



KÜTAHYA'DA BULUNAN DOĞAL ORTAM SULARINDAN *LEGİONELLA* spp.
İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Özlem Saniye BAYRAKTAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz – 2017

KÜTAHYA'DA BULUNAN DOĞAL ORTAM SULARINDAN *LEGIONELLA* spp.
İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Özlem Saniye BAYRAKTAR

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Temmuz - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Özlem Saniye BAYRAKTAR'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “KÜTAHYA'DA BULUNAN DOĞAL ORTAM SULARINDAN *LEGİONELLA* spp. İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

21/07/2017

Üye: Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK (Danışman)

Üye: Doç. Dr. Tuba İÇA

Üye: Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının %15 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Özlem Saniye BAYRAKTAR

KÜTAHYA'DA BULUNAN DOĞAL ORTAM SULARINDAN *LEGIONELLA* spp. İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Özlem Saniye BAYRAKTAR

Biyoloji, Yüksek Lisans Tezi, 2017

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

ÖZET

Çalışmada, Kütahya ilinde bulunan doğal ortam sularından toplam 150 adet su örneği (2016 yılı Haziran –Eylül aylarında) toplanmıştır. Su örnekleri filtrasyon işleminden geçirildikten sonra BYCE besiyerine filtreler yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır. Ardından şüpheli kolonilere Lateks aglütinasyon test kiti uygulanmıştır. Elde edilen 8 *Legionella* izolatının 6 tanesinin serogrubu 2-15, 2 tanesinin ise *Legionella* spp. olarak bulunmuştur. İzolatların, ağır metal dirençlilik testleri, antibiyotik dirençlilikleri ve sekonder metabolit üretme yetenekleri araştırılmıştır. İzole edilen *Legionella* bakterilerinin sekonder metabolit üretme yetenekleri Gram pozitif (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis* ve *S. aureus*), Gram negatif (*E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *A. hydrophila*), mayalardan (*S. cerevisiae* ve *S. baulardii*) kullanılarak agar blok yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatların genel olarak sekonder metabolit üretiminin olmadığı ya da çok zayıf olduğu tespit edilmiştir. *E. coli* ATCC 25922 suşu ağır metal ve antibiyotik dirençlilik testinde referans suş olarak kullanılmıştır. Yapılan ağır metal toleranslılık (MİK) deneyinde, ağır metallere karşı en yüksek MİK değeri referans suş ile kıyaslandığında; %100 kurşun ve krom, %12.5 nikel, çinko, kobalt ve bakır ağır metale karşı dirençli olduğu saptanmıştır. İzolatların demir ve kadmiyum ağır metale karşı herhangi bir dirence sahip olmadığı saptanmıştır. Antibiyotik dirençlilik testleri disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Antibiyotik dirençlilik deneyinde 3 farklı sıcaklık (27°C, 37°C ve 40°C) kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotikler Ampisilin, İmipenem, Sefotaksim, Amikasin, Kanamisin, Tetrasiklin, Eritromisin, Ofloksasin, Sulbaktam, Gentamisin, Doksisiklin, Siprofloksasin ve Levofloksasin'dir. Deneyler sonucunda disk difüzyon yöntemine göre en yüksek antibiyotik dirençliliğinin sefotaksime antibiyotiğine karşı olduğu belirlenmiştir. Doksisiklin, Siprofloksasin ve Levofloksasin antibiyotikleri kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile *Legionella* izolatlarının Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. İzolatların hepsinin denenilen üç antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ağır metal, antibiyotik dirençliliği, *Legionella* spp.

**THE ISOLATION AND DETERMINATION OF SOME PROPERTIES OF
LEGIONELLA spp. FROM NATURALLY FOUND ENVIRONMENTAL WATERS IN
KÜTAHYA**

Özlem Saniye BAYRAKTAR

Biology, M.S.Thesis, 2017

Thesis Supervisor: Asst. Prof. Ferdağ ÇOLAK

SUMMARY

In this study, a total of 150 water samples (from June to September 2016) were collected from the naturally exist environmental waters in the province of Kütahya. After the water samples were passed through the filtration process, filters were placed on the BYCE medium and incubation was allowed in the experimental protocol line. Latex agglutination test kit was then applied to the suspected colonies. Six of the 8 *Legionella* isolates were found to be serogroup 2-15, and 2 of them were *Legionella* spp.. Isolates have been investigated for their heavy metal resistance tests, antibiotic resistance and secondary metabolite production ability. The ability of the isolated *Legionella* bacteria to produce the secondary metabolite is determined by usage of Gram positive (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis* and *S. aureus*), Gram negative (*E. aerogenes*, *E. aeruginosa*, *E. coli* and *A. hydrophila*) and yeasts (*S. cerevisiae* and *S. baulardii*) by executing agar block method. *E. coli* ATCC 25922 strain were used as reference strains in heavy metal and antibiotic resistance tests. When compared with the highest MIC value reference strain against heavy metals in the heavy metal tolerance (MIC) assay performed, the 100% resistance against lead and chromium, 12.5% against nickel, zinc, cobalt and copper heavy metals were detected. The isolates were found to have no resistance to iron and cadmium heavy metals. Antibiotic resistance tests were performed by disk diffusion and microdilution methods. Three different temperatures (27°C, 37°C and 40°C) were used in the antibiotic resistance experiment. The antibiotics used were Ampicillin, Imipenem, Cefotaxime, Amikacin, Kanamycin, Tetracycline, Erythromycin, Ofloxacin, Sulbactam, Gentamycin, Doxycycline, Ciprofloxacin and Levofloxacin. As a result of the experiments, it was determined that the highest antibiotic resistance by disk diffusion method was against cefotaxime antibiotic. Minimal Inhibition Concentrations (MIC) of *Legionella* isolates were determined by microdilution method using doxycycline, ciprofloxacin and levofloxacin antibiotics. All of the isolates were determined to be susceptible to three antibiotics tested.

Key words: Heavy metal, antibiotic resistance, *Legionella* spp.

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, tez konumun seçiminde ve yapım aşamasında her türlü desteği bana sağlayan ve her konuda sonsuz sabır gösteren sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Deneyisel çalışmalarımda bana yardımcı olan Yüksek Lisans Öğrencileri ve arkadaşlarım Nilay GÖREN, Eda BOZKURT'a ve Biyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteği gösteren sevgili aileme ne kadar teşekkür etsem azdır. Her zaman beni destekleyen ve moral veren, annem Havva BAYRAKTAR'a ve kardeşim Soydan MERİÇ'e teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Tarihçe	1
1.2. Sınıflandırma	1
1.3. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	2
1.4. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri	3
1.5. Antijenik Yapı.....	4
1.6. Epidemiyoloji.....	5
1.6.1. <i>Legionella</i> ekolojisi.....	5
1.6.1.1. <i>Legionella</i> türlerinin doğada yayılımı	7
1.7. Patogenez	7
1.8. Klinik Belirtiler ve Bulgular	8
1.9. Mikrobiyolojik Tanı	10
1.9.1. <i>Legionella</i> cinsi bakteri izolasyon yöntemleri	10
1.9.1.1. Kültür	10
1.9.1.2. <i>Legionella</i> besiyerleri.....	11
1.9.1.3. Kültür sonuçlarının değerlendirilmesi.....	12
1.9.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	12
1.10. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Tür Tanısı ve Serogruplandırılması	12
1.10.1. Direkt floresan antikor (DFA) deneyi	13
1.10.2. Lateks aglütinasyon deneyi	13
1.11. Tedavi.....	13
1.12. Koruma ve Kontrol	14
1.13. Su Sistemlerinin Dezenfeksiyonu	14
1.13.1. Fiziksel yöntem	15
1.13.1.1. Membran filtrasyon.....	15
1.13.1.2. Termal yöntem	15
1.13.1.3. Ultraviyole ışınları	15

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.13.2. Kimyasal yöntem	16
1.13.2.1. İyonizasyon	16
1.13.2.2. Okside edici ajanlar	16
1.13.2.3. Oksitlemeyen ajanlar	17
1.14. Ağır Metal	19
1.14.1. Ağır metaller	19
1.14.2. Ağır metallerin önemi	19
1.14.3. Ağır metal ve antibiyotik dirençlilik mekanizmaları	20
1.15. Antimikrobiyal Aktivite	21
1.15.1. Siprofloksasin ve levofloksasinin etki ve direnç mekanizması	21
1.15.2. Doksisiklinin etki ve direnç mekanizması	22
1.16. Çalışmanın Amacı	22
2. MATERYAL VE METOD	24
2.1. Materyal	24
2.1.1. Biyolojik materyaller	24
2.1.1.1. Sekonder metabolit aktivite belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar	24
2.1.2. Kimyasal materyaller	25
2.1.2.1. Ağır metal toleranslık testinde kullanılan ağır metaller	25
2.1.2.2. Kullanılan antibiyotikler	25
2.1.3. Besiyerleri	26
2.1.4. Çözültüler ve nötralize edici maddeler	29
2.1.5. Boyalar	32
2.2. Metod	33
2.2.1. Su örneklerinin alınması	33
2.2.2. <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin izolasyonu	33
2.2.2.1. <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin izolasyon basamakları	33
2.2.3. <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin tür ve serogrup düzeyinde tanımlanması	36
2.2.3.1. Lateks aglütinasyon deneyi	36
2.2.4. <i>Legionella</i> cinsi bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi	38
2.2.4.1. Hareketlilik testi	38
2.2.4.2. Katalaz testi	38
2.2.4.3. Sitrat testi	39
2.2.4.4. İndol testi	39
2.2.4.5. Jelatinaz testi	40

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.4.6. Karbonhidrat fermentasyon testi	40
2.2.4.7. <i>Legionella</i> cinsi izolatlarının sekonder metabolit üretimi	41
2.2.4.8. Ağır metal toleranslılık düzeylerinin belirlenmesi	41
2.2.4.9. Antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi	42
3. BULGULAR	46
3.1. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin İzolasyonu	46
3.2. Antijenik Özelliklerinin Belirlenmesi	46
3.3. <i>Legionella</i> Suşlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	47
3.4. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerinin Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri	47
3.5. Sekonder Metabolit Üretimi	49
3.6. Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri	52
3.7. Minimum İnhibitör Konsantrasyonun (MİK) Belirlenmesi	60
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAK DİZİNİ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Legionella</i> bakterilerinin sıcaklığa duyarlılığı.	4
1.2. <i>Legionella</i> Enfeksiyonları ve Sınıflandırmaları	10
2.1. Üçlü manifold sistemi	34
2.2. BCYE agarda <i>Legionella</i> bakterilerinin üreme özelliği.	35
2.3. Şüpheli <i>Legionella</i> cinsi kolonilerinin kanlı agar ve nutrient agar üreme özelliği.....	35
2.4. Lateks aglütinasyon testi <i>Legionella</i> spp. pozitif sonuç.....	38
2.5. Katalaz testi pozitif sonuç.	39
2.6. Sitrat testi Pozitif, Negatif sonuç.	39
2.7. İndol testi negatif, pozitif sonuç.....	40
2.8. <i>Legionella</i> . izolatlarının sekonder metabolit üretimi	41
2.9. Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotiklerin dirençliliklerinin belirlenmesi.	43
2.10. Diskdifüzyon yöntemi ile toz antibiyotiklerin dirençliliklerinin belirlenmesi.	43
2.11. Mikrodilüsyon yöntemi ile Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun belirlenmesi.....	44
2.12. Damlatma yöntemi ile Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu belirlenmesi.	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Legionella</i> türleri ve serogrup sayıları	2
1.2. <i>Legionella</i> kontrolünde kullanılan metotların avantaj ve dezavantajları	18
2.1. Sekonder metabolit üretiminin belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar.	24
2.2. <i>Legionella</i> tür ve serogrup düzeyinde belirlenmesinde kullanılan Lateks Aglütinasyon test kitinin içindekiler.....	37
3.1. İzole edilen <i>Legionella</i> 'ların serogrupları	46
3.2. <i>Legionella</i> suşlarının biyokimyasal test sonuçları.	47
3.3. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922'un ağır metal dirençlilik düzeyi (mM/mL).	48
3.4. İzolatların ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri (mM/mL).	48
3.5. İzolatların ağır metal toleranslılıklarının %'lik dağılımı.....	49
3.6. <i>Legionella</i> izolatlarının oluşturduğu sekonder metabolitlerin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi	51
3.7. NCCLS rehberinde <i>Escherichia coli</i> bakterisi için belirtilen zon çapları yorumlama standartları.	52
3.8. İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı üç farklı sıcaklıkta gösterdikleri inhibisyon zon çapları.	54
3.9. 27°C'de izolatlarının antibiyotik yüzde dirençlilik sonuçları.	58
3.10. 37°C'de izolatlarının yüzdelik antibiyotik dirençlilik sonuçları.	59
3.11. 40°C'de izolatlarının yüzdelik antibiyotik dirençlilik sonuçları.	60
3.12. CLSI göre antibiyotiklerin dirençli, orta duyarlı ve duyarlı değerleri	60
3.13. 27°C'de izolatların test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri MİK ve MBK sonuçları (µg/mL).....	61
3.14. 37°C'de izolatların test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri MİK ve MBK sonuçları (µg/mL).....	62
3.15. 40°C izolatların test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri MİK ve MBK sonuçları (µg/mL)	63
3.16. İzolatlarının antibiyotik dirençlilik sonuçları.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
°C	santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ACES	(N-(2-acelamido)-2-aminoethanesulfonic acid)
AS	Australian Standart
ATCC	American Type Culture Collection
BCYE	Buffered charcoal yeast extract agar (Tamponlanmış kömür ve maya özlü agar)
BCYE-α	α-ketoglutaratlı tamponlanmış kömür ve maya özlü agar
BMPA agar	Selektif katkılı (sefamandol, polimiksin B, anisomisin) BCYE-α besiyeri
CDC	Centers for Disease Control
DFA	Direkt floresan antikor
DGVP	Dye-Glycine-Vancomycin-Polymyxin B
dk	dakika
DNA	Deoksiribo Nukleik Asit
FISH	Fluorescent In Situ Hibridization,
g	gram
GVPC agar	Selektif katkılı (glisin, vankomisin, polimiksin B, sikloheksimid) BCYE-α Besiyeri
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCL	Hidroklorik Asit
ISO	The International Standart Method
kDa	Kilodalton
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
MCMP	Major stoplazma membran proteini
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
Mip	Macrophage infectivity potentiator
mL	mililitre

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MWY agar	Selektif katkılı (glisin, vankomisin, polimiksin B, anisomisin) BCYE- α besiyeri
NaCl	Sodyum Klorür
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanometre
O₃	Ozon
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
pH	hidrojen gücü
rRNA	ribozomal ribonükleik asit
TTC	Triphenytetrazolium klorür
UV	Ultra viole ışınları
VAMC	Veterans Affairs Medical Center
VBNC	Canlı fakat kültürde üremeyen bakteri hücresi formu
WHO	Dünya Sağlık örgütü (World Health Organisation)

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Tarihçe

Legionella bakterisi ilk kez 1976 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Philadelphia şehrinde Bellevue-Statford otelde toplanan Amerikan lejyonerleri arasında gelişen pnömoni salgını sonrasında fark edilmiş, 147 kişiden 34'nün ölümü ile sonuçlanmıştır. Bu pnömoni salgınına atfen hastalığa Lejyoner Hastalığı, salgına neden olan bakteri cinsine *Legionella* adı verilmiştir. Bakterinin akciğerlerde enfeksiyona neden olmasından ötürü de *Legionella pneumophila* adı verilmiştir. Pontiac ateşi adlandırması ise hastalığın ilk olarak, ABD'nin Michigan eyaletinin Pontiac kasabasında tanımlanmasındandır (Bilim Lab., 2015). Geriye dönük çalışmalar yapıldığında *L. pneumophila* ile bilinen ilk epideminin 1965 yılında Washington'da bir psikiyatri hastanesinde saptandığını ortaya konulmuştur. Bu salgında solunum yolu hastalığı gelişen 81 hastadan 15'i ölmüş ve hastaların saklanan serumlarının %85'inde *L. pneumophila*'ya karşı spesifik antikorlar tespit edilmiştir (Topçu, 2002; Pınar, 2002).

1.2. Sınıflandırma

Legionella cinsi bakterilerin 58 tür ve 70 farklı serogrubunun olduğu bilinmektedir (Isenberg, 2004). Serogrubu tanımlanan *Legionella* türü bakterilerin çoğu, insanlarda görülen infeksiyonlardan sorumludur. *Legionella* cinsi bakterilerin neden oldukları infeksiyonların tümüne 'lejyonelloz' adı ile anılmaktadır (Diagn, 1999). Lejyonelloz klinik olarak; lejyoner hastalığı, Pontiac ateşi ve ekstra-pulmoner infeksiyon olmak üzere üç farklı hastalık belirtisi ile karşımıza çıkmaktadır. Bu klinik durumları biraz açıklarsak; Lejyoner hastalığı; pnömoni tablosu ile seyreden ve uygun tedavi yöntemi uygulanmadığı durumda ölümle sonuçlanabilen ağır bir tablodur. Pontiac ateşi ise, kas ve eklem ağrıları ile seyreden grip benzeri hafif bir tablodur ve tedavi gerektirmez (Köksal, 2002).

Legionella birçok toksin salgılamaktadır, ancak bunların virulans ile ilişkisi kesin değildir. Bu bakterinin tespit edilen cinslerinde sadece bir kısmı insanda hastalık ile ilişkilidir. En sık etken *L. pneumophila* olup diğer *Legionella* türlerinin çoğunda görülmeyen çeşitli invazyon ve virülans faktörlerine sahiptir. *L. pneumophila* serogrup 1 (Sg 1) vakaların %75-80'inden, Sg 2 ve Sg 6 %10'undan sorumlu bulunmuştur. Bunları *Legionella micdadei*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii* ve diğer türler takip eder (T.C Sağlık Bakanlığı, 2016). *Legionella* cinsi bakteriler hücre duvarı yapılarına (antijenik epitop) göre monoklonal antikorlar kullanılarak 50'den fazla (şu ana kadar tanımlanan 58) tür ve 70'in üzerinde farklı serogruba ayrılırlar.

Çizelge 1.1. *Legionella* türleri ve serogrup sayıları (İğnak, 2007).

Çevreden izole edilen türler			
Türler	Serogrup sayıları	Türler	Serogrup sayıları
<i>L.adelaidensis</i>	1	<i>L.gresilensis</i>	1
<i>L.beliardensis</i>	1	<i>L.israelensis</i>	1
<i>L.brunensis</i>	1	<i>L.jamestowniensis</i>	1
<i>L.cherrii</i>	1	<i>L.londiniensis</i>	1
<i>L.drozanskii</i>	1	<i>L.moravica</i>	1
<i>L.fairfieldensis</i>	1	<i>L.nautarum</i>	1
<i>L.fallonii</i>	1	<i>L.quateirensis</i>	1
<i>L.geestiana</i>	1	<i>L.quinlivanii</i>	2
<i>L.gratiana</i>	1	<i>L.spiritensis</i>	1
<i>L.rowbothamii</i>	1	<i>L.steigerwaltii</i>	1
<i>L.rubrilucens</i>	1	<i>L.taurinensis</i>	1
<i>L.santicrucis</i>	1	<i>L.waltersii</i>	1
<i>L.shakespearei</i>	1	<i>L.worsleiensis</i>	1

1.3. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Legionellaceae üyeleri, soluk boyanan, gram negatif, genellikle kapsülsüz, ince basillerdir (İğnak, 2007). Oksijen istekleri bakımından aerob, sporsuz ve hareketli, pleomorf görünümde veya uçları yuvarlak kısa çubuk şeklindedirler. Bir veya iki kutupsal kirpikleri vardır (Tuğrul, 2000). Koloni mikroskopuyla incelendiğinde yüzeyleri pürüzlü, periferinde kırmızı-mavi yeşil röfle veren ve ışığın düzensiz kırılması sonucu buzlu cam görünümünde olan bakterilerdir. Klinik örneklerde 0,3-0,9 µm ile 1,5-5 µm boyutlarında görülürler, fakat kültürlerinde 20 µm uzunluğunda filamantöz yapıda olabilirler. Üremek için L-cysteine özel gereksinimleri vardır. Bu yüzden bu bakteriye spesifik besiyeri geliştirilmiştir. Ortamda demir tuzlarının varlığı üremelerini kolaylaştırır. *L. oakridegensis*, *L. nautarum* ve *L. londinensis* haricindeki türler bir, iki veya daha fazla sayıdaki kıvrık, kutupsal ya da lateral kirpiklerle hareketlidir. Kirpikleri 14-20 µm genişliğinde, 8.0 µm boyundadır. Kirpik yapıları besinlere ve ısıya bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Vural, 1995).

Legionella örneklerinin gram boyası ile görülmesi zordur. Gram boyaması sırasında safranin uzunca bir süre tutulursa veya safranin yerine bazik fuksin kullanılırsa, basiller hafifçe

boyanır. *Legionella*'lar için gimenez boyası, gram boyası kadar hızlı ve ondan daha iyi bir yöntemdir. Dieterle ve Warthin-Starry gümüşleme boyalarıyla dokuların parafin kesitlerinde *Legionella*'ların gösterilmesi mümkündür. Dokuda ve klinik örneklerde *L. micdadei* zayıf olarak aside dirençlidir. Erlich Ziehl Neelson gibi, asidorezistan bakterileri boyayan yöntemlerle, hafif boyanma özelliği gösterebilir. Fakat besiyerlerinde üretildikten sonra bu özellikler kaybolur (Ustaçelebi, 1991).

L. pneumophila'nın hücre duvarında ince bir peptidoglikan ve lipopolisakkarit tabakasının en önemli yapıları olan diaminopimelik asit ve 2-keton-3 deoksitonat vardır. Yağ asit yapıları Gram negatif bakterilerin yağ asit yapısından farklıdır. *Legionella* hücrelerinde çok sayıda dallanmış yağ asiti zincirleri ve az sayıda da ester bağlarıyla bağlı hidroksi asitler vardır. Karmaşık yapıda bulunan bu yağ asitleri, bakterileri sıcak ortamlarda ısıdan korumaya yarar (Harrison, 2006).

Bazı suşlarda polisakkarid kapsüle benzer bir yapıya rastlanır. Sitoplazmada, sudan black B ile boyanan (sudanofilik), polibetahidroksi-butirat granülleri vardır (Ustaçelebi, 1991).

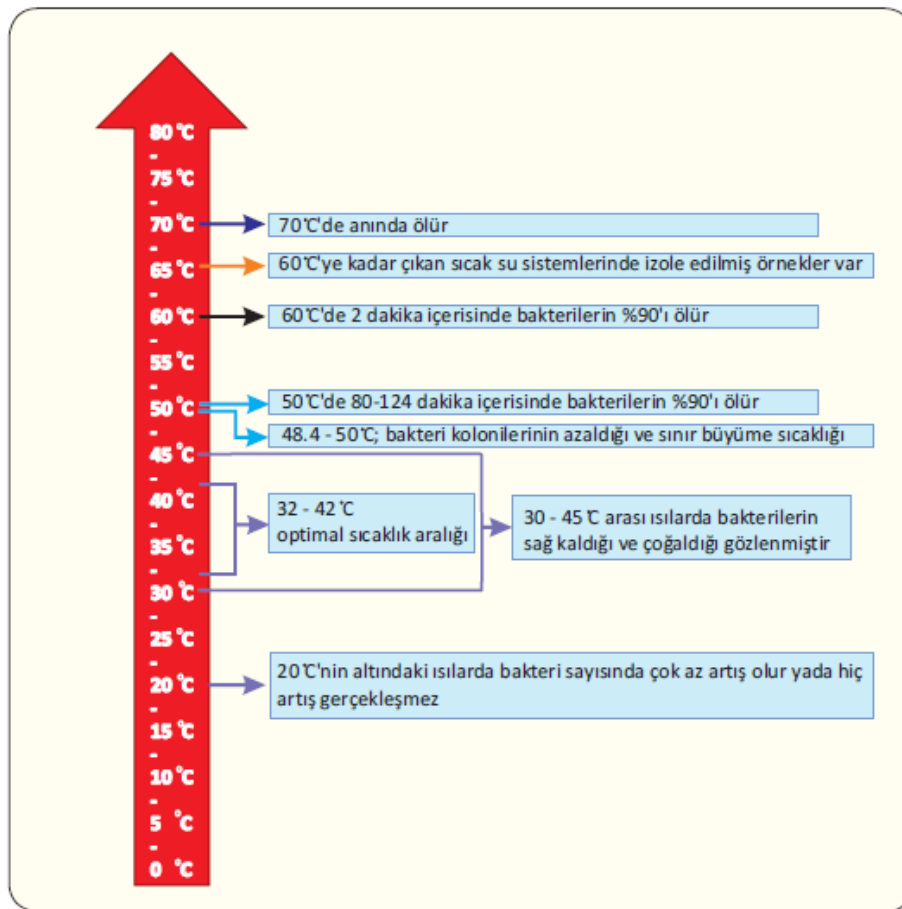
1.4. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Legionella doğal su ortamlarında bulunabildiği gibi laboratuvar ortamında daima zor üreyen bir bakteridir (Bridge, 1983). Bulunduğu ortamdaki demir iyonları ve keto asitler üremeyi artırırken pürin ve pirimidin bazları da üremeyi destekler ve maya özünde bol bulunur (Hoffman, 1983). Karbon kaynağı olarak aktif kömürü kullanırlar. Aynı zamanda aktif kömür, yağ asitlerini ve özellikle besiyerinin ışık ile teması sonucu oluşabilecek süperoksit radikalleri ve peroksit bileşiklerini absorbe ve detoksifiye edebilmektedir. Ayrıca sistenin oksidasyonunu da önlemektedir. Bu nedenlerden dolayı *Legionella* bakterileri standart bakteriyolojik besiyerlerinde üreyemezler. Fakat maya özütü, tamponlanmış kömürlü ve pH:6,9 olan agarda 3-5 günde 1-4 mm çapında, yuvarlak, gri renkli koloniler halinde ürer (Edelstein, 1982; Harrison, 1988). Nemli ortamda 35°C-37°C'de üreme gerçekleştirir ve ortamda %5 CO₂ bulunması üremeyi artırır (Morrill, 1990). Üreme sırasında enerji kaynağı olarak aminoasitleri kullanırlar. Demir bileşikleri üremeyi hızlandırır (Ustaçelebi, 1991).

Legionella bakterisinin tüm türlerinin katalazı zayıf, (Yalnızca *L. worthei*'nin katalaz aktivitesi yoktur) oksidaz negatif veya zayıf pozitifdir. Yapılarında bol miktarda dallanmış yağ asidi zincirleri vardır. Çoğu türler üreaz ve nitrat negatiftir. *L. micdadei*, *L. feeleii* ve *L. nautarum* dışındaki türler jelatini eritirler. Çoğu türler tirozinden, erir bir pigment

oluştururlar. Hippurat hidrolizi testi *L. pneumophila*'da kuvvetli pozitif olduğundan, bu türe diğerlerinden ayırmak için basit bir yöntemdir (Ustaçelebi, 1991).

Legionella bakterisi karbonhidratları fermente ve okside edemez. Enerjinin önemli kısmını arjinin, treonin, metiyonin, serin, isolösin, valin, sistin gibi aminoasitlerden sağlarlar (Ustaçelebi, 1991).



Şekil 1.1. *Legionella* bakterilerinin sıcaklığa duyarlılığı (Sağlık B., 2016).

1.5. Antijenik Yapı

Legionella türlerine özgü antijenler absorbe antiserumlarla, aglütinasyon veya immuofloresan ters yapılarak tanımlanır. Bunlar hücre yüzeyinde bulunan yapılardır. Ayrıca tüm *Legionella* türlerinde protein yapısında, ısıya duyarlı tek bir (flagella) antijeni vardır (Ustaçelebi, 1991).

L. pneumophila'da bir başka antijen, 60 kDa ağırlığında olan bir heat-shock proteindir (hsp). Bakteriyal hsp60 veya GroEL ailesinde yer alan bir proteinin *M. tuberculosis* 65 kDa proteini ile %76 oranında, *Escherichia coli* ve *Coxiella burnetti* hsp60 proteinleri ile %85 oranında benzerlik göstermektedir. *Legionella* hsp60 şeklinde belirtilen bu proteinin major sitoplazma membran proteini (MCMP) olduğu ve *Legionella* cinsine özgü olduğu anlaşılmıştır. Hayvan deneylerinde kuvvetli bir koruyucu bağışıklığın gelişmesi nedeniyle, aşı geliştirilmesinde kullanılması önerilmiştir. *Legionella* hsp60 bugüne dek tanımlanan hsp'ler arasında koruyucu bağışıklık oluşturduğu gösterilen ilk hsp'dir (Ustaçelebi, 1991).

1.6. Epidemiyoloji

1.6.1. *Legionella* ekolojisi

Legionella içinde yer alan bakterilerin gerçekte doğal ekolojik ortamı sudur. Sıcak ve soğuk su kaynakları, bataklıklar, yer altı suları, volkanik göller *Legionella* cinsi bakteriler içerirler. Doğal ortamlarda 0-63°C arasındaki sıcaklıklarda yaşarlar. Klor tolerans gösteren suşları nedeniyle şehir su sistemlerinde kolaylıkla geçerler (Ustaçelebi, 1991).

Doğadan insana bulaş dört halkalı bir zincir şeklinde tanımlanabilir. Birinci halka yaşadıkları doğal sulardır. İkincisi bakterinin üreyerek yüksek konsantrasyonlara çıkmasına izin veren amplifikasyon faktörleridir. Üçüncü halka bakterinin duyarlı popülasyona ulaşılmasında aracı mekanizmalardır. Son halka ise bakterinin yerleşip enfeksiyona neden olabildiği duyarlı konaktır. Zincirin ikinci ve üçüncü halkasını insan yapımı faktörler oluşturur. Yapılan araştırmalar büyük binaların %50'den fazlasının su sistemlerinde *Legionella* türlerinin bulunduğunu göstermektedir. Gerçekte doğal sularda düşük konsantrasyonlarda bulunan bakteriler az sayıda şebeke suyuna geçebilirler. Ancak binaların su sistemlerinde üremeye uygun ortam (ölü boşluklar, suyun durgun olduğu alanlar) bularak çoğalırlar. Su tesisatında yaygın şekilde bulunabilen biyofilm katmanları da bakterinin üremesinde çok önemli rol oynar (Fraser, 1991; Fields, 1996).

Legionella türlerinin, doğada yaşamını sürdürebilmeleri ve çoğalabilmeleri için, ortamda bazı mikroorganizmaların bulunması önemlidir. Önceleri *Legionella* türlerinin doğada serbest yaşadıkları sanılırken, çok geçmeden *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türü amipler içinde simbiyotik/paraziter bir yaşam sürdürdükleri anlaşılmıştır. Amip kistleri içinde, serbest yaşama göre dış etkilere ve biyositlere daha dirençli hale gelmektedirler (Akbafl, 1996). Bazı canlılar *Legioenella* cinsi bakterilerin üremesine olumlu etki ederken, bazıları da üremesini engellemektedir. *Cyanobacteriler*, *Fischerella* ve yeşil algler *Legionella* cinsi bakterilerin

üremesini olumlu yönde etki etmektedir (Baron ve Finegold, 1990; Akbaş, 1996). *Pseudomonas* benzeri suşlar, *Streptococcus* ve *Bacillus* türlerinin ise *Legionella* cinsi bakterilerin üremesini engelledikleri belirtilmiştir (Toze, vd., 1990).

Siyanobakteriler ve diğer *Legionella* dışı bakteriler, *Legionella* türlerinin in vitro koşullarda üremesini stimüle ederler. Sularda serbest olarak yaşayan amipler ve kirpikli protozoalar, infeksiyon kaynağı olarak şüphelenilen ortamlardan, *Legionella* türleri ile birlikte izole edilmişlerdir (Fliermans, vd., 1984; Jantzen, vd., 1993). Mavi-yeşil algler, amip ve kirpikli protozoaları infekte ederek çoğalabilen mikroorganizma, uygun olmayan çevre koşullarında yaşamını sürdürebilir. Mavi-yeşil alglerin (*Cyanobacteria*) bulunduğu ortamlarda bulunurlar ve amipler (*Amoeba*, *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türleri) içinde çoğalabilirler. Bu amipler *Legionella*'ların doğadaki asıl kaynağıdır (Ustaçelebi, 1991).

Legionella türlerini en çok bulunduğu insan yapımı su sistemleri şunlardır;

- Havalandırma sistemleri, merkezi klima ve soğutma kuleleri
- Sıcak su tankları
- Su yumuşatma tankları
- Sıcak su muslukları ve duş başlıkları ve
- Çamurlar, kaplıcalar ve termal banyolar,
- Hastane solunum tedavi ekipmanları
- Nebulizatörler ve evaporatörler
- Göz yıkama birimleri (Whitney, vd., 1997).

Legionella bakterisi suda uzun süre yaşar. Oda ısısında, distile suda aylarca, çeşme suyunda ise bir yıldan uzun süre canlı kalabilmektedir. Aerosollerde canlıdır ve aerosol kaynağından 200 m uzakta canlı kalabilirler. *Legionella* bakterileri damlacıklar içinde ortamda 2 saatten fazla kalabilir ve hava akımlarıyla 1.5-3.0 km uzağa taşınabilirler (Yu, 1993; Blatt, 1993).

Legionella türleri doğada amip dışında biyofilm tabakalarda da çoğalma gösterebilir. *Legionella* türü bakteriler yerleştikleri yüzeylerde slime üretmezler. Su depoları, soğutma kuleleri, vantilatör ve nebulizatör gibi ortamlarda başka bakterilerin oluşturduğu çoğu kez biyolojik atık katmanları şeklindeki biyofilm yapılarının içine yerleşirler. Hastanelerde kullanılan kateter, nazogastrik sonda, entübasyon tüpleri gibi araçların musluk suyu ile yıkanması ve dezenfekte edilmemesi sonucunda mekanik olarak hastaya bulaşma gerçekleşebilir. Biyofilmlerde üreme hızları çok yavaşladığından, metabolizmalarındaki

biyokimyasal ara yollara etki gösteren biyositlere karşı dirençleri artmaktadır (Abigail, vd., 1994).

1.6.1.1. *Legionella* türlerinin doğada yayılımı

Legionella bakterisinin sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmasının sebepleri: farklı bir çok koşulda hayatta kalma yeteneği (Hilbi, vd., 2011) protozoaları enfekte ederek, hücre içi replikasyon yapabilmesi (Rowbotham, 1980) ve farklı mikroorganizmalar tarafından oluşturulmuş biyofilmlerde hayatta kalabilmesidir (Declerck, 2010). Bakteri doğada biyofilmler ve konak hücrelerde parazitlik haricinde, canlı fakat kültürde üremeyen (Viable but not culturable - VBNC) veya serbest planktonik formlarda da bulunabilmektedir (Mekkour, vd., 2013). *Legionella* cinsi bakteriler doğada yaşamlarını sürdürebilmek için gerekli olan besin ve diğer çevresel faktörlerin varlığına bağlı olarak ince duvarlı, hareketsiz replikatif form ile kötü çevresel koşullara adapte olabilmek için kalın duvarlı hareketli geçici fizyolojik formlara dönüşebilmektedirler. Dolayısıyla *Legionella* bakterilerinin olumsuz çevre şartları varlığında geçici formları canlı fakat kültürü yapılamaz olarak adlandırılır. Rutin *Legionella* kültürlerinde çoğaltılamayan bazı *Legionella* türleri amip benzeri *Legionella* olarak adlandırılır (Bilim Lab., 2015).

Doğal su ekosistemlerinin lejyoner hastalığı için kaynak oluşturmadıkları kabul edilir, çünkü çevresel koşullar *Legionella* türlerinin hastalık oluşturacak sayıda üremesine uygun değildir (Declerck, 2010). Hastalığın epidemiyolojik kaynağı içme, kullanma su sistemleridir (Ruf, vd., 1988). Japonya'daki bir kaplıca, lejyoner hastalığı sebebi olarak kayıtlara girmiş istisnai doğal su örneklerinden birisidir (Mashiba, vd., 1993). *Legionella* çevresel izolatları ile klinik izolatlarının kültürde gelişim özellikleri bakımından önemli farklılıkları olmadığı (Orrison, vd., 1981), fakat çevresel izolatların virulans özelliklerinin değişken olabildiği (Bollin, vd., 1985) gösterilmiştir. Ekstrem koşullarda *Legionella* türleri hayatta kalabilirler. Örneğin: algler tarafından oluşturulmuş pH 2.7 asidik biyofilm ortamında *Legionella* türleri izole edilmiştir (Sheehan, vd., 2005).

1.7. Patogenez

Legionella'lar fakültatif hücre içi parazitidir. Hastalığın ortaya çıkması bakteride virulans faktörlerinin varlığı, konağın durumu ve karşılaşılan bakteri sayısı ile ilişkilidir (Ustaçelebi, 1991). *Legionella* enfeksiyonları, bakteri, çevre ve konak olmak üzere üç faktörün etkileşimi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bakterinin konak organizmaya girişi solunum yolları ile olmaktadır. Enfeksiyonun oluşabilmesi için konak solunum yolları direncinin kırılmış olması

gerekmektedir. Bu nedenle *Legionella* ailesinde yer alan bakteriler fırsatçı patojendirler. Bütün *Legionella* türlerinin insanda enfeksiyona neden olmadığı gözönüne alındığında, türe özgül bazı virulans kriterlerinden söz edilebilir. Toprak ve suda *Legionella* türlerinin yaygın olarak bulunması, insanların bu bakterilerle yoğun karşılaştığı gerçeğini ortaya koymaktadır. Doğada yaygın olarak bulunan *Legionella* türlerinin sadece bir kısmının etken olduğu enfeksiyonların solunum yolları direnci zayıflamış kişilerde görülmesi, bakteri, çevre ve konak ilişkisinin önemini vurgulamaktadır (Abigail, 1994).

Legionella'larda virulansta rol oynayan birçok faktör vardır. İnsan enfeksiyonlarına %85 oranında *L. pneumophila* (özellikle serogrup 1 ve 6) ve ikinci sırada *L. micdadei* yol açar. Pontiac hastalığı *L. pneumophila*'dan başka sırasıyla *L. micdadei*, *L. feeleii*, *L. anisa* ile oluşur. Diğer türler ve diğer *L. pneumophila* serogrupları da özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda ağır klinik tablolara yol açabilirler. *Legionella* bakterileri sağlıklı insanlarda da ciddi enfeksiyonlara yol açabilir, ancak ağır enfeksiyonlar ve ölüm en çok savunma sisteminin bozulduğu hastalarda görülür (Ustaçelebi, 1991).

İnhalasyon ile üst solunum yollarından aspire edilerek konak organizmaya giren patojen bakteri, eğer konağın solunum yolları direncini bozan bir neden varsa, 2-10 gün içinde pnömoni ile sonuçlanan enfeksiyon tablosu ortaya çıkartmaktadır. *Legionella* enfeksiyonuna karşı konak direncini bozan risk faktörleri arasında en iyi bilinenler, sigara kullanımı, kronik obstrüktif akciğer hastalıkları, kronik kardiyovasküler hastalıklar, böbrek yetmezliği, transplantasyon ve altta yatan bir hastalığa veya tedaviye bağlı immün supresyondur (Winn, 1995).

1.8. Klinik Belirtiler ve Bulgular

Legionella enfeksiyonları subklinik enfeksiyon olarak 3 farklı durum halinde ortaya çıkar.

1. Nonpnömonik hastalık (Pontiac ateşi)
2. Pnömoni (Lejyoner hastalığı)
3. Ekstrapulmoner inflamatuvar hastalık.

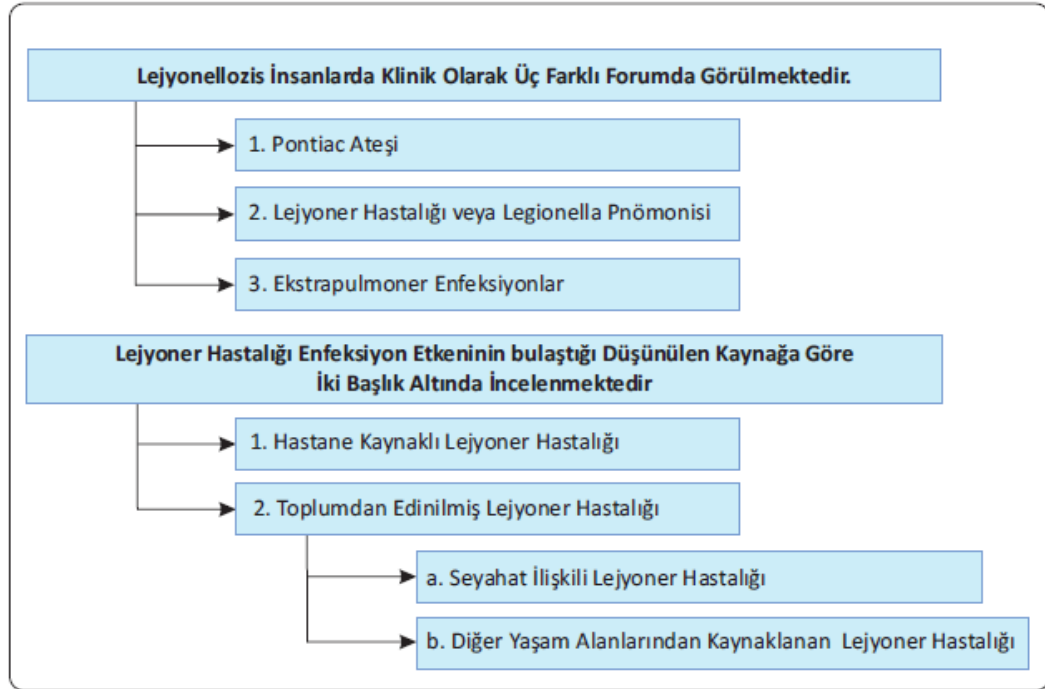
Subklinik enfeksiyon terimi pnömoni tablosu ortaya çıkmadan sadece serumda *Legionella* türlerine karşı antikor saptanması ile tanımlanmaktadır (Winn, vd., 1995).

Nonpnömonik hastalık (Pontiac ateşi); *Legionella* türlerinin neden olduğu nonpnömonik hastalık, "Pontiac ateşi" adıyla anılır. Pnömoni yoktur. Gribal enfeksiyonu andırır. Başlıca belirtileri ateş, kas ağrısı, halsizlik, baş ağrısı ve balgamsız öksürük olan akut bir hastalıktır. Ortalama bir haftada kendiliğinden düzelir. *Legionella* enfeksiyonlarını çoğunlukla

sağlıklı bireylerde pontiac hastalığı şeklinde görülür. Genellikle kendi kendine iyileşme eğilimindedir (Ustaçelebi, 1991; Koneman, vd., 1997).

Pnömoni (Lejyoner hastalığı); *Legionella* enfeksiyonları arasında sıklıkla karşılaşılan ve en ciddi klinik tablodur. Başlangıç aniden yükselen ateş, halsizlik, miyalji, baş ağrısı ve kuru öksürük ile kendini gösterir. Balgam çıkartılabiliyorsa inflamasyon hücreleri içerir, fakat genellikle Gram boyasıyla bakterileri görmek zordur. Özellikle kuru öksürük ile kendini gösteren atipikpnömoni tablosu, *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydia pneumoniae* etkenleri ile ayırıcı tanı gerektirir. Pulmoner infiltrasyonun hızlı gelişimi, diğer loblara ve diğer akciğere yayılım, diğer gram negatif basil pnömonilerini düşündürse de, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve aminoglikozitlere cevap alınamaması, bu tanıdan uzaklaştırır (Winn, vd., 1995). Ağır seyreden *Legionella* pnömonisinde bakteriler kan akımı ile yayılım gösterebilirler. Bakteriyemi sonucu plevral ampiyem, perikardit, miyokardit, endokardit, pankreatit, piyelonefrit, peritonit, sellülit, hepatik apse ve gastrointestinal apseler gelişmiş olgular tanımlanmıştır. Deri döküntüleri, ensefalit, artrit, akut böbrek yetmezliği, miyoglobulinüri gibi enfeksiyon dışı komplikasyonlar da görülebilmektedir. *L. pneumophila* enfeksiyonunun lejyoner hastalığı şeklinde ortaya çıkması bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda (T hücre fonksiyon bozukluğu veya immunsupresif tedavi) kronik akciğer hastalığı olan bireylerde cerrahi girişimler uygulananlarda, transplantasyonlularda, kanserlilerde, ileri yaş dönemlerinde, alkol veya sigara alışkanlığı gibi faktörlerin varlığında daha sık görülmektedir (Ustaçelebi, 1991).

Ekstra pulmoner inflamatuvar; hastalık Lejyoner ve pontiac hastalıklarının dışında son zamanlarda *Legionella* bakterilerinin neden olduğu ve vücudun farklı organlarının etkilendiğini gösteren çok sayıda yayın yapılmıştır. Bu hastalıklardan bazıları; bakteriyem, beyin absesi, ensefalit, deri absesi, sinüzit, piyelonefrit, prostatik kapak endokarditi ve perikardittir (Strohl, vd., 2006).



Şekil 1.2. *Legionella* enfeksiyonları ve sınıflandırmaları (T.C Sağlık B., 2016).

1.9. Mikrobiyolojik Tanı

1.9.1. *Legionella* cinsi bakteri izolasyon yöntemleri

1.9.1.1. Kültür

Örneklerin Toplanması, Dekontaminasyonu ve Yoğunlaştırılması

Farklı kuruluşlar tarafından çevre örneklerinden *Legionella* bakterilerinin; izolasyonu, örneklerin toplanması, dekontaminasyonu, konsantrasyonu ve kültürü gibi konularda farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları:

(CDC) Centers for Disease Control and Prevention Uygulaması: Duş başlığı ve musluklardan örnek alınırken öncelikle sürüntü ardından su örneği alınır. Alınan örneklerle su içerisinde az miktarda bulunan bakteriyi yoğunlaştırmak için filtrasyon işlemi uygulanır. Ardından 15 dk asit ile dekontamine işlemi yapılır. Ekim için BCYE, PAV ve GPAV besiyerleri kullanılır (Ta, vd., 1995).

(VAMC) Veterans Affairs Medical Center Uygulaması: Bu uygulamada sürüntü örneklerinin su örneklerinden ayrı olarak toplanması önerilir. Toplanan örnekler 3 dakika asit

uygulamasıyla dekontamine edilir. Örnekler BCYE ve DGVP besiyerlerine ekilir (Ta, vd., 1995).

The Hygiene Institute: Bu yöntemde sadece su örneği alınır. Alınan örnekler su içerisinde az miktarda bulunan bakteriyi yoğunlaştırmak için filtrasyon işlemin uygulanır. Ardından 15 dk asit ile dekontamine işlemi yapılır. Ekim için BCYE ve GVPC besiyerleri kullanılır (Ta, ve ark., 1995).

(ISO) The International Standard Method: Toplanan örnekler asit veya ısı ile dekontaminasyon edilir. Konsantre edilen örneklerin GVPC ve BCYE- α besiyerlerine ekilmesini önermektedir (Garity, vd., 1980).

(AS) Australian Standart: Bu yöntemde ISO'nun aksine asit ile dekontaminasyon işlemini yüksek oranda kontamine örnekler için önermektedir. Besiyeri olarak da BMPA ve MWY agar önermektedir (Garity, vd., 1980).

Uygulanan yöntemlerde asit ile dekontaminasyon işleminin süresi 5-30 dakika arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Fakat 1/10 oranında pH 2,2 KCl-HCl çözeltisiyle 5 dakika muamele işlemi uygulandığında *Legionella* dışındaki bakterilerin uzaklaştırılmasında yeterli oluğu ve *Legionella* cinsi bakteri izolasyon oranını düşürmediği bildirilmiştir (Rodgers, vd., 1979).

1.9.1.2. Legionella besiyerleri

Legionella bakterisi laboratuvarında kullanılan standart besiyerlerinde üremediği için izolasyonunda özel besiyerleri gereklidir. Çeşitli antibiyotiklerin katılmasıyla seçici özellik kazandırılabilir "Buffered Charcoal Yeast Extract- α -ketoglutarate" (BCYE α) besiyeri kullanılır (Nash, vd., 1991). Besiyerinin içinde bulunan yeast extract bakteri için besin kaynağıdır. Demir bileşikler, L-cysteine ve α -ketoglutarate *Legionella* üremesini uyarır. Özellikle besiyerinin ışık teması sonucu oluşabilecek süperoksit radikalleri ve peroksit bileşiklerinin nötralize edilmesinde ise aktif kömür görev alır. Besiyerine katılan ACES [N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid] tamponu, *Legionella* üremesi için gerekli optimum pH'yı sağlamaktadır. Seçicilik için sıklıkla polymyxin B, anisomycin ve cefamandole veya vancomycin antibiyotikleri besiyerine eklenir (Winn, vd., 1995).

Özellikle çevresel örneklerden izolasyon için BCYE temel besiyerine antibiyotiklerin yanı sıra, glisin, bromtimol mavisi ve bromkrezol moru eklenmesiyle elde edilen modifiye Wadowsky-Yee besiyeri ile bazı *Legionella* türlerinin renkli koloni oluşturmaları sağlanabilmektedir (Winn, vd., 1995).

1.9.1.3. Kültür sonu clarının değerlendirilmesi

Ekim yapılan besiyerlerinin en az 5 gün boyunca, nemli ve %2- 5 CO₂ 'li ortamda inkübasyonu yapılmalıdır. 10 gün süreyle besiyerleri gözlenir. Beřinci günden sonra kültürler genellikle üreme gözlenir.

Legionella bakterilerinin izolasyonunda kullanılan besiyerlerinde diğer bazı zor üreyen bakterilerin de ürediği bilinmektedir. Bakterilere  rnek; *Nocardia asteroides*, *Bordetella pertussis* ve *Francisella tularensis* verilebilir. *Legionella* şüpheli kolonilerin kesin tanısı bakterilerin üremek için sisteine zorunlu gereksinim duymalarıyla konulur (Miyamoto, vd., 1997).

şüpheli kolonilerden koyun kanlı veya  okolata agar gibi rutin amaçlı besiyerlerine antibiyotik içermeyen BCYE agar ile birlikte paralel pasaj yapılır. *Legionella* türleri kanlı veya  okolata agarda  remezler. Kanlı agarda  remeyen, BCYE'de üreyen izolatların agl tınan serumlarla test edilmesi ile tanıya gidilir (Kool, vd., 1999).

1.9.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Legionella türlerinin saptanması amacıyla kullanılan yöntemlerden biride PCR'dır. (Starnbach, vd., 1989). *Legionella* 'ların cinse özgü ribozomal RNA'larının belirlenmesinde, DNA hibridizasyon testleri ve genellikle kontamine sularda *Legionella* aranmasında PCR uygulanmaktadır. Genel olarak hedef DNA bölgesi olarak *Legionella* türlerine  zg l 5SrRNA geni veya *Mip* geni seçilmektedir. Duyarlılık 1-35 cfu/mL arasında değismektedir (Lisby, 1994). Kullanılan bu yöntem *Legionella* gibi zor ve yavaş üreyen bakterilerin tanısı için kültür yönteminin yanında iyi bir alternatiftir (Catalan, vd., 1994). Nükleik asit tespitine dayanan bu yöntemde canlı ve cansız *Legionella* DNA'ları da pozitif sonuç vermektedir (Fields, vd., 2002).

PCR yönteminin; yapılan bazı araştırmalar doğrultusunda su örneklerindeki *Legionella* türlerine uygulanan kültür yönteminden daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir (Miyamoto ve ark., 1997). Fakat suyun kirliliği gibi faktörler PCR sonuçlarını etkilelemektedir. PCR ve kültürün  evre örneklerinin incelenmesinde birbirini tamamlar özellikle olduğu düşünülmektedir (Maiwald, vd., 1994).

1.10. Legionella Cinsi Bakterilerin T r Tanısı ve Serogruplandırılması

Legionella bakterilerin tür düzeyinde tanısında (hippurat hidrolizi, betalaktamaz testi, tirozinli besiyerinde kahverengi pigment oluşturma, uzun dalga boylu ışık altında farklı renkte floresan verme, jelatini hidrolize etme, hareket gibi) biyokimyasal, morfolojik ve enzimatik

testlerin sınırlı düzeyde tanı değeri vardır (Kim, vd., 2002). Kültürde üreyen şüpheli kolonilerin doğrulanması ve tür tanısının yapılması amacıyla bu testlerin dışında DFA ve/veya lateks aglütinasyon yöntemleri kullanılmalıdır (Bartie, vd., 2003).

1.10.1. Direkt floresan antikor (DFA) deneyi

Kültürde üreyen *Legionella* izolatlarının identifikasyonunda DFA yöntemi, sıklıkla kullanılır (Erdem, 1999; Lasheras, vd., 2006). Bu teknikte türe ve serogruba özgül dış membran proteinlerine karşı elde edilmiş (*Legionella* tür ve serogruplarına karşı hazırlanan monoklonal tavşan antikorları) floresan antikorlar kullanılır. 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 kokbasil veya kısa basiller olarak görülür (Eberly, vd., 2007). Bu sayede kültürde üreyen şüpheli kolonilerin doğrulanması ve tür tanısı yapılmış olur (Bartie, vd., 2003). Kısa süre içerisinde sonuç vermesi önemli bir avantajdır (Yu, vd., 2000). Bu yöntem kültür yöntemi ile kıyaslandığında duyarlılığı (%25-70) daha düşük bulunmuştur (Winn, vd., 2006).

1.10.2. Lateks aglütinasyon deneyi

Antikor kaplı boyalı lateks ya da koloidal altın partükülleri, hızlı serolojik identifikasyon ya da saf bakteri kültür izolatlarının teşhis ve tiplendirilmesinde kullanılır. Antijen ile antikorun birleşmesi sonucu gözle görülür aglütinasyon şekillenir.

Legionella bakterilerinin serogruplarını belirlemek için *Legionella* Latex test kiti ile aglütinasyonu yapılır. Bu yöntem *Legionella* hücre duvarı antijenlerine (O antijenlerine) karşı tavşandan elde edilen antikorlarla aynı serogruptan olan *Legionella* bakterilerinin aglütinasyon vermesi esasına dayanmaktadır (Nakipoğlu, 1999).

1.11. Tedavi

Legionella bakterisinin neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde klasik olarak kullanılan ilaç eritromisindir. Çok ağır seyreden hastalıklarda eritromisinin, rifampisin ile birlikte kullanılması gerekmektedir. Yakın zamanda azitromisin, klaritromisin ve roksitromisin gibi daha yeni makrolidler ve siprofiloksin, perfloksasin gibi kinolonlar da *Legionella* enfeksiyonları için kullanılan ilaçlar arasındadır. Kinolonlar, rifampin, makrolidler, trimetoprim sulfametoksazol ve tetrasiklinlerin, *in vivo* koşullarda, *Legionella* türlerine etkili olduğu saptanmıştır, fakat penisilin sınıfı antibiyotikler *Legionella* bakterilerine etki etmezler. Pontiac ateşi hastalığında özgül tedavi gerekmez (Akalin, 1993).

1.12. Koruma ve Kontrol

Legionella bakterisinin neden olduğu lejyoner hastalığı tanısı konmuş olguların, etkeni içerdiği düşünülen binalarda su sisteminin araştırılması gerekir. Şüpheli sistem bir bina yada turistik konaklama tesisi ise, su örnekleri (binaya giren şebeke suyu deposundan, varsa artezyen kuyusu veya artezyen suyunun toplandığı depodan, su tanklarından, klima soğutma kulesi ve klima sistemi içinde dolaşan sudan, binanın tüm katlarının en az birer odasının duş başlıklarından ve su musluklarından, varsa termal havuzlardan) binanın tamamını temsil edecek şekilde alınmalıdır. Şüpheli bina bir hastane ise, örnekler sadece belirli yerleri temsil edecek şekilde değil de, yoğun bakım, ameliyathane ve kliniklerde yatan hastaların özelliklerine ve risk faktörlerine bakılarak alınmalıdır. Varsa çeşitli solunum ekipmanlarının su haznelerinden, su ve buz makinalarından da örnekleme yapılmalıdır (Pınar, 2002).

Su sistemlerinde yapısal alınması gereken önlemler:

- Su depoları sıkı kapanan kapaklı olmalı ve miks batarya kullanılmamalıdır.
- Hidrofor ve böyler tesisatlarında içinde suyun hareketli kaldığı kapalı genişleme depoları kullanılmalıdır.
- Su depoları tamamen boşaltılabilme ve temizlene bilme imkanı sağlanmalı ve iç yüzeyleri kir tutmayan, temizlenebilen bir malzeme ile kaplı olmalıdır.
- Soğuk ve sıcak su boruları izole edilmelidir.
- Dışarıdaki tanklar direk güneş ışınlarına karşı korunmalı ve yansıtıcı boya ile boyanmalıdır.
- Su depoları toprak altında veya bodrum katta yapılmalı, yangın suyu için ayrı depo olmamalıdır (depo içindeki durgun su bakteri üremesine elverişlidir) (Bilim Lab., 2015).

Transplantasyon ünitesi bulunan hastanelerde rutin olarak su sistemlerinde *Legionella* aranmalıdır. Yüzme havuz suları, hastane, okul, otel gibi büyük bina suları bakteriden arındırılmalı, belirli aralıklarla dezenfekte edilmelidir. Su sistemlerinin yüksek ısı (60°C - 77°C) uygulaması, hiperklorinasyon, ozon (O₃), UV ışınlama ile dezenfeksiyonu sağlanmalıdır (Pınar, 2002).

1.13. Su Sistemlerinin Dezenfeksiyonu

Su sistemlerinin dezenfeksiyonu amacı ile kullanılan yöntemler

1. **Fiziksel** (membran filtrasyon, termal yöntem, ultraviyole ışınları)

2. **Kimyasal** (klorlama, gümüş/bakır iyonizasyonu vb.) yöntemler olarak iki ana başlıkta toplanabilir (Nash, vd., 1991).

1.13.1. Fiziksel yöntem

1.13.1.1. Membran filtrasyon

Bu yöntem sistemdeki suyun kullanılmadan önce 0,2 µm por çapındaki filtrelerden geçirilmesini ön görür. Bu uygulamanın nozokomiyal *Legionella* infeksiyonlarının önlenmesinde etkili bir yöntem olduğu bilinmektedir (Vonberg, vd., 2005).

1.13.1.2. Termal yöntem

Termal yöntem, *Legionella* bakterisinin doğal üreme özelliğine bağlı faktörler dikkate alınarak uygulanır. *Legionella* bakterilerinin %90'ı 60°C ısıda yarım saat içerisinde ölmektedir. 70°C sıcaklıkta teorik olarak yaşamaları mümkün değildir. Su sistemdeki her noktada aynı sıcaklık sağlanamayacağından %100 eradikasyon gerçekleşmemektedir (Bilim Lab., 2015).

Eradikasyon yöntemlerinden biri olan “Süperheat-and-flush” metodu oldukça yaygın olarak uygulanmaktadır. Su sıcaklığının 65°C'nin üstüne çıkarılması ve bütün çıkışlardan birkaç dakika akıtılması (superheat-and-flush) kısa süreliğine *Legionella* miktarının azaltılmasında etkilidir. Bu yöntemin düzenli uygulanmaması bakterinin tekrar üreyesine neden olur. Uygulanan yöntem su ısıtıcılarının kapasitesi ile sınırlıdır ve zaman alıcıdır. Kalıcı bir etki için sıcak su sıcaklığı sürekli 50-60°C'nin üstünde tutulmalıdır (Kool, vd., 2002).

Bu yöntemin dezavantajı; yanık tehlikesi yaratması ve tekrar kolonizasyon görülebilmesidir. Sıcak su sıcaklığının artırılması, su sistemlerindeki soğuk su tarafının ılıklaşmasına neden olabilir. Sonuçta soğuk su kısmına *Legionella* bulaş riski artabilir (Kim, vd., 2002).

1.13.1.3. Ultraviyole ışınları

UV kullanımı suyun dezenfeksiyonu için kullanılan fiziksel yöntemlerden biridir. 254 nm dalga boyundaki UV ışınları timin dimerleri oluşturarak hücresel DNA hasarına yol açarak *Legionella*'yı öldürür (Ustaçelebi, 1999). Lokal bir bölgeyi dezenfekte etmek için iyi bir yöntemdir. UV üniteleri, duş başlığı, musluk gibi bölgelerin yanına kurulur. Bu yöntemde düşük basınçlı civa lambalarından geliştirilen UV ışınları ile sterilasyon gerçekleştirilir.

Bu yönteminin kısıtlı bölgelere uygulanabilmesi, etkinin kısa olması ve kalıntı bırakmamasından dolayı tekrar kolonizasyona neden olması dezavantajdır. Fakat kalıntı

bırakmaması nedeniyle çevreye zararlı etki yaratmamasından dolayı atık su arıtım sistemlerinde sıkça kullanılır (Yu, vd., 2002). Bu yöntem tek başına yetersiz kalması nedeniyle Gümüş-bakır iyonizasyonu ve klorlama gibi yöntemlerle beraber uygulandığında daha etkili olur (Kim, vd., 2002; Franzin, vd., 2002).

1.13.2. Kimyasal yöntem

1.13.2.1. İyonizasyon

Bakır/Gümüş İyonizasyonu

Bakır ve gümüşün elektrolizi sonucu oluşan pozitif yüklü bakır (Cu^{+2}) ve gümüş (Ag^+) iyonları bakteri hücre duvarındaki negatif iyonlara bağlanarak hücre duvar permeabilitesini bozmaktadır (Bilim Lab., 2015). Ayrıca bakteri hücre duvarının geçirgenliğinin bozulmasına ve protein denatürasyonuna neden olarak antimikrobiyal etkinliğe neden olur. *Legionella* hücrelerinin liziz olmasına yol açar. Bu yöntem klorlama ve UV ışınları yöntemleri ile beraber kullanılmaktadır, fakat fazla uğraş gerektiren maliyetli bir yöntemdir (Kim, vd., 2002; Stout, vd., 2003).

Hidrojen peroksit/Gümüş İyonizasyonu

Bu yöntem ile hidrojen peroksit ve gümüşün sinerjik olarak oluşturduğu bakterisidal etkinliğinden faydalanılması amaçlanır. Bu yöntem son yıllarda kullanılmaya başlandığı için heniz etkinlik düzeyi tam olarak belirlenememiştir (Bilim Lab., 2015).

1.13.2.2. Okside edici ajanlar

Bu yöntemde dezenfeksiyon amaçlı halojenler (klor, brom, iyot), klorindioksit, kloramin, ozon ve potasyum permanganat gibi değişik okside edici ajanlar kullanılmaktadır (Kim, vd., 2002).

Klorlama

Legionella bakterisi *E. coli* ve diğer koliform bakterilere göre klora daha dirençlidir. Şebeke su sistemlerinde klor oranı azdır. *L. pneumophila*'nın eradikasyonu için klor konsantrasyonunun 2-6 mg/L'ye çıkarılması gerekmektedir. Amip kisti içerisinde yer alan *Legionella* bakterisinin eradikasyonu için gerekli klor miktarı ise >50 mg/L dir. Klorun güçlü bir antioksidan olması avantajdır. Fakat biyofilm içerisindeki *Legionella* bakterisine etkisi zayıftır (Kim, vd., 2002).

Klor yönteminin dezavantajı 5-6 yıl klorlama yapılmış su sistemlerinde korozyon görülmesi ve ayrıca karsinojenik ve toksik etki oluşturabilmesidir (Kim, vd., 2002; Nakipoğlu, 1999).

Monokloramin

Serbest klor ve amonyağın suda doğru oranda karıştırılması ile uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem serbest klor ile biyofilm içindeki bakterilerin öldürülmesinde daha iyidir. İçme suyu dezenfeksiyonunda uzun yıllardır kullanılır (Kool, 2002).

Bu yöntemin avantajları; başlangıç dezenfeksiyonu serbest klordan daha yavaştır. Dağıtım sistemlerinde uzak mesafelerine dezenfeksiyon kalıntısını götürebilir. Serbest klordan daha az karsinojeniktir. Daha az tat ve koku problemine yol açar (Kool, 2002).

Dezavantajları ise, balıklar için toksik madde olması ve diyaliz suyunda kullanıldığında febril reaksiyona yol açmasıdır. Korozyona yol açmaz. *Legionella*'nın ortadan kaldırılmasında 4 ppm monokloraminin çok etkilidir (Kool, 2002).

Ozon

Bu yöntem (ozon) Avrupa'da yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari ozonatörler, var olan oksijeni triatomik fazdaki O_3 'e dönüştürürler. Bakteri DNA'sına zarar vererek etki göstermektedir. Dezavantajı hızlı bir şekilde etkisini kaybetmesidir. Kalıntı bırakmadığı için kolonizasyonun tekrarlanabilir. Klor kadar etkili bir yöntem değildir (Kim, vd., 2002).

Ozonun çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği araştırılmış, *Legionella* türleri, ozona karşı poliovirus ve *Escherichia coli* 'den daha dirençli, *Bacillus subtilis* sporlarından daha duyarlı bulunmuştur (Liu, vd., 1994).

1.13.2.3. Oksitlemeyen ajanlar

Oksitlemeyen ajanlar genellikle organik bazı bileşiklerdir. Glutaraldehit, 2,2-dibromo-3-nitropropionamit (DBNPA), isothiazolin, polihexametilen biguanit (PHMB) ve 2-bromo-2-nitropropionamit gibi oksitlemeyen biyositler bu amaçla kullanılır (Bilim Lab., 2015).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, *Legionella* türlerine karşı klorlu fenolik tiyoeter etkili bulunurken, glutaraldehit ve kuaterner amonyum bileşikleri etkisiz bulunmuştur. "Bromo-nitropropone-diol", "bromo-chloro-dimethylhy-dantoin" ve "isothiazolinon"lar ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise çelişkilidir (Liu, vd., 1994).

Oksitlemeyen biyositler daha kalıcı ve daha stabil etkinliğe sahip olmalarına karşın sistemin su kayıpları ve aktif maddelerin bozulmaları etkinliklerini azaltır. Oksitleyici olmayan biyosit uygulamalarında antimikrobiyal direnci engellemek amacıyla antimikrobiyal mekanizması farklı iki ajanın kombine kullanılması önerilir (Bilim Lab., 2015).

Çizelge 1.2. *Legionella* kontrolünde kullanılan metotların avantaj ve dezavantajları (Bilim Lab, 2015).

Metot	Avantaj	Dezavantaj
<20°C Sıcaklık	Basit, etkili ve kolay izlem, <i>Legionella</i> çoğalması önemli ölçüde azalır.	İçme suyu sistemleri ile sınırlıdır.
>50°C Sıcaklık	Basit, etkili ve kolay izlem	<i>Legionella</i> 'yı yok etmez.
Periyodik olarak 50-60°C'de sıcak su akıtılması	Basit, etkili ve kolay izlem	Soğuk su sistemlerinde uygulanamaz. Süreklilik gereklidir.
Sodyum-hidroklorid ile dozajlama	Kanıtlanmış, etkin dezenfeksiyon metodu. Kolay uygulanır.	Balıklar için toksik, tat ve koku etkisi, bakır korozyonunda artış gözlenir.
Monokloramin ile dozajlama	Klora göre daha kalıcıdır. Biyofilm katmanlarına nüfuz (penetrasyon)	Balıklar için toksiktir.
Klordioksit ile dozajlama	Kanıtlanmış, etkin dezenfeksiyon metodu.	Klorit oluşumu.
Hidrojen peroksit ile dozajlama	Uygulaması basittir.	Zayıf dezenfektan, mutajenik etki şüphesi
Bakır-gümüş iyonizasyonu	Öngörülen konsantrasyonlarda kullanıldığında etkin	Uygulama için pH ve sertlik uygunluğu, suyun bakır ve gümüş konsantrasyonunda artış
UV dezenfeksiyon	Dezenfeksiyon etkinliği mevcut	Kalıcı etki yok, biyofilm katmanlarını etkilemez
Ultrafiltrasyon	Biyolojik yığın ve partiküllerin uzaklaştırılmasında etkili	Filtre dışı kısımlarda etkisiz, sedimen üzerinde etkinliği sınırlı
Sabit filtre kullanımı	Fiziksel bariyer, kolay kurulum, sıcak ve soğuk sistemler için uygun	Sadece belirlenen alanlar için kullanım, düzenli olarak değiştirilmeli, pahalı
Akış sırasının ısı ile pastörizasyon	Basit uygulama, kısa dönemde iyileştirici önlem, dezenfeksiyon bariyeri	<i>Legionella</i> üzerinde etkisi geçici, biyofilmlere etkisiz
Okside edici olmayan biyositler	Soğutma sistemleri için kanıtlanmış teknik	İçme suları için uygun değildir. Bakteri direnci gelişebilir.

1.14. Ağır Metal

1.14.1. Ağır metaller

Gerçekte ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 ' ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, cıva ve çinko olmak üzere 60 tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapis olarak bulunurlar (Sevgi, 2007).

Her ne kadar metallerin yoğunluk değeri üzerinden hareketle ekolojik sistem üzerindeki etkileri tanımlanmaya/gruplandırılmaya çalışılıyorsa da gerçekte metallerin yoğunluk değerleri onların biyolojik etkilerini tanımlamaktan çok uzaktır. Örneğin yoğunluğu $3,65 \text{ g/cm}^3$ olan Baryumun veya $4,51 \text{ g/cm}^3$ olan titanyumun biyolojik sistemlere kadmiyum ($8,65 \text{ g/cm}^3$), kurşun ($11,34 \text{ g/cm}^3$) veya lantanit grubu metallerden ($5,25 - 9,84 \text{ g/cm}^3$) çok farklı etkide bulunduğu kesindir (Sevgi, 2007).

Bir elementin yoğunluğu aslında periyodik sistemdeki (grup ve gruptaki sıra) yerinin, kimyasal özellikleri de elementin ait olduğu grubun fonksiyonudur. Metallerin ekolojik sistem üzerine etkilerinden bahsederken aslında metalin ait olduğu grubun ele alınması ve bu özelliğin vurgulanması biyolojik etki açısından çok daha anlamlıdır (Sevgi, 2007).

1.14.2. Ağır metallerin önemi

Biyolojik proseslere katılma derecelerine göre ağır metaller yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların ağır metaller organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir. Bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinlerle alınmaları zorunludur (Bigersson, vd., 1988). Fakat yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonlarda bile yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedir (John, vd., 1996).

Ağır metallerin yaşamsal olup olmadığı dikkate alınan organizmaya bağlıdır. Örneğin; nikel bitkiler açısından toksik etki gösterir fakat hayvanlarda iz elementi olarak bulunmaktadır. Ağır metallerin etki mekanizması bazı sistemlerde derişime bağlı olarak değişir. Örneğin krom başta insan bünyesinde olmak üzere, canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon kademesine ve oksidasyon kademesindeki kimyasal özelliklerine ve bulunduğu ortamdaki fiziksel yapısına bağlıdır. Bu tür organizmalarda metalin derişimi göz önüne alınmalıdır. Kobalt, kalsiyum, krom, bakır, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel ve çinko gibi metaller ihtiyaç duyulan besinler olduğu için gereklidir. Bu metallerin dışında kalanların (gümüş, alüminyum,

kadmium, civa ve kurşun) herhangi bir biyolojik fonksiyonu bulunmamaktadır (Bigersson, vd., 1988).

Bazı metaller enzimlerin yapısına katılarak önemli biyolojik reaksiyonların katalizlenmesinde rol alır ve hücre için önemlidir. Bazıları bakteri hücre duvarında yer alarak ozmatik balansın korunmasında görev alır, bazıları protein yapısına katılır (Hughes ve Poole, 1989; Ji ve Silver, 1995). Bakır, demir, ve nikel gibi metaller redoks prosesinde görev alır. Magnezyum ve çinko gibileri çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize eder. Kobalt, magnezyum, nikel ve demir çok çeşitli fonksiyonları olan kompleks moleküllere katılırlar. İntrasellüler ozmotik basıncın düzenlenmesinde görev alan metaller ise sodyum ve potasyumdur (Sevgi, 2007).

Ağır metallerin insan metabolizmasında oluşturdıkları etki ve etkin oldukları aşamaları ana sistemler açısından kısaca ele alırsak bunlar;

- Kimyasal reaksiyonlara etki edenler
- Fizyolojik ve Taşınım sistemlerine etki edenler
- Kanserojen ve mutojen olarak yapı taşlarına etki edenler
- Alerjen olarak etki edenler
- Spesifik etki edenler olarak sıralamak mümkündür (Sevgi, 2007).

1.14.3. Ağır metal ve antibiyotik dirençlilik mekanizmaları

Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir (Harnett, vd., 1984; McEntee, vd., 1986). Her iki tip dirençte organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği bazı durumlarda aynı plazmid kökenli olabilmektedir. Fakat metal dirençliliği antibiyotik dirençliliğinden önce rapor edilmiştir (Ji ve Silver, 1995).

Metal dirençlilik mekanizmaları mikroorganizmalarda; geçirgen bariyer sayesinde metallerin hücre dışına bırakılması, aktif transport ile metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması, intrasellüler ayırım, metallerin enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirilmesi ve hücresel hedeflerin metal duyarlılıklarının azaltılması şeklinde olabileceği bildirilmiştir (Silver, 1992; Bruins, vd., 2000). Fakat doğal direnç metaller veya hücre membran bileşenlerinde değişiklikler ile etkileşimi önlemek için, hücresel bileşenlerde mutasyonal formlar alabilirler (Rouch, vd., 1995).

Mikroorganizmalar bir veya birkaç direnç mekanizmasının bir kombinasyonuna sahip olabilmektedirler. Birden fazla direnç mekanizmasına sahip olan bir mikroorganizmanın bir metale karşı hangi mekanizmayı seçeceği, oluşacak ara ürün veya son ürünün toksisitesine bağlıdır (Silver, 1998). Toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının oluşturulmasında mikroorganizmalarda bulunan plazmid DNA'nın kromozomal DNA'dan daha etkili olduğu belirtilmektedir (Silver, 1992).

Seçici-geçirgen bariyer sayesinde, metallerin hücre dışında bırakılması; mikroorganizmanın membranında, hücre duvarında veya zarfında bir takım değişiklikler meydana getirilmektedir ve bu mekanizma sayesinde mikroorganizma metale duyarlı olan önemli hücresel komponentlerini korumaktadır. Örneğin, *E. coli* ile yapılan bir çalışmada bakterinin membran kanal proteini olan porinlerinin sayısını azaltmak suretiyle gümüş iyonlarının hücre içine girişinin engellendiğini bildirmiştir (Li, vd., 1997).

1.15. Antimikrobiyal Aktivite

Düşük molekül ağırlıklı ve organik doğal ürünler olan mikroorganizmalar tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler, seçici toksisiteye sahip olduklarından çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zarar verip, makroorganizmaya zarar vermezler. Biyolojik kökenli ikincil metabolitler olan antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici “bakteriostatik” veya “fungostatik” olabildikleri gibi mikroorganizmanın ölümüne neden olan “bakterisit” veya “fungisit” ler de olabilirler (Schlegel, 1992; Demain, 1999).

Bu maddeler günümüzde tedavi amaçlı olarak tıp alanında antibiyotik olarak kullanılmaktadırlar. Son zamanlarda antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı dirençli mikroorganizmaların varlığı tespit edilmektedir. Mikroorganizmalara karşı tek yönlü etkili olan antibiyotiklerin etkisi zayıf kalmaktadır (Demain, 1999).

1.15.1. Siprofloksasin ve levofloksasinin etki ve direnç mekanizması

Sentetik bir antibiyotik olan florokinolonların en eski üyesi 1962 yılında idrar yolu infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaya başlanan nalidiksik asittir. Bu antibiyotikler etkilerini bakteri sitoplazmasında bulunan ve bakterinin yaşamını sürdürebilmesi için gerekli bir enzim olan deoksiribonükleik asit giraz (DNA giraz) ve topoizomera IV enzimini inhibe ederek gösterirler (Hooper, 1999).

Bu antibiyotiklere karşı direnç,

- Hedef enzimin değişikliğe uğraması
- Dış membran geçirgenliğinin azalması şeklinde iki mekanizma ile gerçekleşmektedir.

Genel olarak Gram negatif bakterilerde kinolonlara karşı direnç gelişimi birincil olarak DNA giraz enzimini kodlayan gyr A geninin bir ya da daha fazla spontan mutasyona uğraması sonucu oluşmaktadır (Hooper, 1999; Wiedemann, vd., 1994). İkincil hedef topoizomera IV enzimidir. Stafilokok ve streptokoklarda ise topoizomera IV birincil hedef, giraz enzimi ise ikincil hedef olarak belirlenmiştir (Moffie ve Mouton, 1988).

1.15.2. Doksisiklinin etki ve direnç mekanizması

Yapıca birbirine çok benzeyen ve tetrasiklik bir bileşik olan naftasen karboksamid'den türeyen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. 1948 yılında *Streptomyces aureofaciens*'ten elde edilen klortetrasiklin ilk tetrasiklin grubu antibiyotiklerdir. Oksitetrasiklin, tetrasiklin ve dimetilklortetrasiklin gibi diğer doğal tetrasiklinler daha sonra tedaviye girmiştir. Yarı-sentetik tetrasiklinler olan metasiklin, doksisiklin ve minosiklin bunları izlemiştir. Bu antibiyotikler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki oluştururlar. Ribozomların 30S alt birimine bağlanarak, 50S alt biriminin akseptör noktasına transfer RNA'nın bağlanmasını bloke ederler ve peptid zincirine amino asitlerin eklenmesini engelleyerek etki gösterirler (Chopra, vd., 1992).

Tetrasiklinlere karşı gelişen direncin başlıca dört mekanizma ile oluştuğu belirlenmiştir. Bu mekanizmalar;

- Bakteri sitoplazma membranında yerleşmiş bulunan ve hücre içine tetrasiklin moleküllerinin aktif transportunu yapan taşıyıcı proteinin işlevini yitirmesi,
- Bakterinin antibiyotiği inaktive eden enzimler salgılaması,
- Hücre membranında tetrasiklinleri dışarı pompalayan, enerjiye bağımlı aktif transport sisteminin oluşumu,
- Ribozomu koruyan proteinlerin oluşumuyla antibiyotiğin ribozomlara girişlerinin engellenmesidir (Spear, vd., 1992).

1.16. Çalışmanın Amacı

Kütahya ilinde bulunan doğal su ortamlarından su örnekleri toplanarak öncelikli olarak *Legionella* bakterisinin bulunma sıklığının belirlenmesidir. Şüpheli izolatların tür ve serogrup düzeylerinin ortaya konmasıdır. Elde edilen izolatların eğer varsa sekonder metabolit üretim

yeteneklerinin araştırılması; *Legionella* bakterisi serbest yaşadığı gibi diğer canlılarla ortak yaşam veya biyofilm oluşturma yeteneklerine sahiptir. Bu nedenle sekonder metabolit üretim yeteneklerinin çeşitli mikroorganizma gruplarına karşı belirlenmesi önem arz etmektedir.

Çevredeki ağır metallerin toksik etki seviyelerinin varlığı bütün canlılar için olumsuz etki oluşturabilmektedir. Metallerin toksisitesi, makromolekül, metabolit ve hücre organelleri ile birlikte biyolojik sistemlerdeki yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine bağlıdır. Öte yandan ağır metallerin toksik etkisine karşı mikroorganizmaların göstermiş olduğu direnç mekanizmaları, antibiyotik dirençliliği ilede bağdaştırılmaktadır. Bu amaçla doğal su ortamlarından izole edilen *Legionella* bakterilerinin çeşitli ağır metaller ve antibiyotiklere karşı dirençleri araştırılmıştır.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Biyolojik materyaller

Çalışmamızda, Kütahya bölgesinde bulunan doğal su ortamlarından (yalak suyu, kuyu suyu, yağmur su birikintisi, göl ve akarsu) 2016 yılının Haziran ve Eylül ayları boyunca toplanmıştır.

Metal toleranslılık testinde ve antibiyotik dirençlilik testinde pozitif kontrol için, kültür koleksiyonundan temin edilen *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.

2.1.1.1. Sekonder metabolit aktivite belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar

İzole edilen *Legionella* spp. izolatlarının sekonder metabolit aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Sekonder metabolit üretiminin belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar.

Mikroorganizma İsmi	Kodu	Kaynağı
Gram Pozitif Bakteri		
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 7064	Amerikan Kültür Koleksiyon
<i>Bacillus subtilis</i>	NRLL B – 200	ARS Kültür Koleksiyonu
<i>Bacillus licheniformis</i>	NRRL B-1001	ARS Kültür Koleksiyonu
<i>Bacillus mycoides</i>	NRRL B-4379	ARS Kültür Koleksiyonu
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Amerikan Kültür Koleksiyon
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Amerikan Kültür Koleksiyon
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Yabani)	Labaratuvar izolatu (yoğurt’dan izole edilmiştir)
Gram Negatif Bakteri		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	Amerikan Kültür Koleksiyon
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Amerikan Kültür Koleksiyon
<i>Escherichia coli</i>	NRLL 3704	ARS Kültür Koleksiyonu
<i>Escherichia coli</i>	(Yabani)	Labaratuvar izolatu (yoğurt’dan izole edilmiştir)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	NRRL 406	ARS Kültür Koleksiyonu
Maya ve Küf		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Yabani)	Labaratuvar izolatu
<i>Saccharomyces boulardii</i>	(Yabani)	Labaratuvar izolatu

2.1.2. Kimyasal materyaller

2.1.2.1. Ağır metal toleranslık testinde kullanılan ağır metaller

Ağır metal toleranslık testinde kullanılan ağır metallerin tuzları aşağıda verilmiştir.

- 1) $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 2) $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 3) $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 4) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 5) $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 6) PbCl_2
- 7) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 8) $\text{CdCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

2.1.2.2. Kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik dirençlilik testinde kullanılan antibiyotikler toz ve disk halinde olarak iki farklı grup kullanılmışlardır.

Disk Halindeki Antibiyotikler (Oxoid)

1. Amikasin (AK 30 μg)
2. Ampisilin (AMP 10 μg)
3. Gentamisin (CN 10 μg)
4. Tetrasiklin (TE 30 μg)
5. Ofloksasin (OFX 5 μg)
6. Sefotaksim (CTX 30 μg)
7. Kanamisin (K 30 μg)
8. Sulbaktam (SAM 10 μg)
9. İmipenem (IMP 10 μg)
10. Eritromisin (E 30 μg)

Toz Halindeki Antibiyotikler

1. Siprofloksasin
2. Doksosiklin
3. Levofloksasin

2.1.3. Besiyerleri

1. BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) Agar Besiyeri (Oxoid)

Maya özütü	10.0 g
Aktif Kömür	2.0 g
α ketoglutarat, monopotasyum tuzu	1.0 g
ACES buffer	10.0 g
(N-2-acetamido-2-aminoethanosulfonic acid) Potasyum hidroksit	2.8 g
L sistein hidroklorid monohidrat	0.4 g
Demir (III) pirofosfat ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$)	0.25 g
Agar	12.0 g
Distile su	1000 mL

Legionella cinsi bakterilerin izolasyonu için kullanılan besiyerleridir (İğnak, 2007).

2. Kanlı Agar (Oxoid CM0055)

Lab-Lemco' Powder	10 g
Pepton	10 g
Sodyum klorid	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri hazırlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 50°C'ye soğutulmuş ve üzerine belirli miktarda defibrine kan ilave edilerek steril petrilere dağıtılmıştır. BCYE besiyerinde üreyen şüpheli kolonilerin kontrolünde kullanılmıştır. Şüpheli kolonilerden kanlı agar BCYE besiyerine pasaj yapılmış, BCYE'de üreme gösterip, kanlı agarda üremeyen koloniler olası *Legionella* cinsi olarak düşünülmüştür (İğnak, 2007).

3. Nutrient Agar

Et ekstrakt	1.0 g
Maya ekstraktı	2.0 g
Pepton	5.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Agar	15.0 g
Saf su	1000 mL

Legionella cinsi bakterilerin kısa süreli pasajlama işleminde kullanılmıştır (İğnak, 2007).

4. Nutrient Broth

Pepton	5.0 g
Et ekstrakt	3.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri hazırlanarak 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri izole edilen *Legionella* cinsibakterilerinin identifikasyon teslerinde kullanılmıştır (Sneath, 1986).

Mikrodilasyon yönteminde kullanılmak üzere çift kuvvetli Nutrient broth hazırlanmıştır. Bu besiyerini hazırlarken hacim aynı kalmak koşulu ile besiyerinden 2 kat miktar tartım yapılarak hazırlanıp steril edilmiştir.

5. Jelatin Besiyeri

Jelatin	120 g
Et özeti	3 g
Pepton	5 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri hazırlanıp otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 115°C'de 10 dakika süre ile steril edilmiştir. *Legionella* cinsi bakterilerin jelatinaz enziminin varlığının tayininde kullanılmıştır (Sneath, 1986).

6.Yarı-Katı Agar

Pepton	5.0 g
Et ekstrakt	3.0 g
Agar	4.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri hazırlanıp su banyosunda 100°C de eritilmiştir. Sıvı halde ikenkapaklı tüplere 5'şer mL olarak dağıtılmıştır. Hazırlanan tüpler otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Tüpler dışarıda dik bir şekilde bırakılarak katılaştırılmıştır. Hazırlanan besiyeri izole edilen *Legionella* cinsi bakterilerin hareketlilik testinde kullanılmıştır (Sneath, 1986).

7. Simmons Sitrat Agar

Amonyum dihidrojen fosfat	1.0 g
Monopotasyum fosfat	1.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Sodyum sitrat	2.0 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Bromtimol mavisi	0.08 g
Agar-agar	13.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri hazırlanmış, su banyosunda erimesi sağlanmıştır. Sıvı haldeyken tüplere dağıtılmıştır. Hazırlanan tüpler otoklavda steril edilmiştir. Tüplerin, dışarıda henüz sıvı iken 1-1.5 cm yüksekliğinde bir çubuğun üzerine yatırılarak katılaşmaları sağlanmıştır. Hazırlanan besiyeri berrak ve yeşil renkte olup, bu besiyeri izole edilen *Legionella* cinsi bakterilerinin identifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

8. Triptonlu Su (Merck 1.10859)

Kazein pepton	10.0 g
NaCl	5.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri uygun miktarda tartılıp, distile suda çözülmüş, deney tüplerine dağıtılmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. İdentifikasyon (indol) testinde kullanılmıştır (Tamer vd., 1989).

9. Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri (MR-VP) Bazal Besiyeri

Poliipepton	7.0 g
Dipotasyum fosfat	5.0 g
Glukoz	5.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri tartılıp su içerisinde çözündükten sonra %0.01 oranında Metil Red indikatörü besiyerine eklenmiş, tüplere dağıtılmıştır. Otoklavda sterilize edildikten sonra, 0,1 mL'lik karbohidrat çözeltisi ilave edilerek hazırlanmıştır. Karbohidrat çözeltisi 2,5 g/10 mL konsantrasyonunda hazırlanarak filtrasyon ile sterilize edilmiştir. Bu ortam identifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Sneath, 1986).

10. Saklama Besiyeri (%10'luk skim-milk)

Skim-milk	10g
Distile su	100 mL

110°C'de 10 dakika otoklavlanmıştır. Steril olan eppendorf tüplerinde steril şartlar altında hazırlanan besiyerinden 1000 µL konularak -20°C'de stok oluşturularak muhafası sağlanmıştır (Ulusal Mik. Standartları, 2015).

2.1.4. Çözeltiler ve nötralizeedici maddeler

Çözelti 1. Tampon Çözeltisi

A. 0.2 M Hidroklorik Asit Çözeltisi

HCl	8.28 mL
Distile su	1000 mL

Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

B. 0.2 M Potasyum Klorür Çözeltisi

KCl	0.745 g
Distile su	1000 mL

Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

C. 1 M Potasyum Hidroksit Çözeltisi

KOH	5.6 g
Distile su	10 mL

Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Bütün çözeltiler hazırlandıktan sonra A çözeltisinden 3.9 mL, B çözeltisinden 25 mL alınarak 100 mL saf suya tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH’ı C çözeltisi ile 2.2 ye ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti cam malzeme içerisinde karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir. Bu çözelti *Legionella* cinsi izolasyonunda diğer bakterilerden elemine etmek (dekontaminasyon) için kullanılmıştır (Zeybek, 2000).

Çözelti 2. Page Sale

NaCl	0.120 g
KH ₂ PO ₄	0.136 g
Na ₂ HPO ₄	0.142 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.004 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.004 g
Saf su	1000 mL

Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan çözelti cam malzeme içerisinde karanlık ortamda muhafaza edilmiştir. Filtrasyon işleminde asidi nötralize etmek amacıyla kullanılmıştır (Zeybek, 2012).

Çözelti 3. Fizyolojik Tuz çözeltisi

NaCl	8.5 g
Saf su	1000 mL

Otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir (Özçelik, 1995).

Çözelti 4. Mc Farland Standardı

BaCl ₂ (%1.175, 0.048 M)	0.5 mL
H ₂ SO ₄ (%1, 0.18 M)	99.5 mL

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırıldığında elde edilen bulanık çözelti spektrofotometre de 625 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu dalga boyunda absorbans değeri 0.08-0.10 aralığına denk gelmiştir. Bu değer 0.5 Mc Farland standardı olarak kabul edilmiştir. Standardın bulanıklılığı ile test mikroorganizma süspansiyonlarının bulanıklılığı çıplak göz ile karşılaştırılarak ayarlanmıştır. 0.5 Mc Farland standardı mL’de 10⁸ bakteri varlığını göstermiştir (NCCLS, 1990).

Çözelti 5. Potasyum Hidroksit Solüsyonu

KOH	40.0 g
Kreatin	0.3 g
Saf su	100.0 mL

Önce KOH’i distile suda karıştırarak ve soğutarak çözdürülmüş, daha sonra kreatin eritilmiştir (Özçelik, 1995).

Çözelti 6. Kovacs İndol Çözeltisi (Merck)

Amil veya isoamil alkol (saf)	150.0 mL
Paradimetil-aminobenzaldehid	10.0 g
HCL	50.0 mL

Amil alkol su banyosunda 60°C’a ısıtılır, içine paradimetil amino benzaldehit ilave edilmiştir. Erimesi bitene kadar ısıtmaya devam edilmiştir. Erime tamamlanınca soğutulup, hidroklorik asit damla damla ilave edilmiştir. Hazır bulunan çözelti, buzdolabında ve karanlıkta

saklanmıştır. *Legionella* bakterisinin identifikasyonunda indol testinde kullanılmıştır (Tamer, vd., 1989).

Çözelti 7. Metil Red pH İndikatörü

Etil alkol (%96)	300.0 mL
Metil red	0.1 g
Saf su	200.0 mL

Metil Red 0.1 g %96'lık etil alkol 300 mL distile su 200 mL bileşimindedir. İndikatör önce alkol içerisinde çözülmüş, sonra distile su ilave edilmiştir (Uçan ve Erganiş, 2005).

Çözelti 8. %30'lık H₂O₂ çözeltisi katalaz testinde kullanılmıştır.

Çözelti 9. %96'lık Etanol çözeltisi gram boyamada kullanılmıştır.

Çözelti 10. Lügol Çözeltisi

İyot	1.0 g
Potasyum iyodür	2.0 g
Saf su	300.0 mL

Bileşenler tartılmış ve distile su ile çözülmüştür. Potasyum iyodür ve iyotun çözülmesi için 24 saat beklenmiştir (Özçelik, 1995).

Çözelti11. TTC (Triphenytetrazolium klorür)

250 mg 2,3,5- Triphenytetrazolium klorür üzerine etanol (%96) ilave edilerek son hacim 100 mL ye ayarlanmıştır (Koç, 2012).

2.1.5. Boyalar

Boya 1. Kristal Viyole

Çözelti A

Amonyum oksalat	0.8 g
Saf su	80.0 mL

Çözelti B

Kristal (Jansiyen) viyole	2.0 g
Etil alkol (%95)	20.0 mL

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmış ve bu iki çözelti karıştırılmıştır. Daha sonra saf su ile 1:10 oranında sulandırılmıştır. Filtre kağıdından süzülerek hazır hale getirilmiştir (Özçelik, 1995).

Boya 2. Safranin Boyası

Safranin (%95 lik etanolde %2.5'luk çözelti)	10 mL
Saf su	100 mL

Safranin saf su içerisinde iyice çözülmüştür (Özçelik, 1995).

2.2. Metod

2.2.1. Su örneklerinin alınması

Alınan su örnekleri steril edilmiş kahverengi cam kavanozlara örnekler 100mL olacak şekilde steril şartlarda alınmıştır. Kavanozlar tam doldurulmadan ve ağzı sıkıca kapatılıp güneş ışığına maruz bırakmadan, soğuk zincir de laboratuara ulaştırılmıştır. Örnekler en kısa zamanda mikrobiyolojik analize alınmıştır.

2.2.2. *Legionella* cinsi bakterilerin izolasyonu

2.2.2.1. *Legionella* cinsi bakterilerin izolasyon basamakları

Filtrasyon: Toplanan su örneklerinin izole edilebilmesi için filtrasyon işlemi uygulanmıştır. Bu yöntem; sularda bulunan mikroorganizmaları tutabilecek por çapına sahip bir membran filtreden vakum sistemi kullanılarak hızlıca süzülmesi işlemidir. Bu işlem için üçlü manifold düzeneği kurulmuştur. Düzenegın çelik kısımları otoklavda steril edilmiştir. Su örnekleri selülozdan yapılmış, porları 0,45 µm ve çapı 47 mm olan siyah renkli filtreler kullanılarak sistemden geçirilmiştir. Her bir örneğın süzölme işleminden sonra düzeneğın içerisinde kaynar su geçirilip steril edilmiş, düzeneğın çabuk soğuması için steril saf su kullanılmıştır (Bartie, 2003). Düzeneğın hareketli kısımları filtrasyon işlemi bittikten sonra otoklavda steril edilerek bir sonraki kullanım için muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1. Üçlü manifold sistemi.

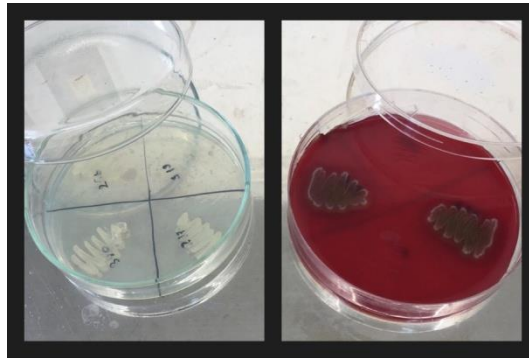
Dekontaminasyon; Toplanan su örneklerinde *Legionella* cinsi dışında farklı bakterilerde olduğu ve bu bakterilerden üreme hızı daha yavaş olan *Legionella* bakterisini baskılayıp hızla üreme gösterdikleri bilinmektedir. Topladığımız su numunelerinde bunu önlemek için asit ile muamele işlemi uygulanmıştır. Filtrasyon işleminde öncelikle toplanan su örnekleri filtreden geçirilmiş, ardından 30 mL tampon çözeltisi filtre üzerine dökülmüş ve 5 dk bekletildikten sonra süzölmüştür. Daha sonra asidi nötralize etmek için 20 mL page sale ilave edilip 1-2 dk bekletildikten sonra filtreden geçirilmiştir. Böylece filtre üzerinden *Legionella* cinsi dışındaki bakteriler uzaklaştırılmıştır.

İnkübasyon; Su örneği içerisinde bulunan tüm mikroorganizmaları üzerinde tutmuş olan filtre, arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) seçici besiyerine steril pens yardımı ile yerleştirilmiştir. Petri kapları polietilen poşetlerin içerisine konularak 37°C 'de 10 gün inübasyona bırakılmıştır. Poşetlerin içerisinde muhafaza edilmesinin nedeni nemli %5'lik CO₂ içeren ortam oluşturmaktır. Diğer taraftan inkübasyon sırasında petrilerin kuruması önlenmesi için etüvün içerisine bir kap içerisinde su konulmuştur.



Şekil 2.2. BCYE agarda *Legionella* bakterilerinin üreme özelliği.

İnkübasyon sonrasında yüzeyleri düzgün, gri-beyaz renkli, hafif bombeli, camısı görünümde ve mukoid yapıdaki koloniler şüpheli olarak belirlenmiştir. Şüpheli olarak belirlenen kolonilerden öze yardımıyla Nutrient ve kanlı agara ekimler yapılmış ve inkübasyona bırakılmıştır. 37°C 'de 24-48 saat sonunda Nutrient agarda üreme gösterip kanlı agarda üreme göstermeyen örnekler *Legionella* cinsi şüphelisi olarak belirlenmiş ve bu örneklerle gram boyama yöntemi uygulanmıştır. Gram boyama işleminin sonunda belirlenen örneklerle lateks aglutinasyon testi uygulanarak tür ve serogrubu belirlenmiştir (Bartie, 2003; Edelstein, 1982).



Şekil 2.3. Şüpheli *Legionella* cinsi kolonilerininkanlı agar ve nutrient agar üreme özelliği.

Muhafaza; İzolasyon sonunda elde edilen izolatların +4°C 'de BCYE agar veya Nutrient agarda ve -20 °C'de %10'luk skim-milk besiyeri içeren eppendorf tüplerinde stok oluşturarak mikroorganizmaların muhafazası sağlanmıştır.

Gram boyama

Temiz bir lam üzerine bir damla su damlatılmıştır. Saf *Legionella* cinsine ait kültürlerden steril bir öze yardımıyla bir miktar alınmış ve su damlasının içerisinde dairesel

hareketlerle yayılmıştır. Hazırlanan preparat önce havada kurutulmuş ardından bakteriyal film üst kısımda kalacak şekilde 2-3 kez alevden geçirilerek fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Hazırlanan preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılmış ve 2 dk bekletirilmiştir. Su ile yıkanan preparata lügol çözeltisi damlatılıp 1 dk bekletildikten sonra alkol ile dekolarizasyon işlemi yapılmıştır. Bu işleminden sonra safranin boyası damlatılarak 2-3 dk bekletilmiş ve preparat su ile yıkanmıştır (klasik gram boyama işleminde safraninle boyama için 30 saniye yeterlidir). Kurumaya bırakılan preperat immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelenmiştir. Yapılan boyama işlemi sonucunda, örneklerde gözlenen zayıf Gram negatif, çomak şeklinde bakterilerin görülmesi durumunda lateks aglütinasyon işlemi uygulanmıştır (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

2.2.3. *Legionella* cinsi bakterilerin tür ve serogrup düzeyinde tanımlanması

2.2.3.1. Lateks aglütinasyon deneyi

Lateks Aglütinasyon Testi, spesifik *Legionella* cinsi hücre duvar antijenleri varlığında aglütinasyon oluşturan, mavi lateks partikülleri ile kaplanmış antikorlar içermektedir. Gözle görülebilir aglütinasyon sayesinde, baskın patojenik *Legionella* tür ve serotiplerinin basit ve hızlı bir şekilde saptanması amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 2.2. *Legionella* tür ve serogrup düzeyinde belirlenmesinde kullanılan Lateks Aglütinasyon test kitinin içindekiler (İğnak, 2007).

<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 1 test reagent	<i>L. pneumophila</i> serogroup 1 antijeni ile reaktif, mavi lateks partikülleri ile kaplı spesifik tavşan antikoru.
<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 2-15 test reagent	<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 2-15 antijeni ile reaktif, mavi lateks partikülleri ile kaplı spesifik tavşan antikoru.
<i>Legionella</i> spp. test reagent	<i>L. longbeachae</i> serogrup 1 ve 2, <i>L. bozemanii</i> serogrup 1 ve 2, <i>L. dumoffii</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. jordanis</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. anisa</i> ile reaktif, mavi lateks partikülleri ile kaplı spesifik tavşan antikoru.
Pozitif kontrol süspansiyonu	Buffer içinde <i>Legionella</i> hücrelerinin polivalan süspansiyonu
Negatif kontrol süspansiyonu	Buffer içinde test reagentleri ile reaktif olmayan <i>Legionella spiritensis</i> hücrelerinin süspansiyonu
Kontrol lateks	Mavi lateks partikülleri ile kaplı reaktif olmayan tavşan globulini
Süspansiyon tamponu	Fosfat tampon solüsyonu
Paket içerisinde 50 adet tek kullanımlık kart bulunmaktadır. Kullanıma kadar buzdolabında bekletilmelidir. Kullanılmadan 20 dakika önce oda sıcaklığında bekletilmelidir.	

Öncelikle kit kartı üzerindeki uygun boşluklara numaralandırmalar yapılmıştır. Daha sonra kart üzerinde yer alan dairelerle sınırlandırılmış (3 farklı bölmeden oluşan) her bir yuvarlak bölmenin ortasına gelecek şekilde NaCl çözeltisinden birer damla damlatılmıştır. Şüpheli *Legionella* cinsi kolonilerinden kit içerisinde yer alan plastik çubuklar yardımıyla alınarak, 3 bölme içine ayrı ayrı homojen bir şekilde süspansiyon edilerek yayma işlemi yapılmıştır. Ardından 1. dairenin içerisine serogrup 1 solüsyonundan damlatılmış ve dairesel hareketler yapılarak (dairenin dışına taşmamasına özen gösterilerek) çökelmenin olup olmadığı gözlemlenmeye çalışılmıştır. Aynı işlem ikinci dairenin içerisine serogrup 2-15 solüsyonu ve 3. dairenin içerisine de spp. serogrup solüsyonundan damlatılarak yapılmıştır. Damlatma işlemi yapılırken gerek NaCl çözeltisi gerekse serogrup solüsyonları için hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilmiştir.

Bir dakika içinde gözle görülebilen aglütinasyon pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. Kullanılan deney ayıraçları bakterinin hangi tür ve hangi serogruptan olduğunu göstermiştir. Bakterinin lateks süspansiyonu ile karıştırılarak yapılan testte aglütinasyon oluşumunun gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Fields, 1997).



Şekil 2.4. Lateks aglütinasyon testi *Legionella* spp. pozitif sonuç.

2.2.4. *Legionella* cinsi bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi

2.2.4.1. Hareketlilik testi

Yarı katı agarlı besiyeri hazırlanarak deney tüplerinin içerisine 5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Sterilizasyon işlemi uygulandıktan sonra dik bir konumda bırakılarak donması sağlanmıştır. Teste tabii tutulacak izolatlar steril şartlar altında iğne uçlu öze yardımıyla alınıp besiyerinin tam ortasından dibine 5mm kalacak şekilde ekim yapılmıştır.

Ekim yapılan tüpler 48-72 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Hareket yeteneği olan kültürlerin yer aldığı deney tüplerinin içerisinde, besiyerinin ekim çizgisinin dışında yanlara doğru üreme olacağından besiyerinde dalımsı bir görünüm meydana gelmiştir. Hareket yeteneği olmayan kültürlerde sadece ekim yapılan çizgi hattında üreme gözlemlenmiştir ve besiyeri parlak görünümünü korumuştur (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

2.2.4.2. Katalaz testi

Steril bir öze yardımıyla izolatlar bir miktar alınarak temiz bir lamın üzerinde %30’luk H₂O₂ ilave edilip karıştırıldığında, hava kabarcıklarının çıkışı testin pozitif olduğunu göstermiştir.

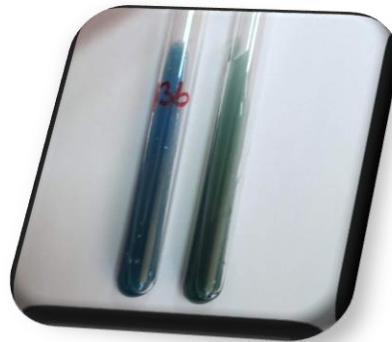


Şekil 2.5. Katalaz testi pozitif sonuç.

2.2.4.3. Sitrat testi

Simmons Sitrat Agar hazırlanıp deney tüplerinin içerisine 5 mL olarak konulmuş ve sterilizasyon işlemine tabii tutulduktan sonra yatık olarak donmaya bırakılmıştır. Steril bir öze yardımıyla saf *Legionella* cinsine ait kültürden alınarak hazırlanan yatık agarların yüzeyine ekim yapılmış ve 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonucunda yeşil renkli olan besiyerinin mavi renk alması ve ekim hattı boyunca üreme gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiş, renk değişimi gözlemlenmeyen örnekler negatif olarak tespit edilmiştir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

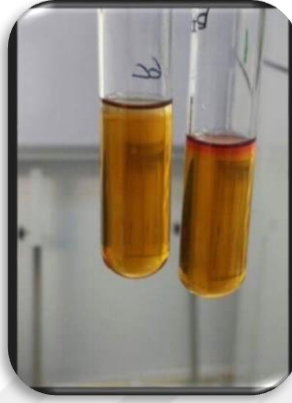


Şekil 2.6. Sitrat testi Pozitif (mavi), Negatif (yeşil) sonuç.

2.2.4.4. İndol testi

Deney tüplerine 5 mL triptofanlı besiyeri konulup *Legionella* kolonilerinden inokülasyon yapılmıştır. Hazırlanan tüpler 37°C sıcaklıkta 72 saat (3 gün) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 0,5 mL Kovacs ayırıcı ilave edilmiştir. Tüplerin üst kısmında

bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif, sarımsı bir halkanın oluşması isenegatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).



Şekil 2.7. İndol testi negatif (solda), pozitif (sağda) sonuç.

2.2.4.5. Jelatinaz testi

Hazırlanan jelatinli besiyerlerine numaralandırma işlemi yapıldıktan sonra saf *Legionella* kültürlerinden alınarak ekim yapılmış, tüpler 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ekim yapılmayan bir deney tüpü buz dolabında kontrol amaçlı kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından tüpler 30-45 dakika buzdolabında bekletilmiş ve yeniden katılaşmaları beklenmiştir. Ekim yapılan tüplerin katılaşmaması pozitif sonuç verirken katılaşan örnekler negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

2.2.4.6. Karbonhidrat fermentasyon testi

%0.5 oranında Metil red içeren karbonhidrat besiyeri 200 mL olarak hazırlanmıştır (Her bir şeker için ayrı ayrı hazırlanmıştır). Testte kullanılacak karbonhidratlar; L (+) Arabinoz, D (-) fruktoz, D (-) glikoz, D (+) ksiloz, Maltoz ve Sakaroz gerekli miktarda tartılıp 50mL steril distile suda çözülmüştür. Otoklavdan çıkartılan besiyeri içerisine filtrasyon yöntemiyle ilave edilmiştir. Steril deney tüplerin içerisine mikropipet yardımıyla 1000 µL konularak saf *Legionella* kültürlerinden ekim yapılmıştır. 37°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir.

Bu testte kullanılan Metil Red indikatörü pH 6.2’de sarı, pH 4.2 ve altında ise kırmızı bir renk oluşturmuştur. Besiyeri renginin değişmesi asit oluşumunu yani test edilen şekerin kullanıldığını göstermiştir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

2.2.4.7. *Legionella* cinsi izolatlarının sekonder metabolit üretimi

Agar blok yöntemi ile sekonder metabolit üretimi; Türü ve serogrubu belirlenen 8 izolatların kültürleri steril fizyolojik su ile Mc Farland 0.5 bulanıklılığına göre ayarlanmış ve steril eküvyon yardımıyla Nutrient agar ve BCYE besiyerlerine ekim yapılmıştır. Kültürler 37°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan çıkarılan petriler steril kabin içerisine alınmış ve steril lamlar yardımıyla besiyerinin yüzeyindeki bakteriler sıyrılarak ortamdaki alınmıştır. Petriler daha sonra steril kabin içerisinde üstleri açık bir şekilde 1 saat UV ışığında bekletilmiştir. İki besiyerinin yüzeyinden 10mm çapında kork borer yardımı ile bloklar elde edilmiştir.

Testte kullanılacak bakteri kültürleri steril fizyolojik su ile 0.5 Mc Farland’a ayarlanmıştır. Mc Farland ayarlı test organizmaları, eküvyon yardımı ile Nutrient agarların yüzeylerine sürülmüştür. İki farklı besiyerinden elde edilen bloklar besiyerlerin üzerine konulmuş ve 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan önce 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları mm olarak ölçülmüştür (Gebhardt, 2002).



Şekil 2.8. *Legionella* izolatlarının sekonder metabolit üretimi (solda nutrient agar, sağda BCYE agar blokları).

2.2.4.8. Ağır metal toleranslılık düzeylerinin belirlenmesi

Her *Legionella* spp. izolatu için sekiz farklı ağır metalin ayrı ayrı Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK), agar dilüsyon metodu ile belirlenmiştir (NCCLS, 1997; Masaoka ve ark., 2003). Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb ve Zn, ağır metallerinin Nutrient agar içerisine 0,0625mM/mL’den 16mM/mL’e kadar iki katlı seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bunun için

$\text{CdCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 , $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ağır metallerinin tuzları kullanılmıştır.

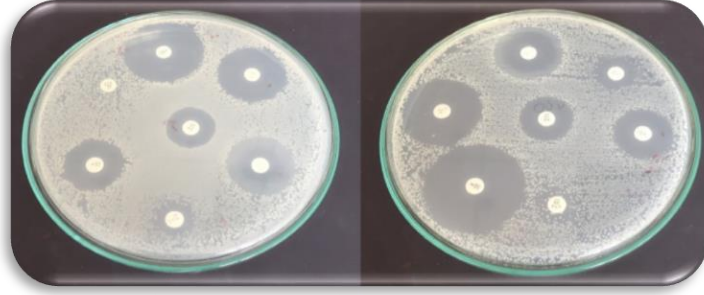
İki katlı seri dilusyonları hazırlanan Nutrient agar besiyerleri etüvde 37 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Türü ve serogrubu belirlenen 8 İzolatların fizyolojik su ile 0.5 Mc Farland'a ayarlanmıştır. Mc Farland'a göre ayarlanmış test bakterilerinden damlatma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Daha sonra petriler 24-48 saat 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda üremenin görülmediği en düşük ağır metal konsantrasyonu MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri olarak kabul edilmiştir (NCCLS, 1990).

2.2.4.9. Antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi

Antibiyotiklerin dirençliliklerinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi ve mikrodillüsyon yöntemi kullanılmıştır.

10 adet antibiyotik diskler oxoid firmasından temin edilmiştir; amikasin (AK 30µg), ampisilin (AMP 10µg), gentamisin (CN 10µg), tetrasiklin (TE 30µg), ofloksasin (OFX 5µg), sefotaksim (CTX 30µg), kanamisin (K 30µg), sulbaktam (SAM 10µg), imipenem (IMP 10µg) ve eritromisin (E 30µg) dir.

Bu antibiyotiklerin antibiyotik dirençliliği disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Nutrient agar hazırlanıp steril petri kaplarına yaklaşık olarak 25 mL dökülmüş ve besiyerlerinin kuruması için 37°C'de 24 saat etüvde bekletilmiştir. Kullanılacak *Legionella* bakteri kültürleri steril fizyolojik su ile 0.5 Mc Farland'a ayarlanmıştır. Hazırlanan bakterilerden steril bir eküvyon yardımı ile besiyerinin tüm yüzeyine ekim yapılmıştır. Daha sonra steril şartlarda antibiyotik diskler yerleştirilmiştir. Ekim yapılan petriler 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda diskin etrafında oluşan inhibisyon zonunun çapı ölçülmüştür (Krumperman, 1985).



Şekil 2.9. Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotiklerin dirençliliklerinin belirlenmesi.

Diğer taraftan toz halinde satın alınarak kendimizin hazırladığı antibiyotikler ise; Siprofloksasin, doksosiklin ve levofloksasin dir.

Öncelikle antibiyotikler 10 μL 'de 30 μg olacak şekilde hazırlanmıştır. Nutrient agar hazırlanıp petrilere dökülmüş ve kurutulmuştur. Kullanılacak *Legionella* kültürleri steril fizyolojik tuzlu su kullanılarak 0.5 Mc Farland'a ayarlanmıştır. Mc Farland'ı ayarlanmış kültürlerden steril eküvyonlar yardımıyla Nutrient agarların yüzeylerine ekim yapılmıştır. Daha sonra steril pens yardımıyla otoklavda steril edilen diskler petri üzerine yerleştirilmiştir. Hazırlanan antibiyotiklerden mikro pipet yardımıyla bu disklerin üzerine damlatma yapılmış ve petriler 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları ölçülmüştür. Aynı işlem 27°C, 37°C ve 40°C'de de uygulanmıştır. Diğer taraftan bu antibiyotiklerin mikrodilüsyon yöntemi ile Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) da belirlenmiştir.

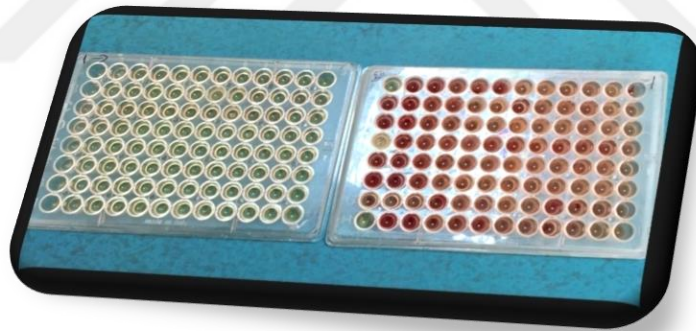


Şekil 2.10. Diskdifüzyon yöntemi ile toz antibiyotiklerin dirençliliklerinin belirlenmesi.

Çift kuvvetli Nutrient Broth hazırlanarak otoklavda steril hale getirilmiştir. Antibiyotiklerden steril flakonların içerisine 12 mg tartılıp 2000 μL steril saf su ile çözülmüştür. Disk difüzyon yönteminde kullanılan Mc Farland'ı ayarlanmış kültürler bu deney içinde hazır

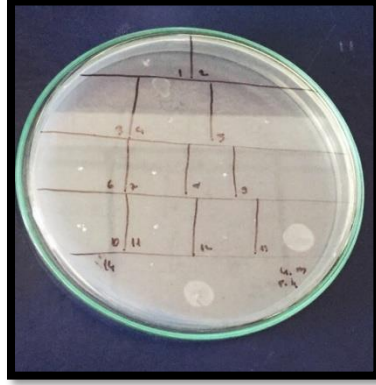
bulundurulmuştur. Steril kabin içerisinde mikropiplakların her bir kuyucuğunun içerisine, mikropipet yardımıyla 150 μ L hazırlanan besiyerinden konulmuştur. Daha sonra birinci kuyucuğun içerisine 150 μ L hazırlanan antibiyotiklerden konulmuş ve 24 numaralı kuyucuğa kadar bir seri dilisyon yapılmıştır (bu deney için her bir bakteri kültürü için 2 adet mikropiplak kullanılmıştır). Seyreltme işlemi tamamlandıktan sonra her bir kuyucuğun içerisine 10 μ L inokulum damlatılmıştır. Ekim işlemi tamamlanan mikropiplakların üzeri steril bir kapakla kapatılıp, buharlaşmayı önlemek amacıyla naylon bir kılıf içerisinde yerleştirilerek 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnküsyon işleminin ardından her bir kuyucuğun içerisine 20 μ L daha önce hazırlanmış olan TTC den damlatılmış ve mikropiplaklar tekrar kapatılarak 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından üremenin gerçekleştiği kuyucuklar kırmızı bir renk alırken üreme görülmeyen kuyucuklarda renk değişimi gözlenmemiştir. Aynı işlem 27°C ve 40°C içinde uygulanmıştır (NCCLS, 1990).

Yapılan bu işlem sonunda üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir.



Şekil 2.11. Mikrodilasyon yöntemi ile Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun belirlenmesi.

Her iki gruptaki antibiyotik gruplarında ve her iki yöntemde çalışılırken 27°C, 37°C ve 40°C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. MİK değerlerini belirledikten sonra üremenin görülmediği her bir kuyucuktan mikro pipet yardımıyla 10 μ L alınarak daha önce hazırladığımız Nutrient agarlı petrilerin yüzeyine damlatma işlemi uygulanmıştır. Damlalar kuruduktan sonra 37°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üremenin görülmediği konsantrasyon MBK değeri olarak belirlenmiştir. Aynı işlem 27°C ve 40°C içinde uygulanmıştır.



Şekil 2.12. Damlatma yöntemi ile Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu belirlenmesi.

3. BULGULAR

3.1. *Legionella* Cinsi Bakterilerin İzolasyonu

Kütahya ilinde bulunan doğal ortam sularından (yalak suyu, kuyu suyu, yağmur su birikintisi, göl ve akarsu) toplam 150 adet su örneği 2016 yılında Haziran ile Eylül ayları arasında toplamıştır ve *Legionella* cinsi bakteriler yönünden incelenmiştir.

Daha sonra morfolojik özellikleri açısından *Legionella* bakterilerine benzeyen örneklerden hem Nutrient hemde kanlı agara ekimler yapılmıştır. Kanlı agarda üreme göstermeyip Nutrient agarda üreme gösteren izolatlar *Legionella* şüphesi ile gram boyama testine tabii tutulmuştur. Gram negatif özellik gösteren izolatlar dışındakiler dikkate alınmamıştır. İncelenen örneklerden 8 adet *Legionella* cinsine ait suş izole edilmiştir. Eldrde edilen bu izolatların tür ve serogrupları belirlenmiştir. Elde edilen 8 izolatın biyokimyasal test sonuçları, ağır metal toleranslılıkları, antibiyotik dirençliliği ve sekonder metabolit oluşumu yönünden incelenmiştir.

3.2. Antijenik Özelliklerinin Belirlenmesi

BCYE besiyerinde tipik koloniler izole edildikten sonra kanlı agara ekimleri yapılmıştır. Kanlı agarda üremeyen izolatlar *Legionella* şüphelisi olarak stoklara çekilmiştir. *Legionella* şüphelisi suşların tür ve serogrup düzeyinde identifikasyonunu yapmak için lateks aglütinasyon test kiti uygulanmıştır. Elde edilen 8 adet *Legionella* suşunun 6 tanesinin *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 geriye kalan 2 örneğin serogrubunun ise *Legionella* spp. olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.1. İzole edilen *Legionella*'ların serogrupları.

	<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 1	<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 2-15	<i>Legionella</i> spp.
L1	-	✓	-
L2	-	✓	-
L3	-	✓	-
L4	-	✓	
L5	-	-	✓
L6	-	✓	-
L7	-	✓	-
L8	-	-	✓

3.3. *Legionella* Suşlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Legionella suşlarına tür ve serogrup düzeyi belirlendikten sonra katalaz, jelatin, sitrat, indol ve hareketlilik testleri yapılmıştır. Bu testlere ek olarak glukoz, ksiloz, arabinoz, maltoz, sakkaroz ve fruktozdan asit oluşumu testleri yapılmıştır. Uygulanan testler sonucunda; bütün izolatların katalaz, sitrat, hareketlilik, jelatinaz ve indol oluşumu testlerinde pozitif sonuç verdiği ancak, glukoz, ksiloz, arabinoz, maltoz, sakkaroz ve fruktozdan asit oluşumu testlerinde ise negatif sonuç verdiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. *Legionella* suşlarının biyokimyasal test sonuçları.

İZOLAT TESTLER		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
Katalaz üretimi		+	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin hidrolizi		+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat kullanımı		+	+	+	+	+	+	+	+
İndol oluşumu		+	+	+	+	+	+	+	+
Hareket		+	+	+	+	+	+	+	+
Şekerler	L (+)Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-
	D (-)fruktoz	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sakkaroz	-	-	-	-	-	-	-	-
	D (-)glukoz	-	-	-	-	-	-	-	-
	D (+)ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-
	Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4. *Legionella* Cinsi Bakterilerinin Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri

Elde edilen izolatların ağır metal dirençlilik düzeyleri agar dilüsyon metodu ile belirlenmiştir. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde referans suş olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır. Referans suşunun sahip olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu değerleri Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. *Escherichia coli* ATCC 25922'un ağır metal dirençlilik düzeyi (mM/mL).

Ağır Metal	MİK
Nikel	2
Çinko	2
Kobalt	2
Demir	4
Krom	2
Kurşun	4
Bakır	2
Kadmiyum	0,5

Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde 8 farklı ağır metal tuzları [$\text{CdCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 , $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$] kullanılmıştır. İzolatların ağır metal dirençlilik düzeylerinin MİK değerleri Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. İzolatların ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri (mM/mL).

	Nikel	Çinko	Kobalt	Demir	Krom	Kurşun	Bakır	Kadmiyum
L1 (Sg 2-15)	1	1	0.5	2	2	4	1	0.125
L2 (Sg 2-15)	1	1	0.5	2	2	4	1	0.125
L3 (Sg 2-15)	1	1	1	2	2	4	1	0.125
L4 (Sg 2-15)	1	1	0.5	2	2	4	1	0.125
L5 (Sg spp.)	1	1	0.5	2	2	4	2	0.125
L6 (Sg 2-15)	1	1	0.5	2	2	4	1	0.125
L7 (Sg 2-15)	1	1	1	2	2	4	1	0.125
L8 (Sg spp.)	2	2	2	2	2	4	1	0.125

L1, L2, L3, L4, L6 ve L7 (Sg 2-15) izolatlarının; kadmiyum, çinko, bakır, kobalt, demir ve nikel ağır metallerine gösterdikleri MİK değerlerinin referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülürken izolatın krom ve kurşun ağır metaline gösterdiği MİK değeri referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu bulunmuştur.

L5 (Sg spp.) izolatının kadmiyum, çinko, kobalt, demir ve nikel ağır metallerine gösterdikleri MİK değerlerinin referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülürken izolatın bakır, krom ve kurşun ağır metaline gösterdiği MİK değeri referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu bulunmuştur.

L8 (Sg spp.) izolatının kadmiyum, bakır, kobalt, demir ve ağır metallerine gösterdikleri MİK değerlerinin referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülürken izolatın çinko, nikel,

krom ve kurşun ağır metale gösterdiği MİK değeri referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.5. İzolatların ağır metal toleranslılıklarının %'lik dağılımı.

Ağır Metal	n	Ağır metal konsantrasyonlarına (mM/mL) göre genel toplam içerisindeki izolatların sayısal dağılımı										Toleranslı İzolatlar
		0,0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	N	%
Nikel	8	-	-	-	-	7	1*	-	-	-	1	12.5
Çinko	8	-	-	-	-	7	1*	-	-	-	1	12.5
Kobalt	8	-	-	-	5	2	1*	-	-	-	1	12.5
Demir	8	-	-	-	-	-	8	-*	-	-	0	0.0
Krom	8	-	-	-	-	-	8*	-	-	-	8	100
Kurşun	8	-	-	-	-	-	-	8*	-	-	8	100
Bakır	8	-	-	-	-	7	1*	-	-	-	1	12.5
Kadmiyum	8	-	8	-	-*	-	-	-	-	-	0	0.0

*Ağır metallerin referans suş MİK değerleri

Elde edilen izolatların referans suşa göre, ağır metal yüzde toleranslılık değerlerine bakıldığında; %100 kurşun ve krom, %12.5 nikel, çinko, kobalt ve bakır ağır metale karşı toleranslı olduğu bulunmuştur. Bunun yanında izolatların demir ve kadmiyum ağır metale karşı toleranslı olmadığı bulunmuştur.

3.5. Sekonder Metabolit Üretimi

İzole edilen 8 *Legionella* bakterisinin sekonder metabolit üretimi agar blok yöntemi ile Gram pozitif (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mycoides*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (yabani)), Gram negatif (*Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (yabani) ve *Aeromonas hydrophila*) ve maya (*Saccharomyces cerevisiae* (yabani), *Saccharomyces boulardii* (yabani)) bakterilerine karşı değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

L1 (Sg 2-15), L2 (Sg 2-15), L3 (Sg 2-15), L4 (Sg 2-15) ve L6 (Sg 2-15) izolatının *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *S. aureus* (yabani), *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. coli* (yabani), *A. hydrophila*, *S. cerevisiae* (yabani) ve *S. boulardii* mikroorganizmasının BCYE ve Nutrient agarda gösterdiği zon çapı 10mm iken, *B. subtilis*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* bakterileri için herhangi bir zon oluşturmadaıkları gözlenmiştir.

L5 (Sg spp.) izolatının *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *S. aureus* (yabani), *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E.coli* (yabani), *A. hydrophila* ve *S. cerevisiae* (yabani) bakterilerinin BCYE ve Nutrient agarda gösterdiği zon çapı 10mm iken, *B. subtilis*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* bakterileri için herhangi bir zon oluşturmadıkları gözlenmiştir. *S. boulardii* bakterisi için ise BCYE agardaki zon çapı 10mm iken Nutrient agarda 11mm olarak ölçülmüştür.

L7 (Sg 2-15) izolatının *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *S.aureus* (yabani), *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E.coli* (yabani), *A. hydrophila*, *S. cerevisiae* (yabani) ve *S. boulardii* bakterilerinin BCYE ve Nutrient agarda gösterdiği zon çapı 10mm iken, *B. subtilis*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* bakterileri için herhangi bir zon oluşturmadıkları gözlenmiştir.

L8 (Sg spp.) izolatının *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B mycoides*, *S aureus* (yabani), *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E.coli* (yabani), *A. hydrophila* ve *S. cerevisiae* (yabani) bakterilerinin BCYE ve Nutrient agarda gösterdiği zon çapı 10mm iken, *B. subtilis*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* bakterileri için herhangi bir zon oluşturmadıkları gözlenmiştir. *S. boulardii* bakterisi için ise BCYE agardaki zon çapı 10 mm iken Nutrient agarda 12 mm olarak ölçülmüştür.

Çizelge 3.6. *Legionella* izolatlarının oluşturduğu sekonder metabolitlerin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi (agar blog zon çapı 10 mm).

	L1		L2		L3		L4		L5		L6		L7		L8	
	BCYE/NA		BCYE/NA		BCYE/NA		BCYE/NA		BCYE/NA		BCYE/NA		BCYE/NA		BCYE/NA	
Gram Pozitif Bakteri																
<i>Bacillus cereus</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Bacillus mycoides</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (Yabani)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Gram Negatif Bakteri																
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Escherichia coli</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Escherichia coli</i> (Yabani)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Maya																
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Yabani)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Saccharomyces boulardii</i> (Yabani)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	11	10	10	10	10	10	12

3.6. Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri

Yapılan çalışmada Kütahya ilinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençliliği disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Antibiyotik dirençliliği düzeylerinin belirlenmesinde referans suş olarak *Escherichia coli* suşu kullanılmıştır. NCCLS rehberinde referans suşunun sahip olduğu antibiyotik duyarlılık değerleri Çizelge 3.7.'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. NCCLS rehberinde *Escherichia coli* bakterisi için belirtilen zon çapları yorumlama standartları (mM/mL).

Antibiyotik	Disk içeriği (µg)	Zon Çapı		
		R (Dirençli)	OD (Orta Derece Duyarlı)	D (Duyarlı)
Ampisiilin	10 µg	≤13	14-16	≥17
Sefotaksim	30 µg	≤14	15-22	≥23
İmipenem	10 µg	≤13	14-15	≥16
Amikasin	30 µg	≤14	15-16	≥17
Kanamisin	30 µg	≤13	14-17	≥18
Tetrasiklin	30 µg	≤14	15-18	≥19
Eritromisin	30 µg	≤13	14-22	≥23
Ofloksasin	5µg	≤12	13-15	≥16
Sulbaktam	10µg	≤11	12-14	≥15
Gentamisin	10µg	≤12	13-14	≥15
Doksisiklin	30 µg	≤12	13-15	≥16
Siprofloksasin	30 µg	≤15	16-20	≥21
Levofloksasin	30 µg	≤13	14-16	≥16

Çalışmamızda elde ettiğimiz *Legionella* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri 13 farklı antibiyotiğe karşı agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.8’de verilmiştir.



Çizelge 3.8. İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı üç farklı sıcaklıkta gösterdikleri inhibisyon zon çapları (disk 6 mm).

İzolatlar	Kullanılan antibiyotikler														
	Amikasin			Ampisilin			Tetrasiklin			Sefotaksim			Ofloksasin		
	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C
L1 (Sg 2-15)	18	18	16	32	30	30	36	36	40	8	8	10	38	36	36
L2 (Sg 2-15)	18	20	20	32	32	32	36	36	34	12	10	10	40	38	40
L3 (Sg 2-15)	18	18	16	32	28	30	36	34	32	8	8	8	38	36	36
L4 (Sg 2-15)	20	18	20	33	31	31	36	35	32	12	12	10	36	33	35
L5 (Sg spp.)	18	20	20	32	32	32	32	34	32	10	10	12	40	38	40
L6 (Sg 2-15)	16	18	16	31	30	30	32	32	32	8	8	10	36	36	36
L7 (Sg 2-15)	18	20	18	34	32	35	36	36	34	10	10	10	40	38	40
L8 (Sg spp.)	20	18	20	32	31	34	36	36	36	8	10	8	40	36	36

Çizelge 3.8. İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı üç farklı sıcaklıkta gösterdikleri inhibisyon zon çapları (devamı).

İzolatlar	Kullanılan antibiyotikler														
	Sulbaktam			Gentamisin			Kanamisin			İmipenem			Eritromisin		
	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C
L1 (Sg 2-15)	32	32	34	18	20	18	20	22	10	42	40	40	28	30	32
L2 (Sg 2-15)	36	36	36	20	18	20	20	18	22	44	42	44	26	28	30
L3 (Sg 2-15)	34	33	34	18	17	16	22	20	18	44	42	42	28	30	30
L4 (Sg 2-15)	36	34	36	18	18	18	22	20	20	44	44	44	28	30	32
L5 (Sg spp.)	32	32	32	18	18	16	22	18	18	40	38	38	30	30	28
L6 (Sg 2-15)	32	31	32	14	16	16	18	20	22	38	40	38	27	28	28
L7 (Sg 2-15)	36	36	36	18	18	20	20	20	20	34	36	36	32	32	30
L8 (Sg spp.)	32	32	34	16	17	18	22	20	20	35	36	36	30	30	34

Çizelge 3.8. İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı üç farklı sıcaklıkta gösterdikleri inhibisyon zon çapları (devamı).

İzolatlar	Kullanılan antibiyotikler								
	Siprofloksasin			Doksisiklin			Levofloksasin		
	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C	27°C	37°C	40°C
L1 (Sg 2-15)	44	40	40	32	30	30	44	42	42
L2 (Sg 2-15)	34	32	34	26	28	28	36	34	36
L3 (Sg 2-15)	33	32	34	30	28	30	32	33	32
L4 (Sg 2-15)	30	31	32	27	25	27	32	31	32
L5 (Sg spp.)	33	30	32	26	24	24	32	30	32
L6 (Sg 2-15)	30	30	32	26	24	24	32	30	32
L7 (Sg 2-15)	30	31	30	28	26	26	32	32	32
L8 (Sg spp.)	40	42	40	34	32	34	36	34	34

L2,L3,L5,L7 ve L8 izolatları için çizelge 3.8'e bakıldığında Amikasin antibiyotiği üç farklı sıcaklık değeri için duyarlı (D) olarak değerlendirilmiştir. L1 ve L4 izolatlarının 40°C'de orta derecede duyarlı 27°C, 37°C'de ise duyarlı olarak tespit edilmiştir. L6 izolatu 27°C ve 40°C de orta derecede duyarlı, 37°C'de duyarlı olarak bulunmuştur.

Ampisin, tetrasiklin, oflaksasin, sulbaktam, kanamisin, imipenem ve eritromisin antibiyotiklerinin üç farklı sıcaklıkta bütün izolatlar için duyarlı olduğu gözlenmiştir. Sefotaksim antibiyotiği 27 °C, 37 °C ve 40 °C'lerde bütün izolatlar için dirençli olarak tespit edilmiştir. Gentamisin antibiyotiği L6 izolatu için 27°C'de orta derecede duyarlı olarak değerlendirilirken, geriye kalan bütün izolatlar 27 °C, 37°C ve 40°C'lerde duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Siprofloksasin, doksisisiklin ve levofloksasin antibiyotikleri 27 °C, 37 °C ve 40 °C'lerde bütün izolatlar için duyarlı olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.9'da elde edilen *Legionella* bakterilerinin 27 °C'de antibiyotik dirençlilik yüzdelere bakıldığında %100'ünün sefotaksime karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların tetrasiklin, oflaxacin, sulbactam, oxacillin, kanamisin, imipenem, eritromisin, siprofloksasin, doksisisiklin ve levofloksasin'e karşı %100 duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzolatların amikasin ve gentamisin antibiyotiğine %87.5 duyarlı olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.9. 27°C’de izolatlarının antibiyotik yüzde dirençlilik sonuçları.

Antibiyotik	N	R	ODD	D	%R	%ODD	%D
Amikasin (AK 30 µg)	8	0	1	7	0	12.5	87.5
Gentamisin (CN 10µg)	8	0	1	7	0	12.5	87.5
Tetrasiklin (TE 30µg)	8	0	0	8	0	0	100
Sefotaksim (CTX 30µg)	8	8	0	0	100	0	0
Ofloxacin (OFX 5 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Sulbactam (SAM 10µg)	8	0	0	8	0	0	100
Oxacillin (OX 1 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Kanamisin (K 30 µg)	8	0	0	8	0	0	100
İmipenem (İPM 10µg)	8	0	0	8	0	0	100
Eritromisin (E 15µg)	8	0	0	8	0	0	100
Siprofloksasin (30 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Doksisiklin (30 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Levofloksasin (30 µg)	8	0	0	8	0	0	100
R; Dirençli; ODD; orta derece duyarlı; D; Duyarlı							

Çizelge 3.10’da elde edilen *Legionella* bakterilerlerinin 37 °C’de antibiyotik dirençlilik yüzdelere bakıldığında en yüksek %100’ü sefotaksime karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Diğer antibiyotiklerin sefotaksim haricinde duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.10. 37°C’de izolatlarının yüzelik antibiyotik dirençlilik sonuçları.

Antibiyotik	N	R	ODD	D	%R	%ODD	%D
Amikasin (AK 30 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Gentamisin (CN 10µg)	8	0	0	8	0	0	100
Tetrasiklin (TE 30µg)	8	0	0	8	0	0	100
Sefotaksim (CTX30µg)	8	8	0	0	100	0	0
Ofloxacin (OFX 5 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Sulbactam (SAM 10µg)	8	0	0	8	0	0	100
Oxacillin (OX 1 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Kanamisin (K 30 µg)	8	0	0	8	0	0	100
İmipenem (IPM 10µg)	8	0	0	8	0	0	100
Eritromisin (E 15µg)	8	0	0	8	0	0	100
Siprofloksasin (30µg)	8	0	0	8	0	0	100
Doksisiklin (30µg)	8	0	0	8	0	0	100
Levofloksasin (30µg)	8	0	0	8	0	0	100
R; Dirençli; ODD; orta derece duyarlı; D; Duyarlı							

Çizelge 3.11’de elde edilen *Legionella* bakterilerlerinin 40 °C’de antibiyotik dirençlilik yüzdelere bakıldığında en yüksek %100’ü sefotaksime karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların gentamisin, tetrasiklin, ofloxacin, sulbactam, oxacillin, kanamisin, imipenem, eritromisin, siproflaksasin, doksisiklin ve levofloksasin’e karşı %100 duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzolatların amikasin antibiyotiğine %37.5 ile orta derece duyarlı olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.11. 40°C’de izolatlarının yüzelik antibiyotik dirençlilik sonuçları.

Antibiyotik	N	R	ODD	D	%R	%ODD	%D
Amikasin (AK 30 µg)	8	0	3	5	0	37.5	62.5
Gentamisin (CN 10µg)	8	0	0	8	0	0	100
Tetrasiklin (TE 30µg)	8	0	0	8	0	0	100
Sefotaksim (CTX 30µg)	8	8	0	0	100	0	0
Ofloxacin (OFX 5 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Sulbactam (SAM 10µg)	8	0	0	8	0	0	100
Oxacillin (OX 1 µg)	8	0	0	8	0	0	100
Kanamisin (K 30 µg)	8	0	0	8	0	0	100
İmipenem (IPM 10µg)	8	0	0	8	0	0	100
Eritromisin (E 15µg)	8	0	0	8	0	0	100
Siprofloksasin (30µg)	8	0	0	8	0	0	100
Doksisiklin (30µg)	8	0	0	8	0	0	100
Levofloksasin (30µg)	8	0	0	8	0	0	100
R; Dirençli; ODD; orta derece duyarlı; D; Duyarlı							

Genel olarak bakıldığında tüm izolatların üç sıcaklık değerinde %100 sefotaksim antibiyotiğine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

3.7. Minimum İnhibitör Konsantrasyonun (MİK) Belirlenmesi

Mikrodilüsyon yöntemi ile izolatları doksisiklin, siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotiğine karşı MİK değerleri CLSI’e göre tespit edilmiştir.

Çizelge 3.12. CLSI göre antibiyotiklerin *E. coli*’ye karşı dirençli, orta duyarlı ve duyarlı değerleri.

Antibiyotik	MİK (µg/mL)		
	R	ODD	D
Doksisiklin	≥16	8	≤4
Siprofloksasin	≥4	2	≤1
Levofloksasin	≥8	4	≤2
R; Dirençli; ODD; orta derece duyarlı; D; Duyarlı			

Çizelge 3.13. 27°C’de izolatların test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri MİK ve MBK sonuçları (µg/mL).

İzolatlar	Kullanılan antibiyotikler					
	Doksisiklin		Siprofloksasin		Levofloksasin	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
L1 (Sg 2-15)	0,10	0,21	0,10	0,10	0,02	0,02
L2 (Sg 2-15)	0,10	0,21	0,05	0,05	0,05	0,05
L3 (Sg 2-15)	0,10	0,21	0,10	0,10	0,01	0,02
L4 (Sg 2-15)	0,10	0,21	0,05	0,05	0,02	0,02
L5 (Sg spp.)	0,05	0,10	0,02	0,02	0,01	0,02
L6 (Sg 2-15)	0,05	0,10	0,02	0,05	0,02	0,02
L7 (Sg 2-15)	0,10	0,21	0,02	0,02	0,02	0,02
L8 (Sg spp.)	0,21	0,43	0,01	0,02	0,10	0,10

Bütün izolatların 27°C’de üç antibiyotiğe karşı MİK ve MBK değerleri Çizelge 3.13’de gösterilmiştir. Doksisiklin antibiyotiğine karşı bütün izolatların MİK değerleri 0.05 - 0.21µg/mL; MBK değeri ise 0.10 ile 0.43 µg/mL arasındadır. Siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotiğine karşı MİK değeri 0.02 ile 0.10 µg/mL, MBK 0.02 ile 0.10 µg/mL arasında olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.14. 37°C’de izolatların test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri MİK ve MBK sonuçları (µg/mL).

İzolatlar	Kullanılan antibiyotikler					
	Doksisiklin		Siprofloksasin		Levofloksasin	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
L1 (Sg 2-15)	0,10	0,21	0,05	0,05	0,02	0,02
L2 (Sg 2-15)	0,21	0,43	0,05	0,10	0,05	0,05
L3 (Sg 2-15)	0,05	0,10	0,10	0,21	0,02	0,05
L4 (Sg 2-15)	0,05	0,21	0,05	0,05	0,05	0,10
L5 (Sg spp.)	0,10	0,21	0,02	0,05	0,02	0,10
L6 (Sg 2-15)	0,05	0,21	0,02	0,05	0,05	0,05
L7 (Sg 2-15)	0,05	0,10	0,02	0,02	0,02	0,05
L8 (Sg spp.)	0,10	0,21	0,02	0,02	0,10	0,10

Bütün izolatların 37°C’de üç antibiyotiğe karşı MİK ve MBK değerleri Çizelge 3.14’de gösterilmiştir. Doksisiklin antibiyotiğine karşı bütün izolatların MİK değerleri 0.05-0.21µg/mL, MBK değeri 0.10 ile 0.43 µg/mL arasındadır. Siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotiğine karşı 0.02 ile 0.10 µg/mL, MBK değeri ise 0.02-0.10 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.15. 40°C izolatların test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri MİK ve MBK sonuçları (µg/mL).

İzolatlar	Kullanılan antibiyotikler					
	Doksisiklin		Siprofloksasin		Levofloksasin	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
L1 (Sg 2-15)	0,10	0,21	0,05	0,05	0,02	0,02
L2 (Sg 2-15)	0,21	0,43	0,05	0,10	0,05	0,05
L3 (Sg 2-15)	0,05	0,10	0,10	0,21	0,02	0,05
L4 (Sg 2-15)	0,05	0,21	0,05	0,05	0,05	0,10
L5 (Sg spp.)	0,10	0,21	0,02	0,05	0,02	0,10
L6 (Sg 2-15)	0,05	0,21	0,02	0,05	0,05	0,05
L7 (Sg 2-15)	0,05	0,10	0,02	0,02	0,02	0,05
L8 (Sg spp.)	0,10	0,21	0,02	0,02	0,10	0,10

Bütün izolatların 40°C’de üç antibiyotiğe karşı MİK ve MBK değerleri Çizelge 3.15’te gösterilmiştir. Doksisiklin antibiyotiğine karşı bütün izolatların MİK değerleri 0.05-0.21µg/mL, MBK değeri 0.10 ile 0.43 µg/mL arasındadır. Siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotiğine karşı 0.02 ile 0.10 µg/mL, MBK değeri ise 0.02-0.10 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.16. İzolatlarının antibiyotik dirençlilik sonuçları (bu sonuçlar bütün sıcaklıklar için geçerlidir).

Antibiyotik	N	R	ODD	D	%R	%ODD	%D
Siprofloksasin	8	0	0	8	0	0	100
Levofloksasin	8	0	0	8	0	0	100
Doksisiklin	8	0	8	8	0	0	100

Bütün izolatlar için üç farklı sıcaklıkta siprofloksasin, levofloksasin ve doksisiklin antibiyotikleri %100 duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

L. pneumophila, *Legionellaceae* ailesine bağlı bir bakteridir. *Legionellaceae* ailesinde 30'dan fazla cins ve 70 farklı serogrup vardır. Bu ailedeki bakterilerle ortaya çıkan infeksiyonların %90'ından *L. pneumophila* sorumludur. *Legionella pneumophila* kendi arasında 3 alt tür ve 16 alt (sero) grup içerir, bunlardan serogrup 1,4,6 infeksiyonların çoğunluğuna neden olur (Topçu, 2002).

Genel olarak *Legionella* türü bakterilerin yaşam alanları doğal ortam sularıdır. Düşük konsantrasyonlarda doğal sularda bulunan bu bakteriler daha az oranda da olsa şehir şebeke suyuna geçebilirler. Binaların su sistemlerinde özellikle de suyun durgun olduğu alanlar bu bakterilerin çoğalmaya uygun ortam bularak çoğalabildikleri belirlenmiştir. *Legionella* türü bakteriler biyofilm tabakalarında çoğalmalarının yanında bazı amip cinslerinin (*Acanthamoeba* ve *Naeglaria*) içinde simbiyotik yaşam sürdürürler. Bakteri hem biyofilm tabakalarında hem de amip kistleri içinde dış etkilere ve biyositlere karşı dirençli hale gelebilir. *Legionella* infeksiyonları sporadik veya epidemik olabilir. *Legionella* türü bakteriler su sistemlerinden insanlara aerosol ve aspirasyon yolu ile bulaşmaktadır. Yaşlılar, küçük yaştaki çocuklar, sigara kullananlar, altta yatan kronik hastalığı bulunanlar, bağışıklık sistemi baskılanmış olanlar, cerrahi girişime maruz kalanlar ve uzun süre hastanede yatanlar *Legionella* infeksiyonları için risk grubunda yer almaktadır. Hastanede yatan hastalarda görülen *Legionella* infeksiyonlarının kaynağı olarak; sıcak su sistemleri, havalandırma sistemleri, duş ve banyolar, nazogastrik tüpler, maskeler, nemlendiriciler, solunum cihazları, soğutma kuleleri, buhar kondansatörleri sorumlu tutulmaktadır (Murdoch, 2003; Ustaçelebi, 1991).

Yapmış olduğumuz çalışmada (2016 yılı Haziran –Eylül aylarında) arasında; Kütahya ilinde bulunan doğal ortam sularından toplam 150 adet su örneği, su örnekleme yöntemiyle toplanmış ve *Legionella* cinsi bakteri varlığı yönünden incelenmiştir. *Legionella* bakterileri doğal sularda bulunan mikroorganizmalardandır. Dünyanın hemen her yerinde göl, nehir, bataklık, kaplıcalar gibi su kaynaklarından; toprak örneklerinden; kuyu suları, gübre, kanalizasyon içeriği ve okyanus kıyılarından izole edilmiştir (T.C Sağlık B., 2016). *Legionella* bakterilerinin konsantrasyonu doğal su ortamlarında oldukça düşük olmasına rağmen insan yapımı su sistemlerine geçtiklerinde koşulların etkisiyle çoğalarak yüksek sayılara ($>10^4$ kob/L) ulaşabilmektedir (Stout, vd., 1985; Muder ve Yuu, 2002). *Legionella*'lar insan yapımı su sistemlerinde de yaygın bir şekilde yerleşip, kontamine sularla insanlara bulaşan ve ağır pnömoniye yol açabilen etkenlerdir (Pınarbaşı, 2011). Bu bakterilerin insan yapımı su sistemlerinde çok yoğun bir şekilde bulunduğu yapılan çalışmalar yardımıyla ortaya konmuştur.

Biz çalışmamızda insan yapımı olmayan su sistemleri üzerinde çalışma yaparak bu mikroorganizmanın görülme sıklığını ortaya koymaya çalıştık. *Legionella* türlerini en çok bulunduğu insan yapımı su sistemleri; havalandırma sistemleri, merkezi klima ve soğutma kuleleri, sıcak su muslukları ve duş başlıkları, çamurlar, kaplıcalar ve termal banyolar, hastane solunum tedavi ekipmanları, nebulizatörler ve evaporatörler, göz yıkama birimleridir (Whitney, vd., 1997). Zanetti ve arkadaşları 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada özel ve kamu kurumlarının 23 dış ünitesinden (oral durulama kabı, hava-su şırıngası, ultrasonik skalor) toplam 101 örnek toplamış ve 22 *Legionella* cinsi bakteri izole etmişlerdir.

Stojek ve arkadaşları 2002 yılında Polonya'da bulunan bir seranın çeşitli sulama birimlerinden örnekler toplamış ve *Legionella* varlığını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda seranın dış ortamında bulunan 38 bitki sulama sisteminden 8, iç ortamda bulunan 20 bitki sulama sisteminden ise 5 *Legionella* cinsi bakterisi izole etmişlerdir. Bunun dışında toplanan 18 musluk, 14 toprak ve 6 hava örneğinde *Legionella* cinsi bakterisine rastlamamışlardır.

Azara ve arkadaşları, 2006 yılında İtalya'da buluna 9 geminin önemli noktalardan (yolcu kabinleri, mürettebat kabinleri, mutfaklar, kahve barları, merkezi klima sistemi odaları) 90 su örneği toplanmış ve 38 *Legionella* bakterisi izole edilmişlerdir. Gemilerde yapılan bir diğer çalışmada, Goutziana ve arkadaşları 2008 yılında 10 gemi ve 21 feribotun su dağıtım sistemleri, eğlence havuzları ve klima sistemlerinden toplamda 276 örnek toplayıp 96 *Legionella* cinsi bakteri izole etmişlerdir.

Legionella bakterileri serbest olarak yaşayabildikleri gibi, amipler, kamçılı protozoonlar ve mavi-yeşil alglerde, hücre içinde çoğalırlar ve sıcaklığı 0-63°C, pH'sı 5,0-8,5 ve çözünmüş oksijen içeriği 0,2-15 mg/L arasında değişebilen geniş fiziksel koşullarda yıllarca canlı kalabilmektedirler (İğnak, 2007). Subbaram ve arkadaşları 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada izole ettikleri *Legionella*'ların farklı sıcaklık, pH ve klor oranlarında üreme yeteneklerini araştırmışlardır. Bunu için 25°C, 30 °C, 35°C, 37°C ve 45°C sıcaklıklarını, 6 ve 8 pH aralığındaki değerleri ve 0.1mg/L ve 1.5 mg/L klor oranlarını kullanmıştır. Çalışmanın sonunda *Legionella* bakterilerinin 25°C ve 45°C'ler arasında üreme yeteneklerinin pozitif olduğunu fakat bu sıcaklıkların altında ve üstünde üreme yeteneklerinin azaldığını, 6 ve 8 pH aralığında ve 0.1mg/L ve 1.5 mg/L klor içeren sulara üreme gösterebildiklerini saptamışlardır. Yapılan bu çalışmada *Legionella* bakterisinin geniş pH aralığında, yüksek klor ve birçok farklı sıcaklıkta üreyebildiğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda *Legionella* cinsi bakterilerin izolasyon işleminde genellikle sürüntü ve su örnekleme yöntemi kullanılmaktadır. Çalışmamızda doğal ortam sularından örnek

aldığımızdan dolayı direk su örneğinden örnekleme çalışması yapılmıştır. Toplanan su örneklerinin, bu bakterinin yoğun olarak görüldüğü yaz aylarında yapılması uygun görülmüştür. Alınan su örnekleri en kısa sürede laboratuara getirilmiştir. *Legionella* bakterilerinin izolasyonu için diğer çalışmalarda da sıklıkla kullanılan kültür yöntemi tercih edilmiştir. *Legionella* bakterilerinin izolasyonunda örneklerin toplanması, toplanan örnek miktarı, dekontaminasyon işlemi standartları farklılık göstermektedir (Bangsborg, vd., 1995). Su örneği toplanan yerlerin ve binaların özelliği, su sisteminin yapısı, coğrafi faktörler, mevsimsel faktörler, suyun organik içeriği, kontrol önlemlerinin kullanımı ve seçilen kültür yöntemlerinin farklılığı gibi birçok faktör izolasyon oranlarında farklılık yaratmaktadır (Afacan, vd., 2006). Toplanan örneklerin su miktarları farklılık gösterse de genellikle 1-10 litre arasında olması önerilmektedir (Winn, vd., 2006). Kültür yönteminin yanı sıra, son yıllarda geliştirilen PCR (Polimer Zincir Reaksiyonu), FISH (Floresan *in situ* hibridizasyon metod) ve DFA (Direkt floresan antikor) gibi daha modern ve moleküler teknikler de kullanılmaktadır (Vılları, 1998; Dutıl, vd., 2006).

Yapılan çalışmalar, *Legionella* bakterisinin izolasyonunda filtrasyon işleminin santrifüj işleminden çok daha iyi sonuç verdiğini göstermektedir (Stone, vd., 1998; Ta, vd., 1995). Bu nedenden dolayı topladığımız su örneklerini filtrasyon işleminden geçirerek ön muamele uygulaması yapılmıştır. Filtrasyon sırasında örnekler asit ile muamele edilmiş (dekontaminasyon işlemi) ve daha sonrasında BCYE besiyerine ekim gerçekleştirilmiştir. *Legionella* bakterisi çevre örnekleriyle çalışılmak istenildiğinde direkt ekim işlemi yoğun kontaminasyonlara neden olabileceği için filtreden geçirilen örneklerle dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. Daha sonra filtreler BCYE agar besiyerine ekim yapıldığında izolasyon oranının arttığı belirtilmektedir (De Luca, vd., 1999; Leoni, vd., 2001; Nakipoğlu, 1999). BCYE agar *Legionella* bakterilerinin üretilmesinde en sık kullanılan besiyerlerinden bir tanesidir (Ustaçelebi, 1999). Maya ekstraktı gelişimi desteklemek için gerekli proteini ve diğer besinleri sağlar. L-Sistein, temel bir amino asit ve çözünür ferric pirofosfat, bir demir takviyesi *Legionella* türlerinin spesifik beslenme gereksinimlerini karşılamak için devreye alınır. Alfa-ketoglutarat gelişimi stimüle etmek için eklenir. Etkinleştirilen kömür, *Legionella* türleri için toksik metabolik bir ürün olan hidrojen peroksidi dekompoze eder ve ayrıca karbondioksit toplayabilir ve yüzey gerilimini modifiye edebilir. Optimum gelişim için düzgün pH'ı korumak üzere ACES tamponu eklenir (İğnak, 2007).

Legionella bakterilerinin izolasyonunu kolaylaştırmak amacıyla besiyerinin içerisine bazı antibiyotikler (vankomisin, polimiksin ve natamisin gibi) ilave edilebilmektedir (Pedersen, 1992; Bartram, vd., 2007; ISO, 1998).

Yapılan bir çalışmada Ergin ve arkadaşları 1998 yılında Pamukkale yöresinde bulunan kaynak sularından, musluk ve duş başlıklarından olmak üzere toplamda 55 su örneğinden kültür ve PCR yöntemi ile *Legionella* spp. varlığını araştırmış ve örneklerin hiçbirinden *Legionella* spp. izole edemediklerini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Wellinghausen ve arkadaşları 2001 yılında PCR yöntemiyle hastanelerdeki suların % 98,7'sinden, kültür yöntemiyle % 70,1'inden *Legionella* izole etmişlerdir. Fakat genel olarak yapılan çalışmalarda pahalı olmaması nedeni ve rutinde de kültür yöntemi tercih edilmesinden dolayı tercih edilmiştir.

Erandaç ve arkadaşları 2001, yılında yapmış olduğu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin musluk ve duş sularından 93 su örneği alınarak *Legionella* cinsi bakterilerin varlığını araştırmıştır. Alınan örnekler filtrasyon işlemi uygulandıktan sonra santrifüj edilerek dekontaminasyon işlemine tabii tutulmuş ve BCYE besiyerine ekim yapılmıştır. Araştırmanın sonucunda *Legionella* bakterisine rastlanmamıştır.

Nakipoğlu, 1999 yılında yapmış olduğu çalışmada örneklerini filtrasyon ile konsantre etmiş ve ardından dekontaminasyon işlemi uygulamıştır. Aynı zamanda ekim yöntemlerini kıyaslamış ve direkt ekimde BCYE ve selektif besiyerleri *Legionella* suşlarının tamamının izolasyonunu sağlayamamıştır. Dekontaminasyon işlemi sonrasında yapılan ekimin direkt ekime göre farklı besiyerlerinde duyarlılığını, BCYE besiyeri için %54 olarak bulmuştur.

İğnak, 2007 yılında yapmış olduğu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nin 15 farklı servisinden ve idare binasından 100 su örneği (92 duş başlığı ve musluk suyu, 8 depo suyu) alarak *Legionella* varlığı yönünden incelenmiş, toplanan örnekleri filtrasyon yöntemi ile konsantre etmiş ve asit ile dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır.

Subbaram ve arkadaşları, 2017 yılında yapmış oldukları çalışmada göl, gölet, depo suyu ve nehirlerden 400 örnek toplamıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda % 20 göl, %10 gölet, %8 depo suyu ve %1 oranında nehirlerden *Legionella* izole etmişlerdir.

Nakipoğlu, 1999 yılında yapmış olduğu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi'nin 20 servis biriminden 70 duş başlığı ve 30 su deposundan 1 yıllık bir periyotta 100 su örneği toplamıştır. Toplanan 70 örnekten (duş başlığı) 4 (*L. jordanis*, *L. feeleeii*, *L.micdadei* ve *L. spp.*), 30 örnekten (su deposu) ise 2 (*L. jordanis* ve *Legionella spp.*) yani % 6 oranında *Legionella* spp. izole ettiğini belirtmiştir.

Zeybek, 2000 yılında yapmış olduğu çalışmada İstanbul'da bulunan 139 binaya ait 554 su örneğini incelemiştir. İncelenen 139 binadan 57 tanesinde toplamda 124 *Legionella* bakterisi izole etmiştir. İzolasyon oranı %22.3 olarak bulunmuştur.

Akkaya, 2009 yılında Kayseri ilindeki çeşitli hastane, okul, otel ve depo suyu, musluk-duş suyu, musluk-duş sürüntüsü örnekleri olmak üzere toplam 120 örnek toplamış ve bu örnekleri *Legionella* cinsi bakteri varlığı yönünden incelemiştir. Toplanan örneklerden 8 tane *Legionella* bakterisi izole edilmiş, bunların 2'si *Legionella* spp. ve 6'sı *L. pneumophila* serogrup 1 olarak kaydedilmiştir. İzolasyon oranını %6.6 olarak bulmuştur.

Pınarbaşı, 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Eskişehir'deki bazı hastanelerden hem su ve hem de sürüntü örneği olmak üzere 100 örnek toplamış ve *Legionella* cinsi bakteri varlığı yönünden incelemiştir. İzolasyon sonucunda 100 su örneğinin 12'sinde ve 100 sürüntü örneğinin 17'sinde toplamda 29 *Legionella* cinsi bakteri izole etmiştir. İzolasyon oranını %23 olarak bulmuştur.

Birteksöz; 2004 yılında yaptığı çalışmada İstanbul'un Avrupa ve Anadolu yakasında yer alan 56 otelin sıcak ve soğuk su sistemlerinin farklı kısımlarından topladığı 225 su örneğini *Legionella* bakterisi yönünden incelemiştir. Örneklerin toplandığı otellerin 22'sinden 50 tane *Legionella* bakterisi izole etmiştir. Bunların 16'sının serogrup 1, 34'ünün serogrup 2-15 olduğunu saptamıştır. İzolasyon oranı % 22.2 olarak belirlemiştir.

Lasheras ve arkadaşları 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada Fransa'da bulunan 10 hastanenin duş başlıkları, musluk suları, sıcak su tankları ve soğutma kulelerinden olmak üzere toplam 106 su örneğinden 67 *Legionella* spp. izole etmişlerdir. İzolasyon oranını %63.2 olarak belirlemişlerdir.

Sabria ve arkadaşları 1994 - 1996 yılları arasında İspanya'da bulunan 20 farklı hastaneden toplanan 196 su örneğinde 73 *Legionella* bakterisi izole etmişler, izolasyon oranını % 37,2 olarak belirlemişlerdir.

Ewglı ve Phls, 1995-1998 yılları arasında Avrupa'da Lejyonellozis açısından en riskli ülkeleri sıralamışlardır. Bunlar sırasıyla İspanya, Fransa, Türkiye, İtalya ve Yunanistan olarak bildirilmiştir. Bu ülkelerin ortak özelliği *Legionella* türlerinin kolonize olmasına uygun, deniz kıyısı bol, nem oranı yüksek ve sıcak ülkeler olmalarıdır. Daha önce yapılmış çalışmalarda dünyanın birçok yerinde çevre örneklerinden *Legionella* spp. izolasyon oranları % 0-97 iken Türkiye'de % 0-76,2 arasında olduğu kaydedilmiştir (İğnak, 2007). *Legionella* türlerinin çevre su örneklerinde kolonizasyon oranlarının mevsimsel farklılık gösterdiği, yaz ve sonbahar mevsimlerindeki oranların kış ve ilkbahara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (Bercovier, vd., 1986). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ki izolasyon oranının bu veriler göz önünde bulundurulduğunda düşük olduğu gözlenmektedir (izolasyon oranı 5,3). Bunun nedenleri arasında; coğrafi bölge, mevsim farklılıkları gösterilebilirken çalıştığımız örnekler arasında

insan yapımı su sistemlerinin olmaması ve *Legionella* bakterilerinin doğada daha az miktarda bulunuyor olması gösterilebilir.

Legionella bakterilerinin doğal ortamlarında olması Lejyoner hastalığı açısından fazla bir sorun teşkil etmemektedir. Hastalığına neden olan insan yapımı su sistemlerinde *Legionella* bakterilerinin sisteme yerleşmesi ve burada çoğalmasıdır (T.C.Sağlık B., 2016).

Çalışmamızda su örneklerinden *Legionella* cinsi bakterilerin izolasyonunda 10 gün süre ile takip edilen ve tipik koloni özelliğine sahip olan izolatlar (buzlu cam görünümü) alınıp kanlı agarda üreme özelliğine bakılmıştır. Kanlı agarda üreme göstermeyen izolatların gram boyama özelliklerine bakılmıştır. *Legionella* cinsine ait izolatlar aerob ve gram negatif boyanma özelliğine sahip bakteriler olduğu bilinmektedir.

İzole edilen *Legionella* şüpheli kolonileri serogrup ve biyokimyasal testler yapılarak tür düzeyinde ise identifikasyonu yapılmıştır. *Legionella* türlerin belirlenmesi işleminde (identifikasyonda); Nakipoğlu ve arkadaşları 1999'da yaptıkları çalışmada lateks aglütinasyon yöntemini kullanmıştır. Erdoğan ve arkadaşları da 2007'deki çalışmalarında serogrup tayininde lateks aglütinasyon testini uygulamışlardır. Köksal ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı çalışmada lam aglütinasyon ve DFA yöntemleri kullanılmıştır. Rivera ve arkadaşlarının 2007'de yaptığı çalışmada şüpheli koloniler lateks aglütinasyon yöntemi ile identifiye edilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada Yong ve arkadaşları 2010'da lateks aglütinasyon ve PCR yöntemlerini kullanarak *Legionella* izolatlarını identifiye etmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda izolasyon sonucunda şüphelenen izolatlara lateks aglütinasyon test kiti uygulanmıştır. İzolatların 8 tanesinden pozitif sonuç alınıp, bununlardan 6'sı *L. pneumophila* 2-15, diğer 2'si *Legionella* spp. olduğu bulunmuştur. Lateks aglütinasyon test kiti sonucuna göre *Legionella* izolasyon oranı % 5.3 olarak belirlenmiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada Türetgen ve arkadaşları 2009 yılında İstanbul'da bulunan farklı 41 diş ünitesinde kullanılan el aletleri, şırıngalar ve su kaynağından alınan 123 örnekten *Legionella* izole etmeye çalışmışlardır. Çalışmanın sonunda 41 diş ünitesinin 5'inde *L. pneumophila* serogrup 2-15 izole etmişlerdir. İzolasyon oranları % 4.06 olarak belirlenmiştir.

Özen ve arkadaşları 2017 yılında Antalya'da bulunan çeşitli otellerden 1403 numune toplamış ve 142 *Legionella* bakterisi izole etmişlerdir. Bu örneklerin % 85'inin *L. pneumophila* 2-15 serogrubuna ait olduğunu belirlemişler. Zeybek, 2000 yılında İstanbul'un çeşitli binalarından izole ettiği *Legionella*'ların %23'ünün serogrup 1, %77'sinin ise serogrup 2-15 olduğunu saptamıştır. Mutaf, 2013 yılında Gaziantep ilinden topladığı örneklerin %20.43'ünün

serogrup 1, % 79.56'sının serogrup 2-15 olduğunu bildirmiştir. Yine ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada; Burak, 2007 yılında ev su sistemlerinden % 12.5 oranında serogrup 1, % 87.5 oranında serogrup 2-15 izole etmiştir. Alim ve arkadaşları 2000 yılında İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan 36 kaplıcanın havuzlarından aldıkları 209 su örneğinin 24'ünde *L. pneumophila* izole etmişlerdir. İzolatların 15.4%'ü *L. pneumophila* serogrup 1, 84.6%'sı *L. pneumophila* serogrup 2-15 olarak gruplandırmıştır. Birteksöz ve arkadaşlarının 2004 yılında binaların su sistemlerinden izole ettikleri *L. pneumophila* suşlarının % 32'sinin *L. pneumophila* serogrup 1, % 68'inin ise serogrup 2-15 olduğunu saptanmışlardır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise %75 oranında *L. pneumophila* serogrup 2-15 izole edilirken %25 oranında *Legionella* spp. izole edilmiştir. Yapılan çalışmaların izolasyon oranlarına bakıldığında Türkiye'de en çok izole edilen türün *L. pneumophila* serogruplarının 2-15 olduğunu göstermektedir. Bu sonucu Türkiye'de *Legionella* vakalarına bağlı hastalıkların ve ölüm oranlarının dünya geneline göre daha az olmasının nedenini olarak açıklayabiliriz.

Pınar ve arkadaşları 2002 yılında klima sistemi bozuk olan bir otomobilin su sızıntısında PCR yöntemiyle *L. pneumophila* serogrup-1 varlığını göstermişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada, Okpara ve arkadaşları 1996 yılında Almanya'da 74 su örneğinden PCR ve kültür yöntemiyle 46 *Legionella* spp. izole etmişlerdir.

Legionella bakterileri üzerine elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar sonucunda hücre duvarı özelliğini bakımından Gram negatif bakteriler ile benzerlik gösterdikleri saptanmıştır (Nakipoğlu, 1999). Bu bakteriler gram yöntemiyle iyi boyanamazlar. Fakat gram negatif boyandıkları kabul edilir (Tuğrul, 2000). *Legionella* konusunda yapılan bütün çalışmalarda izole edilen *Legionella* bakterileri Gram negatif olarak saptanmıştır. Nitekim bizim yapmış olduğumuz çalışma sonucunda izole ettiğimiz 8 *Legionella* bakterisinin de boyanma özelliğinin Gram negatif olduğu saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda *Legionella* suşlarına uygulanan biyokimyasal testler sonucunda; bütün izolatların katalaz, sitrat, hareketlilik, jelatinaz ve indol oluşumu testlerinde pozitif sonuç verdiği, ancak glukoz, ksiloz, arabinoz, maltoz, sakkaroz ve fruktozdan asit oluşumu testlerinde ise negatif sonuç verdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmanın sonucu diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Legionella bakterisinin tüm türlerinin katalazı zayıftır (Yalnızca *L. wrotholensis*'in katalaz aktivitesi yoktur). Bu cinste oksidaz negatif veya zayıf pozitifdir. Çoğu türler üreaz negatif, nitrat negatiftir. *L. micdadei*, *L. feeleii* ve *L. nautarum* dışındaki türler jelatini eritirler. Çoğu türler tirozinden, erir bir pigment oluştururlar. Hippurat hidrolizi testi *L. pneumophila*'da

kuvvetli pozitif olduğundan, bu türe diğerlerinden ayırmak için basit bir yöntemdir (Ustaçelebi, 1991).

Birteksöz, 2014 yılında yapmış olduğu çalışmada izole ettiği *Legionella* bakterileri üzerinde yaptığı biyokimyasal testlerin sonucunda izolatların; katalaz, oksidaz, jelatinaz, beta laktamaz oluşturan, üreyi parçalamayan, glukoz, laktoz, sakkoroz, mannitol, ksiloz, maltozdan asit oluşturmayan, sodyum hippurati kullanan bakteriler olduğunu göstermiştir. Nakipoğlu ise 1999 yılında yapmış olduğu çalışmada hastanenin farklı ortamlardan izole ettiği *Legionella* bakterilerine bazı biyokimyasal testler yapıp farklı sonuçlar elde etmiştir. Onkaloji servisinden izole ettiği bakteriler; jelatini eriten, beta laktamaz oluşturan, hipurat hidrolizi negatif olan, hareketli, oksidaz deneyi pozitif *Legionella* 'lar iken; iç hastalıklar anabilim dalından topladığı örnekler, jelatini eritmeyen, hareketli, hipurati hidrolize eden *Legionella* 'lar olarak bulunmuştur.

Yapılan bir diğer çalışmada İğnak (2006), İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi su sistemlerinden topladığı sulardan izole ettiği 7 (3 tanesi *Legionella* spp. 4 tanesi *L. pneumophila*) *Legionella* bakterisine uyguladığı testler sonucunda; 3 *Legionella* spp. örneğinin hipurat hidrolizinin negatif 4 *L. pneumophila* örneğinin ise pozitif, 6 örneğin oksidaz deneyinin pozitif 1 (*Legionella* spp.) örneğinin ise negatif, 4 *L. pneumophila* örneğinin katalaz deneyinin negatif, 3 *Legionella* spp. örneğinin pozitif olduğunu belirtirken, bütün örneklerin hareketlilik deney sonuçlarının pozitif olduğunu saptamıştır.

Subbaram ve arkadaşlarının 2017'de yaptıkları çalışmada izole etikleri *Legionella* 'lara katalaz, nitrat, üreaz, oksidaz, jelatinaz ve glikoz fermentasyon testleri uygulamışlardır. Bunun sonucunda bütün izolatların; üreaz negatif, nitrat negatif, jelatinaz, katalaz ve oksidaz testlerinin pozitif sonuçlar verdiğini saptamıştır.

Metallerin mikroorganizmaların yaşamında bütünleyici rolleri vardır. Bazı metaller (kalsiyum, kobalt, bakır, krom, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel, çinko) esansiyeldir ve besinsel rolleri vardır. Bazıları ise (gümüş, alüminyum, kadmiyum, altın, civa ve kurşun gibi) esansiyel değildir ve biyolojik rolleri yoktur. Protein yapısının ve bakteri hücre duvar yapısının stabilize edilmesi, biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesi, osmotik dengenin korunması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, biyomoleküllerin aktive edilmesi gibi elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında esansiyel metaller önemli rol oynamaktadırlar (Faulkner, 2000).

Çalışmamızda *Legionella* bakterisinin ağır metal dirençlilik düzeyleri Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olup, bu değer mikroorganizmanın tolerans yeteneğini kaybettiği bu nedenle gelişiminin engellendiği en düşük metal konsantrasyonu olarak

adlandırılır. Mikroorganizmaların özellikle su ortamında tolerans yeteneklerinin olması ekolojik açıdan çok önemlidir. Mikroorganizmaların ağır metalleri bertaraf etme mekanizmaları birbirinden farklı olup çeşitli sistemleri kullanırlar.

Bu çalışmada *Legionella* izolatlarının 8 ağır metal ve bu metallerin 9 farklı konsantrasyonuna karşı toleranslılıkları belirlenmiştir. Elde edilen izolatların ağır metal dirençlilik düzeylerini belirlemek amacıyla agar dilüsyon yöntemi ile Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir (Çizelge 3.4). Özellikle kurşun ve kadmiyum gibi toksisitesi yüksek olan ağır metaller tercih edilmiştir. Bütün izolatların referans suş olarak kullandığımız *E. coli* ATCC 25922 ile kıyaslaması yapılmış ve bu suşun ağır metallere gösterdiği MİK değerinden daha yüksek bir MİK değeri gösteren izolatlar toleranslı olarak değerlendirilmiştir. Test ettiğimiz *Legionella* izolatlarının %100 kurşun ve krom ağır metaline karşı toleranslı olduğu tespit edilmiştir.

Kurşun atmosfere metal veya bileşik olarak yayıldığından ve her durumda toksik özellik taşıdığından çevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metaldir. Elde edilen izolatların kurşun'a karşı en yüksek MİK değeri 4 mM/mL olarak bulunmuştur. Ağır metaller kayaçların ve dolayısıyla toprakların doğal bileşenleridir ve topraklar bileşimlerine bağlı olarak farklı oranlarda ve farklı formlarda ağır metal içerirler (Madigan, 2006). Bu tip topraklara serpentinli topraklar denir. Bu bölgeden elde edilen izolatların ağır metallere karşı toleranslılıklarının yüksek olmasının, bölgedeki toprak yapısının serpentinli olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İkinci olarak izolatların, %12.5 nikel, çinko, kobalt ve bakır ağır metaline karşı toleranslı olduğu belirlenmiştir. Test edilen *Legionella* bakterilerinin demir ve kadmiyum ağır metaline karşı toleranslı olmadığı bulunmuştur. Çalışmamızın *Legionella* toleranslılık düzeyine göre ağır metalleri bir sıraya koymak gerekirse, $Cr = Pb > Ni = Zn = Co = Cu > Fe = Cd$ olduğunu söyleyebiliriz.

Colbourne ve Trew'in (1986) yapmış olduğu çalışmada sıcaklığı 48°C'nin altında olan sularda; demir, potasyum ve çinko oranının düşük olmasının *Legionella* kolonizasyonunu arttırdığını göstermiştir (Colbourne, vd., 1989). Buda gösteriyor ki *Legionella* bakterileri için demir ve çinko gibi maddeler bu mikroorganizmaların kolonizasyonu için önem arz etmektedir.

Çeşitli habitatlardan yapılan mikroorganizma izolasyon çalışmasında, mikroorganizmalardaki metal dirençlilik genlerinin konjugatif plazmitler ve transpozonlar üzerinde kodlandığını ve bu markerlarla çevreye yayıldığı bir çok çalışma ile ortaya konulmuştur.

Mikroorganizmalar primer ve sekonder olmak üzere iki temel tipte mikrobiyal metabolit oluştururlar. Primer metabolit mikroorganizmaların üreme fazı sırasında oluşan üründür. Aksine, sekonder metabolit üreme fazının sonuna yakın, çoğunlukla, üremenin durağan fazında, yakınında veya içinde oluşan üründür. Mikroorganizmalar rekabet halindeki diğer mikroorganizmaları ürettikleri sekonder metabolitlerle durdururlar veya yok ederler. Sekonder metabolitler, primer metabolizma ürünlerinden sentezlenirler (Madigan, 2006). 8 *Legionella* bakterisinin Nutrient agar ve BCYE agar olmak üzere iki besiyerinde üretmek koşulu ile agar blok yöntemi ile sekonder metabolit üretme yetenekleri değerlendirilmiştir. *Legionella* izolatlarının sekonder metabolit üretme kapasiteleri Gram pozitif bakterilerden; *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. aureus*; Gram negatif bakterilerden; *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. coli* (yabani), *A. hydrophila*; mayalardan; *S. cerevisiae* ve *S. Boulardii* bakterilerine karşı denenmiştir. İzolatların test edilen mikroorganizmalara karşı önemli denebilecek düzeyde sekonder metabolit üreterek mikroorganizmaları inhibe etme kapasitesinin olmadığı tespit edilmiştir.

İzole edilen *Legionella* izolatının agar disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik dirençlilik profili belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada; amikasin, ampisilin, gentamisin, tetrasiklin, ofloksasin, sefotaksim, kanamisin, sulbaktam, imipenem, eritromisin, doksisisiklin, siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotikleri kullanılmış ve 3 farklı sıcaklık (27°C, 37°C ve 40°C) denenmiştir.

Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak izole ettiğimiz *Legionella* bakterilerinin antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi aşamasında yapılan disk difüzyon ve MİK, deneylerinde 27°C, 37°C ve 40°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın sonunda sıcaklıklar arasında çok fazla bir fark elde edilememiştir. Bunun nedeni olarak *Legionella* bakterilerinin 0-63°C arasındaki sıcaklıklarda üreme yeteneğine sahip olması ve 25-45°C'ler arasında üreme yeteneğinin optimum olması gösterilebilir.

Legionella bakterilerinin en yüksek antibiyotik dirençliğinin %100'ü sefotaksime karşı olduğu ve geriye kalan bütün antibiyotiklere dirençli olmadıkları saptanmıştır. Denenen üç sıcaklık değerinde de sefotaksim antibiyotiğine karşı *Legionella* izolatlarının dirençli olduğu belirlenmiştir. Antibiyogram çalışmalarında inkübasyon sıcaklıklarının önemli olmasından dolayı üç farklı sıcaklıkta deneylerin yapılması düşünülmüştür. Sefotaksim antibiyotiği, sefalosporin grubu bir antibiyotik olup, bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder. Mikroorganizmaların antibiyotik dirençliliği kromozomal veya plazmitler aracılığıyla sağlanır ve genel olarak; membran permabilitesinin azaltılması, inaktif hale getirilmesi, antibiyotığın dışarı

atılması ve hücredeki etki yerlerinin değiştirilmesi stratejisi dirençlilik sağlamaktadır (Kamala, 2008).

Fakültatif hücre içi patojenler olan *Legionella* cinsi bakteriler hücre duvarına etki eden antimikrobiyal ajanlardan etkilenmezler. Bu nedenle in-vitro duyarlılık deneylerinin henüz bir standardı bulunmamaktadır. Yapılan deneylerde duyarlılık deney sonuçları, kullanılan besiyeri vb. nedenlerle değişmektedir (Stout, vd., 2003).

Doksisiklin, Siprofloksasin ve Levofloksasin antibiyotikleri kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile *Legionella* izolatlarının Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada üç antibiyotiğin mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. Bütün izolatlar için üç farklı sıcaklıkta siprofloksasin, levofloksasin ve doksisiklin antibiyotikleri %100 duyarlı olduğu tespit edilmiştir. CLSI'e göre doksisiklin antibiyotiğinin duyarlı olduğu MİK değerinin ($\leq 4 \mu\text{g/mL}$), Siprofloksasin antibiyotiğinin duyarlı olduğu MİK değerinin ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$), Levofloksasin antibiyotiğinin duyarlı olduğu MİK değerinin ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$) olduğu bilinmektedir. Bu veriler ışığı altında bizim 8 izolatımızın MİK değerlerine göre kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda 8 bakteri izolatının doksisiklin antibiyotiğine karşı MİK değeri üç sıcaklık değerinde de MİK değerleri $0.05\text{-}0.21 \mu\text{g/mL}$ arasında bulunmuştur. *Legionella* bakterisine karşı in vitro çalışmalarla etkili olduğu belirlenen doksisiklin, lejyoner hastalığının tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir (Edelstein, 1995; Havlıcek ve ark., 1987); Nowicki ve ark., 1987). Yapılan çalışmalarda; Schülin ve arkadaşları (1989), klinik örneklerden izole edilen *Legionella* suşlarına karşı çeşitli antibiyotiklerin etkilerini araştırdıkları çalışmada, doksisikline ait MİK değerlerinin $1.0\text{-}8 \mu\text{g/mL}$ arasında, Havlıcek ve arkadaşlarının (1987), ise doksisiklinin *L. pneumophila* suşuna karşı saptanan MİK değerini $0.39 \mu\text{g/mL}$ olarak bildirmişlerdir. Birteksöz (2004), yapmış olduğu çalışmada doksisiklinin saptanan MİK değerlerinin $0.125\text{-}16 \mu\text{g/mL}$ arasında olduğunu bildirmiştir.

Bizim çalışmamızda 8 bakteri izolatının siprofloksasin antibiyotiğine karşı MİK değeri üç sıcaklık değerinde de MİK değerleri $0.02\text{-}0.10 \mu\text{g/mL}$ arasında bulunmuştur. Siprofloksasin antibiyotiğinin *Legionella* bakterisi üzerindeki etkisini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda; Martin ve arkadaşları (2006), klinik örneklerden izole ettikleri 34 *L. pneumophila* suşunu kullanarak MİK değerlerini $1\text{-}2 \mu\text{g/mL}$ arasında belirlerken, Hoogkamp ve Korstanje'nin (1997), çeşitli antibiyotiklerin etkisini araştırdıkları çalışmalarında klinik örneklerden izole edilen *L. pneumophila* suşuna karşı siprofloksasinin saptanan MİK değerlerinin $0.015\text{-}0.06 \mu\text{g/mL}$ arasında olduğunu; Tsakris ve arkadaşlarının (1999), MİK

değerlerini 0.06-0.25µg/mL arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada Onody ve arkadaşlarını (1997), kliniklerden izole ettikleri 98 *L. pneumophila* suşuna karşı siprofloksasinin MİK değerlerini 0.015-0.03 µg/mL olarak saptamışlardır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Birteksöz (2004), 56 otelin su sistemlerinden izole edilen 50 *L. pneumophila* suşuna karşı siprofloksasinin mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerlerinin 0.0078->2µg/mL arasında olduğunu belirlemiştir.

Bizim çalışmamızda 8 bakteri izolatının levofloksasin antibiyotiğine karşı MİK değeri üç sıcaklık değerinde de 0.02-0.10 µg/mL arasında bulunmuştur. *L. pneumophila*'ya karşı antibakteriyel aktivitesi fazla olan levofloksasin yeni bir florokinolondur (Schrock, 1997).Yapılan çalışmalarda, Stout ve arkadaşları (2003), klinik ve çevre kaynaklı *L. pneumophila* suşlarına karşı levofloksasinin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda MİK değerlerini 0.015-0.03µg/mL arasında, Martin ve arkadaşları (1996), ise MİK değerlerini 0.5-1µg/mL arasında olarak bulmuşlardır. Yapılan diğer çalışmalarda Takahata ve arkadaşları (1999), 15 *Legionella* suşuna karşı levofloksasinin MİK değerlerini 0.0039-0.0156µg/mL arasında olarak belirlerken; Garcia ve arkadaşları (2000), 270 *L. pneumophila* suşu üzerinde çeşitli antibiyotiklerin etkilerini araştırmış oldukları çalışmada saptanan MİK değerlerinin 0.007-0.03µg/mL arasında, Baltch ve arkadaşları (1995), 43'ü klinik 15'i çevre kaynaklı olan 56 *L. pneumophila* suşuna karşı levofloksasinin MİK değerlerini 0.003-1µg/mL arasında, olduğunu saptamışlardır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Birteksöz (2004), izole ettiği *Legionella* suşlarının levofloksasine karşı MİK değerlerinin 0.0039->1µg/mL arasında olduğunu saptamıştır.

Yapılan çalışmada siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotikleri bütün izolatlar için %100 duyarlı olarak değerlendirilirken; doksisisiklin için orta derecede duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar bütün sıcaklıklar için geçerlidir. Sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

İzolatların üç antibiyotiğe karşı MİK değerleri belirlendikten sonra damlatma yöntemi ile Minimal bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen MBK değerleri ise; 27°C için; doksisisiklin 0,10-0.43µg/mL, Siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotiğine karşı, 0.02 ile 0.10 µg/mL arasında olduğu tespit edilmiştir. 37°C için; Doksisisiklin antibiyotiğine karşı, MBK değeri 0.10 ile 0.43 µg/mL arasında, siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotiğine karşı MBK değeri ise 0.02-0.10 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. 40°C'de; doksisisiklin antibiyotiğine karşı bütün izolatların MBK değeri 0.10 ile 0.43 µg/mL arasında, siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotiğine karşı, MBK değeri ise 0.02-0.10 µg/mL

olduğu tespit edilmiştir. Birteksöz 2004 yılında yapmış olduğu MİK deneyinin akabinde *L. pneumophila* suşuna karşı siprofloksasin, levofloksasin ve doksisisiklin MBK değerlerini de saptamıştır. Çalışmanın sonucunda siprofloksasin için 0.0078->16µg/mL, levofloksasin için 0.0078->1µg/mL ve doksisisiklin için 0.5-32µg/mL olarak MBK değerlerini saptamıştır.

Ülkemizde *Legionella* bakterisi üzerine yapılan çalışmalar baz alındığında ülke genelinde bir çok şehir için yapılan çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda daha önce *Legionella* bakterisi ile çalışma yapılmamış olan Kütahya ilinde bulunan doğal sulardan *Legionella* izole edilmiştir. Lejyoner hastalığına sebep olan özellikle immun sistemi baskılanmış kişilerde ölümcül olan *L. pneumophila* sg (1)'e rastlanmaması sevindirici bir durumdur. Bunun yanında izole edilen ve tür düzeyinde identifikasyonu yapılan bakterilerin ağır metal ve antibiyotik dirençlilik profilleri de ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmanın ileride yapılacak çalışmalara ışık tutması ve daha da geliştirilmesi için ön çalışma olarak yapılmış olması yönünden önem arz etmektedir.

KAYNAK DİZİNİ

- Abigail A., Whitt S., Whitt DD. (1994), Legionnaires' Disease. In Abigail A, Whitt S, Whitt DD (eds), Bacterial Pathogenesis; A molecular Approach. Amer Soc Microb, Washington D.C. s. 301-306.
- Afacan G., Yumuk Z., Baskın Y., Balıkcı E., (2006), 'Turistik bölgelerden alınan su örneklerinde *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 sıklığı.' Türk Mikrobiyol Cem Derg. 34: 214-218.
- Akalın, H.E., (1993). Atypical pneumonias: Therapeutic possibilities. *Int J Antimicrob Agents*. **3**, 75.
- Akbaş, E., (1996). *Legionellaceae*; Intracellüler Parazitizm. *Mikrobiyol Bolt*, **30**, 313-322.
- Akkaya Z., (2009), Kayseri'deki Farklı Binaların Su Depolarından *Legionella* Araştırılması, Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Alim, A., (2002). İç Anadolu Bölgesinde Bulunan Kaplıcaların Termal Havuz Sularında *Legionella pneumophila* Araştırması. *Doktora Tezi*, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas.
- Alim, A., Hakgüden, Y., ve Poyraz, Ö., (2002) İç anadolu bölgesinde bulunan kaplıcaların termal havuz sularında *Legionella pneumophila* araştırması, *Mikrobiyol Bul*, 36: 237-246.
- Anonim, (2012), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9. Edition (M07-A9), Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne PA, , 68s.
- Azara A., Piana A., Sotgiu G., Dettori M., Deriu MG., Masia MD., Are BM., Muresu E., (2006), Prevalence study of *Legionella spp.* contamination in ferries and cruise ships. *Apr* 18;6:100.
- Bigersson B., Sterner O., Zimerson E., (1988), Chemie und Gesundheit "Eine verständliche Einführung in die Toxikologie", VCH Verlagsgesellschaft, , ISBN 3-527-26455-8.
- Baltch, A.L., Smith, R.P. ve Ritz, W., (1995), Inhibitory and bactericidal activities of levofloxacin, ofloxacin, erythromycin, and rifampin used singly and in combination against *Legionella pneumophila*, *Antimicrob Agents Chemother*, 39 (8), 1661-1666.
- Bangsberg JM., Gerner-Smidt P., Colding H., Fiehn NE., Bruun B., Hoiby N., (1995), Restriction fragment length polymorphism of rRNA genes for molecular typing of members of the family *Legionellaceae*. *J Clin Microbiol*; 33 (2): 402-406.
- Baron, E.J., Tenover, S.M. (1990). Unclassified or Unusual but Easily Cultivated Etiologic Agents of Infectious Disease. 8th Edition, Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. C.V. Mosby Company. s.578-583.
- Bartie C., Venter SN., Nel LH., (2003), Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Wat Res*; 37: 1362-1370.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J. V., (2007), *Legionella* and the Prevention of Legionellosis, *WHO Health Organization* , India, 92- 4- 156297- 8.
- Bercovier H., Fattal B., Shuval H., (1986), Seasonal distribution of *Legionellae* isolated from various types of water in Israel. *Isr J Med Sci*; 22:644-6. PMID:3793447.
- Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., Chemie ve Gesundheit, (1988), Eine verst 2nd liche einföhrung in die toxikologie, VCH Verlagsgesellschaft, isbn 3-527-264455-8s.
- Bilim Laboratuvarları, (2015), Su Sistemlerinde *Legionella* Kontrolü, İstanbul.
- Birteksöz A., (2004), Antibiyotiklerin *Legionella Pneumophila* Şuslarına Karşı İn Vitro Etkilerinin Araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Blatt SP., Parkinson MD., Page E., (1993), Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Amer J Med*; 95: 16-22.
- Bollin, G.E., Plouffe, J.F., Para, M.F. ve Prior, R.B. (1985) Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*, *J. Clin. Microbiol.*, 21:674-677.
- Bridge JA., Edelstein PH., (1983), Oropharyngeal colonization with *Legionella pneumophila*. *JClin Microbiol*; 18: 1108-1112.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., (2000), Microbial Resistance to Metals in the Environment, *Ecotox. Environ.Safe.*, 45:198-207s.
- Burak, D., (2007), Ev Su Sistemlerinde *Legionella* ve Serbest Yaşayan Amiplerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Catalan V., Moreno C., Dasi MA., Munoz C., Apraiz D., (1994), Nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in water. *Res Microbiol*; 145(8):603-610.
- Chopra, I., Hawkey, P.M. ve Hinton, M., (1992), Tetracyclines, molecular and clinical aspects, *J Antimicrob Chemother*, 29 (3), 245-277.
- Colbourne JS., Trew RM., (1986), Presence of *Legionella* in London's water supplies, *Isr J Med Sci*:633.
- De Luca G., Stampi S., Lezzi L., Zanetti F., (1999), Effect of heat and acid decontamination treatments on the recovery of *Legionella pneumophila* from drinking water using two selective media. *New Microbiol*; 22 (3): 203-208.
- Declerck, P., (2010), Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*, *Environ. Microbiol.*, 12: 557-566.
- Demain, A.L. ve Davies, J.L., (1999), Manual of industrial microbiology and Biotechnology 2nd Edition, 392-416s.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Dutil, S., Tessier, S., (2006), Detection of *Legionella* spp. by Fluorescent in Situ Hybridization in Dental Unit Waterlines, *Journal and Applied Microbiology*, cilt. 100, No. 5, 955-963.
- Eberly BJ., Whelen AC., (2007), *Legionella*. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. (eds). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Elsevier; 485-493.
- Edelstein, P.H., (1991), Rifampin resistance of *Legionella pneumophila* is not increased during therapy for experimental Legionnaires disease: study of rifampin resistance using a guinea pig model of Legionnaires disease, *Antimicrob Agents Chemother*, 35 (1), 5-9.
- Edelstein, P.H., (1995), Antimicrobial chemotherapy for legionnaires' disease, *Clin Infect Dis*, 21 (3), 265-276.
- Edelstein, PH., (1993), Legionnaires' disease, *Clin Infect Dis*, 16 (6), 741-747.
- Edelstein PH., (1982), Comprative study of selective media for of *Legionellla pneumophila* fropotable water. *J Clin Microbiol*; 16: 697-699.
- Erandaç M., Elaldı N., (2001), Hastane Musluk Ve Duş Sularında *Legionella* Cinsi Bakterilerin Araştırılması, *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 23 (2): 81 - 83.
- Erdem B., (1999), *Legionella*. Ustaçelebi S., ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji'de*. Ankara: Günes Kitabevi, 559-66.
- Erdoğan H., Arslan H., (2007), Colonization of *Legionella* species in hotel water systems in Turkey. *J Travel Med*; 14 (6): 369-373.
- Ergin C., Yalçın AN., Pınar A., Çetin CB., Turgut H., (1998), Pamukkale yöresi termal su kaynaklarında kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu ile *Legionella* türlerinin araştırılması, *Mikrobiyol Bult* 32: 227.
- Faulkner, D.J., (2000), Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.*, 17s.
- Fields BS., Benson RF, Besser RE., (2002), *Legionella* and legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*; 15 (3): 506-526.
- Fields BS., (1996), The molecular ecology of *Legionellae*. *Trends in Microbiology*, 4 (7): 286-90.
- Fliermans CB., Harvey RS., (1984), Effectiveness of 1-bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin against *Legionella pneumophila* in a cooling tower, *Appl Environ Microbiol*; 47 (6): 1307-10.
- Franzin L., Cabodi D., Fantino C., (2002), Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by *Legionella*. *J Hosp Infect*; 51 : 269-274.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

Fraser DW., (1991), *Legionellosis*. In: Evans AS, Brachman PS (eds), *Bacterial Infections of Humans*. 2nded. Plenum Publishing Corp. New York, NY.; 333-47.

Garcia, M.T., Pelaz, C., Gimenez, M.J. ve Aguilar L., (2000), *In vitro* activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test results, *Antimicrob Agents Chemother*, 44 (8), 2176-2178.

Garity GM., Brown A., ve Vickers RM., (1980), *Tatlockia* and *Fluoribacter*. Two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *Int J Syst Bacteriol*; 30: 609-614.

Gebhardt, K., Schimana, J., Otand, J., Fiedler, H.P, Kallenborn, G.H., Holzenkampfer, M., Krastel, P., Zeeck, A., Vater, J., Hölzel, A., Schmid, G.D., Rheinheimer, J. ve Dettner, K., (2002), Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. *Fems Microbiology Letters*, 217,s.199-205 .

Goutziana G., Mouchtouri VA., Karanika M., Kavagias A., Stathakis NE., Gourgoulialis K., Kremastinou J., Hadjichristodoulou C., (2008), *Legionella* species colonization of water distribution systems, pools and air conditioning systems in cruise ships and ferries. *Nov* 24;8:390. doi: 10.1186/1471-2458-8-390.

Harnett, N.M. ve Gyles, C.L., (1984), Resistance to drugs and heavy metals colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:930-945s.

Harrison TG., ve Taylor AG., (1988), Phenotypic characteristics of *legionellae*. In: Harrison TG, ve Taylor AG. (eds), *A laboratory manual for legionella*. Chichester: *Jhon Wiley & Sons*; pp 45-46.

Harrison, T.G., (2006). *Legionella*, Topley and Wilsons Microbiology and microbial Infections 10th Edward Arnold (publishers) Ltd. London. pp 1761-1785.

Havlichek, D., Saravolatz, L., ve Pohlod, D., (1987), Effect of quinolones and other antimicrobial agents on cell-associated *Legionella pneumophila*, *Antimicrob Agents Chemother*, 31 (10), 1529-1534.

Hilbi, H., Hoffmann, C., ve Harrison., C.F. (2011), *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence, *Environ Microbiol Rep*,3: 286-296.

Hoffman PS., Pine L., ve Bell S., (1983), Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl Environ Microbiol*; 45, 784-791.

Hoogkamp-Korstanje J.A., (1997), *In-vitro* activities of ciprofloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, ofloxacin, pefloxacin, sparfloxacin and trovafloxacin against gram-positive and gram-negative pathogens from respiratory tract infections, *J Antimicrob Chemother*, 40 (3), 427-431.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

Hooper, D.C., (1999), Mechanisms of fluoroquinolone resistance, *Drug Resist Updat*, 2 (1), 38-55. *Drug Resist Updat*, 2 (1), 38-55.

Hughes, M.N., Poole, R.K., (1989), *Metals and Micro-organism.*, Chapman and Hall, London.

International Standard, ISO 11731,(1998), *Water Quality- Detection and Enumeration of Legionella*, First Edition.

Isenberg HD, (2004), *Clinical Microbiology Procedures* .2nd ed.Washington DC: ASM Pres.

İğnak, S., (2007), İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi su sistemlerinde *Legionella* cinsi bakterilerin araştırılması. *Yüksek lisans tezi*, İstanbul Tıp Fakültesi.

Jantzen E., Sonesson A., Tangen T., Eng J., (1993), Hydroxy- fatty acid profiles of *Legionella* species: diagnostic usefulness assessed by principal component analysis, *J Clin Microbiol*;31 (6):1413-9.

Ji, G., ve Silver, S., (1995), Bacterial resistance mechanism for heavy metals of enviromental concern, *J.Ind.Microbiol.* 14:61-168s.

John H., Duffus., Howard G.J., (1996), Worth, “Fundamental toxicology for chemists”, Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry Information Services.

Kamala-Kannan, S. , Lee, K.j., (2008),’ Metal tolerance and Antibiotic Resistance of B. Species Isolated from Sunchon Bay Sediments, South Korea’, Research Institute of Bioindustry. Collageof Agriculture and Life Science, Chonbuk National University, Jeonju,561-756.

Kim BR., Anderson JE., Mueller SA., Gaines WA., Kendall AM., (2002), Literature reviewefficac of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res*; 36: 4433-4444.

Koç, L., (2012), Bazı Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal, Antioksidan ve Sitotoksik Etkileriyle, Kanseri Dokularda Adenozin Deaminaz Enzimi Üzerine Etkisi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Koneman EW., Allen SD., Janda WM., Schreckenberger PC., Winn Jr WC., (1997), *Legionella*. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC (eds). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.; 473-89.

Kool JL., Bergmire-Sweat D., Butler JC., Brown EW., Peabody DJ., Massi DS., Carpenter JC., Pruckler JM., Benson RF., Fields BS., (1999), Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *legionella* and risk of nosocomial legionnaires’ disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*; **20**: 798-805.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Kool JL., (2002), Control of *Legionella* in drinking water systems: impact of monochloramine. In: Marre R (ed) et al. *Legionella*. Washington, DC: ASM Press; 411-418.
- Köksal F., Oğuzkurt N., Samastı M., (2002), İstanbulda üç eğitim hastanesinin depo ve musluk sularında *Legionella* bakterilerinin araştırılması. *Klinik Derg.*; 15 (1): 16-18.
- Krumperman, P. H. , (1985), Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. *Appl Environ Microbiol.*
- Lasheras A., Boulestreau H., Rogues AM., Ohayon-Courtes C., Labadie JC., GachieJP., (2006), Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control*; 34 (8): 520-525.
- Leoni E., (2001), Legnani PP. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *J Appl Microbiol*; **90**:27-33.
- Li, X.Z., Nikaido, H. ve Williams, K.E., (1997), Silver-resistance Mutants of *Escherichia coli* Display Active Efflux of Ag⁺ and are Deficient in Porin., *J. Bacteriol.*, 179 (19): 6127-6132s.
- Lisby G., Dessau R., (1994), Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples. *Eur J microbiol Infect Dis*; 13 (3): 225-231.
- Liu Z., Stout JE., Tedesco L., (1994), Controlled evaluation of copper/silver ionization in eradication of *Legionella* from a hospital water distribution system, *J Infect Dis*;169 (4): 919-22.
- Madigan, M. T. , Martinko, J. M. ve Parker J., (2006), Brock Biology of Microorganisms. 11th edition, Prentice Hall.
- Maiwald M., Helbig JH., Lück PC., (1998), Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *J Microbiol Meth*; **33**: 59-79.
- Maiwald M., Kissel K., Srimuang S., Knebel Doeberitz M., Sonntag HG.,(1994), Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of *legionellas* in hospital water samples. *J Appl Bacteriol*; **76** (3): 216-225.
- Martin, S.J, Pendland, S., Chen, C., Schreckenberger, P. ve Danziger, L.H., (1996), *In vitro* synergy testing of macrolide-quinolone combinations against 41 clinical isolates of *Legionella*, *Antimicrob Agents Chemother*, 40 (6), 1419- 1421.
- Masaoka, T., Suzuki, H. , Kurabayashi, K., Kamiya, A., Shii, H., (2003), Gastroenterology, Cilt 124, Sayı 4, supplement 1, s. A406.
- Mashiba, K., Hamamoto, T. ve Torikai, K., (1993), A case of Legionnaires' disease due to aspiration of hot spring water and isolation of *Legionella pneumophila* from hot spring water, *Kansenshogaku Zasshi*, 67:163-166.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

McEntee, J.D., Woodrow, J.R., ve Quirk, A.V., (1986), Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:515-520s.

Mekkour, M., Driss, E.K.B., Tai, J. ve Cohen, N. (2013), *Legionella pneumophila*: An environmental organism and accidental pathogen, *International Journal of Science and Technology*, 2: 187-196.

Miyamoto H., Yamamoto H., Arima K., Fujii J., Maruta K., Izu K., Shiomori T., Yoshida S., (1997), Development of new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *legionellae* in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol*; **63** (7): 2489-2494.

Moffie, B.G. ve Mouton, R.P., (1988), Sensitivity and resistance of *Legionellapneumophila* to some antibiotics and combinations of antibiotics, *J Antimicrob Chemother*, 22 (4), 457-62.

Morrill WE., Barbaree JM., (1990), Increased recovery of *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin. *J Clin Microbiol*; 28: 616-618.

Muder, R.R. ve Yu, V.L., (2002), Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*, *Emerging infections*, 35, 990-998.

Murdoch DR., (2003), Diagnosis of *Legionella* infection. *Med Microbiol*.

Mutaf S., (2013), Gaziantep İl Merkezindeki Çeşitli Soğutma Sistemleri Ve Su Sistemlerindeki *Legionella pneumophila* Varlığının Araştırılması.

Nakipoğlu Y., (1999), İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde kullanılan sularda *Legionella* cinsi bakterilerin araştırılması, Doktora tezi, İstanbul Tıp Fakültesi.

Nash P., Krenz MM., Culture media, In Murray PR., Baron EJ., Pfaller MA., Tenover FC., Tenover FC., (1991), *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Amer Soc Microb, Washington D.C.; p: 533-44.

National Committee For Clinical Laboratory Standards, (2000), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 5.ed. Approved Standard M7-A5 NCCLS, Wayne.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, (1990), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard (M7-A2), National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

Nowicki, M., Paucod, J.C., Bornstein, N., Meugnier, H., Freney, J., Isoard, P. ve Fleurette, J.,(1987), Doxycycline treatment of experimental legionellosis in guinea pigs infected by aerosol, *Pathol Biol (Paris)*, 35 (5 Pt 2), 865- 869.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

Okpara J., Maiwald M., Windeler J., Sonntag HG., (1996), Evaluation of a new version of the EnviroAmp Legionella kit for the detection of Legionella in water samples by the polymerase chain reaction. Zentrabl Hyg Umwelted.

Onody, C., Matsiota-Bernard, P. ve Nauciel, C., (1997), Lack of resistance to erythromycin, rifampicin and ciprofloxacin in 98 clinical isolates of *Legionella pneumophila*, *J Antimicrob Chemother*, 39 (6), 815-816.

Orrison, L.H., Cherry, W.B., Fliermans, C.B., Dees, S.B., McDougal, L.K. ve Dodd, D.J. (1981) Characteristics of environmental isolates of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 109-115.

Özçelik, S., (1995), Genel mikrobiyoloji uygulama klavuzu, Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Yayın No:2, Ders kitapları, Isparta.

Pedersen, J., (1992), Natamycin as a Fungicide in Agar Media, *Applied and Environmental Microbiology*, Cilt. 58, No. 3, 1064- 1066.

Pınar A., Ramirez JA., Schindler LL., Miller RD., Summersgill JT., (2002), The use of heteroduplex analysis of polymerase chain reaction products to support the possible transmission *Legionella pneumophila* from a malfunctioning automobile air conditioner. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 23: 145-7.

Pınar A., (2002). Doğa Kaynaklı İnsan Patojeni *Legionella*; Tanı ve Korunma Yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33 (2): 93-98.

Pınarbaşı, M., (2011), Eskişehir’de Klinik Örneklerde ve Sularda *Legionella* spp. Araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi.

Rivera JM., Aguilar L., Granizo JJ., Vos-Arenilla A., Gimenez MJ., Aguiar JM., Prieto J., (2007), Isolation of *Legionella* species/serogroups from water cooling systems compared with potable water systems in Spanish healthcare facilities. *Journal of Hospital Infection*; 67: 360-366.

Rodgers FG., Greaves PW ve Macrae AD., (1979), Flagella and fimbriae on *Legionella* ororganisms. *Lancet*; 2: 753-754.

Rodgers FG., Greaves PW., (1980), Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J Clin Pathol*; 33: 1184-1188.

Rouch, D.A., Lee, B.T.D., ve Morby, A.P., (1995), Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance, *J.Ind Microbiol.*, 14:132-141s.

Rowbotham, T.J., (1980), Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *J Clin Pathol*, 33: 1179-1183.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

Ruf, B., Schürmann, D., Horbach, I., Seidel, K. ve Pohle, H.D., (1988), Nosocomial legionella pneumonia: demonstration of potable water as the source of infection, *Epidem. Inf.*, 101: 647-654.

Sabria M., Modol JM., Garcia-Nunez M., Reynaga E., Pedro-Botet ML., Sopena N, Rey-Joly C., (2004), Environmental cultures and hospital-acquired Legionnaires' disease: a 5- year prospective study in 20 hospitals in Catalonia, Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 25: 1072-1076.

Schlegel, H., (1992), Produktion sekundärer metabolite, Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Tehieme Verlag, 362-371s.

Schrock, J., Hackman, B.A ve Plouffe, J.F., (1997), Susceptibility of ninetyeight clinical isolates of *Legionella* to macrolides and quinolones using the Etest, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 28, (4), 221-223.

Schulin, T., Wennersten, C.B., Ferraro, M.J., Moellering, RC. J.R. ve Eliopoulos, G.M., (1998), Susceptibilities of *Legionella* spp. to newer antimicrobials *in vitro*, *Antimicrob Agents Chemother*, 42 (6), 1520-1523.

Sepin Özen N., Tuğlu Ataman Ş., Emek M., (2017), Exploring the *Legionella pneumophila* positivity rate in hotel water samples from Antalya, Turkey. Mar 29. doi: 10.1007/s11356-017-8864-1.

Sevgi, E. , (2007), Ağır metalle kontamine olmuş topraklardan metal iyonlarına dirençli bakterilerin izolasyonu ve bu dirençliliğin plazmidlerle olan ilişkisinin araştırılması', Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi.

Sheehan, K.B., Henson, J.M. ve Ferris, M.J., (2005,) *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in yellowstone national park, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 507-511.

Silver, S., (1992), Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanism, Range and Overview. *Plasmid*, 27 :1-3s.

Sneath, P.H.A., (1986), Endospore-forming gram-positive, Rods and Cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, edited by PHA Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Williams ve Wilkins, Holt, s.1104-1139.

Spear, B.S., Shoemaker, N.B. ve Salyers, A.A., (1992), Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* 5, 387-399.

Starnbach MN., Falkow S., Tompkins LS., (1989), Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol*; 27 (6): 1257-1261.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

Stojek, NM., Dutkiewicz, J., (2002), *Legionella* in sprinkling water as a potential occupational risk factor for gardeners. *Ann Agric Environ Med.* ; 9 (2): 261-4.

Stone BJ., ve Abu Kwaik Y., (1998), Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun.*; 66: 1768-1775.

Stout JE., Rihs JD., Yu VL., (2003), *Legionella*. İçinde Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Pres; s. 809-823.

Stout JE., Yu VL., (2003), Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for *Legionella* control: Implications for the evaluation of other disinfection modalities. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 21 (8): 563-568.

Strohl WA., Rouse H., Fisher BD., (2006), *Lippincott's Illustrated Reviews*. Anđ Ö., çeviri editörü. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Subbaram K., Kannan H., Masadeh M., (2017), Isolation, identification, characterization and antibiotic sensitivity profile of pathogenic *Legionella pneumophila* isolates from different water sources. 2221-1691.

T.C Sağlık Bakanlığı Türk Halk Sağlığı Kurumu Lejyoner Hastalığı Kontrol Rehberi Ankara 2016.

Ta AC., Stout JE., Yu VL., Wagener MM., (1995), Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol*; 33 (8): 2118-2123.

Takahata, M., Mitsuyama, J., Yamashiro, Y., Yonezawa, M., Araki, H., Todo, Y., Minami, S., Watanabe, Y. ve Narita, H., (1999), *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of T-3811ME, a novel des-F (6)-quinolone, *Antimicrob Agents Chemother*, 43 (5), 1077-1084.

Tamer A. U., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, I., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R., (1989), microbial ecology (in turkish), in: microbiology handbook for 3rd and 4th classes. Anadolu University Pres No:74, Eskişehir

Temiz, A., 2000, Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri, Hatipoğlu yayınevi, Ankara.

Topçu A., Söyletir G., Doğanay M., (2002), Legionella, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 393-96.

Toze, S., Sly, L.I., Macrae, L.C., Fuerst, J.A., (1990), Inhibition of Growth of *Legionella* Species by Heterotrophic Plate Count Bacteria Isolated from Chlorinated Drinking Water. *Cwr Microbiol.* 21, 139-143.

Tsakris, A., Alexiou-Daniel, S., Souliou, E. ve Antoniadis, A., (1999), *In vitro* activity of antibiotics against *Legionella pneumophila* isolates from water systems, *J Antimicrob Chemother*, 44 (5), 693-695.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

Tuğrul HM., Serter D., Ertem E., Gökengin D., (2000), *Legionella* türleri. Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları. İzmir: Nobel Tıp Kitabevleri; s. 308-312.

Türetgen I., Göksay D., Cotuk A., (2008), Comparison of the microbial load of incoming and distal outlet waters from dental unit water systems in Istanbul, *Environ Monit Assess*. 2009 Nov; 158 (1-4): 9-14. Doi: 10.1007/s10661-008-0260-7.

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bakteriyoloji, Test Prosedürleri, (2015), B-TP-24,,s.5-8.

Uçan, U.S. ve Erganiş, O., (2005), Pratik bakteriyoloji, Selçuk Ün. Basımevi, Konya.

Vılları, P., (1998), Comparison of Conventional Culture and PCR methods for the Detection of *Legionella pneumophila* in Water, *Letters in Applied Microbiology*, Cilt. 27, No.2, 106-110.

Vonberg RP, Eckmanns T, Bruderek J, Rüden H, Gastmeier P. Use of terminal tap water filter systems for prevention of nosocomial legionellosis. *J Hosp Infect* 2005; 60:159-162.

Vural T., Süleymanlar G., Ergin Ç., Öngüt G., (1996), *Legionella pneumophila* antibodies in haemodialysis patients. In *Legionella infections and atypical pneumonias*, Proceedings of the 11th meeting of the European Working Group on Legionella Infections, ed. Berdal BP (EWGLI 1996), 121-2, Oslo,

Wellinghausen N., Frost C., Marre R., (2001), Detection of *legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time lightcycler PCR. *Appl Environ Microbiol.*; 67 (9): 3985-93.

Whitney CG., Hofman J., Pruckler JM., Benson RF., Fields BS., Bandyopadhyay U., Donnally EF., Giorgio-Almonte C., Mermel LA., Boland S., Matyas BT., Breiman RF., (1997), The role of arbitrarily primed PCR in identifying the source of an outbreak of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol*; 35 (7): 1800-1804.

Wiedemann, B. ve Heisig, P., (1994), Mechanisms of quinolone resistance, *Infection*, 22 (suppl) 2, 73-79.

Winn Jr WC., *Legionella*. In: Murray PR., Baron EJ., Pfaller MA., Tenover FC., Tenover RH., (1995), *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. American Society of Microbiology, Washington D.C.; 533- 44.

Winn WC., Koneman EW., Stephen DA., Gary WP., Janda WM., Schreckenberger PC., (2006), Woods GL. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins.

Yong SF., Goh FN., Ngeow YF., (2010), *Legionella* species and serogroups in Malaysian water cooling towers. Identification by latex agglutination and PCR-DNA sequencing of isolates. *J Water Health*; 8 (1):92-100.

Yu VL., (1993), Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella* Amer J Med;95: 13-15.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

Yu VL., (2000), *Legionella pneumophila* (Legionnaires' Disease). İçinde Mandel GL, editor. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. US: Churchill Livingstone;. s. 2424-2435.

Zanetti F., Stampi S., De Luca G., Fateh-Moghadam P., Antonietta M., Sabattini B., Checchi L., (2000), Water characteristics associated with the occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units;108 (1): 22-8.

Zeybek Z., (2000), İstanbul'da Binaların Su Sistemlerinde *Legionella* Cinsi Bakterilerin Araştırılması, Doktora, Fen Bilimleri Enstitüsü.

