legionella* türünün de saptanmasına olanak sağlamaktadır.

*Legionella* Lateks Aglütinasyon Testi, spesifik *Legionella* hücre duvar antijenleri varlığında aglütinasyon oluşturan, mavi lateks partikülleri ile kaplanmış antikolar içermektedir. Gözle görülebilir aglütinasyon sayesinde, baskın patojenik *Legionella* tür ve serotiplerinin basit ve hızlı bir şekilde saptanmasına olanak sağlar.

*Legionella* Lateks Aglütinasyon Kitinin içeriği;

1°-*Legionella pneumophila* serogrup 1 test reagent: *Legionella pneumophila* serogroup 1 antijeni ile reaktif, mavi lateks partikülleri ile kaplı spesifik tavşan antikoru.

2°-*Legionella pneumophila* serogrup 2-14 test reagent: *Legionella pneumophila* serogrup 2-14 antijeni ile reaktif, , mavi lateks partikülleri ile kaplı spesifik tavşan antikoru.

3°-*Legionella* spp. test reagent :*L.longbeachae* serogrup 1 ve 2, *L.bozemanii* serogrup 1 ve 2, *L.dumoffii*, *L.gormanii*, *L.jordanis*, *L.micdadei*, *L.anisa* ile reaktif, mavi lateks partikülleri ile kaplı spesifik tavşan antikoru.

4°-Pozitif kontrol süspansiyonu: Buffer içinde *Legionella* hücrelerinin polivalan süspansiyonu.

5°-Negatif kontrol süspansiyonu: Buffer içinde test reagentleri ile reaktif olmayan *Legionella spiritensis* hücrelerinin süspansiyonu.

6°-Kontrol lateks: mavi lateks partikülleri ile kaplı reaktif olmayan tavşan globulini.

7°-Süspansiyon tamponu: Fosfat tampon solüsyonu

8°-Reaksiyon kartları: 50 adet tek kullanımlık kart

Testin yapılışı;

Reaksiyon kartı üzerindeki 6 bölmenin her birine *Legionella pneumophila* serogrup 1, *Legionella pneumophila* serogrup 2-14 ve *Legionella* spp. test reagentlerinden, pozitif, negatif kontrollerden ve kontrol lateks süspansiyonundan birer damla damlatılır. İlk dört bölmenin diğer yanına damlalarla karışmayacak şekilde süspansiyon tampondan birer damla damlatılır. Öncelikle test edilecek bakteriden birkaç koloni alınarak süspansiyon tamponu ile homojen bir şekilde karıştırılır ve daha sonra bu süspansiyon test reagentleri ile karıştırılır. Bir dakika içinde mavi renkte aglütinasyon oluşumu değerlendirilir. Bakteri hangi tür ve serogruptan ise o tür ve serogrubun reagenti ile aglütinasyon verir. Pozitif sonuç alınan bakteri, süspansiyon tamponu ve daha sonra kontrol lateks ile karıştırılır. Aglütinasyon olmaması yalancı pozitifliği ekarte ettirir. Bu testin içerdiği

reagentlerden herhangi biri ile aglütinasyon vermeyen bir bakterinin kitte bulunmayan bir *Legionella* türü olması mümkündür.

### **3.2.4. İzolatların Saklanması**

Olası *Legionella* bakterisi üreyen plaklardan BCYE besiyerine yoğun ekimler yapıldı. Etüvde 24-48 saat bekletildi. Üreme sağlanınca steril öze yardımıyla, plaktaki bakteriden yoğun bir şekilde STGG besiyerine aktararak, vortekslendi ve -70 °C'de saklandı.

### **3.2.5. Klinik Örneklerin İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler**

#### **Klinik Örneklerin Alınması ve Saklanması:**

Çalışma kapsamına alınan hastalardan akut dönem alt solunum yolu örnekleri (balgam, BAL ve transtrakeal aspirat örnekleri), idrar ve kan örnekleri alındı. Balgam, BAL, transtrakeal aspirat ve idrar örnekleri steril kapaklı kaplara alındı. Balgam örnekleri çalışmaya alınırken, kültür için uygunluğunda kullanılan mikroskopik değerlendirme kriterleri göz ardı edildi (3). Kan örnekleri hazır jelli tüplere alındıktan sonra 3000 devirde santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Alt solunum yolu örnekleri, idrar ve serum örnekleri daha sonra çalışılmak üzere 2ml'lik eppendorflar içinde -20°C'de saklandı.

#### **Alt Solunum Yolu Örneklerinin Kültürü:**

Çalışmaya alınan hastaların balgam, BAL ve transtrakeal aspirat örneklerinde kültür yöntemi ile *Legionella* cinsi bakteriler araştırıldı. Balgam örnekleri direkt olarak ve asitle dekontaminasyon işleminden sonra BCYE ve MWY besiyerlerine ekildi. BAL örnekleri santrifüj edildikten sonra 0.1 ml olarak BCYE ve MWY besiyerlerine ekildi (84). Transtrakeal aspirat örnekleri de 0.1ml olarak BCYE ve MWY besiyerlerine ekildi. Alt solunum yolu örneklerinin %5 kanlı agar, çikolatamsı agar ve EMB agar besiyerlerine de kültürü yapıldı. Besiyerleri %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 14 güne kadar inkübe edildi. Kültürü yapılan alt solunum yolu örneklerinin eş zamanlı olarak Gram boyamaları yapılarak mikroskopta değerlendirildi. *Legionella* kültürleri günlük olarak değerlendirildi, şüpheli kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram

boyamada küçük, ince, soluk boyanan gram negatif basiller görüldüğünde, şüpheli kolonilerden kanlı agar ve BCYE besiyerlerine pasaj yapıldı. Kanlı agarda üreme olmayıp, BCYE besiyerinde üreme olması durumunda şüpheli kolonilere lateks aglütinasyon testi uygulandı.

### ***Legionella* İdrar Antijen Testi:**

Çalışmaya alınan hastaların idrarında *Legionella pneumophila* antijeninin kalitatif olarak saptanması amacıyla *Legionella* urinary antigen EIA kiti (Diagnostic Automation, Inc) kullanıldı.

*Legionella* urinary antigen EIA Kitinin içeriği;

**Test stripleri:** Saflaştırılmış tavşan *Legionella pneumophila* IgG antikoları içeren mikrokuyucuklar.

**Enzim konjugatı:** kırmızı boya ve timerosalli HRP (peroksidaz) ile konjuge edilmiş saflaştırılmış tavşan *Legionella pneumophila* IgG antikoları.

**Pozitif kontrol:** Timerosalli tampon solüsyonunda, dilüe edilmiş *Legionella pneumophila* antijeni.

**Negatif kontrol:** Timerosalli dilüsyon tamponu

**Kromojen:** Tetrametilbenzidin (TMB) ve peroksit

**Yıkama solüsyonu:** Konsantre buffer ve surfaktan

**Durdurma solüsyonu:** 1M fosforik asit

Testin yapılışı;

1) Distile su ile 20x yıkama solüsyonu hazırlandı. İyice karıştırıldı.

2) Hasta sayısı ve kontrollere yetecek kadar kuyucuk mikropleyde yerleştirildi

3) Kuyucuk 1'e 100µl negatif kontrol konuldu.

4) Kuyucuk 2'ye 100µl pozitif kontrol konuldu.

5) Kuyucuklara hastalara ait idrar örneklerinden 100µl konuldu.

6) Oda ısısında (15-25°C) 30 dakika inkübe edildi ve sonra yıkama işlemi uygulandı.

7) Kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Bu işlem için otomatik yıkayıcı kullanıldı.

8) Her kuyucuğa 2 damla konjugat eklendi.

9) 10 dakika inkübe edildi ve ardından tekrar yıkama yapıldı

10) Her kuyucuğa 2 damla kromojen ilave edildi.

11) 5 dakika inkübe edildi. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadı.

12) Her kuyucuğa 2 damla durdurma solüsyonu ilave edildi.

13) Testin sonunda sonuçlar otomatik EIA okuma cihazı ile 450 nm dalga boyunda fotometrik olarak okundu.

Sonuçların değerlendirilmesi;

Absorbans değeri  $\geq 0.15$  OD (optik dansite) ise pozitif,

Absorbans değeri  $< 0.15$  OD ise negatif

olarak değerlendirildi.

### **Antikor Arama Testi:**

Hasta serumunda *Legionella pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı total antikor (IgG/IgM/IgA) saptanması amacıyla *Legionella* IgG/IgA/IgM EIA kiti (Diagnostic Automation, Inc) kullanıldı.

*Legionella* IgG/IgA/IgM EIA Kitinin içeriği;

**Konjugat:** konjuge (horseradish peroksidaz) keçi anti-insan IgG/IgA/IgM

**Pozitif kontrol** (Maymun serumu)

**Kalibratör** (Maymun serumu)

**Negatif kontrol** (insan serumu)

**Örnek seyreltici:** Tween-20 sığır serum albumini ve tamponlanmış fosfat tuzu

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametil benzidin

**Durdurma solüsyonu:** 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.7M HCl

**Yıkama solüsyonu konsantrati:** 10x konsantre fosfat tampon tuzu ve Tween-2 solüsyonu

Testin yapılışı;

1) Serum örnekleri -20°C'deki saklandığı yerden çıkarılarak oda ısısına getirildi.

2) Hasta sayısı, kullanılacak kontroller, kör reagen ve kalibratörün sayısı hesaplanarak yeterli sayıda mikrokuyucuk mikropleyte yerleştirildi

3) Tüm hasta serumları, pozitif ve negatif kontroller ve kalibratörden 1: 21 dilüsyon hazırlandı. (10µl serum + 200µl örnek dilüenti)

4) Örnek, dilüentle birleştiğinde renk değişikliği görüldü

5) Dilüe edilen kontrol, kalibratör ve hasta serumlarından kuyucuklara 100µl konuldu. 2 adet kalibratör kullanıldı.

6) İlk kuyucuğa reagent blank olarak 100µl sample dilüent konuldu.

7) Oda ısısında (20-25°C) 25 ± 5 dakika inkübe edildi.

8) Kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Bu işlem için otomatik yıkayıcı kullanıldı.

9) Reagent blank dahil her kuyucuğa 100µl konjugat ilave edildi.

10) Oda ısısında (20-25°C) 25 ± 5 dakika inkübe edildi.

11) Kuyucuklar 300 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Bu işlem için otomatik yıkayıcı kullanıldı.

12) Reagent blank dahil her kuyucuğa 100µl TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) ilave edildi.

13) Oda ısısında (20-25°C) 10-15 dakika inkübe edildi.

14) Reagent blank dahil her kuyucuğa 50µl durdurma solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu.

15) Testin sonunda sonuçlar otomatik EIA okuma cihazı ile 450 nm dalga boyunda fotometrik olarak okundu. Her kuyucuğun kör reagine karşı optik dansitesi ölçüldü.

Sonuçların değerlendirilmesi;

Sınır (Cut off) değerini saptamak için kalibratörlerin ortalaması alındı ve düzeltme faktörü ile çarpıldı. Örneğin optik dansitesinin, cut off (sınır) değerine bölünmesiyle indeks değeri veya optik dansite oranı saptandı. Buna göre;

İndeks değeri  $\leq 0.90$  ise negatif,

İndeks değeri 0.91-1.09 ise şüpheli pozitif,

İndeks değeri  $\geq 1.10$  ise pozitif

olarak değerlendirildi.

İndeks değeri 0.91-1.09 olan örnekler tekrar test edildi.

### 3.3. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmanın verileri "SPSS for Windows, Version 15.0" paket programı kullanılarak analiz edildi. Çalışmanın verileri, ortalama değer, sayı, standart sapma ve yüzde değerler ile verildi. Gruplar arasında frekansların karşılaştırılmasında Ki-kare testi ve Fisher's Exact Test kullanıldı. Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normallik testleri sonucunda yaş gruplarının karşılaştırılması için nonparametrik testlerden Mann Whitney U testi uygulandı. İstatistiki değerlendirmede elde edilen p değerinin 0.05 değeri'nden küçük olması durumunda "fark var", 0.01 değeri'nden küçük olması durumunda "önemli fark var", 0.001 değeri'nden küçük olması durumunda "ileri düzeyde fark var", kabul edildi.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Su Kaynaklı Bulgular

Çalışmamızda Nisan 2010 – Aralık 2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Eskişehir'deki bazı hastanelerin çeşitli bölümlerindeki toplam 100 adet musluktan hem su ve hem de sürüntü örneği olmak üzere toplam 200 adet örnek alındı ve *Legionella* cinsi bakteri varlığı yönünden incelendi.

Su ve sürüntü örneklerinin alındığı hastane birimlerinin dağılımı Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Musluktan alınan su ve sürüntü örnekleri ve alındığı hastane birimleri

Hastane Birim Sayısı	Örneğin Alındığı Yer	Duş Su ve Sürüntü Örnek Sayısı	Musluk Su ve Sürüntü Örnek Sayısı
1	Onkoloji Servisi	24	---
2	Hematoloji Servisi	7	3
3	Göğüs Hastalıkları Servisi	4	6
4	Dahiliye Servisleri	3	16
5	Göğüs Kalp-Damar Cerrahisi Servisi	---	5
6	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi	---	8
7	Pediyatri Büyük Çocuk Servisi	6	2
8	Dahiliye Yoğun Bakım	---	2
9	Anestezi Yoğun Bakım	---	1
10	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	---	1
11	Göğüs Cerrahi Yoğun Bakım	---	1
12	Pediyatri Yoğun Bakım	---	1
13	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım	---	1
14	Mikrobiyoloji Laboratuvar	---	4
15	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	---	1
16	Kardiyoloji Yoğun Bakım	---	1
17	Ameliyathane	---	2
18	Yanık Birimi (tank)	---	1
Toplam	18 Farklı Bölüm	44	56



ESOGÜ Tıp Fakültesi Hastanesi ile şehrimizde bulunan bazı hastanelerdeki, Dahiliye Yoğun Bakım Üniteleri, Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi, Onkoloji Servisi, Dahiliye Hematoloji Servisi, Genel Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi, Göğüs Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitesi, Pediatri Yoğun Bakım Ünitesi, Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi, Göğüs Hastalıkları Servisi, Dahiliye Servisleri, Göğüs-Kalp Damar Cerrahisi Servisi, Pediatri Süt Çocuğu ve Büyük Çocuk Servislerinden ve Mikrobiyoloji Laboratuvarlarından 100 adet musluğa ait hem su ve hem de sürüntü örnekleri olmak üzere toplam 200 örnek alındı.

*Legionella* cinsi bakterilerin izole edildiği örnekler ve alındığı hastane birimleri Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. *Legionella* cinsi bakterilerin izole edildiği örnekler ve alındığı hastane birimleri

Suş No	İzole Edildiği Birim	Örnek Türü
1	Onkoloji Servisi	Duş musluğu sürüntü
2 ve 3	Onkoloji Servisi	Duş musluğu su / Duş musluğu sürüntü
4	Onkoloji Servisi	Duş musluğu su
5 ve 6	Onkoloji Servisi	Duş musluğu su / Duş musluğu sürüntü
7	Onkoloji Servisi	Duş musluğu su
8	Onkoloji Servisi	Duş musluğu su
9	Hematoloji Servisi	Duş musluğu su
10	Hematoloji Servisi	Musluk sürüntü
11	Hematoloji Servisi	Musluk su
12 ve 13	Pediatri Yoğun Bakım Ünitesi	Musluk su / Musluk sürüntü
14	Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi	Musluk sürüntü
15 ve 16	Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi	Musluk su / Musluk sürüntü
17	Göğüs Hst.Yoğun Bakım Ünitesi	Musluk sürüntü
18	Göğüs Hastalıkları Servisi	Musluk sürüntü
19	Göğüs Hastalıkları Servisi	Musluk sürüntü
20	Göğüs Hastalıkları Servisi	Musluk sürüntü
21	Göğüs Hastalıkları Servisi	Musluk Su
22	Dahiliye Servisi	Musluk sürüntü
23	Dahiliye Servisi	Musluk sürüntü
24	Pediatri Süt Çocuğu Servisi	Musluk sürüntü
25	Pediatri Büyük Çocuk Servisi	Duş musluğu sürüntü
26 ve 27	Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Musluk su / Musluk sürüntü
28 ve 29	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	Musluk su / Musluk sürüntü

Alınan su ve sürüntü örnekleri asitle muamele edildi ancak hem asitle muamele öncesi ve hem de asitle muamele sonrası olmak üzere 200 örnekten MWY besiyerine toplamda 400 adet ekim yapılmış oldu. 48-72 saatlik inkübasyon sonrası MWY besiyerindeki morfolojileri *Legionella* spp.'ye benzeyen koloniler saptanarak Gram boyama yapıldı. Gram boyamada, soluk boyanan, gram negatif ince basiller görüldüğünde olası *Legionella* spp. olarak düşünüldü (Şekil 4.3). Şüpheli kolonilerden BCYE ve kanlı agara pasaj yapıldı (Şekil 4.1 ve 4.2). Kanlı agarda üremeyip, BCYE besiyerinde üreyen kolonilere *Legionella* lateks aglütinasyon testi uygulanarak serogrup tayini yapıldı (Şekil 4.4).

Aşağıda *Legionella pneumophila* izole edilen hastane birimleri ayrı ayrı ele alınmıştır.

ESOGÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Onkoloji Servisindeki 24 duş musluğundan toplam 48 adet su ve sürüntü örneği alındı. Bunlardan 2'si su ve sürüntü örneğinde, 1'i sadece sürüntü örneğinde ve 3'ü sadece su örneğinde olmak üzere 6 musluktan alınan 8 adet su ve/veya sürüntü örneğinde *L.pneumophila* üretildi ve serogrup 2-14 olduğu saptandı.

ESOGÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Servisinden 7 duş musluğu ve 3 oda içi musluk olmak üzere 10 adet musluğa ait toplam 20 adet su ve sürüntü örneği alındı. Bunlardan 1 duş suyu, 1 musluk suyu ve 1 musluk sürüntüsünden olmak üzere toplam 3 musluktan alınan 3 adet su ve sürüntü örneğinde *L.pneumophila* üretildi ve serogrup 2-14 olduğu saptandı.

Pediyatri Yoğun Bakım ve Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitelerindeki birer musluktan alınan su ve sürüntü örneği ile Dahiliye Yoğun Bakım Ünitelerindeki 2 musluktan alınan su ve sürüntü örneği olmak üzere toplam 4 musluktan 8 adet su ve sürüntü örneği alındı. Pediyatri Yoğun Bakım Ünitesindeki 1 adet musluktan alınan hem su ve hem de sürüntü örneğinde *L.pneumophila* üretildi ve serogrup 2-14 olduğu saptandı.

Dahiliye Yoğun Bakım Ünitelerindeki muslukların bir tanesinden alınan sürüntü örneğinde *L.pneumophila* üretilip serogrup 2-14 olarak saptanırken, diğer bir musluktan alınan hem su ve hem de sürüntü örneğinde *L.pneumophila* serogrup 1 üretildi.

Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesindeki 1 adet musluktan alınan sürüntü örneğinde de *L.pneumophila* üretildi ve serogrup 1 olarak saptandı.

Göğüs Hastalıkları servisindeki 4 adet duş musluğu ve 6 adet oda içi musluktan hem su ve hem de sürüntü olmak üzere toplam 20 örnek alındı. Bunlardan 3 adet musluğun sürüntü örneğinde ve 1 adet musluğun su örneğinde olmak üzere toplam 4 musluktan izole edilen şüpheli koloniler *L.pneumophila* olarak tanımlandı ve serogrup 2-14 olarak belirlendi.

Dahiliye Servislerindeki 16 adet oda içi musluk ve 3 adet duş musluğundan hem su ve hem de sürüntü olmak üzere toplam 38 örnek alındı. Bunlardan 2 adet musluğun sürüntü örneğinde *Legionella pneumophila* üretildi ve serogrup 2-14 olduğu saptandı.

Pediyatri Süt Çocuğu ve Büyük Çocuk Servislerinden 10 adet oda içi musluk ve 6 adet duş musluğundan hem su ve hem de sürüntü örneği olmak üzere toplam 32 örnek alınmış olup, her iki servisten alınan birer adet oda içi musluğun sürüntü örneğinde ve 1 adet duş musluğunun sürüntü örneğinde olmak üzere toplam 3 örnekte *L.pneumophila* üretildi ve serogrup 2-14 olduğu saptandı.

Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında bulunan 4 adet musluktan hem su ve hem de sürüntü örneği olmak üzere toplam 8 örnek alındı. Bunlardan 1 adet musluğun hem su ve hem de sürüntü örneğinde *L.pneumophila* üretildi ve serogrup 1 olduğu saptandı.

Enfeksiyon Hastalıkları Servisinden alınan 1 adet musluğa ait hem su ve hem de sürüntü örneklerinde de *L.pneumophila* üretildi ve serogrup 2-14 olduğu saptandı.

Anestezi Yoğun Bakım, Genel Cerrahi Yoğun Bakım, Kardiyoloji Yoğun Bakım, Göğüs Cerrahisi Yoğun Bakım ve Yanık Birimindeki (tank) toplam 5 musluktan alınan hem su ve hem de sürüntü örnekleri olmak üzere 10 adet örnek ile Göğüs-Kalp Damar Cerrahisi Servisindeki 5 adet ve Ameliyathanedeki 2 adet musluktan alınan hem su ve hem de sürüntü örnekleri olmak üzere toplam 14 örnekte *Legionella* spp. üremedi.

Sonuç olarak 44'ü duş musluğu ve 56'sı oda içi musluk olan toplam 100 adet musluktan hem su ve hem de sürüntü olmak üzere toplam 200 örnek alınarak *Legionella* spp. varlığı yönünden incelendi. Bu 100 musluktan 11'inden alınan sürüntü örneğinde, 6'sından alınan su örneğinde ve 6'sından alınan su ve sürüntü örneklerinde olmak üzere toplam 23 (%23) musluğa ait 29 örnekte *Legionella* izole edildi. İzolatların hepsi BCYE ve MWY besiyerlerine ekim sonrası 3.günde izole edildiler.

*L.pneumophila* üretilen musluklar ve örnek cinsi Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. *L.pneumophila* üretilen musluklar ve örnek cinsi

	<i>L.pneumophila</i> üretilen örnek sayısı			
	Su	Sürüntü	Su ve Sürüntü	Toplam
Duş musluğu n=44	4	2	2	8
Oda içi musluk n=56	2	9	4	15
Toplam	6	11	6	23

*Legionella* üretilen örneklerin 12'si su, 17'si sürüntü örneğiydi. Örnek cinsine göre *L.pneumophila* izolasyonu değerlendirildiğinde; sürüntü örneklerinde *Legionella* daha fazla üredi ve istatistiksel olarak da önemli fark bulundu ( $p<0.01$ ).

Bu 29 *Legionella* izolatının 17(%58.6)'si immüdüşkün hastaların bulunduğu Onkoloji, Hematoloji, Dahiliye Yoğun Bakım, Pediatri Yoğun Bakım ve Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım gibi birimlerden alınan örneklerden üretildi (Bkz. Tablo 4.2).

Tablo 4.4'de su kaynaklı izole edilen *Legionella* türlerinin serogrup dağılımı gösterilmiştir. Su ve sürüntü örneklerinden izole edilen *L.pneumophila* bakterisinin *Legionella* lateks aglütinasyon yöntemi ile yapılan serogrup tayininde 29 *Legionella* izolatının 23'ünün *L.pneumophila* serogrup 2-14, 6'sının *L.pneumophila* serogrup 1 olduğu saptandı. *Legionella* üretilen

12 su örneğinin 9 (%75.0)'unda *L.pneumophila* serogrup 2-14, 3 (%25.0)'ünde *L.pneumophila* serogrup 1 izole edilirken, *Legionella* üretilen 17 sürüntü örneğinin 14 (%82.4)'ünde *L.pneumophila* serogrup 2-14 ve 3 (%17.6)'ünde *L.pneumophila* serogrup 1 izole edildi.

Tablo 4.4. Su kaynaklı izole edilen *Legionella* türlerinin serogrup dağılımı

<i>L.pneumophila</i> (+) Örnek cinsi ve sayısı	<i>L.pneumophila</i> serogrup 1 n (%)	<i>L.pneumophila</i> serogrup 2-14 n (%)
Su : 12	3 (25.0)	9 (75.0)
Sürüntü : 17	3 (17.6)	14 (82.4)
Toplam : 29	6 (20.7)	23 (79.3)

İzole edilen *Legionella* türlerinin serogrup dağılımı değerlendirildiğinde, *L.pneumophila* serogrup 1 ile *L.pneumophila* serogrup 2-14 üremesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

*L.pneumophila* izole edilen 12 su örneğinin 6'sında asitle muamele edilmeden direkt ekimde, 3'ünde asit uygulanması sonrası, ve 3'ünde ise hem asitle muamele öncesi direkt ekimde ve hem de asitle muamele sonrası izolasyon sağlandı. Su örneklerinde direkt ekimle *Legionella* daha fazla üremiş olup, direkt ekimle asitle muamele sonrası ekim arasında istatistiksel olarak da önemli fark bulundu ( $p<0.01$ ).

*L.pneumophila* izole edilen 17 sürüntü örneğinin 12'sinde asitle muamele sonrası, 4'ünde asitle muamele öncesi ve sonrası, 1'inde ise asitle muamele yapılmadan direkt ekimde izolasyon sağlandı. Sürüntü örneklerinde asitle muamele işlemi sonrası *Legionella* daha fazla üremiş olup, asitle muamele sonrası ekim ile direkt ekim arasında istatistiksel olarak da önemli fark bulundu ( $p<0.01$ ).

Tablo 4.5. Örneklerin asitle muamele işlemine göre *Legionella* üretilme durumları

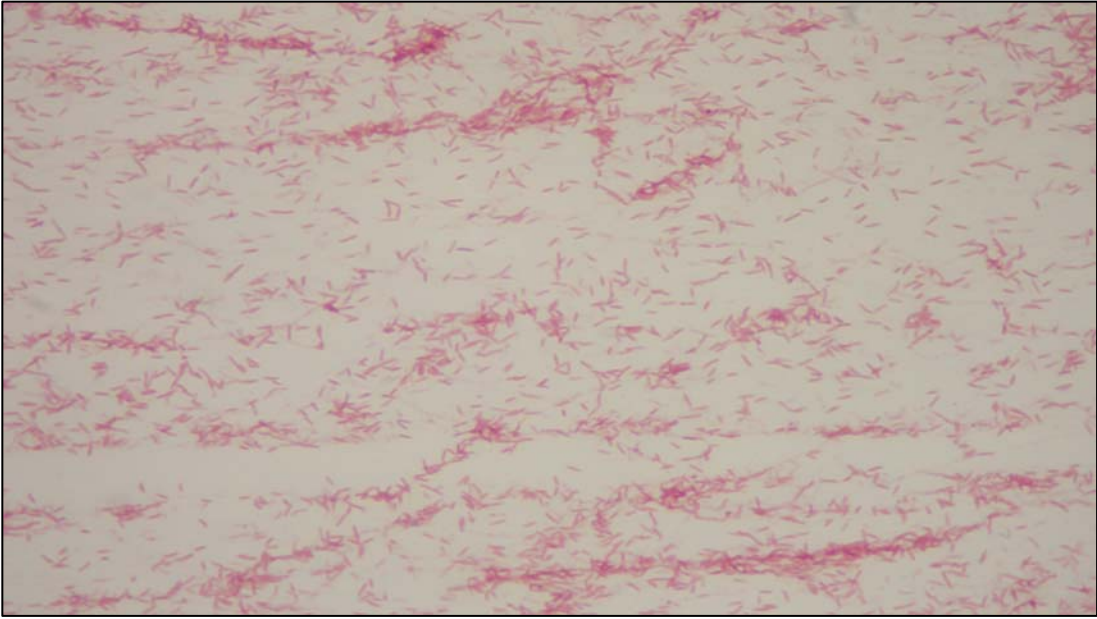
Örnek cinsi	<i>Legionella pneumophila</i> izole edilen suş sayısı (n)			
	Direkt ekimle üreyen n (%)	Asitle muamele ile üreyen n(%)	Hem direkt ekim hem de asitle muamele ile üreyen n (%)	Toplam
Su n=100	6 (50.0)	3 (25.0)	3 (25.0)	12
Sürüntü n=100	1 (5.9)	12 (70.6)	4 (23.5)	17
Toplam	7 (24.1)	15 (51.8)	7 (24.1)	29



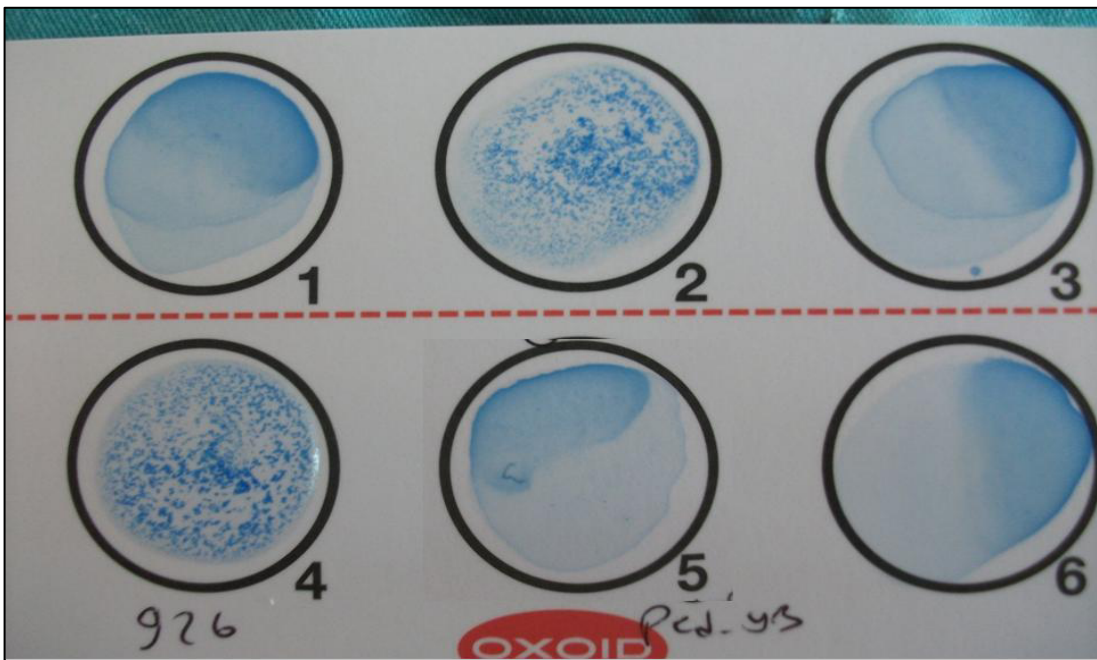
Şekil 4.1. BCYE besiyerinde üreyen *Legionella* cinsi bakterilerin kolonileri



Şekil 4.2. BCYE besiyerinde üreyen *Legionella* cinsi bakterilerin kolonileri



Şekil 4.3. Gram negatif çomaklar şeklindeki *Legionella* cinsi bakteriler



Şekil 4.4. Su örneklerinde üreyen *Legionella* cinsi bakterilere uygulanan Lateks Aglütinasyon testinin negatif ve pozitif sonuçları

\*(1) Negatif kontrol; (2) Pozitif kontrol; (3) *L.pneumophila* serogrup 1 reageni ile negatif reaksiyon; (4) *L.pneumophila* serogrup 2-14 reageni ile pozitif reaksiyon; (5) *Legionella spp.* reageni ile negatif reaksiyon; (6) Kontrol lateks



## 4.2. Hasta Bulguları

Çalışmamızda ayrıca, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine ve şehrimizdeki bazı hastanelerin Göğüs Hastalıkları ve Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine ya da Acil Servise başvurup, pnömoni tanısı ile izlenen 50 hastaya ait alt solunum yolu örnekleri, idrar ve kan örnekleri alınarak *Legionella* açısından incelendi.

Çalışmaya alınan hastaların 36'sı erkek, 14'ü kadın idi. Hastaların en küçüğü 20, en büyüğü 85 yaşında idi. Hastaların yaş ortalaması 53.04 olarak saptandı.

Çalışmaya alınan hastaların 41'inden balgam, 6'sından BAL örneği ve 3'ünden transtrakeal aspirat örneği alınarak, BCYE ve MWY besiyerlerinde kültürü yapıldı. Besiyerleri 14 gün boyunca *Legionella* kolonileri açısından değerlendirildi ve şüphelenilen kolonilerden kanlı agara kontrol pasaj yapıldı. Hastalardan alınan örneklerden yapılan kültürlerde *Legionella* spp. üremesi saptanmadı.

Hastaların hepsinden akut dönem kan örnekleri alınarak, EIA yöntemi ile *Legionella pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı total antikor (IgG/IgM/IgA) arandı. Toplam 50 hastanın 5'inde *Legionella pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı total antikor (IgG/IgM/IgA) pozitif bulundu. 2 hastada şüpheli pozitif bulundu. Test tekrar edildi ve aynı sonuca varıldı. Toplamda 5 (%10) hastada seropozitiflik saptandı.

Hastalardan ayrıca akut dönem idrar örnekleri alınarak EIA yöntemi ile *Legionella* idrar antijeni araştırıldı. *Legionella* idrar antijeni, 50 hastanın 1'inde pozitif bulundu. Bu hastada eş zamanlı alınan serum örneğinde total antikor da pozitif idi.

Pnömoni tanılı hastaların demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Pnömoni tanılı hastaların demografik özellikleri ve laboratuvar bulguları

Olgu	Cinsiyet	Yaş	İdrar Antijen Testi	Total Antikor Arama Testi	<i>Legionella</i> Kültürü
1	E	47	Negatif	Negatif	Negatif
2	E	72	<b>Pozitif</b>	<b>Pozitif</b>	Negatif
3	E	53	Negatif	Şüpheli Pozitif	Negatif
4	K	30	Negatif	Negatif	Negatif
5	K	66	Negatif	<b>Pozitif</b>	Negatif
6	K	84	Negatif	<b>Pozitif</b>	Negatif
7	K	39	Negatif	Negatif	Negatif
8	E	53	Negatif	Negatif	Negatif
9	E	67	Negatif	Negatif	Negatif
10	E	64	Negatif	Negatif	Negatif
11	K	35	Negatif	Negatif	Negatif
12	K	52	Negatif	Negatif	Negatif
13	E	66	Negatif	Negatif	Negatif
14	K	78	Negatif	Negatif	Negatif
15	E	56	Negatif	Negatif	Negatif
16	E	68	Negatif	Negatif	Negatif
17	E	46	Negatif	Negatif	Negatif
18	K	53	Negatif	<b>Pozitif</b>	Negatif
19	E	55	Negatif	Negatif	Negatif
20	E	55	Negatif	Negatif	Negatif
21	E	74	Negatif	Negatif	Negatif
22	E	75	Negatif	Negatif	Negatif
23	E	79	Negatif	Negatif	Negatif
24	K	22	Negatif	Negatif	Negatif
25	K	67	Negatif	Negatif	Negatif
26	E	75	Negatif	Negatif	Negatif
27	E	80	Negatif	Negatif	Negatif
28	E	55	Negatif	Negatif	Negatif
29	E	64	Negatif	Negatif	Negatif
30	E	64	Negatif	Negatif	Negatif
31	E	85	Negatif	Negatif	Negatif
32	K	37	Negatif	Negatif	Negatif
33	K	57	Negatif	Negatif	Negatif
34	E	20	Negatif	Negatif	Negatif
35	E	20	Negatif	Negatif	Negatif
36	E	20	Negatif	Negatif	Negatif
37	E	20	Negatif	Negatif	Negatif
38	E	21	Negatif	Negatif	Negatif
39	E	24	Negatif	Negatif	Negatif
40	E	21	Negatif	Negatif	Negatif
41	E	21	Negatif	Negatif	Negatif
42	E	76	Negatif	Negatif	Negatif
43	E	84	Negatif	Negatif	Negatif
44	E	34	Negatif	Negatif	Negatif
45	E	73	Negatif	<b>Pozitif</b>	Negatif
46	E	42	Negatif	Şüpheli pozitif	Negatif
47	K	67	Negatif	Negatif	Negatif
48	E	32	Negatif	Negatif	Negatif
49	E	21	Negatif	Negatif	Negatif
50	K	83	Negatif	Negatif	Negatif

Seropozitiflik saptanan 5 hastanın balgam örneklerinden yapılan kültürde *Legionella* üremesi saptanmadı. İdrar antijeni ve *Legionella* total antikoru pozitif olan 1 numaralı hastanın balgam örneğinden yapılan Gram boyamada orta miktarda yassı epitel, yoğun gram pozitif zincir yapmış kok, az miktar gram pozitif diplokok, orta miktar gram negatif kok ve az miktar soluk boyanan gram negatif kısa basil ve pleomorfik basiller görüldü. Örnek kaliteli balgam niteliğinde değildi ancak balgam değerlendirme kriterleri göz ardı edilerek, *Legionella* kültürü yapıldı ve üreme görülmedi. Rutin balgam kültüründe ise patojen bakteri üremesi olmadı. Klinik bulguları arasında ateş, öksürük ve dispne mevcuttu. Bir haftadır devam eden şikayetleri nedeniyle 1.kuşak sefalosporin grubu antibiyotik kullanmış ancak tedaviye yanıt alınamamıştı. Özgeçmişinde KKH (kronik kalp hastalığı) mevcuttu.

Seropozitiflik saptanan 2 numaralı hastanın yatışından 5 gün sonra alınan balgam örneğinden yapılan Gram boyamada, az miktar PMNL ve az miktar gram pozitif kok görüldü. Rutin kültüründe patojen bakteri üremedi. Bu hastanın klinik bulguları arasında ateş, dispne, öksürük, baş ağrısı, myalji, kusma ve ishal mevcuttu. Özgeçmişinde aktif sigara içiciliği ve KOAH (kronik obstrüktif akciğer hastalığı) mevcuttu.

Seropozitiflik saptanan 3 numaralı hastanın hastaneye yatışının 2. gününde alınan balgam örneğinden yapılan Gram boyamada az miktar gram pozitif zincir yapmış kok ve diplokok görüldü, örnek kaliteli balgam niteliğinde değildi. Yapılan rutin balgam kültüründe patojen bakteri üremedi. *Legionella* kültüründe de üremesi olmadı. Öyküsünde ateş, dispne, öksürük, myalji ve ishal mevcuttu. Özgeçmişinde aktif sigara içiciliği ve KOAH vardı. KOAH nedeniyle inhaler steroid kullanımı mevcuttu.

Seropozitiflik saptanan 4 numaralı hastanın balgam örneğinden yapılan Gram boyamada, orta miktarda PMNL görüldü, mikroorganizma görülmedi. Nonspesifik balgam kültüründe patojen bakteri üremedi ve *Legionella* kültüründe de üremesi olmadı. Öyküsünde ateş, dispne, miyalji ve kusma mevcuttu.

Seropozitiflik saptanan 5 numaralı hastanın balgam örneğinden yapılan Gram boyamada, orta miktarda PMNL ve orta miktar gram negatif

basil görüldü. Yapılan rutin balgam kültüründe yoğun *P.aeruginosa* ve az miktarda *Klebsiella* spp. üredi. *Legionella* kültüründe üreme olmadı. Bu hastanın klinik bulguları arasında ateş, dispne, öksürük, miyalji ve ishal mevcuttu. Özgeçmişinde KOAH ve inhaler kortikosteroid kullanımı vardı.

*Legionella* seropozitifliğine göre risk faktörlerinin karşılaştırılması Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. *Legionella* seropozitifliğine göre risk faktörlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	<i>Legionella</i> seropozitif n=5	<i>Legionella</i> seronegatif n=43	Toplam n=48	Karşılaştırma
Yaş ortalaması	69.60 ±5.066	51.37 ±3.375	53.27 ± 3.163	p=0.105
Cinsiyet Erkek Kadın	2 (40) 3 (60)	32 (74.4) 11 (25.6)	34 (70.8) 14 (29.2)	p=0.140
DM Var Yok	0 5 (100)	4 (9.3) 39 (90.7)	4 (8.3) 44 (91.7)	p=1.000
Kronik kalp hastalığı Var Yok	1 (20.0) 4 (80.0)	5 (11.6) 38 (88.4)	6 (12.5) 42 (87.5)	p=0.503
Kronik akciğer hastalığı Var Yok	3 (60.0) 2 (40.0)	14 (32.6) 29 (67.4)	17 (35.4) 31 (64.6)	p=0.331
Hematolojik malignensi Var Yok	0 5	0 43	0 48	-
Kortikosteroid kullanımı(sistemik) Var Yok	0 5 (100)	2 (4.7) 41 (95.3)	2 (4.2) 46 (95.8)	p=1.000
Organ Transplantasyonu Var Yok	0 5	0 43	0 48	-
Sigara öyküsü Var Yok	2 (40.0) 3 (60.0)	20 (46.5) 23 (53.5)	22 (45.8) 26 (54.2)	p=1.000

*Legionella* total antikor testi pozitif olan 5 hastanın 3'ü kadın, 2'si erkek idi ve yaş ortalamaları 69.6 bulundu. *Legionella* total antikor testi negatif olan 43 hastanın ise 32'si erkek, 11'i kadındı ve yaş ortalamaları 51.5 bulundu. *Legionella* antikor testi pozitif olan 5 hastanın 3'ünde KOAH ve 1'inde de kronik kalp hastalığı mevcuttu (Bkz Tablo 4.9). Hastaların 2'sinde sigara kullanma öyküsü vardı. *Legionella* antikoru negatif olan hastaların 4'ünde DM, 5'inde KKH, 14'ünde KOAH saptandı. Bu 43 hastanın 20'sinde sigara kullanma öyküsü vardı. Hastaların 2'sinde sistemik steroid kullanma öyküsü vardı. *Legionella* seropozitifliğine göre risk faktörleri karşılaştırıldığında, *Legionella* seropozitif hastalar ile seronegatif hastalar arasında istatistiksel olarak değerlendirilen risk faktörleri açısından anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

*Legionella* total antikoru pozitif olan 5 hastanın 3'ünde pnömoni bulgularına ishal eşlik etmekteydi. Hastaların 2'sinde kusma, 4'ünde myalji ve 1'inde baş ağrısı mevcuttu. *Legionella* seropozitif hastalarla, seronegatif hastalar arasında klinik bulgular açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

*Legionella* seropozitif hastaların klinik bulgularının dağılımı Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. *Legionella* seropozitif hastaların klinik bulgularının dağılımı

Hasta No	Klinik Bulgular							
	Ateş	Dispne	Öksürük	Myalji	Kusma	İshal	Baş ağrısı	Bilinç değişikliği
1	+	+	+	-	-	-	-	-
2	+	-	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-	+	-	-
4	+	+	-	+	+	-	-	-
5	+	+	+	+	-	+	-	-

*L.pneumophila* testlerinde pozitiflik saptanan hastaların test sonuçları ile risk faktörlerinin dağılımı Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. *L.pneumophila* testlerinde pozitiflik saptanan hastaların test sonuçları ile risk faktörlerinin dağılımı

Hasta No	Kültür		İdrar antijen	<i>Legionella</i> total antikor	Risk faktörü
	Örnek	<i>L.pneumophila</i> üremesi			
1	Balgam	-	+	+	*KKH(+) İleri yaş
2	Balgam	-	-	+	**KOA(+) Sigara(+) İleri yaş
3	Balgam	-	-	+	KOA(+) Sigara(+) İleri yaş
4	Balgam	-	-	+	İleri yaş
5	Balgam	-	-	+	KOA(+) İleri yaş

\*KKH (kronik kalp hastalığı), \*\*KOA (kronik obstrüktif akciğer hastalığı)

## 5.TARTIŞMA

*Legionella* bakterileri, tabiatta yaygın şekilde bulunan, insan yapımı su sistemlerine yerleşip, kontamine sularla insanlara bulaşan ve ağır pnömoniye yol açabilen etkenlerdir. *L.pneumophila*'nın su dağıtım sistemlerini kolonize etmesinin keşfinden sonra su dağıtım sistemleri mikroorganizmanın yayılımında primer kaynak olarak kabul edilmiştir (5). *Legionella* toplum kökenli pnömonin en sık görülen dört etkeninden (*Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella* spp.) biridir (8). Nozokomiyal pnömoni olgularının da %1-40'ında görülebilmektedir. Nozokomiyal pnömoninin insidansı *Legionella* kolonizasyonunun derecesine, immüdüşkün konak sayısına ve hastanedeki tanı yöntemlerinin kullanılabilirliğine bağlıdır. Sigara içiciliği, kronik akciğer hastalığı, kronik kalp hastalığı, ileri yaş ve immüdüşkünlük başlıca risk faktörleridir. Aşırı alkol alımı ve renal yetmezlik, hematolojik malignensiler, diyabet ve erkek cinsiyet de bazı çalışmalarda risk faktörleri arasında kaydedilmiştir (5). Yapılan çeşitli çalışmalarda kontamine hastane su dağıtım sistemleri ile nozokomiyal enfeksiyon olguları arasında epidemiyolojik bağlantı kurulmuştur (5). Hastanede yatan hastalarda *Legionella*'nın kaynağı çoğunlukla duş başlıkları ve banyoların sıcak su sistemleri ve soğutma kuleleri olmaktadır. Ayrıca nazogastrik tüpler, nemlendiriciler ve solunum yolu tedavi ekipmanları da daha az görülen diğer kaynaklardır (13).

Su kaynaklarından bakterinin izolasyon oranları her çalışmada değişiklik göstermektedir. Seçilen binaların özelliği, su sisteminin yapısı, coğrafi faktörler, mevsimsel faktörler, kontrol önlemlerinin kullanımı ve seçilen kültür yöntemlerinin farklılığı gibi birçok faktör izolasyon oranlarında farklılık yaratmaktadır (86).

Çevresel örneklerde *Legionella* spp. izolasyonunda standart bir yöntem bulunmamaktadır. Literatürde *Legionella* spp. kültüründe, izolasyon için maksimum duyarlılığa sahip yöntemin tesbiti amacıyla yapılmış çalışmalar bulunmaktadır.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ; Musluk ve duş başlıklarından hem su hem de sürüntü örneklerinin birlikte alınmasını önermektedir. Öncelikle de sürüntü örneğinin alınmasını sonra su örneğinin alınarak 15 dakika asitle muamele edildikten sonra örneklerin BCYE, GPAV ve PAV besiyerlerine ekilmesini tavsiye etmektedir (69).

The Hygiene Institute ise, sadece su örneği alınmasını ve örneklerin 15 dakika asit ile muamele edildikten sonra BCYE ve GVPC besiyerlerine ekilmesini önermektedir. CDC ve HI'un her ikisinin protokollerinde de örneklerin konsantrasyonu için filtrasyon yöntemi kullanılmaktadır (69).

Veterans Affairs Medical Center (VAMC) ise, tek başına sürüntü örneğinin alınmasını yeterli bulmakta ancak su örneği de alınacak olursa santrifügasyonla konsantrasyon önermektedir. Örnekler 3 dakika asit işlemi ile dekontamine edilip, BCYE ve DGVP besiyerlerine ekilmektedir (69).

Halk sağlığı açısından en güvenilir 3 kuruluşun yöntemlerinin de farklılık gösterdiği görülmektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Nakipoğlu ve ark. (87) İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesindeki 20 farklı bölümden 70'i duş başlığı sürüntüsü ve su örneği, 30'u depo suyu olmak üzere 100 adet su ve sürüntü örneği alıp, Köksal ve ark. (88) ise İstanbul'da 3 eğitim hastanesindeki 13 depo ve 48 musluktan toplam 61 su örneği alıp *Legionella* cinsi bakteri varlığı yönünden araştırmıştır. Erdoğan ve ark.(89) Alanyada'ki 52 otelden 491 adet su ve sürüntü örneği alıp, örneklerde *Legionella* cinsi bakteri varlığını araştırmışlardır. Ta ve ark.(69) yaptığı çalışmada Pittsburgh'daki 7 hastanedeki 33 musluktan su ve sürüntü örnekleri alınmış, Reinthaler ve ark.'nın (90) yaptığı çalışmada da 21 hastanenin musluklarından 210 su örneği alınarak *Legionella pneumophila* yönünden incelenmiştir. Leoni ve ark. (91) 32'si hastane, 59'u özel binalar ve 46'sı otellerden olmak üzere 137 sıcak su örneğinde *Legionella* spp. prevalansını araştırmışlardır. Borella ve ark. (92) yaptıkları çok merkezli çalışmada 146 su örneğinde, Zacheus ve ark. (93) ise Finlandiya'daki 67 apartman binasının duş ve musluklarından aldıkları sıcak su örneklerinde *Legionella* varlığını incelemişlerdir. Yong ve ark. (94) yaptığı çalışmada ise 11 soğutma kulesinden 20 su örneği alınarak



*Legionella* kültürü yapılmıştır. Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Eskişehir'deki bazı hastanelerin çeşitli bölümlerinde bulunan 100 adet musluktan hem su ve hem de sürüntü örneği alınıp, *Legionella* cinsi bakteri varlığı yönünden incelenmiştir. Çalışmamızda *Legionella* izolasyonu için incelediğimiz örnek sayısı yeterli olup, yurt içi ve yurt dışında yapılan *Legionella* prevalans çalışmalarındaki örnek sayıları ile uyumludur. Yapılan çalışmaların çoğunda musluklardan su ve/veya sürüntü örneği alınarak *Legionella* spp. araştırılmıştır. Çalışmamızda incelediğimiz örneklerin kaynağı ve tipi de literatürdeki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Literatürde su ve sürüntü örneklerinden *Legionella* spp. kültüründe farklı konsantrasyon ve dekontaminasyon yöntemleri ile selektif besiyerlerinin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Nakipoğlu ve ark. (87) su ve sürüntü örneklerini filtrasyonla konsantre edip, asitle muamele etmeden direkt olarak ve asitle muamele sonrası BCYE, GVPC, BMPA ve MWY besiyerlerine ekmiş ve asitle dekontaminasyon işleminin uygulanmasını ve besiyeri olarak da BCYE ile birlikte MWY besiyerinin kullanılmasını önermişlerdir. Köksal ve ark.(88) 61 su örneğini filtrasyon yöntemi ile konsantre edip, asitle muamele etmeden ve asitle muamele sonrası BCYE, MWY ve BMPA besiyerlerine ekmişlerdir. Erdoğan ve ark.'nın (89) otel sularında *Legionella* prevalansını araştırdıkları çalışmada, su örnekleri filtrasyon yöntemi ile konsantre edilip, ısı ile muamele yoluyla dekontamine edildikten sonra BCYE ve GVPC besiyerlerine ekilmiştir. Yurt dışında Ta ve ark.(69) sürüntü örneklerini direkt ve 3 ile 15 dakika asitle muamele ederek, su örneklerini ise işlem yapılmadan direkt, filtrasyon ya da santrifügasyon sonrası direkt ve konsantrasyon sonrası 3 ile 15 dk asitle muamele ederek ekmiş ve su örneklerinden filtrasyonla konsantrasyonun, santrifügasyon yöntemine göre daha başarılı olduğunu, su ve sürüntü örneklerinin 3 dakika asitle muamelesinin *Legionella* spp.'nin izolasyonunu arttırdığını ve glisin içeren selektif besiyerlerinden birinin kullanılmasının *Legionella* dışı mikroorganizmaların üremesini minimale indirdiğini göstermişlerdir.

Reinthal ve ark.'nın (90) yaptığı çalışmada da su örnekleri filtrasyonla konsantrasyondan sonra direkt olarak, ısı ile ve asit ile muamele edilip, MWY, BMPAα ve bir kısmı ayrıca GVPC besiyerine ekilmiş olup izolasyonda kullanılan besiyerleri arasında anlamlı fark bulunmamış ancak konsantre edilen örneklerin asitle muamele edilmesinin ve GVPC besiyerinin kullanılmasının mikrobiyal florayı azaltmada en etkili olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda alınan su örnekleri, santrifügasyon yöntemiyle yoğunlaştırılmış, asitle muamele edilmeden direkt olarak ve 3 dakika asit ile muamele edildikten sonra BCYE ve MWY besiyerlerine ekilmiştir. Sürüntü örnekleri de asitle muamele edilmeden direkt olarak ve 3 dakika asitle muamele edildikten sonra BCYE ve MWY besiyerlerine ekilmiştir. *Legionella* türleri izole edilen 17 sürüntü örneğinin 12'sinde direkt ekimde *Legionella* izole edilememiş olup, asitle muamele sonrası izolasyon sağlanmıştır. Sürüntü örneklerinde direkt ekimde yoğun mikroflora bulunması nedeniyle izolasyon sağlanamadığı düşünülmüştür. Çalışmamız sonucunda asitle muamelenin, sürüntü örneklerinde *Legionella* izolasyonunu arttırdığı istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ).

Su örneklerinde ise direkt ekimle izolasyon şansımızın daha yüksek olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Direkt ekimle *Legionella* spp. izole edilen 12 su örneğinin 6'sında asitle muamele sonrası izolasyon sağlanamamış olup, asitle dekontaminasyon işlemi sırasında suda az sayıda varolan bakteri sayısının azaldığı ve besiyerinde üremediği düşünülmüştür. Bu çalışmada ayrıca su örneklerinde *Legionella* izolasyonunda santrifügasyonla konsantrasyon yöntemi yerine filtrasyon yönteminin kullanılmasının da başarı şansını arttırabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda MWY besiyeri *Legionella* izolasyonunda yeterli bulunmuş olmakla birlikte, izolasyon başarısının değerlendirilmesinde diğer selektif besiyerlerinin kullanıldığı karşılaştırmalı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

Literatürde Ta ve ark.'nın (69) yaptığı çalışmada *Legionella* spp. kültüründe, sürüntü örnekleme su örneklemeinden daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir. Bartie ve ark.'nın (70) yaptığı çalışmada da *Legionella*

spp.'nin izolasyonunda VAMC'in sürüntü örnekleme yönteminin, su örnekleme yöntemlerinden daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda sürüntü örneklemesinin *Legionella* izolasyonunda su örneklemesine göre daha başarılı olduğu saptanmış ve istatiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p<0.01$ ). *Legionella* izolasyonunda sürüntü örneklemesinin başarısının, biyofilm tabakasına adhere olan *Legionella* sayısının suda bulunduğundan daha fazla olması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.

Yurt içi ve yurt dışında yapılan çalışmalarda su sistemlerinden *Legionella* spp. izolasyon oranları %6-100 arasında değişmektedir. Ülkemizde Nakipoğlu ve ark.'nın (87) İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde yaptıkları çalışmada alınan 100 örneğin 5'inde, Köksal ve ark.'nın (88) yaptığı çalışmada toplam 61 su örneğinin 4'ünde, Erdoğan ve ark.'nın (89) Alanya'daki otel su dağıtım sistemlerindeki *Legionella* spp. prevalansını araştırdıkları çalışmada alınan 491 örneğin 93'ünde (%18.9) *Legionella* spp. saptanmıştır. Ta ve ark.'nın (69) yaptığı çalışmada 33 örneğin tümünde (%100) *Legionella* izole edilmiştir. Reinthaler ve ark.'nın (90) yaptığı çalışmada 210 su örneğinin 72'sinde (%34), Borella ve ark.'nın (92), sıcak su sistemlerinde *Legionella* ve *Pseudomonas* kontaminasyonunu araştırdıkları çalışmada 146 su örneğinin 56'sında (%38.4), Zacheus ve ark.'nın (93) yaptıkları çalışmada sıcak su sistemlerinin %30'unda *Legionella pneumophila* izole edilirken, Leoni ve ark.'nın (91) bina su sistemlerinde yaptıkları çalışmada ise izolasyon oranları %40 bulunmuştur. Rivera ve ark.'nın (95) yaptıkları çalışmada, 2341 su örneğinin 373 (%15.9)'ünde *Legionella* spp. izole edilmiştir.

Çalışmamızda örnek aldığımız 100 musluktan hem su ve hem de sürüntü örnekleri alınmış olup, 100 su örneğininin 12'sinde ve 100 sürüntü örneğinin 17'sinde olmak üzere toplam 23 musluktan 29 *Legionella* cinsi bakteri izole edilmiştir. *Legionella* izolasyon oranımız %23 bulunmuştur.

İzole edilen *Legionella* spp.'nin tür ve serogrup dağılımına bakıldığında; ülkemizde Nakipoğlu ve ark. (87) duş başlığı sürüntüsü ve duştan alınan su örneklerinin 3'ünde dört ayrı *Legionella* türü (*L.jordanis*, *L.feeleii*, *L.micdadei*, *Legionella* spp.) ve su depolarından alınan örneklerin

ikisinde de *L.jordanis* ve *Legionella* spp. izole etmiştir. Köksal ve ark.'nın (88) yaptığı çalışmada izole edilen 4 suşun 3'ünün *Legionella pneumophila*, 1'inin *Legionella* spp. olduğu bildirilmiştir. Erdoğan ve ark.'nın (89) yaptığı çalışmada izole edilen türlerin %63.5'i *Legionella pneumophila* serogrup 6 ve %21.5'i serogrup 1 olarak bulunmuştur. Zacheus ve ark.'nın (93) 67 binanın sıcak su sistemlerinde *Legionella* varlığını araştırdıkları çalışmada; bu sistemlerin %30'unda *Legionella pneumophila* izole edilmiştir. Yong ve ark.'nın (94) Malezya'da su soğutma kulelerindeki *Legionella* spp.'nin dağılımını araştırdıkları çalışmada 28 *Legionella* izolatının %35.7'si *L.pneumophila* serogrup 1, %39'u *L.pneumophila* serogrup 2-14 bulunmuştur. Rivera ve ark.'nın (95) hastane su sistemlerinde *Legionella* spp. varlığını araştırdığı çalışmada izolatların 384'ünün *Legionella* spp. ; 317'si (%82.5) *L.pneumophila* (169'u serogrup 1 ve 148'i diğer serogruplar), 67'sinin diğer *Legionella* türleri olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda 100 musluğun 23'ünde toplam 29 *L.pneumophila* izole edilmiştir. *L.pneumophila* serogrup 1 izolasyonu ile serogrup 2-14 izolasyonu arasında İstatiksel olarak anlamlı fark bulunmamış ( $p>0.05$ ) olmakla birlikte toplam 23 musluğun 20'sinde *L.pneumophila* serogrup 2-14, 3'ünde *L.pneumophila* serogrup 1 izole edilmiştir. *L.pneumophila* serogrup 2-14 izolat sayısının fazla olmasının göz ardı edilmemesi ve Lejyoner hastalığı olgularının varlığında özellikle *L.pneumophila* serogrup 2-14 izole edilen birimlerde tanı testlerinin kombine kullanılmasının gerekliliği düşünülmüştür.

Tür ve serogrup düzeyinde identifikasyonda; Nakipoğlu ve ark. (87) lateks aglütinasyon yöntemi ve fenotipik özellikleri değerlendirerek identifikasyon yapmıştır. Köksal ve ark.'nın (88) yaptığı çalışmada identifikasyonda lam aglütinasyon ve DFA yöntemleri kullanılmıştır. Erdoğan ve ark.'nın (89) çalışmasında da lateks aglütinasyon testi uygulanarak identifikasyon yapılmıştır. Yurt dışından Rivera ve ark.'nın (95) yaptığı çalışmada da şüpheli koloniler lateks aglütinasyon yöntemi ile tanıya edilmiştir. Yong ve ark. (94) yaptıkları çalışmada lateks aglütinasyon ve PCR yöntemlerini kullanarak *Legionella* izolatlarını tanıya etmişlerdir.

Çalışmamızda yurt içi ve yurt dışında yapılan çalışmalara benzer şekilde şüpheli kolonilere lateks aglütinasyon testi uygulanmış ve tür ve serogrup düzeyinde identifikasyon yapılmıştır.

Çalışmamızda ayrıca, pnömoni tanısı ile izlenen 50 hastada, pnömoni etiolojisinde *Legionella* varlığı araştırılmıştır. Hastalara ait alt solunum yolu örneklerinden *Legionella* cinsi bakteriler açısından kültür yapılmış, idrarda antijen testi ile *L.pneumophila* antijeni araştırılmış ve serumlarında *L.pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı total antikor (IgG/IgM/IgA) bakılmıştır.

Hastalarımızın hiçbirinde alt solunum yolu örneklerinin kültüründe *Legionella* üretilmemiştir. İdrarda *L.pneumophila* antijen testi, 50 hastadan 1 tanesinde pozitif bulunmuştur. Bu hasta dahil 5 (%10) hastanın serumunda *L.pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı özgül antikor varlığı gösterilmiştir. İdrarında *L.pneumophila* antijeni varlığı gösterilen ve aynı zamanda serumunda total antikoru pozitif olan hastamızın; gerek klinik özellikleri gerekse alt solunum örneğinin direkt mikroskopik inceleme bulgularının da uyumlu olması nedeniyle, Lejyoner Hastalığı olgusu olduğu kabul edilmiştir.

*Legionella* enfeksiyonlarının tanısında kültür pozitifliği altın standart olarak kabul edilmekle birlikte literatürdeki pek çok çalışmada, *Legionella* izolasyonunun zor ve zahmetli olduğu ve rutin laboratuvarlarda pozitif kültür yüzdesinin çok düşük olduğu bilinmektedir (34,35). Referans laboratuvarlarda yapılan retrospektif çalışmalarda bile, Lejyoner hastalığı tanısında kültürün duyarlılığı %11-65 olarak hesaplanmıştır (31). Ayrıca kültür sonuçlarının hastalığın şiddeti ile de ilişkili olduğu ve orta şiddette pnömonide pozitif kültür sonuçlarının oranı düşük iken (%15-25), ciddi pnömonilerde bu oranın anlamlı yüksek olduğu (>%90) gösterilmiştir (4). Çalışmamızda su kaynaklı örneklerden çok sayıda *Legionella* izole etmiş olmamıza karşın, pnömoni tanısıyla izlenen 50 hastamızın hiçbirinde kültür pozitifliğinin elde edilememiş olması, bu bakterinin kültürde üretilme zorluğunun yansıması olmuştur. Ayrıca bakterinin müşkülpesent olmasının yanı sıra, örnek kalitesinin istenilen düzeyde alınamamış olması (veya hastanın verememiş olması), tekrar örnek alma şansının olmaması, örneğin transportunda yaşanabilecek

olumsuzluklar, hastaların bazılarının antimikrobik tedavi almış olması gibi durumların izolasyon şansımızı etkilediği söylenebilir.

Ülkemizde Babaoğlu ve ark.'nın (96) atipik pnömonili 83 olguda yaptığı çalışmada Lejyonelloz saptanan 11 (%13.2) hastanın 9'unda kültür yöntemi kullanılmış ve bunlardan sadece 1'inde alt solunum yolu kültüründe *Legionella* saptanmıştır. Javed ve ark.'nın (97), toplum kökenli pnömonilerde *Legionella* spp. varlığını araştırdığı çalışmada toplam 113 hastanın 31'i (27.43) seropozitif bulunurken, hastaların hiçbirinde solunum yolu örneklerinin kültüründe üreme saptanmamıştır. Nazarian ve ark.'nın (98) 64 alt solunum yolu örneğinde yaptıkları çalışmada, PCR ile *Legionella* pozitif bulunan 15 örneğin sadece 2'sinde kültür yöntemi ile pozitiflik saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda, mevcut idrar antijen testlerinin çoğunun, *L.pneumophila* serogrup 1'in Pontiac (Mab 2+) monoklonal antikör tipini saptamada oldukça duyarlı (>%90) iken *L.pneumophila* serogrup 1'in diğer monoklonal antikör tiplerini saptamada duyarlılığının daha düşük (%60) olduğu bulunmuştur. Aynı idrar antijen testlerinin, *L.pneumophila*'nın diğer serogrupları ile diğer *Legionella* türlerinin saptanmasında da duyarlılıklarının çok düşük (%5) olduğu gösterilmiştir (41,42). Bu nedenle idrar antijen testlerindeki negatif sonuçların *Legionella* enfeksiyonunu ekarte ettirmeyeceği kabul edilmektedir (37,43).

Çalışmamızda *Legionella* seropozitifliği saptanan 5 pnömoni olgusundan sadece birinde idrarda *Legionella* antijeninin pozitif bulunması ve diğer 4 tanesinde idrar antijeninin negatif bulunmasının nedeni testin bu özelliğinden kaynaklanıyor olabilir ve bu nedenle de bu 4 hasta için *Legionella* enfeksiyonunu ekarte ettirmediği düşünülmüştür. Literatürde Babaoğlu ve ark.'nın (96) yaptığı çalışmada da lejyonelloz saptanan 11 hastanın sadece birinde *Legionella* idrar antijeni pozitif bulunmuştur. Javed ve ark.'nın (97) yaptığı çalışmada toplam 113 pnömonili hastanın 31'i seropozitif bulunurken, %17.69'unda antijenüri saptanmıştır. Antijenüri saptanan 2 hastada anti-*Legionella* IgM antiköründe pozitif bulunduğu için doğrulanmış *Legionella* enfeksiyonu olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, sigara içiciliği, kronik akciğer hastalığı, kronik kalp hastalığı, ileri yaş ve immüdüskünlük Lejyoner hastalığı için başlıca risk faktörleri arasında sayılmaktadır (8). Aşırı alkol alımı ve renal yetmezlik, hematolojik malignansiler, diyabet ve erkek cinsiyet de bazı çalışmalarda risk faktörleri arasında kaydedilmiştir. Organ nakli alıcılarındaki nosokomiyal enfeksiyonlarda, cerrahi en önemli hazırlayıcı faktördür (5). Yurt içinde Babaoğlu ve ark.'nın (96) yaptığı çalışmada lejyonelloz saptanan 11 hastanın 6'sında böbrek transplantasyonu, 1'inde kronik böbrek yetmezliği, 1'inde tüberküloz, 1'inde kortikosteroid kullanımı ve 1'inde de sigara kullanma öyküsü olmak üzere 10'unda risk faktörleri saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da *Legionella* seropozitif olan 5 hastanın 5'inde de Lejyoner hastalığının risk faktörleri mevcut idi. Hastaların 3'ünde KOAH, 1'inde kronik kalp hastalığı ve 2'sinde de sigara kullanma öyküsü bulunmuştur ancak *Lejyonella* seropozitif hastalar ile seronegatif hastalar arasında risk faktörleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Hastaların yaş ortalaması 69.6 olup bu sonucun Lejyoner hastalığının risk faktörleri arasında sayılan ileri yaş açısından anlamlı olabileceği düşünülmüş ancak *Lejyonella* seropozitif hastalarla, seronegatif hastalar arasında yaş açısından anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Literatürde araştırmacılar organ transplant alıcıları ve immün düşük hastalarda çevresel kaynakların *Legionella* enfeksiyonu salgınlarına neden olabileceği konusunda dikkatli olunması gerektiğini belirtmişlerdir.

Sabria ve ark.'nın (99) Catalonia'da (İspanya) yaptıkları 5 yıllık prospektif çalışmada, toplam 20 hastaneden 196 su örneği alınmış, 73'ünde (%37.2) *Legionella* izole edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca nozokomiyal Lejyoner hastalığı olgularının da izlemi yapılmış ve su kültürünün pozitif olduğu 11 hastanede idrar antijen testi ile nozokomiyal lejyonelloz olguları saptanmıştır. Su kültürünün negatif olduğu hastanelerde ise olgu görülmemiştir.

Engelhart ve ark. (100) 75 yaşındaki malign melanom ameliyatı geçirmiş bir hastada hastane kökenli *Lejyonella* enfeksiyonu saptamışlardır. Bu hastada kültür yöntemi ile BAL sıvısında *L.pneumophila* serogrup 1 izole

edilmiştir. Hastanın kronik sigara içicisi olduğu belirlenmiştir. Soğutma kulesi su örneklemede saptanan 3 izolat monoklonal antikör ve genotipleme yöntemleriyle tiplendirilmiş ve bunlardan birisi hastanın izolatıyla uyumlu bulunmuştur.

Knirsch ve ark.'nın (101) yaptığı çalışmada ise pnömoni tanısı ile izlenen 38 renal transplant ve kardiyak transplant hastasından 12'sinde kültür veya serolojik testlerle *Legionella micdadei* saptanmıştır. Sıcak su kaynağından izole edilen *L. micdadei* izolatları ile kültür pozitif 3 hasta ve 16 ay sonra görülen 2 hastanın izolatlarının DNA bant paterni, PFGE yöntemi ile benzer bulunmuştur.

Çalışmamızda su ve sürüntü örnekleri alınan 23 musluktan 20'sinde *L.pneumophila* serogrup 2-14, 3'ünde ise *L.pneumophila* serogrup 1 izole edilmiştir. Literatürde kültür yöntemi ile ya da idrar antijen testi ile doğrulanmış olguların %79'undan *L.pneumophila*'nın sorumlu olduğu gösterilmekle birlikte *Legionella* türlerinin yaklaşık yarısı insan hastalıkları ile ilişkili bulunmuştur. *L.pneumophila* serogrup 1, 4 ve 6 hastalık etkeni olarak daha sık izole edilmektedir (5,8). Daha az yaygın *Legionella* suşlarının sebep olduğu enfeksiyonlar ise tanıdaki eksiklikler ve nadir görülmeleri nedeniyle daha az rapor edilmektedir ancak bu suşların immüdüşkün hastalarda sorun olduğu düşünülmektedir (1). Çalışmamızda izole edilen 29 *Legionella* izolatının 17'si immüdüşkün hastaların bulunduğu Onkoloji, Hematoloji, Dahiliye Yoğun Bakım, Pediatri Yoğun Bakım, Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitelerinden izole edilmiştir. Bu bölümlerde yatan hastaların bu izolatları aerosol yoluyla alma ve Lejyoner hastalığı bulaşma olasılığı göz ardı edilmemelidir.

Sonuç olarak, *Legionella* enfeksiyonlarının, tahmin edilenden daha sık görülen ancak tanısı sıklıkla atlanan enfeksiyonlar olduğu söylenebilir. Tanı ve tedavide geç kalınması prognozu etkileyen en önemli faktörlerdir. Lejyoner hastalığı tanısında tek bir tanı yöntemi kullanılmasının yeterli olmayacağı, yöntemlerin duyarlılığı ya da özgüllüğündeki sorunlar nedeniyle birden fazla yöntem –test baterisi- kullanılarak hastalık kesin tanısının yakalanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *Legionella* tür ve serogruplarının dağılımına uygun,



duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek tanı testlerinin geliştirilmesine ve daha fazla çalışma yapılmasına gereksinim vardır.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Su Kaynaklı Sonuçlar

Çalışmamızda; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Eskişehir'deki bazı hastanelerin 18 farklı biriminde bulunan 44'ü duş musluğu ve 56'sı oda içi musluk olmak üzere toplam 100 adet musluktan hem su ve hem de sürüntü örneği olmak üzere toplam 200 örnek alınmış ve bu örneklerde *Legionella* cinsi bakteri varlığı araştırılmıştır. 200 örnekten direkt ve asitle muamele sonrası olmak üzere 400 inokülasyon yapılmıştır.

1°. Çalışmamızda hem su ve hem de sürüntü örneği alınan 100 adet musluktan 23'ünde (%23) 29 *Legionella* spp. izolatu üretilmiştir.

2°. Alınan 100 su örneğinin 12'sinde ve 100 sürüntü örneğinin 17'sinde *Legionella* spp. izole edilmiştir. Sürüntü örneklerinde *Legionella* daha fazla üremiş olup, istatistiksel olarak da önemli fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ).

3°. *L.pneumophila* izole edilen 12 su örneğinin 6'sında asitle muamele edilmeden direkt ekimde, 3'ünde asit uygulanması sonrası, ve 3'ünde ise hem asitle muamele öncesi direkt ekimde ve hem de asitle muamele sonrası izolasyon sağlandı. Özetle 12 su örneğinden 9'unda direkt ekimle *Legionella* üremiş olup, direkt ekimle asitle muamele sonrası ekim arasında istatistiksel olarak da önemli fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ).

4°. *L.pneumophila* izole edilen 17 sürüntü örneğinin 1'inde asitle muamele yapılmadan direkt ekimde, 12'sinde asitle muamele sonrası, 4'ünde ise hem asitle muamele öncesi ve hem de asitle muamele sonrası izolasyon sağlandı. Özetle 17 sürüntü örneğinden 16'sında asitle muamele işlemi sonrası *Legionella* üremiş olup, asitle muamele sonrası ekim ile direkt ekim arasında istatistiksel olarak da önemli fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ).

5°. Su ve sürüntü örneklerinden izole edilen *L.pneumophila* bakterisinin *Legionella* lateks aglütinasyon yöntemi ile yapılan serogrup tayininde 29 *Legionella* izolatının 23'ünün *L.pneumophila* serogrup 2-14, 6'sının *L.pneumophila* serogrup 1 olduğu saptanmıştır.

6°. *Legionella* üretilen 12 su örneğinin 9 (%75.0)'unda *L.pneumophila* serogrup 2-14, 3 (%25.0)'ünde *L.pneumophila* serogrup 1 izole edilirken, *Legionella* üretilen 17 sürüntü örneğinin 14 (%82.4)'ünde *L.pneumophila*

serogrup 2-14 ve 3 (%17.6)'ünde *L.pneumophila* serogrup 1 izole edilmiştir. *L.pneumophila* serogrup 1 ile *L.pneumophila* serogrup 2-14 üremesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

7°. Toplam 29 izolatin 17 (%58.6)'si Lejyoner hastalığı için riskli immün düşkün hastaların yattığı servis ve yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiştir.

## 6.2. Hasta Sonuçları

Çalışmamızda ayrıca pnömoni tanısı ile izlenen 50 hastada, pnömoni etiolojisinde *Legionella* varlığı araştırılmıştır. Hastalara ait alt solunum yolu örneklerinden *Legionella* cinsi bakteriler açısından kültür yapılmış, idrarda antijen testi ile *L.pneumophila* antijeni araştırılmış ve serumlarında *L.pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı total antikor (IgG/IgM/IgA) bakılmıştır.

1°. Hastalarımızın hiçbirinde alt solunum yolu örneklerinin kültüründe *Legionella* üretilmemiştir.

2°. İdrarda *L.pneumophila* antijen testi, 50 hastadan 1 tanesinde pozitif bulunmuştur. Bu hasta dahil 5 (%10) hastanın serumunda *L.pneumophila* serogrup 1-6'ya karşı özgül antikor varlığı gösterilmiştir.

3°. İdrarında *L.pneumophila* antijeni varlığı gösterilen ve aynı zamanda serumunda total antikoru pozitif olan hastamızın; gerek klinik özellikleri gerekse alt solunum örneğinin direkt mikroskopik inceleme bulgularının da uyumlu olması nedeniyle, Lejyoner Hastalığı olgusu olduğu kabul edilmiştir.

4°. *Legionella* seropozitif olan 5 hastanın tümünde Lejyoner hastalığının risk faktörleri saptanmıştır. Hastaların 3'ünde KOAH, 1'inde kronik kalp hastalığı ve 2'sinde de sigara kullanma öyküsü bulunmuştur. Bu 5 hastanın yaş ortalaması 69.6 olup, Lejyoner hastalığının risk faktörleri arasında bulunan ileri yaş ile uyumlu bulunmuştur.

5°. *Legionella* seropozitif hastalar ile seronegatif hastalar arasında değerlendirilen risk faktörleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

6°. *Legionella* seropozitif hastalarla, seronegatif hastalar arasında klinik bulgular açısından da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

### 6.3. Öneriler

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Eskişehir'deki bazı hastanelerin çeşitli bölümlerinde bulunan 100 adet musluktan alınan 200 adet su ve sürüntü örneği ile pnömoni tanısıyla izlenen 50 hastaya ait alt solunum yolu örnekleri, idrar ve serum örneklerinin incelenmesi ile bulunan sonuçlar doğrultusundaki önerilerimiz aşağıda maddeler halinde yer almaktadır.

1°. *Legionella* için su örneklerinin rutin kültürünün yapılması İmmüdüşkün hastaların bulunduğu üniteler için önerilmektedir ancak diğer ünitelerde olgu olmadıkça önerilmez.

2°. İmmüdüşkün hastaların bulunduğu bölümlerde kullanım suyunda *Legionella* saptandığında su kaynağının dekontamine edilmesi gerekmektedir.

3°. Su kaynağı dekontamine edilene kadar, güvenilir su kaynağı olmadığı immüdüşkün hastaların steril su kullanması önerilmektedir.

4°. Hastanelerde *Legionella* için su örnekleme yapılırken, musluklardan sürüntü örneklerinin de alınması izolasyon şansını arttıracaktır.

5°. Su örneklerinde *Legionella* izolasyonu için filtrasyonla konsantrasyon ve sonrasında asitle muamele edilmeden doğrudan ekim yapılması izolasyon oranını arttırmada faydalı olacaktır. Sürüntü örneklerinde ise su örneklerinin tersine asitle muamele işlemi, *Legionella* izolasyonunu arttıran iyi bir yöntemdir ve kullanılması önerilir.

6°. *Legionella*, sanıldığı aksine pnömoni etiolojisinde önemli oranda etkindir. Bu nedenle özellikle risk faktörlerinin varlığında pnömoni etiolojisinde *Legionella* mutlaka araştırılmalıdır.

7°. Lejyoner hastalığı tanısında halen mevcut tanı testlerinin duyarlılığı ya da özgüllüğündeki sorunlar nedeniyle tek bir yöntem yerine, birden fazla yöntemin birlikte kullanılması tanı şansını arttıracaktır.

8°. *Legionella* tür ve serogruplarının dağılımına uygun, duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek tanı testlerinin geliştirilmesine ve daha fazla çalışma yapılmasına gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

1. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Mikrobiol Rev 2002; 15(3): 506-526.
2. Benson RF, Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. Semin Respir Infect 1998; 13: 90-9.
3. Edelstein PH. *Legionella*. In: Murray PR. (ed). Pınar A. (çev.ed). Klinik Mikrobiyoloji. 9. baskı. Cilt 1. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti. 2009; 53: 835-849.
4. Diederer BMW. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. Journal of Infection 2008; 56: 1-12.
5. Yu VL. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds). Principles and Practise of Infectious Diseases. 5th ed. US: Churchill Livingstone; 2000: 2424-2435.
6. Mülazimoğlu L. *Legionella* (Lejyoner Hastalığı). In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. 1667-1670.
7. Bell M. *Legionella*. In: Wilson WR, Sande MA. (eds). Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease. International ed. Lange Medical Books. Mc Graw-Hill Inc. 2001; 58: 614-619.
8. Eberly BJ, Whelen AC. *Legionella*. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. (eds). Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier 2007: 485-493.
9. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med 1977; 297: 1197-203.

10. Stout JE, Rihs JD, Yu VL. *Legionella*. In: Murray PR. (ed). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Pres; 2003: 809-823.
11. Dowlig JN, Saha AK, Glew RH. Virulence factors of the family *Legionellaceae*. Microbiol Rev 1992; 56: 32-60.
12. Stout JE, Yu VL. Nosocomial *Legionella* Infection. In: Mayhall CG. (ed). Hospital Epidemiology and Infection Control. 3rd ed. US: Williams and Wilkins; 2004: 603-621.
13. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop G, Schreckenberger PC, Woods G. (eds). *Legionella*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott; 2006: 549-565.
14. Zumsan T, Yenushalmi G, Segal G. Functional similarities between the icm/dot pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *L. pneumophila* . Infect Immun 2003; 71: 3714-3723.
15. Jantzen E, Sonesson A, Tangen T. Hydroxy-fatty acid profiles of *Legionella* species: Diagnostic usefulness assessed by principal component analysis. J Clin Mikrobiol 1993; 31:1413-9.
16. Rogers J, Dowsett A.B, Dennis P.J, Lee J.V, Keew C.W. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl. Environ. Microbiol 1994; 60: 1585-1592
17. Whoo AH, Goetz A, Yu VL. Transmission of *Legionella* by respiratory equipment aerosol generating devices. Chest 1992; 102: 1586-90.
18. Yu VL. Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella*? Am J Med 1993; 95:13-5.
19. Brabender W, Hinthorn DR, Asher M. *Legionella pneumophila* wound infection. JAMA 1993; 250: 3091-5.

20. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. (eds). Medical Microbiology. 4th ed. US: Mosby, Inc; 2002; 35: 325-329.
21. Mc Nally C, Hackman B, Fields BS, Plouffe JF. Potential importance of *Legionella* species as etiologies in community-acquired pneumonia (CAP). *Diagn. Microbiol. Infect.* 2000; 38: 79-82.
22. Helbig JH, Bernander S, Castellani P, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay P, Lück PC, Mergues T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG. Pan-European study on culture proven Legionnaires' disease: Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 21: 710-716
23. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Cheresky A. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J. Infect. Dis.* 2002; 186: 127-128.
24. Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Verdenesch F, Etienne J, Jarraud S. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 458-460.
25. Borchardt J, Helbig JH, Lück PC. Epidemiological subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany. Abstract RFP03, Annual Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology, Würzburg. 2006.
26. Harrison TG, Doshi N, Fry NK, Joseph CA. Isolates of *Legionella pneumophila* obtained in UK over 19 years. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13: 78-85.
27. Forbes AB, Sahm DF, Weissfeld AS. (eds). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 12th ed. US: Mosby, Inc; 2007; 37: 424-429.

28. Erdem B. *Legionella*. In: Ustaçelebi Ş. (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 559-566.
29. Ebright JR, Tarakji E, Brown WJ. Multiple bilateral lung cavities caused by *L. pneumophila*: A case report and review of the literature. Infect Dis Clin Pract 1993; 2: 195-9.
30. Pasculle A.W. (ed). *Legionella* Cultures In: Isenberg HD. (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. section 3. Washington DC: ASM Pres; 2004
31. Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, Lloyd RV, Cockerill FR. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of a lightcycler per, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection and culture. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 2618-2626.
32. Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires Disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2004; 23: 871-878.
33. Lindsay DS, Abraham WH, Findley 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.
34. Blazquez RM, Espinosa FJ, Martinez- Toldos CM, Alemany L, Garca-Orenes MC, Segovia M. Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large outbreak of *Legionella* pneumonia in Spain. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2005; 24: 488-491.
35. Lück PC, Von Baum H, Helbig JH, Marre R. The usefulness of microbiological diagnostic methods for the detection of *Legionella* infections in Legionella-State of the art 30 years of its recognition. Cianciotto NP, Abukwaik Y, Edelstein PH, Fields BS, Geary DF, Harrison TG, Joseph CA, Ratcliff RM, Stout JE, Swanson MS ( eds). Washington DC: ASM Press. 2006: 15-21.



36. Edelstein PH. Detection of selected fastidious bacteria. Clin. Infect. Dis. 2000; 31: 846.
37. Başustaoğlu AC. (çev ed). Tıbbi Mikrobiyoloji. 6th ed. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic.Ltd. Şti. 2010; 37: 365-369.
38. Joseph JA. European Working Group for *Legionella* infections. Legionnaires' disease in Europe 2000-2002. Epidemiol Infect 2004; 132: 417-424.
39. Formica N, Yates M, Beers M, Carnie J, Hogg G, Ryan N. The impact of diagnosis by *Legionella* urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of Legionnaires' disease. Epidemiol Infect 2001; 127: 275-280.
40. Burnsed LJ, Hicks LA, Smithee LM, Fields BS, Bradley KK, Pascoe N, Richards SM, Mallonee S, Littrell L, Benson RF, Moore MR. A large travel-associated outbreak of legionellosis among hotel guests: utility of the urine antigen assay in confirming Pontiac fever. Clin. Infect. Dis. 2007; 44: 222-228.
41. Harrison T, Uldum S, Alexiou-Daniel S, Bangsberg J, Bernander S, Drasbrevear V. A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. Clin Microbiol Infect. 1998; 4: 359-365.
42. Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L. Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires' disease. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 41: 199-203.
43. Lück PC. Diagnostic and clinical Disease treatment. In: Heuner K, Swanson M. (Eds). *Legionella: Molecular Microbiology*. Caster Academic Press, UK; 2008: 19-34.
44. Yzerman EP, DenBore JW, Lerringa KD, Schellekans J, Dankert J, Peeters M. Sensitivity of three urinary antigen test associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 3232-3236.

45. Guerrero C, Toldos CM, Yague G, Ramirez C, Rordiguez T, Segovia M. Comparison of diagnostic sensitivities of three assays for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 467-468.
46. Horn J. Binax and Biotest *Legionella* urinary antigen kits. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 1682.
47. Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, Lück PC, Wewalka G, Abraham B. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial Legionnaires' disease. J Clin Microbiol. 2003; 41: 838-840.
48. Sopena N, Sabri M, Pedro-Boyer ML, Reynoga E, Garca-Nez M, Dominguez J, Matas L. Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with Legionnaires' disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2002; 21: 845-848.
49. Koide M, Higa F, Tateyama M, Sakugawa H, Saito A. Comparison of polymerase chain reaction and two urinary antigen detection kits for detecting *Legionella* in clinical samples. Eur.J.Clin. Microbiol.Infect. Dis. 2004; 23: 221-223.
50. Dominguez JA, Gali N, Pedroso P, Forgas A, Padilla E, Monterola JM, Matas L. Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen EIA with Biotest *Legionella* urinary antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2718-2722.
51. Helbig JH, Uldum SA, Lück PC, Harrison TG. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* urinary EIA and Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. J.Med. Microbiol. 2001; 50: 509-516.

52. Leland DS, Kohler RB. Evaluation of the L-CLONE *Legionella pneumophila* serogroup 1 urine antigen latex test. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2220-2223.
53. Diederer BM, Peeters MF. Evaluation of two new immunochromatographic assays for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. J Clin Microbiol. 2006; 44: 2991-2993.
54. Diederer BM, Peeters MF. Evaluation of the SAS *Legionella* test, a new immunochromatographic assay for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. J Clin Microbiol Inf. 2007; 13: 86-88.
55. 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: 3060-3063.
56. Boshuizen HC, Den Boer JW, De Melker H, Schellekens JF, Peeters MF, van Vilier JA, Conyn-Van Spaendonck MA. Reference values for the SERION classic ELISA for detecting *Legionella pneumophila* antibodies. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2003; 22: 706-708.
57. Rojas A, Navarro MD, Forns FE, Serra E, SimarroE, Rojas J, Ruiz J. Value of serological testing for diagnosis of legionellosis in outbreak patients. J.Clin. Microbiol. 2005; 43: 4022-4025.
58. Plouffe JF, File TM, Breiman RF, Hackman BA, Salstrom SJ, Marston BJ, Fields BS. Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease : use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group. Clin. Infect. Dis. 1995; 20:1286-1291.
59. Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin Infect Dis. 2003; 36: 64-69.

60. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR,. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1709-1712.
61. Templeton KE, Scheltinga SA, Sillekens P, Crielaard JW, van Dam AP, Goossens H. Development and clinical evaluation of an internally controlled single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4016-4021.
62. Reischl U, Linde HJ, Lehn N, Landt O, Borratt K, Wellinghausen N. Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by Dual-Color Real-time PCR and melting curve analysis. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3814-3817.
63. Helbig JH, Engelstadter T, Maiwald M, Uldum SA, Witzleb W, Lück PC. Diagnostic relevance of the detection of *Legionella* DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. Eur.J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1999; 18: 716-722.
64. Matsiota-Bernard B, Waser S, Vrioni G. Detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. Clin. Microbiol. Infect. 2000; 6: 223-225.
65. Diederens BM, de Jong CM, Marmouk F, Kluytmans JA, 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.
66. Diederens BM, Bruin JP, den Boer JW, Peeters MF, Yzerman EP. Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity. J Med Microbiol. 2007; 56: 1255.
67. Herpers B, de Jong BM, van der Zwaluw K, van Hannen EJ. Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4815-4816.

68. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1560-1567.
69. Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. J Clin Microbiol 1995; 33 (8): 2118-2123.
70. Bartie C, Venter SN, Nel LH. Identification methods for *Legionella* from environmental samples. Wat Res 2003; 37: 1362-1370.
71. Jonas D, Engels I, Friedhoff C, Spitzmueller B, Daschner FD, Frank U. Efficacy of moxifloxacin, trovafloxacin, clinafloxacin and levofloxacin against intracellular *Legionella pneumophila*. J. Antimicrob. Chemother. 2001; 47: 147-152.
72. Helbig JH, Benson RF, Pelaz C, Jacobs E, Lück PC. Identification and serotyping of atypical *Legionella pneumophila* strains isolated from human and environmental sources. J. Appl. Microbiol. 2007; 102: 100-105.
73. Fry NK, Bangsberg JM, Bergnans A, Bernander S, Etienne J, Jonas D, Lindsey D, Mentula S et al. EWGLI Amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. Microbiol. Infect. Dis. 1997; 21: 722-728.
74. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 2005; 43: 2047-2052.
75. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for

- typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol. 2007; 45: 1965-1968.
76. Roig J, Rello J. Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 1119-1129.
77. Jonas D, Engels I, Hartung D, Beyersmann J, Frank U, Daschner FD. Development and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 51: 275-280.
78. Plouffe JF, Breiman RF, Fields BS, Herbert M, Inverso J, Schwartz DB. Azithromycin in the treatment of *Legionella pneumophila* requiring hospitalization. Clin. Infect. Dis. 2003; 37: 1475-1480.
79. Mykietiuik A, Carratal J, Fernandez-Sab N, Dorca J, Verdaguer R, Monresa F, Gudiol F. Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella* pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. Clin. Infect. Dis. 2005; 40:794-799.
80. Sabria M, Pedro-Borer ML, Gomez J, Roig J, Vilaseca B, Sopena N, Banos V. and for the Legionnaires' disease Therapy Group. Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires' disease. Chest. 2005; 128: 1401-1405.
81. Tablon OC, Anderson LJ, Beser R, Bridges C, Hajjeh R. Guidelines for preventing health-care associated pneumonia 2003: Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. MMWR Recomm Rep 2004; 53: 1-36.
82. Kool JL. Control of *Legionella* in drinking water systems: impact of monochloramine. In: Marre R (ed) et al. Legionella. Washington, DC: ASM Press 2002: 411-418.
83. RSHMB Bakteriyoloji ve Mikoloji Laboratuvarı/ Ulusal *Legionella* Referans Laboratuvarı BCYE Besiyeri Hazırlanması ve *Legionella* su örnekleri inceleme Talimatı.

84. Miller JM. (ed) Culture of hospital water for *Legionellaceae*. In: Isenberg HD. (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Section 13. Washington DC; ASM Press; 2004.
85. Türk standartı (Su kalitesi- *Legionella*'nın Tesbiti ve Sayımı). 1.baskı. 1999; Ankara.
86. Afacan G, Yumuk Z, Baskın Y, Balıkçı E. Turistik bölgelerden alınan su örneklerinde *Legionella pneumophila* serogrup 2-14 sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2006; 34: 214-218.
87. Nakipoğlu Y, Gürler B. İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde kullanılan sularda *Legionella* cinsi bakterilerin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 1999; 30: 97-104.
88. Köksal F, Oğuzkurt N, Samastı M. İstanbulda üç eğitim hastanesinin depo ve musluk sularında *Legionella* bakterilerinin araştırılması. Klimik Derg. 2002; 15 (1): 16-18.
89. Erdoğan H, Arslan H. Colonization of *Legionella* species in hotel water systems in Turkey. J Travel Med 2007; 14 (6): 369-373.
90. Reinthaler FF, Sattler j, Dullnig KS, Weinmayr B, Marth E. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. J Clin Mikrobiol 1993; 31 (5): 1213-1216.
91. Leoni E, De Luca G, Legnani PP, Sacchetti R, Stampi S, Zanetti F. *Legionella* water line colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. J Apply Microbiol 2005; 98: 373-379.
92. Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, Neglia R, Marchesi I, Fantuzzi G, Tato D, Napoli C, Quaranta G, Laurenti P, Leoni E, De LucA g, Ossi C, Moro M, Ribera D'alcala G. *Legionella* infection risk from domestic hot water. Emerg Infect Dis 2004; 10 (3): 457-464.

93. Zacheus OM, Martikainen PJ. Occurrence of *Legionella* in hot water distribution systems of Finnish apartment buildings. *Can J Microbiol* 1994; 40 (12): 993-999.
94. Yong SF, Goh FN, Ngeow YF. *Legionella* species and serogroups in Malaysian water cooling towers. Identification by latex agglutination and PCR-DNA sequencing of isolates. *J Water Health* 2010; 8 (1):92-100.
95. Rivera JM, Aguilar L, Granizo JJ, Vos-Arenilla A, Gimenez MJ, Aguiar JM, Prieto J. Isolation of *Legionella* species/serogroups from water cooling systems compared with potable water systems in Spanish healthcare facilities. *Journal of Hospital Infection*. 2007; 67: 360-366.
96. Babaoğlu G, Aydın D, Arseven O, Berkiten R. Atipik pnömoni olgularında *L.pneumophila*'nın direkt ve indirekt mikrobiyolojik yöntemlerle araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33: 35-38.
97. Javed S, Chaudhry R, Passi K, Shama S KP, Dhawan B, Dey AB. Serodiagnosis of *Legionella* infection in community acquired pneumonia. *Indian J Med Res* 2010; 131: 92-6.
98. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylor A, Limberger J, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008; 62 (2): 125-132.
99. Sabria M, Modol JM, Garcia-Nunez M, Reynaga E, Pedro-Botet ML, Sopena N, Rey-Joly C. Environmental cultures and hospital acquired Legionnaires' disease: A 5 year prospective study in 20 hospitals in Catalonia, Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004; 25: 1072-1076.
100. Engelhart S, Pleischl S, Lück C, Marklein G, Fischnaller E, Martin S, Simon A, Exner M. Hospital acquired Legionellosis originating from a cooling tower during a period of thermal inversion. *Int J Hyg Environ Health*. 2008; 211 (3-4): 235-240.
101. Knirsch CA, Jakob K, Schoonmaker D, Kiehlbauch JA, Della-Latta P, Whittier S, Layton M, Scully B. An outbreak of *Legionella micdadei*



pneumonia in transplant patients. Evaluation, molecular epidemiology and control. *Am J Med* 2000; 108 (4): 290-5.

