



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* İZOLATLARININ
VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN İNCELENMESİ**

Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Ayten ERDEM

Ocak, 2012

İSTANBUL

Bu çalışma 25/01/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

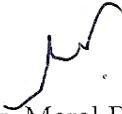
Tez Jürisi



Doç. Dr. Ayten ERDEM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Meral BİRBİR
Marmara Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Seza ARSLAN
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 2747 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda olduğu kadar akademik ve özel hayatımda da her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen sevgili danışmanım Doç. Dr. Ayten ERDEM'e,

Çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini cömertçe sunan değerli hocam sayın Prof. Dr. Ayşın ÇOTUK'a,

Tez çalışmam için gerekli *Acanthamoeba castellanii* amip suşunu ve ihtiyacım olan her konuda elinden gelen yardımı içtenlikle sağlayan Yrd. Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK'e,

Çalışmalarımda ihtiyaç duyduğum her konuda güleryüzle yardımcı olan sayın hocalarım Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN, Yrd. Doç. Dr. Esra İLHAN SUNGUR, Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT ve Doç. Dr. Füsün ÖZTAY'a,

Tez deneylerim esnasında ihtiyacım olan tüm desteği sağlayan sevgili arkadaşlarım Sevan GÜRÜN, Savaş ÜSTÜNOVA, Özlem YAĞCI, Elif TEKİN, Hüseyin US, Duygu GÖKSAY KADAİFCİLER, Nihal GÜNGÖR, Nazmiye Özlem ŞANLI YÜRÜDÜ, Selda GEZGİNCİ OKTAYOĞLU ve Özgecan KAYALAR'a,

İhtiyacım olan her konuda varını yoğunu seferber eden canım annelerim Gülsabah ARSLAN ve Asya AYDOĞDU'ya; Zeki ARSLAN ve Mahir AYDOĞDU'ya; sevgili eşim Hüseyin AYDOĞDU ve tezim için çalışırken sabırla beni bekleyen biricik kızım Öykü' me sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2012

Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	x
SEMBOL LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. <i>LEGIONELLA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ ...	5
2.1.1. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Keşfi ve Sebep Oldukları Hastalıklar	5
2.1.2. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Fenotipik Özellikleri	6
2.1.3. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Yaşam Alanları.....	7
2.2. <i>LEGIONELLA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN PATOGENEZİ	8
2.2.1. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Bulaşma Yolu	8
2.2.2. <i>Legionella</i> Cinsi Bakterilerin Hücre İçine Alınışı ve Hücre İçi Üreme Özellikleri.....	9
2.2.3. Lejyoner Hastalığı (Lejyonellosis)	11
2.2.4. Lejyoner Hastalığının Tanısı.....	12
2.2.5. Lejyoner Hastalığının Tedavisi	14
2.3. <i>LEGIONELLA</i> CİNSİ BAKTERİLERİN VİRÜLANSI	14

2.3.1. Biyofilm Oluşturabilme	15
2.3.2. Flagella ve Pili (Fimbria) Üretimi	16
2.3.3. Demir Kazanımı	18
2.3.4. Sahip Olduğu Antijenik Yapılar ve Toksinler	19
2.3.5. Sekresyon Sistemleri ve Enzimatik Özellikler	20
2.3.5.1. Proteaz Aktivitesi	21
2.3.5.2. Nükleaz Aktivitesi	22
2.3.5.3. Fosfolipaz Aktivitesi	22
2.3.5.4. Fosfataz Aktivitesi	23
2.3.5.5. Lipaz Aktivitesi	23
2.3.5.6. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	23
2.3.6. <i>Legionella</i> Cinsi Bakteriler ile Konak Hücreler Arasındaki İlişki	24
2.3.6.1. <i>Legionella</i> Cinsi Bakteriler ve Bağışıklık Sistemi	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. ARAŞTIRMADA KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR	29
3.1.1. Araştırmada Kullanılan Bakteriler	29
3.1.2. Araştırmada Kullanılan <i>Acanthamoeba castellanii</i> Amip Türü	29
3.2. <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİNİN STATİK KOŞULLAR ALTINDA TUTUNMA VE BİYOFİLM İÇİNDE ÜREME YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ	30
3.2.1. Tutunma Kapasitesinin İncelenmesi	30
3.2.2. Biyofilm İçerisinde Üreme Kapasitesinin İncelenmesi	31
3.3. <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİNİN HAREKETLERİNİN VE FLAGELLA YAPILARININ IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ	32
3.4. <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİNİN HEMAGLUTİNASYON YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ	32
3.5. <i>L. PNEUMOPHILA</i> BAKTERİLERİNİN ENZİMATİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ	33
3.5.1. Hücre Lizatları ve Süpernatantların Hazırlanması	33
3.5.2. Hemoliz Aktivitesinin İncelenmesi	34
3.5.3. Proteaz Aktivitesinin İncelenmesi	34
3.5.4. Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi	36

3.5.5. Fosfolipaz A Aktivitesinin İncelenmesi.....	36
3.5.6. Fosfolipaz C Aktivitesinin İncelenmesi.....	36
3.5.7. Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi	37
3.5.8. Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi.....	37
3.5.8.1. <i>P-nitrofenil Kaprilat ve P-nitrofenil Palmitat Bileşikleri Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi.....</i>	<i>37</i>
3.5.8.2. <i>1,2-dilauril-racglisero-3-glutarik Asit Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi</i>	<i>38</i>
3.5.8.3. <i>1-monopalmitolgliserol ve 1,2-dipalmitolgliserol Bileşikleri Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi.....</i>	<i>38</i>
3.5.9. NEFA HR2 Serbest Yağ Asidi Belirleme Kitinin Kullanımı	38
3.5.10. Standart Oleik Asit Eğrisinin Hazırlanması.....	40
3.5.11. Standart p-nitrofenol (pNP) Eğrisinin Hazırlanması.....	40
3.6. L. PNEUMOPHILA BAKTERİLERİ İLE KONAK HÜCRELER ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN İNCELENMESİ.....	41
3.6.1. Deneyde Kullanılacak Bakterilerin Hazırlanması	41
3.6.2. L. pneumophila Bakterileri ile İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	41
3.6.2.1. <i>İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin (PKMH) Eldesi</i>	<i>41</i>
3.6.2.2. <i>L. pneumophila Bakterilerinin Periferik Kan Mononükleer Hücrelerine (PKMH) Karşı Patojenitelerinin İncelenmesi.....</i>	<i>42</i>
3.6.3. L. pneumophila Bakterileri ile Fare Peritoneal Makrofajları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi.....	46
3.6.3.1. <i>Fare Peritoneal Makrofajlarının (PM) Eldesi.....</i>	<i>46</i>
3.6.3.2. <i>L. pneumophila Bakterilerinin Fare Peritoneal Makrofajlarına (PM) Karşı Patojenitelerinin İncelenmesi</i>	<i>47</i>
3.6.4. L. pneumophila Bakterileri ile A. castellanii Amip Türü Arasındaki İlişkinin İncelenmesi.....	50
3.6.4.1. <i>A. castellanii Kültürünün Hazırlanması.....</i>	<i>50</i>
3.6.4.2. <i>L. pneumophila Bakterilerinin A. castellanii Amip Türüne Karşı Patojenitelerinin incelenmesi.....</i>	<i>51</i>
3.6.5. Mikroskopik İnceleme.....	54
3.6.5.1. <i>Preparat Hazırlanması.....</i>	<i>54</i>
3.6.5.2. <i>Gimenez Yöntemi</i>	<i>54</i>
3.6.5.3. <i>Acridine Orange Boyama Yöntemi.....</i>	<i>54</i>
3.6.6. İstatistiksel Analiz	55

3.7. DENEYLERDE KULLANILAN BESİYERİ VE TAMPONLARIN	
HAZIRLANIŞI	55
3.7.1. Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar Besiyeri	55
3.7.2. Triptik Soya Agar (TSA) Besiyeri.....	56
3.7.3. % 2 Mannoz İçeren % 3'lük Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanışı.....	56
3.7.3.1. Deneylerde Kullanılan Eritrositlerin Eldesi.....	56
3.7.4. Buffered Yeast Extract Broth (BYEB) Besiyeri	57
3.7.5. İnsan veya Koyun Eritrositi İçeren Buffered Yeast Extract Agar	
(eBYEA) Besiyeri.....	57
3.7.5.1. BYEA Hazırlanışı.....	57
3.7.5.2. eBYEA Hazırlanışı	58
3.7.6. Noble Agar Besiyeri.....	58
3.7.7. Isıyla İnaktif Fetal Bovine Serum (iFBS) içeren RPMI 1640 Besiyeri	58
3.7.8. Pepton Maya Özütü Glukoz (PMG) 712 besiyeri.....	58
3.7.9. Liziz Tamponu.....	59
3.7.10. Etidyum Bromür Çözeltilisi	59
3.7.11. Fosfolipaz A Substratı.....	60
3.7.12. Fosfolipaz C Substratı.....	60
3.7.13. Alkali ve Asit Fosfataz Substratları.....	60
3.7.14. Lipaz Substratları	61
3.7.14.1. P-Nitrofenil Kaprilat ve P-Nitrofenil Palmitat İçeren Substratlar	61
3.7.14.2. 1,2-Dilauril-racglisero-3-glutarikası Resorufin Ester İçeren Substrat.....	61
3.7.14.3. 1-Monopalmitolgliserol (1-MG) ve 1,2-Dipalmitolgliserol (1,2-DG) İçeren	
Substratlar.....	61
3.7.15. PBS (Phosphate Buffered Saline)	62
3.7.16. HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)	62
3.7.17. Ac Tamponu.....	62
3.7.18. Kromik Asit Çözeltilisi	63
3.7.19. Leifson'un Flagella Boyası	63
3.7.20. Leifson'un Metilen Mavisi.....	64
3.7.21. Giemenez'in Karbol Fuksini	64
3.7.22. % 1'lik Malaşit Yeşili	64
3.7.23. Acridine Orange Boyası.....	64
4. BULGULAR	66

4.1. L. PNEUMOPHILA BAKTERİLERİNİN STATİK KOŞULLAR ALTINDA TUTUNMA VE BİYOFİLM İÇİNDE ÜREME YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ.....	66
4.1.1. Tutunma Kapasitesinin İncelenmesi.....	66
4.1.2. Biyofilm İçerisinde Üreme Kapasitesinin İncelenmesi.....	67
4.2. L. PNEUMOPHILA BAKTERİLERİNİN HAREKETLERİNİN VE FLAGELLA YAPILARININ IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ.....	69
4.3. L. PNEUMOPHILA BAKTERİLERİNİN HEMAGLUTİNASYON YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ.....	69
4.4. L. PNEUMOPHILA BAKTERİLERİNİN ENZİMATİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ	70
4.4.1. Hemolitik Aktivitenin İncelenmesi	71
4.4.1.1. <i>Koyun Eritrositi İçeren eBYEA Besiyeri Üzerinde Hemolitik Aktivitenin İncelenmesi.....</i>	<i>71</i>
4.4.1.2. <i>İnsan Eritrositi İçeren eBYEA Besiyeri Üzerinde Hemolitik Aktivitenin İncelenmesi</i>	<i>73</i>
4.4.2. Proteaz Aktivitesinin İncelenmesi.....	75
4.4.3. Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi.....	76
4.4.4. Fosfolipaz A Aktivitesinin İncelenmesi.....	77
4.4.5. Fosfolipaz C Aktivitesinin İncelenmesi.....	79
4.4.6. Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi	80
4.4.6.1. <i>Alkali Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi.....</i>	<i>80</i>
4.4.6.2. <i>Asit Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi.....</i>	<i>83</i>
4.4.7. Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi.....	84
4.4.7.1. <i>P-nitrofenil Kaprilat ve P-nitrofenil Palmitat Bileşikleri Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi.....</i>	<i>84</i>
4.4.7.2. <i>1,2-dilauril-racglisero-3-glutarik Asit Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi</i>	<i>88</i>
4.4.7.3. <i>1-monopalmitolgliserol ve 1,2-dipalmitolgliserol Bileşikleri Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi.....</i>	<i>90</i>
4.5. L. PNEUMOPHILA BAKTERİLERİ İLE KONAK HÜCRELER ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN İNCELENMESİ.....	91
4.5.1. L. pneumophila Bakterileri ile İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	91
4.5.1.1. <i>L. pneumophila Bakterilerinin PKMH'ne Yapışma Kapasitelerinin İncelenmesi.....</i>	<i>91</i>

4.5.1.2. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin PKMH İçine Giriş ve Hücre İçi Üreme Kapasitelerinin İncelenmesi	92
4.5.2.L. <i>pneumophila</i> Bakterileri ile Fare Peritoneal Makrofajları (PM) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	95
4.5.2.1. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin PM'a Yapışma Kapasitelerinin İncelenmesi.....	95
4.5.2.2. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin PM İçine Giriş ve Hücre İçi Üreme Kapasitelerinin İncelenmesi.....	96
4.5.3.L. <i>pneumophila</i> Bakterileri ile <i>A. castellanii</i> Amip Türü Arasındaki İlişkinin İncelenmesi.....	99
4.5.3.1. <i>L. pneumophila</i> Bakterilerinin <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerine Yapışma Kapasitelerinin İncelenmesi	99
4.5.3.2. <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerine Giriş ve Hücre İçi Üreme Kapasitelerinin İncelenmesi	100
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	104
KAYNAKLAR.....	125
EK A.....	151
ÖZGEÇMİŞ.....	154

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: <i>L. pneumophila</i> bakterisinin mikroskopik görüntüsü.....	7
Şekil 2.2: Fagositoz çeşitleri ve <i>L. pneumophila</i> 'nın alveolar makrofaj tarafından fagositozu	10
Şekil 3.1: BCYE Agar besiyerinde üremiş taze <i>L. pneumophila</i> kültürü	30
Şekil 3.2: NEFA kiti ile serbest yağ asitlerinin açılmesi.....	39
Şekil 3.3: Standart oleik asit eğrisi	40
Şekil 3.4: Standart pNP eğrisi	40
Şekil 3.5: İnsan periferik mononükleer hücrelerinin (PKMH) eldesi	42
Şekil 3.6: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PKMH' ne karşı patojenitelerinin değerlendirilmesi	43
Şekil 3.7: Fare peritoneal makrofajlarının (PM) eldesi	46
Şekil 3.8: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PM' na karşı patojenitelerinin değerlendirilmesi	48
Şekil 3.9: <i>A. castellanii</i> kültürünün hazırlanması.....	50
Şekil 3.10: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin <i>A. castellanii</i> amip türüne karşı patojenitelerinin değerlendirilmesi	52
Şekil 4.1: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin tutunma kapasiteleri	67
Şekil 4.2: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin biyofilm içerisinde üreme kapasiteleri	68
Şekil 4.3: <i>L. pneumophila</i> bakterisinin lam-lamel arası canlı inceleme görüntüsü	69
Şekil 4.4: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin flagella boyama görüntüleri	69
Şekil 4.5: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin MR-HA özellikleri	70
Şekil 4.6: Koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin hemolitik aktiviteleri	72
Şekil 4.7: Koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde farklı hemoliz görünümleri	72
Şekil 4.8: İnsan eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin hemolitik aktiviteleri	74
Şekil 4.9: İnsan eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde farklı hemoliz görünümleri	74
Şekil 4.10: <i>L. pneumophila</i> bakterilerine ait API ZYM stripleri	76
Şekil 4.11: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının nükleaz aktiviteleri	77
Şekil 4.12: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının farklı nükleaz aktivite görüntüleri	77
Şekil 4.13: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatları ve süpernatantlarının PLA aktiviteleri	78
Şekil 4.14: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatları ve süpernatantlarının PLC aktiviteleri	80
Şekil 4.15: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının alkali fosfataz aktiviteleri	82
Şekil 4.16: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının alkali fosfataz aktiviteleri	82
Şekil 4.17: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının asit fosfataz aktiviteleri	83
Şekil 4.18: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının asit fosfataz aktiviteleri.....	84
Şekil 4.19: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri	85

Şekil 4.20: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri	86
Şekil 4.21: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktiviteleri	87
Şekil 4.22: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktiviteleri	88
Şekil 4.23: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının resorufin esteraz aktiviteleri	89
Şekil 4.24: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının resorufin esteraz aktiviteleri.....	89
Şekil 4.25: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatları ve süpernatantlarının 1-monopalmitol gliserol (1-MG) üzerine lipaz aktiviteleri	91
Şekil 4.26: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatları ve süpernatantlarının 1,2-dipalmitol gliserol (1,2-DG) üzerine lipaz aktiviteleri	91
Şekil 4.27: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PKMH'ine yapışma yüzdeleri.....	92
Şekil 4.28: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PKMH içine giriş yüzdeleri	92
Şekil 4.29: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PKMH içinde üreme kapasiteleri	94
Şekil 4.30: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PKMH'ne yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin ışık mikroskobu görüntüleri	94
Şekil 4.31: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PKMH'ne yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin epifloresan mikroskobu görüntüleri.....	95
Şekil 4.32: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PM'a yapışma yüzdeleri	96
Şekil 4.33: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PM içine giriş yüzdeleri.....	96
Şekil 4.34: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PM içinde üreme kapasiteleri.....	98
Şekil 4.35: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PM'a yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	98
Şekil 4.36: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PM'a yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin epifloresan mikroskobu görüntüleri	99
Şekil 4.37: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin <i>A. castellanii</i> trofozoitlerine yapışma yüzdeleri.....	99
Şekil 4.38: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin <i>A. castellanii</i> trofozoitleri içine giriş yüzdeleri.....	100
Şekil 4.39: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin <i>A. castellanii</i> trofozoitleri içinde üreme kapasiteleri.....	102
Şekil 4.40: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin <i>A. castellanii</i> trofozoitlerine yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	102
Şekil 4.41: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin <i>A. castellanii</i> trofozoitlerine yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin epifloresan mikroskobu görüntüleri	103

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: <i>Legionella</i> cinsi üyeleri	6
Tablo 2.2: Doğal su kaynaklarında bulunan <i>L. pneumophila</i> konakları	25
Tablo 3.1: API ZYM enzimatik test stribi içeriği ve sonuç okuma tablosu	35
Tablo 4.1: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin tutunma kapasiteleri	67
Tablo 4.2: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin biyofilm içerisinde üreme kapasiteleri	68
Tablo 4.3: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin hemaglutinasyon özellikleri	70
Tablo 4.4: Koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin hemolitik aktiviteleri	71
Tablo 4.5: Koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin hemolitik indeksleri	73
Tablo 4.6: İnsan eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin hemolitik aktiviteleri	73
Tablo 4.7: İnsan eritrositi içeren eBYEA üzerinde <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin hemolitik indeksleri	74
Tablo 4.8: <i>L. pneumophila</i> bakterilerine ait API ZYM sonuçları	75
Tablo 4.9: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının nükleaz aktiviteleri	76
Tablo 4.10: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatları ile süpernatantlarının fosfolipaz A aktiviteleri	78
Tablo 4.11: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatları ve süpernatantlarının PLC aktiviteleri	79
Tablo 4.12: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının alkali fosfataz aktiviteleri	81
Tablo 4.13: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının alkali fosfataz aktiviteleri	82
Tablo 4.14: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının asit fosfataz aktiviteleri	83
Tablo 4.15: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının asit fosfataz aktiviteleri	84
Tablo 4.16: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri	85
Tablo 4.17: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri	86
Tablo 4.18: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktiviteleri	87
Tablo 4.19: <i>L. pneumophila</i> süpernatantlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktiviteleri	88
Tablo 4.20: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin hücre lizatları ve süpernatantlarının resorfin esteraz aktiviteleri	89
Tablo 4.21: <i>L. pneumophila</i> hücre lizatları ve süpernatantlarının 1-monopalmitolgliserol (1-MG) veya 1,2-dipalmitolgliserol (1,2-DG) bileşiklerine üzerine lipaz aktiviteleri	90
Tablo 4.22: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PKMH'ne yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme kapasiteleri	93
Tablo 4.23: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin PM'a yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme kapasiteleri	97

Tablo 4.24: <i>L. pneumophila</i> bakterilerinin <i>A. castellanii</i> trofozoitlerine yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme kapasiteleri.....	100
---	-----

SEMBOL LİSTESİ

1,2-DG	: 1,2- diaçil gliserol
1-MG	: 1-monoaçil gliserol
A	: thoma zeiss sayım kamarsasında 16 büyük karede sayılan boyanmamış canlı hücre sayısı
ABC	: “ATP-binding cassette” taşıyıcı sistemleri
Ac	: <i>A. castellanii</i>
ACES	: n-(2-asitamido)-2-aminoetanosulfonik asit
ACOD	: açıl-CoA oksidaz
ACS	: açıl-CoA sentataz
ATCC	: Amerikan kültür koleksiyonları
BCYE	: buffered charcoal yeast extract agar
BYEA	: buffered yeast extract agar
BYEB	: buffered yeast extract broth
C ₃	: komplement komponenti
CDC	: United States Center for Disease Control and Prevention
CR	: komplement reseptörü
cm ³	: santimetre küp
CoA	: koenzim-A
CYE	: charcoal yeast extract agar
DFA	: direkt floresan antikor
dk	: dakika
DNA	: deoksiribonükleik asit
DNaz	: deoksiribonükleaz
dot	: defective in organelle trafficking
DPPC	: dipalmitoilfosfatidilkolin
eBYEB	: eritrositli buffered yeast extract broth
ELISA	: enzim bağlı immünosorbent deney
FG Agar	: feeley gorman agar
FlaA	: flagellum subunit gene
frgA	: fur düzenleyici gen
fur	: ferric uptake regulator
g	: gram
Gal/GalNac	: galactose/N-acetylgalactosamine
HBSS	: hanks'buffered salt solution
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hsp	: heat shock protein
IFA	: indirekt floresan antikor
IFN	: interferon
Ig	: immünoglobulin

IL	: interlökin
icm	: intracellular multiplication
iFBS	: ısıyla inaktive Fetal Bovine Serum
kat	: katalaz-peroksidaz enzimi
kob	: koloni oluşturan birim
KV	: kristal viyole
lly	: legiolisin geni
LPS	: lipopolisakkarit
luc	: lusiferaz geni
M	: molar
MEHA	: 4-aminoantipirin ve 3-metil-N-etil-N(β -hidroksietil)-anilin
mip	: macrophages infectivity potentiator
ml	: mililitre
MOMP	: major outer membran protein
MR-HA	: mannoza dirençli hemaglutinasyon
NEFA	: nonesterified fatty acids
NK	: natural killer
nm	: nanometre
°C	: santigrat derece
OD	: optik densite
PBS	: phosphate buffered salt solution
PIP ₂	: fosfoinositid fosfatidilinositol-4,5- bisfosfat
pilD	: tip IV-A pilus geni
PKMH	: perifer kan mononükleer hücreleri
PLA	: fosfolipaz A
PLC	: fosfolipaz C
PM	: peritoneal makrofajlar
PMG 712	: tamponlu peptonlu maya özütü glukoz buyyon
pNFK	: p-nitrofenil kaprilat
pNFP	: p-nitrofenil palmitat
pNP	: p-nitrofenil
pNPPC	: p-nitrofenil fosforil kolin
POD	: peroksidaz
ppGpp	: 3',5'-bispirofosfat
PPIase	: propil-prolil izomeraz
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
RIA	: radioimmün assay
RNA	: ribonükleik asit
RNase	: ribonükleaz
RNO	: reaktif nitrojen
ROS	: reaktif oksijen
RPMI	: roswell park memorial institute medium
RpoS	: sigma faktör 38 (σ^{38}) kodlayan gen bölgesi
rtxA	: repeats in structural toxin
SF	: sulandırma faktörü
SG	: serogrup
sn	: saniye
SOD	: süperoksit dismutaz
TGC	: thioglycolate medium

T_H : yardımcı T hücreleri
TNF : tümör nekrozis faktör
TSA : trypticase soy agar

ÖZET

FARKLI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* İZOLATLARININ VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN İNCELENMESİ

Lejyoner hastalığının etkeni olan *Legionella pneumophila*, göller, nehir, klima sistemleri, soğutma kuleleri ve dental üniteler gibi doğal ve insan yapımı su sistemlerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu bakteriler bulundukları su kaynaklarından çevreye aerosoller ile taşınırlar. Hastalığın oluşumu için solunan aerosol içerisindeki bakterinin sayısı kadar bakterinin patojenite derecesi yani virülansı da önemlidir. *Legionella* bakterilerinin virülansları yaşadıkları çevrenin kimyasal, fiziksel ve biyolojik koşullarına bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle bakterinin su sistemlerindeki varlığının araştırılması kadar patojenitesinin araştırılması da önemlidir. Klinik örneklerden izole edilen *Legionella* bakterilerinin virülansını belirlemeye yönelik çalışmalar mevcut olsa da çevresel izolatların patojenitesinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda soğutma kulelerinden izole edilen dokuz farklı *L. pneumophila* bakterileri ile standart *L. pneumophila* serogrup 1 (ATCC 33152, Philadelphia 1) bakterisinin virülans faktörleri incelenerek patojenitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız kapsamında bakterinin hem doğada hayatta kalmasını sağlayan hem de konak hücreye girişini düzenleyen flagella yapısı ile biyofilm oluşturma kapasitesi, tip II sekresyon sisteminde yer alan ve bakterinin konak içi üremesini sağlayan enzimatik aktiviteleri (hemolizin, nükleazlar, proteaz, fosfolipaz A (PLA) ve C (PLC), asit ve alkali fosfataz ve lipaz) ile hemaglutinasyon yetenekleri, farklı konak hücrelerine (*Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30234), fare peritoneal makrofajları ve insan periferik monositlerine) karşı tip IV sekresyon sistemi tarafından düzenlenen bakteriyel yapışma, invazyon ve hücre içi üreme özellikleri incelenmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde tüm bakterilerin hareketli, polar flagellalı ve mannoza dirençli hemaglutinasyon oluşturabildikleri dolayısıyla tip IV fimbriyaya sahip olduğu tespit edilmiştir. *L. pneumophila* bakterilerinin statik koşullar altında tutunma kapasitesinin 6. ve 24. saatlerde anlamlı ölçüde ($p<0.05$) arttığı, standart *L. pneumophila* bakterisi (ATCC 33152) ile izolatlar arasında tutunma kapasitesi ve biyofilm oluşturma kapasiteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Sekresyon sistemleri göz önünde bulundurulduğunda, izolat 1'in tip II sekresyon sistemi açısından izolat 2'nin ise tip IV sekresyon sistemi açısından en patojen *L. pneumophila*

bakterisi olduğu saptanmıştır. Tüm virlans faktörleri açısından sonuçlar değerlendirildiğinde ise en patojen bakterinin izolat 2 olduğu saptanmıştır.

Tez çalışmamız kapsamında incelenen virlans faktörleri değerlendirildiğinde her izolatın farklı virlans özelliklerine sahip olduğu saptanmıştır. Genel olarak, virlans özellikleri açısından karşılaştırıldığında dokuz izolatın beşinin (izolat 1, 2, 3, 4, 5) standart ATCC 33152 bakterisinden daha virülent olduğu saptanmıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde bakterilerin konak hücrelere yapışma, hücre içine giriş ve hücre içinde üreme yeteneklerinin hem konağa hem de incelenen *L. pneumophila* bakterilerine göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu beş izolatın epidemik risklerine rağmen neden herhangi bir salgına sebep olmadıkları genetik metotlar kullanılarak araştırılmalıdır.

Bu tez ülkemizde evresel *L. pneumophila* bakterilerinin virlansını karşılaştırmak amacıyla yapılan ilk çalışmadır ve *L. pneumophila*'nın epidemiyolojisini belirlemede önemli bir adımdır.

SUMMARY

INVESTIGATION OF VIRULANCE FACTORS OF DIFFERENT *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* ISOLATES

Legionella pneumophila which is the agent of Legionnaires' disease, is ubiquitous in natural and man-made aqueous environments such as lakes, air-conditioning systems, cooling towers, and dental devices. These bacteria are transmitted from the water source to environment with aerosols. For the formation of disease, numbers of bacteria in inhaled aerosol are important as well as pathogenicity degree of bacteria which means virulence. The virulence of *Legionella* bacteria could change depending on chemical, physical and biological conditions of the environment where they live. Therefore, the investigation of this bacterium pathogenicity is important as well as its existence. Although there are studies to determine the virulence of *L. pneumophila* which was isolated from clinical samples, any investigation about the pathogenesis of the environmental isolates has not been found. For this reason, the aim of the study is to evaluate their pathogenicity, with examining to compare virulence factors between different nine environmental *L. pneumophila* isolates and *L. pneumophila* serogroup 1 (ATCC 33152, Philadelphia 1) standard strain.

In scope of the study, both to ensure the survival of bacterium in nature and the flagellar structure regulating to entry in the host cell and capacity of biofilm formation, hemagglutination capabilities and enzymatic activity in type II secretory system (hemolysin nucleases, protease, phospholipase A (PLA) and C (PLC), acid and alkaline phosphatase, lipase), and bacterial attached, invasion and intracellular multiplication, which were regulated by type IV secretory system, against different host cells (*Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30234), murine peritoneal macrophages and human peripheral monocytes) were investigated.

When the results are evaluated, all bacteria have been identified as motile, polar flagellated and showing mannose resistant hemagglutination in consideration of they have type IV fimbria. It was determined that adherence capacities under static conditions of *L. pneumophila* bacteria were significantly ($p < 0.05$) increased in 6th and 24th hours and there is no statistical significant ($p > 0.05$) differences in the ability of attachment and biofilm formation between standard *L. pneumophila* bacterium and the isolates.

When the secretory systems is taken into consideration, isolate 1 and 2 in term of type II and type IV secretory system, respectively, were determined of the most pathogen bacteria. Considering all the experiments, the isolate 2 was found out as the most pathogen bacterium among all tested isolates.

When the virulence factors in our study were considered, it has been determined that, all bacteria have different virulence properties. Generally, five (isolate 1, 2, 3, 4, 5) of the nine isolates were found to be more virulent than ATCC 33152.

When the results of the thesis were evaluated, it was determined that ability of attachment, invasion and intracellular growth have differences depending on both host and *L. pneumophila* bacteria. Despite of their epidemic risks, it must be investigated using genetic methods why these five bacteria did not cause any outbreak.

This thesis is the first study performed in our country comparing the virulence of different environmental *L. pneumophila* isolates and the study is an important step to define the epidemiology of *L. pneumophila*.

1. GİRİŞ

İlk kez 1976 yılında Philadelphia’da askeri bir toplantı esnasındaki salgın sonrası tanısı konan *Legionella pneumophila*, Gram negatif aerobik bir bakteridir (Friedman ve diğ., 2002). *Legionella* cinsine ait bir diğer tür olan *Legionella micdadei*, 1980 yılında Pittsburg ve Charlottesville’de pnömoni vakalarının etkeni olarak keşfedilmiştir (Dowling ve diğ., 1992). Bu tarihten itibaren *Legionella* cinsinin en az yirmisi hastalık etkeni olan 53 türü tanımlanmıştır (Gaia ve diğ., 2011).

Legionella cinsi bakteriler genel olarak doğal ve insan yapımı su sistemlerinde yer alır, biyofilm tabakası içerisinde bulunan özgür yaşayan amip türleri içerisinde çoğalırlar. *Legionella* cinsi bakterilerin *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella* spp., *Naegleria* spp. ve *Vahlkampfia* spp.’den oluşan 15’in üzerinde serbest yaşayan amip türü içerisinde çoğalabildiği bilinmektedir (Cowgill ve diğ., 2005). 25-43 °C arasındaki sıcaklıklarda yaşamalarının yanı sıra 55-60 °C’de de hayatta kalabilen *Legionella* cinsi bakteriler genellikle sıcak su sistemlerinde bulunmaktadır (Hsu ve diğ., 2011).

Su sistemlerinde genellikle biyofilm içerisinde bulunan *Legionella* cinsi bakteriler bu ortamlarda yer alan amipler içerisinde çoğaldıktan sonra konağını parçalayarak serbest forma geçerler. Bu sayede su içerisinde sayısını arttıran bakteriler uygun koşullarda aerosol olarak tanımlanan su zerrecikleri içerisinde çevreye yayılırlar. İçerisinde bakteri bulunan aerosoller solunduğunda ise bakteriler alveolar makrofajlara ulaşırlar (Costerton ve diğ., 1987; Abu Kwaik ve diğ., 1998a). Makrofajlar tarafından fagosite edilen bakteriler endositik yolu değiştirir ve lizozom ile fagozomun birleşmesini engellerler. Sindirimin durmasını takiben içerisinde bakteri bulunan fagozomun etrafına küçük vesiküller, mitokondriler ve son olarak da granüllü endoplazmik retikulum yerleşir ve hücre içi çoğalma başlar. Oluşan bu yapı “replikatif fagozom” olarak adlandırılır (Vogel ve Isberg, 1999). Friedman ve diğ. (1998), enfekte makrofaj içerisindeki bakterinin sayısını 48-72 saat içerisinde 100-1000 kat artırdığını

bildirmişlerdir. Çoğalma tamamlandıktan sonra konak hücrenin kendini parçalaması sonucu serbest kalan bakteriler yeni hücreleri enfekte ederler. Alveolar bölgede çok sayıda makrofajın parçalanması sonucu açığa çıkan litik ürünler nedeni ile doku hasarı ve iltihap oluşur (EPA, 1999).

Doku hasarı sonucu kişide “Lejyonelloz” olarak tanımlanan hastalığa ait belirtiler gözlenir. Lejyonelloz iki farklı klinik tablo sergilemektedir. İlki basit bir soğuk algınlığına benzer semptomlara sahip olan ve hastanın tedaviye gerek duymadan iyileşebildiği “Pontiak Ateşi”dir. İkincisi ise bir çeşit pnömoni olarak tanımlanan “Lejyoner Hastalığı”dır. Lejyoner hastalığı diğer pnömoni türlerinden klinik tablo ve akciğer röntgen filmi yardımı ile ayrılabilen, ancak kesin tanı mikrobiyolojik yöntemlerle konulabilmektedir. Hastalık ateş, ani öksürük krizleri, baş ağrısı, miyalji, titreme, solunum güçlüğü, ishal ve bilinç kaybı gibi semptomlar oluşturmaktadır (Fields ve diğ., 2002). *Legionella* cinsinin oluşturduğu enfeksiyonların yaklaşık % 90’ında etken *L. pneumophila* olarak saptanmıştır. Ayrıca 16 farklı serogrubu bulunan bu türün oluşturduğu hastalıkların % 84’ünden fazlasının serogrup 1 kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (Kozak ve diğ., 2009).

L. pneumophila’nın özellikle çocuklarda ve yaşlılarda, sigara kullanan kişilerde, diyabet hastalarında, tedavi amaçlı immun sistemi baskılanan bireylerde tehlikeli bir patojen olduğu bilinmektedir. *Legionella* kaynaklı enfeksiyonlarda ölüm oranı % 1- 80 arasında değişmektedir. Ölüm oranının bu kadar değişken olması hastanın bağışıklık sistemine, bakterinin serogrubuna ve patojenite derecesine yani virülansına bağlıdır (Fields ve diğ., 2002).

Yaşamı süresince iki farklı ortamda bulunan *Legionella* cinsi bakteriler bu ortamlarda farklı fenotipik özellikler göstermektedirler. Su ortamında çoğalma özelliğine sahip olmayıp enfeksiyöz fazda olan bu bakteriler konağı enfekte ettiklerinde replikatif faza girerler (Steinert ve diğ., 2002). Bu bakteriler replikatif fazda iken çoğalma yeteneğinde, uzun filamentöz yapıda, flagellasız, Na direnci yüksek, sitotoksitesi düşük ve stres koşullarına duyarlı bir formdadırlar. Enfeksiyöz fazdayken durağan evrede olan bu bakteriler kısa çomak şeklinde, flagellalı ve hareketli, Na’a duyarlı, sitotoksik ve stres koşullarına dirençlidirler.

İnsan sağılığı açısından büyük bir öneme sahip olan *Legionella* cinsi bakteriler diğerk hücre içi parazitlerden farklı olarak hem konak içerisinde hem de yapay ortamda hızla çoğalabilme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle *Legionella* cinsi bakteriler ilk izole edildikleri tarihten itibaren gerek bu bakterilerin varlığının saptanarak mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi, gerekse patojenite mekanizmalarının araştırılması açısından ilgi çeken bir mikroorganizma olmuştur (EPA, 1999; Vogel ve Isberg, 1999). Son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmelere bağılı olarak bakterinin virölansı daha detaylı olarak incelenmeye başlanmıştır. Çalışmalarda genellikle standart *Legionella* bakterileri ile incelenen virölans özelliğine uygun mutant suşlar kullanılmaktadır. *L. pneumophila*'nın virölansını belirlemeye yönelik çalışmalarda bakterinin hareketliliğı, yapışma ve biyofilm oluşturma kapasitesi, konak hücre içine girişı ve çoğalması, sahip olduğı ekstraselüler enzimler ve toksinler incelenmiştir (Winn, 1988; Steinert ve diğ., 2002; Diederer, 2008).

Bakterinin hareketli olmasını sağılayan flagella, bakterinin konak hücreye yapışmasını ve girişini sağılayan antijenik bir yapıdır. Bakterinin diğerk bir antijenik yapısı ise yapışmadan sorumlu pilileridir. Bakterinin canlı ve cansız yüzeylere yapışabilmesini sağılayan flagella ve pili, virölansla ilgili *pilD* gen bölgesince sentezlenir. Biyofilm oluşumunda rol oynayan pili, bakterinin konak hücreye yapışmasından da sorumlu olduğı için virölansın belirlenmesine yönelik çalışmalarda önem kazanmaktadır. Ayrıca biyofilm tabakası bakteriyi çevresel faktörlere karşı koruyarak hayatta kalmasını sağılarken bu tabaka içerisinde bulunan amip türleri de bakterinin çoğalmasını mümkün kılmaktadır. Bakterinin cansız yüzeylere tutunabilmesi ve biyofilm oluşturmada da bu nedenle ilgi çekmektedir (Aragon ve diğ., 2000; Luneberg ve diğ., 2001).

Bakterinin virölansını değerlendirmek için genellikle tip II ve tip IV sekresyon sistemleri incelenmektedir. Tip II sekresyon sistemi *pilD* genince kontrol edilir. Temel işlevi prepirin sentetaz üretimi olan bu gen bölgesi bakterinin tip IV pilus üretimini düzenler. Bu sistem proteaz, fosfatazlar, nükleaz, çinko-metalloproteaz, lipaz, fosfolipaz A, lizofosfolipaz A, ve p-nitrofenil fosforilkolin hidrolaz (fosfolipaz C) enzimlerini içerir. Tip IV sekresyon sistemi ise *dot* (defective in organelle trafficking) ve *icm* (intracellular multiplication) gen bölgelerince düzenlenir. Dot ve Icm proteinleri hücre

içi üreme esnasında fago-lizozom oluşumunu engelleyerek replikatif vakuolünün oluşumunu sağlar (Aragon ve diğ., 2000; Flieger ve diğ., 2000).

Legionella cinsi bakterilerin insan, serbest yaşayan amip türleri, siliatlar ve biyofilm içerisinde yaşayabilen bir küf türü olmak üzere birçok konağı bulunmaktadır (Fields ve diğ., 2002; Molmeret ve diğ., 2002). Ayrıca laboratuvar ortamında bakterinin patojenitesini değerlendirmek amacıyla kullanılan hayvan modelleri de mevcuttur. *Legionella* cinsi bakterilerin patojenitesini değerlendirmek için model hayvan olarak maymun, fare, sıçan, hamster ve kobay türleri kullanılmıştır (Fitzgeorge ve diğ., 1983; Yamamoto ve diğ., 1988). Yapılan araştırmalar bakterinin akciğerlere ulaşmasının ardından muhtemel konaklarının insan alveolar makrofajları, alveolar fagositer epitel hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerinin olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte T ve B lenfositleri de salgıladıkları sitokinlerle immün cevap oluşturabilmektedir. Bununla birlikte Cirillo ve diğ. (1999), *Legionella* bakterilerinin patojenitesinin belirlenmesi için insan periferik mononükleer hücrelerinin de konak hücre olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda hastalık etkeni olarak en sık rastlanan *Legionella* türü olan *L. pneumophila* serogrup (SG) 1'in Philadelphia salgınında izole edilen standart suşu (ATCC 33152) ile İstanbul ilinde farklı su sistemlerinden izole edilmiş 9 farklı *L. pneumophila* SG1 bakterisi kullanılmıştır. Çalışmanın amacı patojenitesi bilinen standart *L. pneumophila* bakterisi ile bu dokuz izolatın tip II ve tip IV sekresyon sisteminde düzenlenen bazı virülans faktörlerini incelemektir. Elde edilen sonuçlar ile herhangi bir salgına sebep olmamış çevresel suşların enfeksiyon oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinin *L. pneumophila* enfeksiyonlarının patogenezinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *LEGIONELLA* CİNSİ BAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Legionella cinsi bakteriler Gram negatif zorunlu hücre içi parazitidirler. Doğada genellikle tatlı su kaynaklarında yaşayan bakteriler solunum yolu ile alındıklarında Lejyoner hastalığı veya Pontiak ateşine neden olurlar (Vogel ve Isberg, 1999). 50'den fazla türe ve 70'in üzerinde serogruba sahip *Legionella* cinsinin hastalık etkeni olarak en sık rastlanan türü % 90'lık bir oranla *L. pneumophila*'dır. Ayrıca *L. pneumophila* dışında 19 türünün daha insanlarda hastalık etkeni olduğu saptanmıştır (Tablo 2.1) (Fields ve diğ., 2002; Muder ve Yu, 2002; Blatny ve diğ., 2011). Bu türler içerisinde *L. pneumophila*'dan sonra en sık rastlanılan türü ise *L. micdadei*'dir (Dowling ve diğ., 1992).

2.1.1. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Keşfi ve Sebep Oldukları Hastalıklar

Legionella cinsi bakterilerin ilk izolasyonları 1943 yılında Tatlock, 1947'de Jackson ve diğ. tarafından kobaylar üzerinde gerçekleştirilmiştir (McDade ve diğ., 1979; Hebert ve diğ., 1980). 1956 yılında ise Drozanski, bu bakteriyi topraktan izole ettiği özgür yaşayan bir amip türünde tespit etmiş ve *Sarcobium lyticum* olarak adlandırmıştır (Drozanski, 1991). Bu bakterinin *Legionella* cinsi üyesi olduğu 1996 yılında Hookey tarafından belirtilmiştir. Bununla birlikte kaynağı tanımlanmasa da ilk Pontiak ateşi vakası 1949 yılında rapor edilmiştir (Diederer, 2008). İlk Lejyoner hastalığı bulgusu ise 1957 yılında Minnesota eyaletinin Austin şehrindeki 30000 nüfuslu SPAM City bölgesine aittir. Et üretim tesisi ile ünlü bölgede pnömoniye yakalanan 78 kişinin bilinen antibiyotiklerle tedavi edilememesi, hastalık belirtileri görüldükten 2-14 gün sonra hastaların % 97'sinin kendiliğinden iyileşmesi nedeniyle vakanın tanısı o tarihlerde konulamamıştır. Bu vakadan tam 22 yıl sonra iyileşen kişilerin yirmisinin serumlarında tespit edilen antikorlar ile hastalık etkeninin *L. pneumophila* olduğu ortaya konmuştur (Heuner ve Swanson, 2008).

L. pneumophila'nın keşfi ise 35 yıl önceye dayanmaktadır. 1976 Haziran'ında Amerika Birleşik Devletleri'nin Pennsylvania eyaletinde düzenlenen askeri bir toplantı esnasında yaklaşık 3000 katılımcıdan 221'inde pnömoni görülmüş, bunların 34'ü hayatını kaybetmiştir (Evenson, 1998; Friedman ve diğ., 2002). Salgından altı ay sonra Amerika Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (United States Center for Disease Control and Prevention, CDC) araştırmacılarından Joseph McDade ve Charles Shepards, atipik pnömoniyle ölen bir hastanın otopsi örneğinden hastalık sebebi olarak Gram negatif bir basili izole ettiklerini açıklamıştır. Hastalık etkeni olarak bakterinin tanısının konulması üç yıl sürmüş ve bu cinse vakaya atfen *Legionella* (İngilizce'de "Legion" ordu anlamına gelmektedir) denilmiştir (Diederer, 2008).

Tablo 2.1: *Legionella* cinsi üyeleri (Muder ve Yu, 2002; Diederer, 2008)

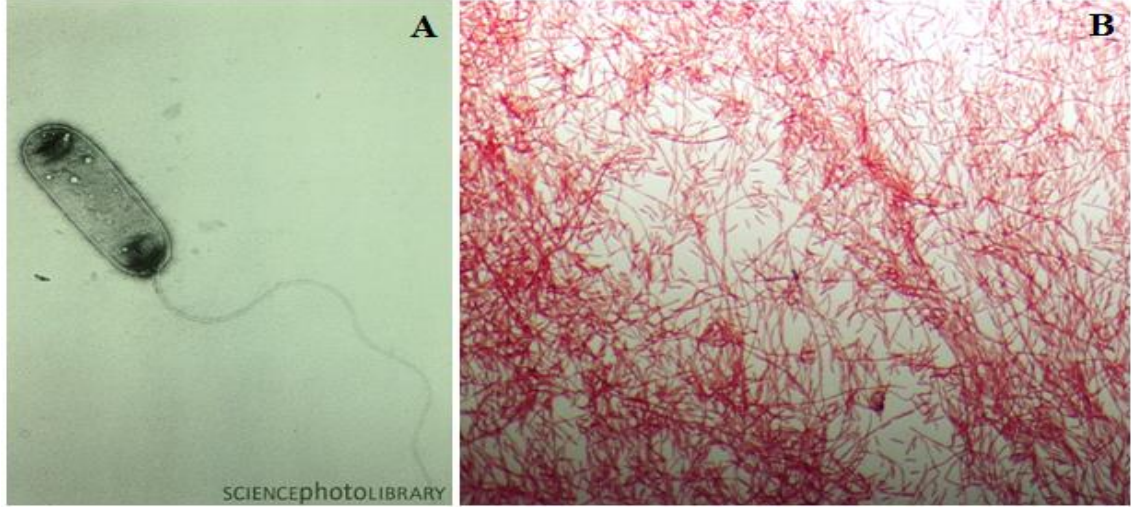
<i>Legionella adelaidensis</i>	<i>Legionella jordanis</i>
<i>Legionella anisa</i> *	<i>Legionella lansingensis</i> *
<i>Legionella beliardensis</i>	<i>Legionella londiniensis</i>
<i>Legionella birminghamensis</i> *	<i>Legionella longbeachae</i> *
<i>Legionella bozemanii</i> *	<i>Legionella lytica</i>
<i>Legionella brunensis</i>	<i>Legionella maceachernii</i> *
<i>Legionella busanensis</i>	<i>Legionella micdadei</i> *
<i>Legionella cherrii</i>	<i>Legionella moravica</i>
<i>Legionella cincinnatiensis</i> *	<i>Legionella nautarum</i> *
<i>Legionella donaldsonii</i> *	<i>Legionella oakridgensis</i> *
<i>Legionella drancourtii</i>	<i>Legionella parisiensis</i> *
<i>Legionella drozanskii</i>	<i>Legionella pneumophila</i> *
<i>Legionella dumoffii</i> *	<i>Legionella quateirensis</i>
<i>Legionella erythra</i>	<i>Legionella quinlivanii</i>
<i>Legionella fairfieldensis</i>	<i>Legionella rowbothamii</i>
<i>Legionella fallonii</i>	<i>Legionella rubrilucens</i>
<i>Legionella feeleeii</i> *	<i>Legionella sainthelensi</i> *
<i>Legionella geestiana</i>	<i>Legionella santicrucis</i>
<i>Legionella genomospecies 1 (L. quinlivanii ile oldukça yakın, ad konulmamış tür)</i>	<i>Legionella shakespearei</i>
<i>Legionella gormanii</i> *	<i>Legionella spiritensis</i>
<i>Legionella gratiana</i>	<i>Legionella steigerwaltii</i>
<i>Legionella gresilensis</i>	<i>Legionella taurinensis</i>
<i>Legionella hackeliae</i> *	<i>Legionella tucsonensis</i> *
<i>Legionella impletisoli</i>	<i>Legionella wadsworthii</i> *
<i>Legionella israelensis</i>	<i>Legionella waltersii</i>
<i>Legionella jamestowniensis</i>	<i>Legionella worsleiensis</i>
<i>Legionella jeonii</i>	<i>Legionella yabuuchiae</i>

*: İnsan patojeni olan türler

2.1.2. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Fenotipik Özellikleri

Legionella cinsi bakteriler polar ya da lateral flagellalı, 0.3-0.9 µm genişlikte ve 2-20 µm uzunlukta olan ve doğal su kaynaklarında rastlanan Gram negatif aerobik bir

çomaktır (Şekil 2.1). Ürediği ortama bağlı olarak ışık mikroskopunda uzun filamentöz yapı gösterirler (Steinert ve diğ., 2002; Diederer, 2008).



Şekil 2.1: *L. pneumophila* bakterisinin mikroskopik görüntüsü. A: Transmisyon Elektron Mikroskobu görüntüsü (x40.000 büyütme) (Sciencephotolibrary) ; B: Gram yöntemi ile boyanmış ışık mikroskobu görüntüsü (100x büyütme)

Nonfermentatif olan *Legionella* türlerini kültür ortamında üretmek için sistein ve demir tuzlarına ihtiyaç duyulur. Katalaz ve oksidaz pozitif olan bakteriler üre ve nitrati kullanamazlar. UV ışık altında sarı-yeşil renkte ve suda çözünebilen ekstraselüler bir bileşik üretirler. Bununla birlikte kırmızı, beyaz veya mavi hücre içi otofloresans özellik de sergilemektedirler (Muder ve Yu, 2002).

2.1.3. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Yaşam Alanları

Legionella'lar genellikle su rezervuarları, göller ve akarsular gibi doğal su kaynaklarında ya da havalandırma sistemleri, nemlendiriciler, soğutma kuleleri, spa merkezleri, dekoratif su fiskiyeleri, jakuzi ve duş başlıkları, buz makineleri, sebze nemlendiriciler ve dental üniteler gibi yapay su çevrelerinde bulunmaktadır (Blatny ve diğ., 2011).

Legionella cinsi bakteriler için su temel yaşam alanı olarak görülmektedir. Fields (1996) tatlı su kaynaklarının en az % 40'ında kültür, % 80'inden fazlasında ise PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemleri kullanarak *Legionella* cinsi bakterileri tespit etmişlerdir. Su dışında istisnai yaşam alanına sahip tek tür ise *L. longbeachae*'dir. Genellikle bitki yetiştirilen topraklardan izole edilen bu bakteri ilk kez California, Long Beach'de tespit

edilmiştir. Genellikle Avustralya’da salgınlara sebep olan bakteri Pontiak ateşine sebep olmaktadır. Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, Yunanistan ve Birleşik Krallık’ta da bu bakteriden kaynaklanan vakalar rapor edilmiştir (CDC, 2000; Fields ve diğ., 2002; Kubota ve diğ., 2007).

Su kaynakları içerisinde biyofilm tabakası veya serbest su fazında bulunabilen organizma zorunlu hücre içi paraziti olduğu için bu ortamlarda bulunan amip türleri içinde çoğalabilmektedir. Bu bakteriler laboratuvarında kendileri için hazırlanan özel besiyerlerinde de üretilmektedir. *Legionella* cinsi bakterileri üretmek için yaygın olarak kullanılan besiyerlerinden biri, içerisinde L-sistein, ferrik pirofosfat, α -ketoglutarik asit, N-(2-asitamido)-2-aminoetanosulfonik asit (ACES), aktif kömür ve maya özütü bulunan Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) besiyeridir (Muder ve Yu, 2002). *Legionella* cinsinin *L. pneumophila* dışındaki diğer üyeleri bu ortamda zayıf üreme gösterirler.

0-63 °C arasındaki sıcaklıklarda ve 0.2-15 ppm oksijen varlığındaki ortamlarda bulunan *Legionella* cinsi bakterilerin su kaynağı içerisinde 2-8 °C’de saklandığı takdirde yıllarca canlılıklarını sürdürebildikleri saptanmıştır (Cabeza, 2005). Bakterinin optimum üreme sıcaklığı 30-45 °C’dir. 20 °C’nin altındaki sıcaklıklarda gelişemezler, 70 °C’nin üzerinde ise ölürler. *Legionella* cinsi bakteriler uygun besiyerinde, 35 °C’lik nemli ortamda 2-5 gün içerisinde üreyebildikleri halde ilk izolasyonda bazen 10-14 gün gibi bir süre gerekebilmektedir (Diederer, 2008).

2.2. *LEGIONELLA* CİNSİ BAKTERİLERİN PATOGENEZİ

2.2.1. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Bulaşma Yolu

Bulundukları su kaynaklarından aerosoller içerisinde çevreye yayılan *Legionella* cinsi bakteriler çevrede bulunan hastane, okul ve benzeri yapıları kirletebildiği gibi solunum yolu ile alındığında hastalıklara da neden olabilmektedir. Blatny ve diğ. (2011), *Legionella* içeren partiküllerin 90 km uzağa kadar yayıldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu mesafeyi kat eden 3.5 μ m çaplı bir aerosolde maksimum 147 canlı *Legionella* bakterisi olduğunu, yayılma süresinin ise 11 saatten daha kısa olduğunu tespit etmişlerdir.

Hayvan modelleri ile yapılan farklı çalışmalarda 10-100 bakterinin asemptomatik hastalık oluşturabildiği, 1000 hücrenin enfeksiyöz ve 10.000 hücrenin ise kobaylarda ölümcül olduğu ile ilgili veriler sunulmaktadır (Berendt ve diğ., 1980; Muller ve diğ., 1983). Bauer ve diğ. (2008), litrede 1000 *Legionella* bakterisi içeren bir aerosolün yaşlı ve immün sistemi baskılanmış kişilerde yüksek enfeksiyon riski oluşturduğunu belirtmektedirler. Ayrıca enfeksiyon şiddetinin bakteri sayısı kadar bu bakteriye maruz kalma süresine de bağlı olduğu bilinmektedir (Woo ve diğ., 1992).

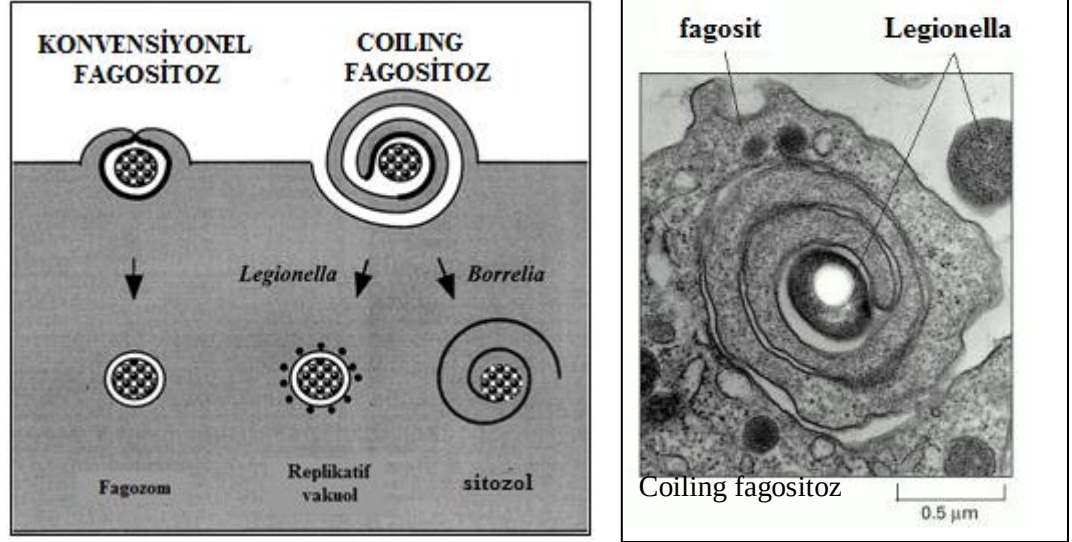
2.2.2. *Legionella* Cinsi Bakterilerin Hücre İçine Alınışı ve Hücre İçi Üreme Özellikleri

Kontamine su kaynağından yayılan aerosoller içinde bulunan *Legionella* bakterileri solunum yolu ile vücut içine alınır ve alveolar boşluklara ilerlerler. Epitel hücreleri ile karşılaşarak alveolar yüzeye tutunan bakteriler alveolar makrofajlar tarafından iki farklı yol ile hücre içine alınırlar. Biri klasik pseudopod uzantıları ile çevrelenen bakterinin konvansiyonel fagositozudur (zippering phagocytosis). Diğeri ise “coiling phagocytosis” olarak adlandırılan ve tek bir hücre çıkıntısının bakteri hücresi etrafında katlı sarmallar oluşturması ile oluşan fagositozudur (Şekil 2.2) (Dowling ve diğ., 1992; Vogel ve Isberg, 1999).

Konvansiyonel fagositozda *Legionella* cinsi bakterilerin yüzey antijenleri komplemanı hem klasik hem de alternatif yoldan aktive edebilmektedir. Bakterinin sahip olduğu lipopolisakkarit (LPS) tabakası, komplemanı klasik yoldan aktive ederken, C₃b komponentine bağlanan MOMP (temel dış membran porin proteini; major outer membran protein), komplemanın alternatif yoldan aktive edilmesinde etkindir. Bakteri yüzeyine yapışan C₃b komponenti makrofajların yüzeyinde bulunan CR1 ve CR3 reseptörlerine bağlanarak fagositozun gerçekleşmesini ve bakterinin hücre içine alınmasını sağlar (Payne ve Horwitz, 1987).

Coiling fagositozda ise fagositer hücre tarafından oluşturulan pseudopod bakteri etrafında kıvrılıp sarmallar oluşturarak bakteriyi vakuolün içine alır (Birteksöz, 2004). Araştırmalar coiling fagositozun konvansiyonel fagositozdan farklı olarak opsonine ihtiyaç duymadan gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Cirillo ve diğ. (1999), özellikle

amip enfeksiyonu sonrasında bakterinin makrofajlar tarafından coiling fagositoz ile hücre içine alındığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar amip içerisinde üreyen *Legionella* bakterilerinin makrofajlar üzerinde daha patojen olduğunu ve coiling fagositoz ile bakterinin hücre içine girişi (invazyonu yeteneği) arasında doğru orantılı bir ilişki olduğunu saptamıştır.



Şekil 2.2: Fagositoz çeşitleri (Rittig ve diğ., 1998) ve *L. pneumophila*'nın alveolar makrofaj tarafından fagositozu (Alberts ve diğ., 2002)

Normal bir fagositozda, fagozom ile hücre içine alınan bakteri, içinde bulunduğu vakuol ile lizozomun birleşmesi sonucu oluşan fago-lizozom içinde sindirilir. *Legionella* cinsi bakterilerde ise bu birleşme sekiz saatten önce meydana gelmez (Chang ve diğ., 2005). *Legionella* cinsi bakterilerde *dot* ve *icm* genlerinin şifrelediği Dot/Icm tip IV salgı sistemi fago-lizozomun oluşumunu önleyerek fagozomun tekrar yapılandırılmasını düzenler. Ayrıca bu sistemin bakteri üremesini tamamladıktan sonra hücrenin apoptozunu düzenlediği de belirlenmiştir (Gao ve Abu Kwaik, 1999). İlk olarak fagozomun etrafında granüllü endoplazmik retikulum, ribozom ve mitokondrilerin toplandığı görülür. Oluşan bu yapıya “replikatif fagozom” denir (Vogel ve Isberg, 1999). Replikatif fagozom sayesinde bakteri kendi ihtiyaç duyduğu aminoasitleri konak hücreye sentezletir ve çoğalmaya başlar. Logaritmik fazın ortalarında bakterinin sayısını iki katına çıkarması ilk iki saatlik süreyi kapsar (Swanson ve Hammer, 2000). Friedman ve diğ. (1998), enfekte makrofaj içerisindeki bakterinin sayısını 48-72 saat içerisinde 100-1000 kat artırdığını bildirmişlerdir.

Swanson ve Hammer (2000), bakterinin konak hücrenin aminoasit kaynaklarını tüketmesinin ardından 3',5'-bispirofosfat (ppGpp) birikimi ile Na hassasiyeti yüksek ve hareketli virulent forma dönüşümünün gerçekleştiğini belirtmektedirler. Ekspansiyel fazın sonlarında ppGpp sentataz ile sağlanan birikim “durağan-faz RpoS σ faktör” miktarının artmasını sağlar. Başka bir deyişle bu proteinlerin yeni konağın enfekte edilmesi, tuz hassasiyeti, sitotoksinite, osmotik direnç, hareket ve fagozom-lizozom birleşmesinin önlenmesinden sorumlu olduğu belirtilmektedir (Fields ve diğ., 2002).

Bakterinin konak hücreden ayrılması ile ilgili farklı görüşler mevcuttur. Çoğalmanın durağan fazında *Legionella* fagozomu ile lizozom bakterilere zarar vermeksizin birleşir (Steinert ve diğ., 2002). Bu noktada bakteri fago-lizozom zarında parçalanmalara sebep olur ve asidik içerik konak hücre içine dağılır. Sonuç olarak hücre içinde nekroz meydana gelir ve en son hücre zarı parçalanarak bakteri serbest kalır. Bununla birlikte nekroz olmaksızın *Legionella* tarafından konak hücrenin apoptozunun kodlandığı ve bu sayede bakterinin serbest kaldığı yönünde görüşler de bulunmaktadır (Gao ve Abu Kwaik, 1999). Ayrıca fago-lizozom oluşmadan bakterinin vakuol dışına çıkarak hücreyi nekroza sürüklediğini öne süren araştırmacılar da bulunmaktadır (Bitar ve diğ., 2004).

2.2.3. Lejyoner Hastalığı (Lejyonellosis)

Konak hücre içerisinde çoğalarak tüm kaynakları tüketen bakteri yukarıda belirtilen yollarla hücre dışına çıkar. Serbest kalan bakteriler yeni hücreleri enfekte eder. Alveolar bölgede çok sayıda makrofajın parçalanması sonucu açığa çıkan litik ürünler nedeni ile doku hasarı ve iltihap oluşur (EPA, 1999). Bu durum Lejyoner hastalığı olarak adlandırılır.

Epidemiyolojik çalışmalar *Legionella* cinsi bakterilerin fırsatçı bir patojen olduğunu ortaya koymaktadır. Hastalık immün sistemi gelişmediği için bebek ve çocuklarda, yaşlılarda, sigara kullanan orta yaş grubunda, solunum ve kalp yetmezliği bulunan kişilerde, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, diyabetlilerde ve şehirlerarası taşımacılık yaptığı için bir gecedan uzun süre ev dışında konaklayan sürücülerde görülmektedir (Marston ve diğ., 1994; Muder ve Yu, 2002). Özellikle organ nakli yapılan veya uzun süre kemoterapi gören hastalarda bağışıklık sistemleri baskılandığı için patojenin bulaşma oranı daha yüksektir (Cianciotto ve diğ., 2006). Fliermanns

(1996), tedavi edilen Lejyoner hastalığı vakalarında ölüm oranının % 7-24 arasında değiştiğini ve bu kişilerin genellikle yaşlı ve immün yetmezliği olan hastalar olduklarını belirtmiştir. Çoğu olgu raporunda hastalığın seyahat ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Den Boer ve diğ., 2006; Diederer, 2008).

Lejyonellosis, Lejyoner hastalığı ve Pontiak ateşi hastalık tablosu için kullanılan ortak bir isimdir. Pontiak ateşi, genellikle sağlıklı kişilerde görülen ve basit bir soğuk algınlığı şeklinde seyreden (pnömoni belirtisi göstermeyen) *Legionella* hastalığıdır. 2-5 gün süren hastalığın genel belirtileri keyifsizlik, miyalji, ateş ve titremedir (Evenson, 1998). Bununla birlikte pek çok Pontiak ateşi vakasında herhangi bir hastalık belirtisi gözlenmemektedir.

Lejyoner hastalığı pnömokoktan sonraki en yaygın pnömoni çeşididir. Hastalığın başlıca belirtileri ateş, ani öksürük, baş ağrısı, miyalji, kilo kaybı, hipoksi, nefes darlığı, titreme, ishal ve sayıklamadır. Hastaların % 25'inde denge kaybı ve kafa karışıklığı gibi mental etkiler de gözlenmiştir. Akciğer röntgeni bu hastalığı diğer pnömoni çeşitlerinden ayırmaya yeterli olmasa da alveolar infiltrasyon (tüberküloz olgusu) Lejyoner hastalığında oldukça yaygındır. Tanı tablosunu hastanın risk grubunda olması ve serolojik testler tamamlamaktadır (Fields ve diğ., 2002).

2.2.4. Lejyoner Hastalığının Tanısı

Lejyonellosis şüpheli vakalarda zaman kaybetmeden tedaviye başlanması gerekli olmakla birlikte bakterinin izolasyon ve identifikasyonunun yapılması da gereklidir. *Legionella* bakterilerinin tanısı için kültür, lateks aglütinasyon, enzim bağlı immünosorbent deney (ELISA), radyo-immün test (RIA), direkt veya indirekt floresans antikor (DFA ve IFA) bağlama testleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler içinde bronkoalveolar sıvıdan alınan örneklerde kültür yöntemi ile bakteri aranması en hassas yöntemdir. Hasta numunesinin asit ile muamelesi ve seçici özel antibiyotikli besiyerlerinin kullanılması diğer flora bakterilerinin üremesini engeller. Balgam örneğinden hazırlanan kültürlerde bakterinin ürememesi nedeniyle hasta numunesi olarak plevral sıvı, akciğer dokusu, bronkoskopik örnek veya transtrankeal aspirat tercih edilmektedir. Bu kaynakların eldesi operasyon gerektiren yöntemler olduğu için hastalık tanısında serolojik yöntemler tercih edilmektedir (Fields ve diğ., 2002).

Legionella tanısında rutin olarak kullanılan floresans antikor testi, haftalık olarak 6 hafta boyunca tekrarlanır. Bu testte hastaların üçte ikisi 3. haftada pozitif sonuç verirken, 6. haftada % 100'ünde antikor tespit edilir. Akciğer kültürü (biyopsi ya da otopsi örneğinden) veya solunum salgılarından *Legionellae* aranması için ilk kullanılan yöntem, test spesifikliğı % 95 'den fazla olan DFA testidir. Bu yöntem ile antibiyotik uygulamasını takip eden birkaç gün içerisinde bakterinin saptanması mümkündür. DFA yönteminde kullanılan poliklonal antikorların çapraz reaksiyon verdiğıne dair bir kayıt bulunmamakla birlikte hastalığın klinik tablosundan emin olunmadığı durumlarda *Legionellae* aranması için poliklonal antikorların kullanılması önerilmemektedir (Jimenez Lucho ve diğ., 1994; Maiwald ve diğ., 1998). En yaygın kullanım alanına sahip olan IFA yönteminde antijen kaynağı olarak ısıyla veya formalin ile öldürölmüş bakteriler kullanılır. Her iki antijen için de yöntemin spesifikliğı % 99'dur. ELISA testi ise sadece *L. pneumophila* SG1 için kullanılmaktadır (Fields ve diğ., 2002).

Bununla birlikte *L. pneumophila* SG 1-4 için indirekt hemaglutinasyon da kullanılmaktadır. Spesifikliğı % 97-99 arasında değışen mikroaglutinasyon çok sayıda örneğın hızlı ve kolay çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Bu testte *Legionella* ile *Campylobacter* spp. veya *Pseudomonas aeruginosa*'nın çapraz reaksiyon verdiğı saptanmıştır (Collins ve diğ., 1984; Bossel, 1996).

Belirtilen serolojik testler ile *Legionella* için oluşın immünoglobulin G (IgG), IgM ve IgA incelenebilmektedir. Hassasiyeti arttırmak için üç Ig grubunun da araştırılması önerilmektedir. Bununla birlikte çoğı ticari kitte IgM ve IgA için uygun ikincil antikor bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar Lejyoner hastalığında kişide ilk olarak IgM saptandığını göstermektedir. Ancak IgM hastalığın son aşamasında ve bağışıklık döneminde de serumda bulunduğı için tek başına değıerlendirilemez. Testin belirli aralıklarla tekrarlanması kesin sonuç verir (Ory ve diğ., 2000).

Bir diğeri tanı yöntemi ise diğeri yöntemlere göre oldukça hızlı ve kolay olan üriner antijen testidir. Bu testle genelde *L. pneumophila* SG1 incelendiğı için diğeri Lejyonellosis etkeni bakterilerin oluşturduğı % 40'lık bir dilim değıerlendirilemez (Kashuba ve Ballow, 1996; Rigby ve diğ., 1997).

2.2.5. Lejyoner Hastalığının Tedavisi

Pnömoni olgusuyla karşılaşıldığında beklenmeden pnömokok veya Lejyoner hastalığı gibi bakteriyel pnömonilere karşı kullanılan antibiyotiklere başlanır. *Legionella* cinsi bakteriler sefalosporinaz ürettikleri için penisilin ve sefalosporinlere dirençlidirler (Evenson, 1998). Lejyoner hastalığı için en sık kullanılan antibiyotik eritromisindir. Bu antibiyotik epigastrik rahatsızlıklara yol açabilir. Bununla birlikte özellikle immün yetmezliği olan hastalarda yetersiz kalabileceği düşünülerek destekleyici ajanlara başvurulabilir. En sık kullanılan ajanlar rifampisin veya doksisisiklidir. Ayrıca azitromisin ve levofloksasinin de bakteri üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğu görülmektedir (Fields ve diğ., 2002). Bunların yanısıra Diederer (2008), azitromisin, klaritromisin ve spiramisin makro-azalidlerinin, tetrasiklin grubu olan doksisisiklin'in, florosinolon olan siprofloksasin, gatifloksasin, gemifloksasin, moxifloksasin, ofloksasin'in ve ketolid grubu telithromisinin de Lejyoner hastalığının tedavisinde kullanıldığını belirtmiştir.

Doğada yaygın olarak bulunan *Legionella* cinsi bakteriler her an yeni bir salgına sebebiyet verebilecekleri için bu bakterilerin kolayca kolonize olup çoğalabileceği yerler gözlem altında tutulmalıdır. Genellikle soğutma kuleleri, hastahane ve otel su depoları, kamu kullanımına açık havuzlar ile su fışkıyeleri temel bulaştırıcılar olarak görülmektedir. Bu sistemlerde bakterinin bulunmaması için düzenli dezenfeksiyon ve sıcak su pompalama, ultraviyole ışık uygulaması, ozonlama, metal iyonizasyonu ve klorinasyon gibi farklı yöntemler uygulanmakta (Miyamoto ve diğ., 2000) ancak yine de *Legionella* kaynaklı salgımların tümü önlenememektedir.

2.3. *LEGIONELLA* CİNSİ BAKTERİLERİN VİRÜLANSI

Lejyonellosis salgını tehlikesi açısından maruz kalınan bakteri sayısı kadar bakterinin hastalık yapma yeteneğinin olması da önemlidir. *Legionella* cinsi bakterilerin patojenitesi tip II ve tip IV sekresyon sistemleri olarak belirtilen mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Tip II sekresyon sistemi ile bakterinin virülans faktörleri arasında değerlendirilen enzimlerin üretimi, tip IV sekresyon sistemi ile de genel olarak bakterilerin konak hücre ile teması, hücre içine girişi, çoğalması ve hücre dışına çıkışı düzenlenmektedir. Bakterinin patojenitesinin değerlendirildiği çalışmalarda bakterilerin

virölansı, biyofilm içerisinde yer alabilmeleri, flagella ve piliye sahip olmaları, demir kazanımı, sahip oldukları peptit toksinler, sekrete enzimleri, antijenik hücre yüzey proteinleri ile konak hücreyle olan ilişkisi göz önünde bulundurularak tayin edilmektedir (Dowling ve diğ., 1992; Vogel ve diğ., 1998; Steinert ve diğ., 2002; Bitar ve diğ., 2004).

2.3.1. Biyofilm Oluşturabilme

Winogradsky (1928) tarafından toprak örnekler içerisindeki canlı bakterilerin cam lamlara yapıştığı gösterildikten sonra bakterilerin yapışma özelliği hızla ilgi odağı haline gelmiştir. Bu çalışmadan kısa süre sonra Henrici (1933) benzer şekilde tatlı su örnekleri içerisindeki bakterilerin de lama yapıştığını ve burada çoğaldığını göstermiştir. İlk kez 1930'lu yıllarda Zobell tarafından da denizel mikroorganizmaların yapışma özellikleri incelenmeye başlamıştır (Zobell, 1933, 1935, 1936). Araştırmacı, biyofilm oluşturan denizel mikroorganizmaların birçok farklı yüzeydeki zararlı etkilerini incelediği için biyofilm konusundaki araştırmaların kurucusu olarak kabul edilmektedir. Günümüzde biyofilm “su ortamında bulunan cansız bir yüzeyde mikroorganizmalarca oluşturulan kominiteler” olarak tanımlanmaktadır (Marshall, 1976). Biyofilm oluşumunda ilk olarak sudaki organik maddelerin tutunumu ve ardından mikroorganizmaların bu yüzeye yapışması söz konusudur. Yapışmanın ardından polisakkarit yapılı salgılar salınarak biyofilm oluşumu başlar. Bu noktada mikroorganizmalar arası etkileşim mekanizmaları ile farklı mikroorganizmalar ortama çekilerek bir kominite oluşur. Su sistemlerinde kör boruların bulunması, otel veya mevsimlik çalışan işletmelerde olduğu gibi bu sistemlerin bazı dönemlerde kullanılmaması veya biyofilm oluşumunu kolaylaştıran materyallerin tercih edilmesi gibi sebeplerden dolayı su sistemlerinde biyofilm oluşumu artar (Gonpot ve diğ., 2000; Watrick ve Kolter, 2000; Shirtliff ve diğ., 2002).

Yapılan araştırmalarda mikroorganizmaların sıcaklık, kimyasal ajan, besin eksikliği gibi çevresel faktörlerden ve avcı organizmalardan korunmak için biyofilm içerisinde yer aldıkları belirtilmektedir (Watrack ve Kolter, 2000; Shirtliff ve diğ., 2002). Ayrıca olgun biyofilm tabakasının koparak yeni bir yüzeyde hızla yeni bir biyofilm tabakası oluşturabilmesi mikroorganizmaların kendilerini koruyarak daha hızlı ve etkili bir şekilde çoğalmasına da olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte biyofilm içerisindeki

bakterilerin gen alışverişi sayesinde kazandıkları özellikler ile çevresel faktörlere karşı direnç geliştirdikleri de bilinmektedir (Sakarya, 2005). Ayrıca *Legionella* cinsi bakterilerin su çevrelerindeki konağı olan amip türlerinin de biyofilm tabakası içerisinde yer alması *Legionella* kaynaklı enfeksiyon oluşma riskini arttırmaktadır (Steinert ve diğ., 2002).

Tatlı su kaynaklarında biyofilm içerisinde çoğalan bu bakteri için cansız yüzeylere yapışma ve biyofilm oluşturma kapasitesi önemlidir. Her ne kadar *Legionella* cinsi bakterilerin biyofilm içerisinde çoğalma yeteneği çoğu araştırmacı tarafından virülans faktörleri arasında değerlendirilmemiş olsa da De Buck ve diğ. (2005) biyofilm oluşumunun, katlanmış proteinlerin sitoplazma zarından geçmesini sağlayan ve virülans faktörleri arasında değerlendirilen twin-arginine translokasyon (tat) yolu tarafından düzenlendiğini belirtmektedirler. Ayrıca Lau ve Ashbolt (2009) virulent *Legionella* bakterilerinin biyofilm içerisinde daha rahat yaşadığını, avirulent olanlarına ise suda serbest formda rastlanabildiğini belirtmektedirler. Araştırmacılar bu durumu bakterinin biyofilm tabakası içinde bulunan amip türleri gibi konaklarını enfekte etmelerine bağlamaktadır.

2.3.2. Flagella ve Pili (Fimbria) Üretimi

Flagella, bakterilerde hareketten sorumlu bazal membrana tutunmuş uzun, filamentöz yapılardır. Flagella sayısı ve hücredeki konumu bakteriden bakteriye değişiklik gösterir. Flagella'lar hücrede bulundukları yere ve sayılarına göre monotrik (tek ve polar konumlu), lofotrik (en az iki ve polar kutuplu), amfitrik (her iki kutupta birer flagella), amfilofotrik (her iki kutupta en az iki flagella) ve peritrik (tüm hücre yüzeyi flagella ile kaplı) olarak adlandırılırlar. Özellikle Gram negatif bakterilerde görülen flagella filament, çengel ve bazal cisimden oluşur. Filament 13-17 nm uzunluğunda ve 30-40 kDa'luk flagellin proteini subünitelerinden oluşan antijenik yapıdır. Çengel ise bazal cisim ile filament arasında hareketin iletiminden sorumlu olan yapıdır. Bazal cisim 4 halkadan oluşur. Bu halkalardan biri membrana, biri periplazmik yüzeye, biri peptidoglikan tabakaya ve biri de lipopolisakkarit yüzeye bağlıdır. Flagellanın hareketi bazal cisim tarafından sağlanır (Winn ve diğ., 2006).

Hareketten sorumlu flagella *Legionella* bakterilerinin virölansının değerlendirilmesinde önemlidir. Aynı zamanda antijenik özelliğe de sahip flagella konağa yapışmada, konak istilasında, hücre içi üreme ve biyofilm oluşturmada rol oynamaktadır (Heuner ve Swanson, 2008).

Bir diğer antijenik yapı ise yapışmadan sorumlu pililerdir. Pilus (seks pilisi) ve fimbria (tutunmadan sorumlu pili) olmak üzere iki çeşiti bulunan bu yapılar bakteriler arası genetik bilgi alışverişi, biyofilme veya ökaryotik hücre ve dokulara yapışma gibi fonksiyonlara sahiptir. Bakteriler arası DNA transferinden sorumlu pilus, 9-10 nm uzunluğunda ve bir hücrede en fazla 10 adet bulunabilen yapılardır. Fimbria ise pilusa göre daha kısa ve bakteri hücresinin kutuplarında veya tüm yüzeyine yayılmış halde bulunurlar. Sayıları 200'e kadar artabilen fimbriumlar bakterinin antijenik yüzey yapıları arasında yer alırlar. Başlıca pilin proteininden oluşan bu yapılar bakteriye göre değişebildiği gibi *E. coli* gibi bazı bakterilerde enfeksiyon aşamasına göre de değişiklik gösterebilir (Winn, 1988; Molofsky ve diğ., 2005; Aschtgen ve diğ., 2008). *Legionella* cinsi bakteriler, sentezinde sıcaklığın rol oynadığı yapışmadan sorumlu tip IV pili'ye sahiptir (Dietrich ve diğ., 2001).

Legionella cinsi bakterilerin cansız yüzeylere yapışabilmesini sağlayan flagella ve pili, virölansla ilgili *pilD* gen bölgesince sentezlenir. Makrofajların uyarımında rol oynayan yapılar olan flagella ve fimbria sıcaklık, üreme fazı, amino asitler, viskozite ve osmolarite ile düzenlenir. Flagella her ne kadar hücre içi patojenite için gerekli olmasa da yapışmayı kolaylaştırdığı için virölansla fayda sağlar (Bosshardt ve diğ., 1997).

Molofsky ve diğ (2005), bakterinin besin kıtlığı durumunda flagellin sigma faktör olan FliA ürettiğini göstermişlerdir. Bu faktör ile bakteri flagellar ve hareketli bir yapı kazanır. Araştırmacılar *L. pneumophila*'nın kemik iliğinden türevlenmiş makrofajlar üzerine patojenitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, bakterinin tüm kaynakları kullanarak çoğalması sonucu hücre içi kıtlık başladığında ürettiği flagellanın konak hücre lizisini uyardığını ve bakterinin bu şekilde yeni besin kaynakları bulmak için konağın parçalanmasını düzenlediğini göstermiştir.

2.3.3. Demir Kazanımı

Birçok organizma için hayati öneme sahip olan demir, bazı patojenik bakterilerde virölans için gereklidir. Mikroorganizmalar demiri doğadan sağlayabildikleri gibi konak dokularından transferrin ve laktoferrin proteinlerine bağlanmış durumdaki demiri alarak da sağlayabilirler. Demirin bu kazanımında rol oynayan yüksek eğilimli demir kelatörlerine siderofor denilmektedir. Sideroforlar virölans faktörleri arasında yer alırlar. Demir +2 değerlikli haliyle hücre içine alınır. Ancak doğada genelde oksitlenerek +3 halinde bulunun bu metalin indirgenmesi sideroforlarca sağlanır. Konak içerisinde ise bu proteinler, konağın transferrin ve laktoferrini ile bağlanarak demiri alırlar (Winn ve diğ., 2006). Ferrikrom (*Ustilago sphaerogena*), enterobaktin (*Escherichia coli*), mikobaktin (*Mycobacterium*), basillibaktin (*Bacillus subtilis*), ferrioksamin B (*Streptomyces pilosus*), fusarinine C (*Fusarium roseum*), yersiniabaktin (*Yersinia pestis*), vibriobaktin (*Vibrio cholerae*), azotobaktin (*Azotobacter vinelandii*), psödobaktin (*Pseudomonas*), eritrobaktin (*Saccharopolyspora erythraea*) ve ornibaktin (*Burkholderia cepacia*) en iyi bilinen sideroforlar arasında sayılabilir.

Demir kazanımı birçok bakteride olduğu gibi *Legionella* bakterilerinde de hem konak içinde hem de konak dışında çoğalabilmek için gereklidir. Bakteri hem makrofaj enfeksiyonunda rol oynayan pnömobaktin denilen hidroksimat benzeri hem de piyoverdin benzeri bir siderofor üretir (Viswanathan ve Cianciotto, 2001). Legiobaktin, sitokrom c biyogenez sistem, periplazmik ve sitoplazmik ferrik reduktazlar *Legionella* cinsi bakterilerin demir kazanımında rol oynayan faktörlerdir (Steinert ve diğ., 2002).

L.pneumophila'nın insan monositleri içerisinde çoğalması demire bağlıdır. Byrd ve Horwitz (2000), monositlerdeki transferrin reseptör ekspresyonunun olağandan daha düşük olmasının *Legionella* enfeksiyonunu önlediğini saptamışlardır. Aslında *Legionella* transferrin veya laktoferrini direkt olarak kullanmaz. Bakteri, konağın bu faktörleri kullanarak oluşturduğu hem içeren bileşikler kullanır (O'Connell ve diğ., 1996). Demir kazanımı genleri transkripsiyonel regülatör olan Fur tarafından düzenlenir. *L.pneumophila*'ya spesifik Fur tarafından düzenlenen *frgA* geni *E. coli*'deki demir alım kelatları olan aerobaktin sentetaz, *lucA* ve *luc C* genleri ile homolog olan bir proteini kodlamaktadırlar. Araştırmalar *frgA* mutantlarının U937 hücreleri içerisindeki üreme yeteneklerinin 80 kat azaldığını göstermektedir (Hickey ve Cianciotto, 1997). Bir

siderofor olan legiobaktin periplazmik ve sitoplazmik Fe^{+3} reduktazlar gibi demir asimilasyonuna katkı sağlamaktadır (Viswanathan ve Cianciotto, 2001).

2.3.4. Sahip Olduğu Antijenik Yapılar ve Toksinler

Legionella cinsi bakteriler tarafından salınan ve bakterinin virölansını belirleyen enzimler, toksik bileşikler ve pigmentler gibi pek çok faktör bulunmaktadır. Bakteri tarafından salınan legiolisin (lly) proteini, kültür ortamını mavileştiren ve bakterinin ekolojik adaptasyonundan sorumlu olan bir proteindir. *Legionella* bakterilerinin ultraviyole radyasyon, sıcaklık ve ışık etkisine karşı hayatta kalması lly proteinine bağlı olmakla birlikte bu proteinin hücre içi üreme ile ilgili bir etkisi bulunamamıştır (Bender ve diğ., 1991; Steinert ve diğ., 1995).

Legionella cinsi bakteriler antijenik özellikteki LPS, flagella, fimbria, ısı şok proteini (Hsp60) ve dış membran proteinlerine sahiptir. *Legionella* LPS yapısı diğer Gram negatif bakterilerdeki kadar güçlü bir antijenik yapı değildir. Endotoksin özellikteki LPS serum direnci, hücre içi üreme ve virölans ile ilişkilidir (Lüneberg ve diğ., 2001).

Legionella yüzey yapıları arasında yer alan peptidoglikana bağlı 28 kDa'luk dış membran porini, komplementlerin bağlanması ve dolayısıyla opsonize fagositozdan sorumludur. 24 kDa'luk mip (macrophages infectivity potentiator) proteini ise propil-prolil izomeraz (PPIase) aktivitesine sahip dış yüzey proteindir. Bakterinin hücre dışında ürediği zamanda sentezlenen bu protein, bakterinin konak hücre içine girmesinden sonra hücre içi sindirimi engelleyerek bakterinin hayatta kalmasında rol oynar. *Mip* geni makrofaj, protozoa ve akciğer epitel hücrelerindeki enfeksiyonun erken evresinde konak fagozomunun yüzey proteinlerinin izomerizasyonunu sağlayarak bakterinin hayatta kalmasında rol oynar (Cianciotto, 2001).

Legionella'nın sahip olduğu diğer antijenik yüzey yapıları 19 kDa'luk dış membran lipoproteini, 25 kDa'luk dış membran proteini ve 60 kDa'luk ısı şok proteindir. 19 kDa büyüklüğündeki dış membran lipoproteininin virölans ile ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır (Engleberg ve diğ., 1991). Krinos ve diğ. (1999), *Legionella* cinsi bakterilerin yüzeyinde porin aktivitesi gösteren 24-25 kDa büyüklüğündeki tek bir

MOMP bulunduğunu ve bunun yapışmada rol oynadığını göstermişlerdir. Sıcaklığa bağlı stres koşullarında sentezlenen ısı şok proteinleri genellikle hücre içinde yer alsa da Hsp60 gibi bazı tipleri hücre dışına salgılanabilmektedir. Hsp60'ın makrofajların sitokin salgılamasını uyardığı kanıtlanmıştır (Retzlaff ve diğ., 1996).

2.3.5. Sekresyon Sistemleri ve Enzimatik Özellikler

Bakterilerde besinlerin ve gerekli kofaktörlerin hücre içine alımı ve metabolik atıkların, toksik maddelerin ve salgılanan makromoleküllerin hücre dışına çıkışı için, özel transport sistemleri bulunmaktadır. Sekresyon sistemleri bakterilerin hayatta kalmaları için gerekli olmakla birlikte patojeniteleri için de önemlidir. Gram negatif bakterilerde tanımlanmış altı farklı sekresyon sistemi bulunmaktadır. Bunlar, ABC proteini, membran füzyon proteini ve dış membran proteininden oluşan bir taşıma sistemi olan tip I, por oluşumuna bağlı protein sekresyon sistemi olan tip II, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio* gibi Gram negatif patojen bakterilerde flagella üretimi ve patojeniteden sorumlu tip III sekresyon sistemi, hücre içi patojenite ve bazı toksinlerin salınımından sorumlu tip IV sekresyon sistemi, tip V ototransporter sistem ve *Vibrio cholerae* ile *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri tarafından savunma mekanizması olarak geliştirildikleri düşünülen tip VI sekresyon sistemidir (Salyers ve Whitt, 2002; Cascales ve Christie, 2003; Christie ve diğ., 2005; Bingle ve diğ., 2008; Wooldridge, 2009; Çadırcı, 2010).

Yapılan çalışmalar *Legionella* bakterilerinin hücre içi patojenite gösterebilmeleri için tip IV sekresyon sisteminde yer alan membrana bağlı sekresyon yapılarına ihtiyaç duyduklarını göstermiştir. Bu yapıların üretimi *dot* ve *icm* gen bölgelerince düzenlenir. Dot ve icm proteinleri fago-lizozom oluşumunu engelleyerek replikatif vakuolünün oluşumunu sağlar (Steinert ve diğ., 2002). Aslında *dot/icm* lokusu 23 geni içeren iki farklı gen bölgesidir. Bu gen bölgelerinin aktivitesinin memeli ve protozoa hücrelerinde fago-lizozom oluşumunu engellediği, A/J fare peritoneal makrofajlarında makropinositoz için gerekli olduğu, alveolar makrofajlarda kaspaz-3'e bağlı apoptozu düzenlediği, hem protozoa hem de memeli hücrelerinde por oluşumuna bağlı sitotoksiteyi düzenlediği bilinmektedir (Bitar ve diğ., 2004). Vogel ve diğ. (1998), Dot/Icm sekresyon sisteminin konak hücre içindeki endositik birleşmeye izin veren makromolekülleri fagozom zarında oluşturdukları porlar vasıtasıyla konak

sitoplazmasına aktardıklarını tespit etmişlerdir. Dot/Icm sekresyon sisteminin etkisiyle ilk olarak endoplazmik retikulum ile bağlanan fagozom daha sonra ribozom ve mitokondriler ile bağlanır.

Legionella bakterilerinin diğer bir sekresyon sistemi olan tip II sekresyon sistemi *pilD* genince kontrol edilir. Temel işlevi prepilin sentetaz üretimi olan gen bölgesi bakterinin tip IV pilus üretimini düzenlemektedir. Proteaz, fosfatazlar, nükleaz, çinko-metalloproteaz, mono-, di- ve triaçilgliserol lipazlar, fosfolipaz A, süperoksit dismutaz ve p-nitrofenil fosforilkolin hidrolaz (fosfolipaz C) enzimlerinin sentezi tip II sekresyon sistemi tarafından düzenlenir (Aragon ve diğ., 2000; Flieger ve diğ., 2001).

2.3.5.1. Proteaz Aktivitesi

Proteinlerin parçalanmasından sorumlu proteaz temel bir enzimdir. İşlevine ve yerine göre serin, treonin, sistein, aspartat ve metalloproteazlar olmak üzere 5 çeşit proteaz tanımlanmıştır (Barrett ve diğ., 2003).

Legionella cinsi bakterilerin sahip olduğu proteazlar bakterinin patojenitesinde önemli bir yere sahiptir. Hücre dışına saldıgı proteazlar sayesinde doku harabiyetine sebep olduğu bilinen *Legionella* bakterilerinin aminopeptidaz ve metalloproteaz aktiviteleri belirlenmiştir (Dowling ve diğ., 1992). Bakterinin sahip olduğu ekstraselular proteaz *P. aeruginosa* alataz enzimi ile benzerlik göstermektedir. Blander ve diğ. (1990), *Legionella* bakterilerinin proteaz aktivitesinin polimorf nüklear nötrofiller üzerindeki virölansının zayıf olduğunu göstermiştir. Bu enzim proteolitik olduğu kadar hemolitik özelliğe de sahiptir. Moffat ve diğ. (1994), proteaz salgılama özelliğini yitiren mutantların kobayı enfekte etme yeteneklerini de kaybettiklerini göstermişlerdir. *Legionella*, konak hücre fagozomu içerisinde proteaz üretebiliyor olsa da bu enzimin patojenitedeki rolü tam olarak belirlenememiştir. Bakterinin sahip olduğu çinko metalloproteazın sitotoksik olduğu ve hemolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan bazı *in vivo* araştırmalar, zayıf bir virölans etkeni olarak tanımladıkları proteaz aktivitesinin polimorf nüklear fagositlerin kemotaksis ve oksidatif etkisinin önlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (Blander ve diğ., 1990; Edelstein ve diğ., 1999).

Muller (1981), *L. pneumophila*'nın sekrete proteaz ve esteraz aktivitesini incelemiş, L-alanine, L-arginin, L-aspartik asit, L-sistin, L-glutaminik asit, glisin, L-histidin, L-isolösin, L-lösin, L-lizin, L-metionin, L-fenilalanin, L-triptofan, L-tirozin ve L-valin üzerinde proteaz aktivitesi gözlemlemiştir.

2.3.5.2. Nükleaz Aktivitesi

Nükleik asitleri kısmen veya tamamen parçalayan nükleazlar gerek sindirim sisteminde, gerekse hücre içinde hata tamiri, gen regülasyonu, viral savunma gibi önemli işlevlerin gerçekleşmesinde rol oynarlar. Nükleazlar, nükleik asit tipine bağlı olarak deoksiribonükleaz (DNaz) ve ribonükleaz (RNaz) olarak isimlendirilirler. Bazı patojenik bakteriler hücre dışına salgıladıkları nükleazlara sahiptir. Örneğin *Staphylococcus aureus* bakterileri tahrip ettikleri dokularda meydana gelen cerahattaki DNA'yı sindirmek için deoksiribonükleaz salgırlar (Engleberg ve diğ., 2006).

Legionella cinsi bakterilerin DNaz ve RNaz enzimlerine sahip olduğu bilinmektedir. Aragon ve diğ. (2000), *pilD* gen bölgesince düzenlenen bu enzimlerin hücre içi patojenitede önemini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında RNaz aktivitesinin intraselüler üremeden sorumlu *pilD* geni ile ilişkili olduğunu, DNaz aktivitesinin ise *pilD* geni tarafından düzenlenmediğini saptamışlardır.

2.3.5.3. Fosfolipaz Aktivitesi

Fosfolipazlar fosfolipitleri parçalayan hidrolazlardır. A, B, C ve D olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Fosfolipaz A ve B açıl zincirini parçalarken Fosfolipaz C (PLC) diaçilgliserolün parçalanmasından ve sinyal transdüksiyonundan sorumludur. Fosfolipaz D (PLD) ise fosfatı alkol ve fosfatidik asite parçalar.

Flieger ve diğ. (2000), *Legionella* cinsi bakterilerin virülanslarında etkili PLA ve PLC aktivitesine sahip olduklarını belirlemiştir. PLC tarafından sindirilen membran fosfoinositid fosfotidilinosito-4,5- bisfosfat (PIP₂) ve PLA aktivitesi ile açığa çıkan arakidonik asit hücre içi sinyal taşınmasını bozarak bakterinin sindirimi önlemektedir. Bu nedenle her iki enzim de bakterinin virülansında önemli yere sahiptir. PLC PIP₂'nin hidrolizini katalizler, açığa çıkan ürünler Ca⁺² iyonlarının sitoplazmadan endoplazmik retikuluma aktarılmasını sağlar. Ca⁺² iyonlarının artışı protein kinaz C'nin

aktivasyonunu sağlar. Bu durum O^- radikallerinin salınımını, nötrofillerin kemotaksisini ve enfeksiyonun bu sayede daha hızlı ilerlemesini sağlar (Dowling ve diğ., 1992).

2.3.5.4. Fosfataz Aktivitesi

Fosfatazlar nükleotid, protein ve alkoloidler gibi birçok molekülden fosfat gruplarının koparılmasını sağlayan hidrolazlardır. Temel olarak pH ihtiyaçlarına göre asit ve alkali fosfatazlar olarak gruplanırlar. Özellikle alkali fosfataz vücutta yıkımdan sorumlu organlar tarafından da salgılanmaktadır (Tamas ve diğ., 2002).

Aragon ve diğ. (2000), *Legionella* cinsi bakterilerin endotoksin özelliğine sahip periplazmik bir alkali fosfataz ile hücre dışına salınan asit fosfataza sahip olduğunu göstermişlerdir. Alkali fosfataz, alkali ortamda birçok bileşiği fosfat grubundan ayıran bir enzimdir. Enzim hücrenin fosfat ihtiyacını karşılamada veya büyük moleküllerin parçalanarak hücre içine alınmasında rol oynar (Kim ve diğ., 1994). Aragon ve diğ. (2000), asit fosfatazın logaritmik fazın ortalarından itibaren sentezlendiğini ortaya koymuşlardır. Alkalın fosfatazın *Legionella* patogenezindeki rolü kesin olarak tespit edilememiştir. *L. pneumophila* dışında *L. micdadeii*'nin de ürettiği asit fosfatazın ise polimorf nükleer lökositlerin süperoksit anyonları üretmelerini bloke ettikleri belirtilmektedir (Winn, 1988).

2.3.5.5. Lipaz Aktivitesi

Lipazlar, doğal ve sentetik çok çeşitli esterlerin kemo- regio- ve/veya stereo-seçimli olarak hidrolizini veya organik sentez reaksiyonlarını katalizleyebilirler. Bununla birlikte, bu tip enzimler diğer küçük ve yüksek molekül ağırlıklı esterleri, tiol esterleri, amidleri, poliol ve poliasitleri substrat olarak kullanırlar (Çadırcı, 2010).

Legionella cinsi bakterilerinin lipaz ekzoenzimi intraselüler enfeksiyonda önemli rol oynar. *pilBCD* lokusu tarafından sentezlenen enzimin granülosit kemotaksisini önlediği, hücre içi sindirimi engellediği ve doku içerisinde yayılmayı kolaylaştırdığı bilinmektedir. Ayrıca enzimin bakterinin konaktan ayrılmasında da etkin bir şekilde rol oynadığı düşünülmektedir (Steinert ve diğ., 2002).

2.3.5.6. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Legionella bakterilerine ait pek çok virülans faktörü hücre periplazmasında ve/veya sitoplazmasında (bu grupta genellikle strese bağlı enzimler yer alır) yer alır. Bunlardan

biri olan bakır-çinko süperoksit dismutaz (SOD) periplazmada yer alır, bakteriyi süperoksit iyonlarından korur, durağan fazda hayatta kalmasını sağlar (John ve Steinman, 1996), ancak makrofajların enfeksiyonunda etkin rol oynamaz. Bununla birlikte sitoplazmada bulunan demir-süperoksit dismutaz enziminin ise bakterinin hayatta kalmasında rol oynadığı saptanmıştır (Sadosky ve diğ., 1994). Ayrıca bakteri hidrojen peroksiti parçalayan iki farklı katalaz-peroksidaz enzimine de sahiptir. Bunlardan biri olan KatA, periplazmada yer alır ve durağan fazda sentezlenir. Diğeri ise enfeksiyon esnasında rol oynayan sitoplazmik KatB enzimidir (Bandyopadhyay ve Steinman, 2000).

2.3.6. *Legionella* Cinsi Bakteriler ile Konak Hücreler Arasındaki İlişki

Lejyoner hastalığı etkeni olan *L. pneumophila* ve diğ. *Legionella* türleri doğada su kaynakları içerisinde yaşayan amip türleri içerisinde ürerken ökaryotlarda alveolar makrofajlar, nötrofiller ve alveolar fagositer epitel hücreleri üzerinde patojendirler (Dowling ve diğ., 1992). *Legionella* enfeksiyonlarını araştırmaya yönelik çalışmalarda konak hücre olarak genelde polimorf nükleer nötrofiller, alveolar makrofajlar ve periferel kan monositik makrofajları kullanılmıştır (Davis ve diğ., 1983; Yamamoto ve diğ., 1988; Gao ve Abu Kwaik, 1999).

Yapılan çalışmalarda *Legionella* bakterilerinin insan patojeni olmasının yanı sıra deneylerde kullanılan farklı hayvan gruplarını da enfekte edebildiği görülmüştür. *Legionella* enfeksiyonunun incelendiği araştırmalarda model organizma olarak genellikle peritoneal makrofajlar veya intratrakeal uygulamaların yapıldığı fare ve kobay tercih edilmektedir (Yamamoto ve diğ., 1988; Husmann ve Johnson, 1992). Bunun yanı sıra rhesus (alyanak) maymunu, ipek maymunu (Fitzgeorge ve diğ., 1983), sıçan ve hamster (Yoshida ve Mizuguchi, 1986) ile yapılan çalışmalar da bulunmaktadır.

Yamamoto ve diğ. (1988) yaptıkları bir çalışmada, A/J, BDF1, DBA/2, C3H/HeN, C57BL/6 ve BALB/c ırkı farelerin peritoneal makrofajları ile *L. pneumophila* bakterisini *in vitro* şartlarda bir araya getirmiş ve bakterinin enfeksiyon kapasitesinin ırka bağlı bir fark gösterip göstermediğini incelemişlerdir. Araştırmacılar BDF1 ırkı fare makrofajlarının bakteriyi kısa sürede öldürdüğünü, A/J ırkı makrofajlarının bakteriyi

çoğaltmada etkili olduğunu, diğer fare ırkları makrofajlarının ise bakteri sayısını daha düşük seviyede de olsa arttırdığını tespit etmişlerdir.

Doğal su kaynaklarında bakterinin birçok konağı bulunmaktadır (Tablo 2.2). İlk kez 1980 yılında Rowbotham tarafından *Legionella* bakterilerinin *Acanthamoeba* ve *Naegleria* cinsi amipler içerisinde çoğalabildiği laboratuvar ortamında kanıtlanmıştır.

Tablo 2.2: Doğal su kaynaklarında bulunan *L. pneumophila* konakları (Lau ve Ashbolt, 2009).

<i>Acanthamoeba castellanii</i> *	<i>Hartmannella vermiformis</i> *
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> *	<i>Naegleria fowleri</i> *
<i>Acanthamoeba hatchetti</i> *	<i>Naegleria gruberi</i> *
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> *	<i>Naegleria jadini</i> *
<i>Acanthamoeba palestinensis</i> *	<i>Naegleria lovaniensis</i> *
<i>Acanthamoeba royceba</i> *	<i>Paratetramitus jugosis</i> *
<i>Amoeba proteus</i> strain x D*	<i>Vahlkampfia</i> spp.*
<i>Comandonia operculata</i> *	<i>Vahlkampfia jugosa</i> *
<i>Echinamoeba exudans</i> *	<i>Vahlkampfia ustiana</i> *
<i>Filamoeba nolandi</i> *	<i>Tetrahymena pyriformis</i> ⁺
<i>Hartmannella</i> spp.*	<i>Tetrahymena thermophila</i> ⁺
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i> *	<i>Dictyostelium discoideum</i> ⁻

*: Amip türleri

⁺: Siliatlar

⁻: slime küfleri

Legionella cinsi bakterilerin patojenitesi üzerine yapılan çalışmalar, bakterinin amip hücreleri ve makrofajları benzer mekanizmalarla enfekte ettiklerini göstermişlerdir. İki konak hücre arasındaki tek fark bakterinin hücre içine alınmasında rol oynayan reseptörleridir. Swanson ve Isberg (1995), bakterinin *H. vermiformis* yüzeyindeki Gal/GalNAc (galaktoz/N-asetilgalaktozamin) lektin reseptörüne bağlanması sonucu konak hücrenin proteinlerinde (özellikle bakterinin yapışmasında rol oynayan ve amip hücre iskeletini oluşturan proteinlerde) tirozin defosforilasyonunun gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Bu olay amip hücresinin bakteriye bağlanarak fagosite etmesini hızlandırır. Amip hücresinde reseptöre bağlı ensoditozda rol oynayan mikrofilament hücre iskeleti metilamine duyarlıdır (King ve diğ., 1991).

Abu Kwaik ve diğ. (1998a), *L. pneumophila*'nın *H. vermiformis* hücresi içine alınımı takip eden ilk bir saat içerisinde fagozomun etrafının mitokondrilerle çevrelendiğini, hücre içine girişi takip eden 4 saat içerisinde ise fagozomun etrafında granüllü endoplazmik retikulumların yerleştiğini, bu noktada bakterinin çoğalmasının başladığını saptamışlardır. Abu Kwaik ve diğ. (1998b), *L. micdadeii*'nin *H. vermiformis* içerisinde

çoğalması esnasında fagozomun çevresinin granüllü endoplazmik retikulumlarca sarılmadığını tespit etmişlerdir.

Legionella bakterileri ile amip türleri arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik çalışmalar konak-bakteri ilişkisinin bu bakteri için ne denli önemli olduğunu ortaya koymuştur (Cirillo ve diğ., 1994; Bouyer ve diğ., 2007). Bouyer ve diğ. (2007), *A. castellanii* içeren ortamda tutulan bakterinin 6 ay sonra bile kültüre edilebildiğini, konak olmaksızın biyofilm içerisinde tutunan bakterinin ise birkaç hafta içerisinde inaktive olduğunu ve bu inaktif bakterinin sadece amip kültürü ile canlandırılabilirdiğini kanıtlamışlardır.

Bakterinin amip içerisinde üremesi bazı durumlarda yüzey antijenlerinde de değişikliğe neden olabilmektedir. Barker ve diğ. (1993) yaptıkları bir çalışmada, *A. polyphaga* içerisinde üremiş bakterinin yeni bir amip kültürüne eklendiğinde enfektivitesinin daha yüksek olduğunu ve amip lizati ile besiyerinde üretilmiş bakteriyi karıştırıp deneyi tekrarladıklarında aynı sonucu almadıklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu etkiyi amibin yüzeyinde bulunan ve bakteriyi kaplayan 15 kDa'luk bir dış membran proteini ve doymamış düz zincirli yağ asidine bağlamaktadır. Bu durumun bakterinin yeni bir amip konağı bulmasını ve biyosit etkisine karşı daha da dirençli olmasını sağladığı düşünülmektedir (Lau ve Ashbolt, 2009). Genellikle amip içerisinde üreyen *Legionella* türlerinin insan patojeni oldukları bilinse de *A. polyphaga*'dan izole edilen *L. drancourtii* (La Scola ve diğ., 2004) ve *Amoeba proteus* strain xD'den izole edilen *L. jeonii*'nin (Park ve diğ., 2004) insanlarda patojen olmadıkları belirlenmiştir.

2.3.6.1. *Legionella* Cinsi Bakteriler ve Bağışıklık Sistemi

Legionella cinsi bakteriler solunum yolu ile akciğerlere ulaştıktan kısa süre sonra buradaki fagositer hücreler içerisinde çoğalır ve bu esnada sekresyon ürünleri ile dokuda harabiyete sebep olurlar (Dowling ve diğ., 1992). Yapılan *in vitro* çalışmalar *L. pneumophila*'nın fagositozu için C₃ komplemanı ile antikorun bağlanmasının şart olduğunu göstermiştir. *L. micdadei* içinse bu durum gerekli değildir. Araştırmalar *Legionella* bakterilerinin sahip olduğu LPS, ısı şok proteini, dış membran proteini, flagella ve fimbria yapılarının antijenik olduğu ve bunlara karşı konakta doğal bağışıklık cevabının geliştiğini ortaya koymuştur (Horwitz ve Silverstein, 1981; Steffenson ve diğ., 1985; Bellinger-Kawahara ve Horwitz, 1990).

Bakterinin konağı enfekte edip çoğalmaya başlaması 2-3 gün içerisinde gerçekleşir. Bakterinin sayısal olarak alveolar bölgede çoğaldığı bu evrede temel olarak makrofajlar, B lenfositleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler rol oynar. Bu hücreler doğal immünite sisteminde yer alan ve antijen tarafından uyarılan cevabı oluştururlar. Antimikrobiyal IFN γ , TNF α , IL-6 ve IL-1 sitokinleri tarafından uyarılan makrofajların aktivitesi ile doğal immünite artar. Doğal immünitede bu sitokinler genellikle dolaşım sistemindeki bağışıklık hücrelerini uyarak hastalığın kontrol altına alınmasını sağlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar IFN γ 'nın *Legionella*'nın makrofaj içindeki çoğalmasını düzenlediğini ortaya koymuştur (Arata ve diğ., 1993; Brieland ve diğ., 1994; Salins ve diğ., 2001; Shinozawa ve diğ., 2002).

TNF α , normal süreçte iltihap hücrelerinin düzenlenmesinden sorumludur. TNF α , NK ve mast hücreleri, IFN γ tarafından uyarılan mononükleer fagositler veya bakteriyel LPS tarafından uyarılan T_H1 hücreleri tarafından sentezlenir. Endotelial hücreler ve makrofajlardan IL-1 salınımını teşvik ederler. Bakterisidal aktiviteyi ve enfeksiyona karşı direnci arttıran TNF α , *Legionella* enfeksiyonu esnasında dolaşım sistemindeki lenfositler tarafından bakteriyel antijenlere karşı üretilir. Böylece *Legionella* bakterilerinin hem IFN γ hem de TNF α monositik hücreler tarafından öldürülmesi sağlanır. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar TNF α uygulanan bireylerde *L. pneumophila* enfeksiyonunun muhtemelen nötrofil aktivasyonu sayesinde oldukça zayıfladığını ortaya koymuştur (Matsiota-Bernard ve diğ., 1993; Salins ve diğ., 2001).

Bakteri vücuda girdikten bir süre sonra antikor üretimi ve adaptif immünite gelişimi de sağlanır. Araştırmalar antikorların *Legionella* enfeksiyonunu önlemede tam olarak nasıl bir rol oynadığını ortaya koyamasa da bağışıklık kazanmış kişilerde makrofaj yanıtının ve enfeksiyon kontrolünün daha hızlı geliştiğini göstermiştir (Horwitz ve Silverstein, 1981; Nash ve diğ., 1984; McHugh ve diğ., 2000). Çalışmalar adaptif immünite geliştiren kişilerin bu bakteri ile ikinci kez karşılaştıklarında antijene özgül lenfositlerin kanda hızla çoğaldığını ve çok kısa sürede T_H1 ve T_H2 tarafından salınan sitokinlerin *Legionella* üremesini baskıladığını göstermiştir (Salins ve diğ., 2001).

Legionella bakterilerinin patojenitesi amip içerisinde üremeye bağlı olarak artabilmektedir. Tam olarak sebepleri açıklanamasa da amip içerisinde üremenin

bakterinin patojenitesi ile ilgili genlerin ekspresyonunu teşvik ettiği düşünülmektedir (Lau ve Ashbolt, 2009). Bununla birlikte bakterinin konak hücre içindeki üreme mekanizmasının konağa bağlı olarak farklılık gösterdiği de bilinmektedir. Fagositer hücreler solunum yolu ile alınan patojene ilk olarak reaktif oksijen türleri (ROS) veya reaktif nitrojen türleri (RNO) salarak müdahale ederler. *A. castellanii*, nötrofil ve makrofajlardaki gibi süperoksit radikalleri salarken polimorf nüklear lenfositler *A. polyphaga* içinde kültüre edilen *L. pneumophila*'yla karşılaştığında daha hızlı cevap verirler (Gao ve Abu Kwaik, 1999).

Bakterinin coiling fagositoz ile hücre içine alınması esnasında p (+)-mannoz ile inhibe olabilen bir reseptör rol oynamaktadır. Memeli fagositlerinde reseptöre rastlansa da farklı amip ve *Legionella* türleri arasında bu reseptör her zaman şart değildir. Örneğin p-mannozun belirli bir konsantrasyonu *A. castellanii*'nin *L. micdadei*'yi fagositozunu etkilemezken *A. polyphaga*'yı etkilemektedir (Harb ve diğ., 1998).

İntraselüler üreme açısından incelendiğinde ise memeli fagositer hücrelerinde fagozom oluşunu takip eden dakikalar içerisinde vakuolün etrafı mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum ve ribozomlarca çevrelenir. Amip hücresinde ise vakuolün etrafında ribozom görülmez (Gao ve diğ., 1999).

Bakterinin hücreden çıkmak için izlediği yol da farklılık göstermektedir. Makrofajlarda kaspaz 3'e bağlı apoptozu indükleyen bakteri, amip hücrelerinde nekrotik hücre ölümünü teşvik etmektedirler (Gao ve Abu Kwaik, 1999). Polimorf granüllü lenfositlerde ve bazı amip konaklarında hücre lizisini takiben *Legionella* serbest kalır. Bazı durumlarda ise amip içerisinde bakterilerin bulunduğu replikatif vakuolü pinositozla hücre dışına salar. Bu durum amip hücresinin yaşamına devam etmesini sağladığı gibi *Legionella*'nın da çevresel faktörlerden korunmaya devam etmesine olanak verir (Lau ve Ashbolt, 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMADA KULLANILAN MİKROORGANİZMALAR

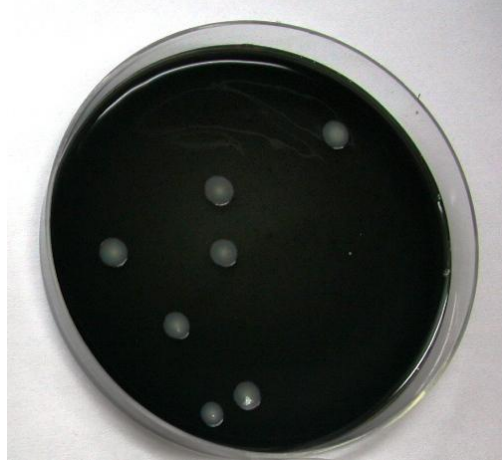
3.1.1. Araştırmada Kullanılan Bakteriler

Çalışmamızda *L. pneumophila* türüne ait Philadelphia 1 (ATCC 33152; American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterisi ile İstanbul ilindeki farklı su kaynaklarından izole edilen dokuz farklı *L. pneumophila* serogrup 1 (SG1) izolatu kullanılmıştır. BCYE Agar besiyerine azaltma metodu ile ekilen bakteriler 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ ve % 95 su buharı içeren ortamda 3-4 gün bekletilmiştir (Feeley ve diğ., 1979). Bu süre sonunda tek düşen tipik *L. pneumophila* kolonilerinden (Şekil 3.1) hazırlanan preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyanmıştır. Işık mikroskobu incelemesinde Gram negatif filamentöz çomak görünümlü koloniler Triptik Soya Agar (TSA) besiyerine ekilmiş ve 37 °C sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda üremenin olmaması durumunda BCYE Agar üzerindeki şüpheli koloniler serolojik açıdan *Legionella* Lateks Kiti (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) ile değerlendirilmiştir. *L. pneumophila* SG1 olarak doğrulanan suşlar deneylerde kullanılmak üzere % 37 gliserin içeren steril çeşme suyu içerisinde -86 °C'de saklanmıştır (Lim ve diğ., 2011). Araştırma süresince bu stok solüsyon içerisinde alınan bakteriler BCYE Agar besiyeri üzerine ekilerek 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 3-4 gün bekletilmiştir. Bu sayede pasaj sayısı en az seviyede tutularak mutasyonlardan kaçınılmaya çalışılmıştır.

3.1.2. Araştırmada Kullanılan *Acanthamoeba castellanii* Amip Türü

Amerikan kültür koleksiyonlarından temin edilen *A. castellanii* ATCC 30234 amibi, 75 cm³'lük doku kültürü kaplarındaki PMG 712 (Tamponlu Peptonlu Maya Özütü Glukoz Buyyon) besiyeri içerisine ekilerek 30 °C'de trofozoit forma dönüşmesi için 14-21 gün beklenmiştir. Ekspansiyel üreme evresindeki amipler John ve John'a (2006) göre -86 °C'de saklanmıştır. Bu stok kültürlerden 75 cm³'lük doku kültürü kaplarındaki PMG

712 besiyeri içerisine pasaj alınan amiplerin 30 °C’de trofozoit forma dönüşmesi sağlanmış, % 1 tripan mavisini ile canlı sayımı yapılarak Bölüm 3.6.4’te belirtilen deneylerde kullanılmıştır.



Şekil 3.1: BCYE Agar besiyerinde üremiş taze *L. pneumophila* kültürü

3.2. *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN STATİK KOŞULLAR ALTINDA TUTUNMA VE BİYOFİLM İÇİNDE ÜREME YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ

L. pneumophila SG1 bakterilerinin sabit koşullar altında yapay ortamlarda tutunma ve çoğalma yetenekleri Hindre ve diğ. (2008)’ne göre incelenmiştir. 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren ortamda 3-4 gün BCYE Agar üzerinde üretilen bakteriler steril çeşme suyu içerisinde 600 nm dalga boyunda 0.30 absorbans verecek şekilde sulandırılmıştır.

3.2.1. Tutunma Kapasitesinin İncelenmesi

Bakterilerin tutunma kapasitelerinin belirlenmesi için 96 kuyucuklu düz tabanlı steril polistren mikroplyetler kullanılmıştır. 600 nm dalga boyunda yaklaşık 0.3 absorbans veren bakteri süspansiyonlarından kuyucuklara 200’er µl dağıtıldıktan sonra mikroplyetler 30, 60, 180, 360 ve 1440 dakika 37°C’de ve % 5 CO₂’li ortamda bekletilmiştir. Her bir bekleme süresi için ayrı kuyucuklar kullanılmıştır. Belirtilen süreler sonunda kuyucuklar üç kez steril çeşme suyu ile yıkanarak tutunmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Boyama ve dekolorizasyon aşamalarında tutunan hücrelerin kaybını önlemek için deney kuyucukları metanol ile doldurularak 5 dk beklenmiştir. Tespit işlemini takiben metil alkol uzaklaştırılmış ve kuyucuklar bir kez steril çeşme suyu ile

yıkanmıştır. Tutunan hücreler % 0.1 kristal viyole (KV) ile 15 dk boyanmıştır. Fazla boyanın uzaklaştırılması için kuyucuklar steril çeşme suyu ile üç kez yıkanmıştır. Bu aşamada hücrelerin içindeki boyanın geri kazanılması amacı ile ortama etanol:aseton (80:20) karışımı eklenerek 15 dk beklenmiştir. Kuyucuklardaki üst sıvılar toplanarak 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak kuyucuklara bakteri süspansiyonu içermeyen 200 µl steril çeşme suyu konarak deney prosedürü uygulanmıştır (Hindre ve diğ., 2008).

Bakterilerin tutunma kapasitesi Stepanovic ve diğ. (2000) tarafından tanımlanan ve aşağıda belirtilen kriterler göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir.

$$\begin{aligned} OD &\leq OD_c \dots\dots\dots \text{non-aderent} \\ OD_c &< OD \leq 2 \times OD_c \dots\dots\dots \text{zayıf tutunma kapasitesi} \\ 2 \times OD_c &< OD \leq 4 \times OD_c \dots\dots\dots \text{orta dereceli tutunma kapasitesi} \\ 4 \times OD_c &< OD \dots\dots\dots \text{yüksek tutunma kapasitesi} \end{aligned}$$

Formüllerde belirtilen OD_c değeri, negatif kontrollerin 595 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları ile standart hata değerlerinin toplanması sonucu elde edilen değeri, OD ise bakteri içeren kuyucuklardan kazanılan boyanın absorbans değerlerini göstermektedir.

3.2.2. Biyofilm İçerisinde Üreme Kapasitesinin İncelenmesi

Bu deney için 24 kuyucuklu düz tabanlı steril polistren mikropleytlerde tek tip bakteri ile biyofilm oluşturulmuştur. Mikropleytlerdeki kuyucuklara steril çeşme suyu içerisinde 600 nm dalga boyunda yaklaşık 0.30 absorbans verecek şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 1 ml dağıtılmıştır. 37 °C ve % 5 CO₂'li ortamda 6 saat beklenmiş ve süre sonunda üst sıvılar atılarak kuyucuklar üç kez steril çeşme suyu ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin bitimi deneyin 0. saati olarak değerlendirilmiştir. Tüm kuyucuklara 1 ml steril Buffered Yeast Extract Broth (BYEB) besiyeri eklenmiş ve mikropleytler 37 °C ve % 5 CO₂'li ortamda 24, 48, 72, 96, 168 ve 336 saat bekletilmiştir. Belirtilen süreler sonunda, deney kuyucukları üç kez yıkanmış ve yukarıda anlatıldığı şekilde KV boyama yöntemi uygulanarak biyofilm tabakasındaki bakteriyel yoğunluk spektrofotometrik olarak (595 nm) ölçülmüştür. Deney süresinin

uzunluğu nedeni ile 336. saat için ayrılan kuyucuklardaki üst sıvılar 168. saatte atılarak yerlerine taze besiyeri eklenmiştir. Negatif kontrol olarak kuyucuklara bakteri süspansiyonu içermeyen 1 ml steril çeşme suyu konarak deney prosedürü uygulanmıştır (De Buck ve diğ., 2005; Hindre ve diğ., 2008).

3.3. L. PNEUMOPHILA BAKTERİLERİNİN HAREKETLERİNİN VE FLAGELLA YAPILARININ IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ

Bakterilerin hareketlerini incelemek amacıyla BCYE Agar besiyeri üzerinde 37 °C sıcaklıkta ve % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 3-4 gün bekletilerek elde edilen taze kültürler kullanılmıştır. Taze kültürden alınan bir öze dolusu örnek temiz lam üzerindeki 100 µl steril çeşme suyu içerisinde süspanse edilmiştir. Üzerine temiz bir lamel kapatılan preparat bekletilmeden ışık mikroskopunda 100x büyütmede incelenmiştir (Dietrich ve diğ., 2001).

Flagella yapılarının gözlenebilmesi için Leifson flagella boyama metodu uygulanmıştır (Clark, 1976). Kromik asit solüsyonu ile temizlenen lamlar kurutulduktan sonra mavi Bunsen alevi ile steril edilmiş ve soğumaya bırakılmıştır. Lamın üzerine konan 1 öze dolusu steril distile su içerisine öze yardımı ile alınan taze bakteri kültürü dikkatlice bırakılmıştır. Havada kurumaya bırakılan preparat taze hazırlanmış Leifson flagella boyası ile 12 dk boyanmıştır. Çeşme suyu ile durulanan örnekler 30 sn metilen mavisi ile zıt boyama işlemine tabi tutulmuş, zıt boya akıtılıp çeşme suyu ile yıkandıktan sonra lamlar kurumaya bırakılmıştır. Tüm preparatlar 100x büyütmede incelenmiştir.

3.4. L. PNEUMOPHILA BAKTERİLERİNİN HEMAGLUTİNASYON YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ

L. pneumophila bakterilerinin tip IV fimbriyaya sahip olduğunu doğrulamak amacıyla hemaglutinasyon özellikleri, Davis ve diğ. (1982) tarafından belirtildiği şekilde incelenmiştir. BCYE Agar besiyeri üzerinde üretilen taze bakteri kültürleri PBS içerisinde spektrofotometrik olarak 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. 100 µl bakteri süspansiyonu 100 µl % 3'lük insan eritrositi süspansiyonu (PBS içerisinde) ile steril bir lam üzerinde bir araya getirilmiştir. Hazırlanan lamlar 10 dk boyunca dairesel

hareketlerle dikkatli bir şekilde sallanmış ve oluşan hemaglutinasyon incelenmiştir. 2 dk içerisinde oluşan hemaglutinasyon (++++), 10 dk içerisinde oluşan hemaglutinasyon (+++), 10 dk içerisinde oluşan zayıf hemaglutinasyon (++) ve 10 dk sonunda x4 büyütmede tespit edilebilen hemaglutinasyon ise (+) olarak değerlendirilmiştir.

Bakterilerin D-mannoza dirençli hemaglutinasyon özellikleri olup olmadığını belirlemek için % 2 mannoz içeren PBS içerisinde % 3'lük eritrosit süspansiyonu hazırlanmıştır. 100 µl bakteri süspansiyonu ile 100 µl % 3'lük insan eritrositi süspansiyonu 10 dk boyunca dairesel hareketlerle dikkatli bir şekilde sallanmış ve oluşan hemaglutinasyon incelenmiştir. Bir süşun hem mannoz içeren hem de içermeyen ortamda oluşturduğu hemaglutinasyon “mannoza dirençli hemaglutinasyon (MR-HA)” olarak değerlendirilmiştir (Kimiran, 1993). Deneyler esnasında negatif kontrol olarak 100 µl PBS ile 100 µl % 3'lük insan eritrositi süspansiyonu bir araya getirilmiştir.

3.5. *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN ENZİMATİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Bakterilerin enzimatik aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla hemoliz, proteaz, nükleaz, fosfolipaz A, fosfolipaz C, fosfataz ve lipaz aktiviteleri incelenmiştir. Belirtilen deneylerden hemoliz ve proteaz aktiviteleri için taze bakteri kültürleri, nükleaz aktivitesi için sıvı besiyerinde üretilmiş bakteri kültürüne ait süpernatantlar ve fosfolipaz A, fosfolipaz C, fosfataz ve lipaz aktiviteleri için hem süpernatantlar hem de aynı sıvı kültürden elde edilen hücre lizatları kullanılmıştır.

3.5.1. Hücre Lizatları ve Süpernatantların Hazırlanması

Enzimatik aktivitenin tayini için incelenen *L. pneumophila* SG1 bakterilerinin süpernatantları ve hücre lizatları hazırlanmıştır. Bu amaçla BCYE Agar besiyeri üzerinde 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 3-4 gün içerisinde üremiş olan taze bakteri kültürü 20 ml BYEB içerisinde 600 nm dalga boyunda yaklaşık 0.1 absorbans verecek şekilde sulandırılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda bir gece tutulmuştur. Süre sonunda sıvı kültürler 4°C'de 12000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar 0.22 µm por çaplı enjektör ucuna takılabilen filtreler ile steril edilerek -20 °C'de saklanmıştır. Santrifüj

işlemi ile elde edilen hücreler ise 1:1 oranında liziz tamponu ile karıştırıldıktan sonra 30 gauge iğne takılmış steril enjektör ile en az 10 defa pipetaj yapılarak parçalanmıştır. Tüm enzimatik aktivite deneylerinde kullanılmak üzere süpernatant negatif kontrolü olarak bakteri ekilmemiş BYEB süspansiyonu, hücre lizatlarının negatif kontrolü olarak ise steril BYEB ile 1:1 oranında sulandırılmış liziz tamponu hazırlanmıştır. Elde edilen hücre lizatları, süpernatantlar ve negatif kontrolleri -20°C’de saklanmıştır (Aragon ve diğ., 2000). Negatif kontroller hücre lizatlarının ve süpernatantlarının hazırlanması ile aynı zamanda elde edilmiştir. Deney esnasında tekrar hazırlanmamış, böylece spektrofotometrik ölçümlerde kör olarak kullanılmıştır.

3.5.2. Hemoliz Aktivitesinin İncelenmesi

BCYE Agar besiyeri üzerinde 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 3-4 gün bekletilerek üretilen taze bakteri kültüründen öze yardımı ile toplanan bir koloni, batırma yöntemi ile insan veya koyun eritrositi içeren BYE Agar (eBYEA) üzerine ekilmiştir. 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 3 gün bekletilen Petri kutuları hemoliz açısından incelenmiştir. eBYEA üzerinde gelişen yarı şeffaf yeşilimsi zonlar α hemoliz, şeffaf ve renksiz zonlar ise β hemoliz olarak değerlendirilmiştir (Keen ve Hoffman, 1989).

Alfa ve beta hemoliz özelliklerinin yanı sıra *L. pneumophila* bakterilerinin hemolitik aktiviteleri hemolitik indeksleri hesaplanarak da değerlendirilmiştir. Bu amaçla eBYEA besiyeri üzerinde üreyen bakterilerin oluşturduğu α ve β hemoliz zonlarının çapları koloni çaplarına bölünmüş ve hemolitik indeks değeri 1 ve üzeri olan bakterilerin hemolitik oldukları kabul edilmiştir (Ekşi ve diğ., 2008).

3.5.3. Proteaz Aktivitesinin İncelenmesi

Proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla API ZYM test sistemi (bioMerieux, Basingstoke, Hants) kullanılmıştır. API ZYM stribi, içinde enzimatik substrat ve tampon içermek üzere tasarlanmış 20 adet küpüllerden oluşmuştur. Test sisteminde bakterilerin proteaz aktivitesini belirlemek amacıyla lösin, valin, sistin aminopeptidaz, tripsin ve α -kimotripsin enzimleri incelenmektedir. Bu stripler içerisinde proteaz aktivitesinin yanı sıra esteraz, asteraz-lipaz, lipaz, alkali ve asit fosfataz, naftol-AS-BI-

fosfohidrolaz, galaktozidaz, glikoronidaz, glukozaminidaz, mannozidaz ve fukosidaz aktiviteleri de incelenmektedir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: API ZYM enzimatik test stribi içeriği ve sonuç okuma tablosu

Küpül no	Test edilen enzim	Substratlar	pH	Sonuç	
				Pozitif	Negatif
1	Kontrol			Gözlenen renk numunenin rengidir	
2	Alkali fosfataz	2-naftil fosfat	8,5	Menekşe rengi	
3	Esteraz (C4)	2-naftil butirat	6,5	Menekşe rengi	
4	Esteraz lipaz (C8)	2-naftil kaprilat	7,5	Menekşe rengi	
5	Lipaz (C14)	2-naftil miristat	7,5	Menekşe rengi	
6	Lösin aminopeptidaz *	L-lösil-2-naftilamid	7,5	Turuncu	
7	Valin aminopeptidaz *	L-valil-2-naftilamid	7,5	Turuncu	
8	Sistin aminopeptidaz*	L-sistil-2-naftilamid	7,5	Turuncu	
9	Tripsin*	N-benzol-DL-arginin- L-lösil-2-naftilamid	8,5	Turuncu	Renksiz veya çok açık sarı
10	α -kimotripsin*	N-glutaril-fenilalanin- L-lösil-2-naftilamid	7,5	Turuncu	
11	Asit fosfataz	2-naftil fosfat	5,4	Menekşe rengi	
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	Naftol-AS-BI-fosfat	5,4	Mavi	
13	α -galaktozidaz	2-Br-2-naftil- α D-galaktopiranosid	5,4	Menekşe rengi	
14	β -galaktozidaz	2-naftil- β D-galaktopiranosid	5,4	Menekşe rengi	
15	β -glikoronidaz	Naftol-AS-BI- β D-glikoronid	5,4	Mavi	
16	α -glikozidaz	2-naftil- α D-glikopiranosid	5,4	Menekşe rengi	
17	β -glikozidaz	2-Br-2-naftil- β D- glikopiranosid	5,4	Menekşe rengi	
18	N-asetil- β -glukozaminidaz	1-naftil-N-asetil- β D-glikozaminid	5,4	Kahverengi	
19	α -mannozidaz	6-Br-2-naftil- α D-mannopiranosid	5,4	Menekşe rengi	
20	α -fukosidaz	2-naftil- α L-fucopiranosid	5,4	Menekşe rengi	

*: proteaz enzimleri

3 günlük taze bakteri kültürleri steril çeşme suyu içerisinde türbidimetrik olarak ml'de $1,5 \times 10^9$ hücre olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir bakteri için ayrı bir test stribi kullanılmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonları, üretici firma tarafından belirtilen şekilde küpüllere paylaştırılmıştır. Test stripleri içerisine steril distile su ilave edilen özel kaplarına yerleştirildikten sonra 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 4 saat bekletilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuğa ZYM A ve ZYM B ayıraçlarından birer damla damlatılmış ve 5 dk karanlıkta bekletilmiştir. Dört saatlik inkübasyon sonunda oluşan metabolik son ürünler, reaktifler ile reaksiyona girerek renk oluşumuna sebep olmuştur. 5 dk sonunda küpüller birbirleri ile kıyaslanarak ortaya çıkan renge göre 0-5 arasında bir değer verilmiştir (Nolte ve diğ., 1982). Bahsedilen sayılardan 0

negatif, 1 zayıf pozitif, 2 ile 3 pozitif, 4 ve 5 ise güçlü pozitif reaksiyonu ifade etmektedir.

3.5.4. Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi

Nükleaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla bakterilerden elde edilen süpernatantlar kullanılmıştır. DNaz ve RNaz aktivitesinin belirlenmesi için % 0.15 RNA veya % 0.1 DNA içeren Noble Agar besiyeri plakaları hazırlanmıştır. Hazırlanan plakalara açılan 6 mm çapındaki kuyucuklara 100 µl süpernatant eklenmiştir. Bir gece oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilen plakalar % 0.01 etidyum bromür çözeltisi ile 15 dk boyandıktan sonra jel görüntüleme sistemi (Gellogic 1500 Imaging System, Kodak, Rochester, NY, USA) ile incelenmiştir. Etidyum bromür nükleik asite bağlanır ve UV ışık altında floresan etki gösterir. Bu nedenle UV ışık altında çukurların çevresinde floresan vermeyen şeffaf zonlar pozitif sonuç olarak kaydedilip zon çapları ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak RNaz ONE (Promega) ve RQ1 DNaz (Promega) enzimleri kullanılmıştır (Aragon ve diğ., 2000).

3.5.5. Fosfolipaz A Aktivitesinin İncelenmesi

Fosfolipaz A aktivitesinin belirlenmesi amacıyla hücre lizatları ve süpernatantların dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC)'den serbest yağ asidi oluşturma yetenekleri incelenmiştir. 0.1 ml örnek, içerisinde 3 mM sodyum azid, % 0.5 Triton X-100 ve 5 mg/ml DPPC (Sigma) içeren 1 ml 20 mM Tris-HCl çözeltisi ile bir araya getirilmiş ve 37 °C'de 15 saat bekletilmiştir. Süre sonunda NEFA HR2 Kit (Wako Diagnostics, Richmond, VA) kullanılarak (Bölüm 3.5.9) açığa çıkan serbest yağ asit miktarı spektrofotometrik olarak (550 nm) ölçülmüş, elde edilen değerler standart oleik asit eğrisi (Bölüm 3.5.10) göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Streptomyces violaceoruber*'den elde edilmiş fosfolipaz A₂ (Sigma) enzimi kullanılmıştır (Flieger ve diğ., 2001).

3.5.6. Fosfolipaz C Aktivitesinin İncelenmesi

P-nitrofenilfosforilkolin (pNPPC)'den p-nitrofenol (pNP) açığa çıkaran fosfolipaz C'nin belirlenmesi amacıyla 0.1 ml örnek, içerisinde 5 mM CaCl₂, 5 mM MnCl₂, 3 mM sodyum azid, % 0.5 Triton X-100 ve 2.5 mM pNPPC bulunan 1 ml 50 mM HEPES (pH 7.5) tamponu ile bir araya getirilmiştir. 37 °C'de bir gece bekletilen örneklerde oluşan

pNP miktarı 410 nm’de ölçülmüştür. Elde edilen absorbands değerleri hazırlanan standart pNP eğrisi (Bölüm 3.5.11) yardımı ile değerlendirilmiş, dakikada 1 nM pNP açığa çıkartan enzim miktarı 1 ünite olarak kabul edilmiş ve hesaplamalar bu veri göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Bacillus cereus* tip 4 fosfolipaz C (Sigma) enzimi kullanılmıştır (Flieger ve diğ., 2000).

3.5.7. Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi

Çalışmamızda *L. pneumophila* bakterilerinin p-nitrofenilfosfatı parçalayarak pNP salınmasını sağlayan asit ve alkali fosfataz enzimleri incelenmiştir. Asit fosfataz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla içerisinde 7.6 mM p-nitrofenilfosfat bulunan 50 mM sitrik asit süspansiyonu, 1 M HCl ile pH 5’e, alkali fosfataz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla ise 1 M NaOH ile pH 10’a ayarlanmıştır. Her iki pH değerinde hazırlanan 0.1 ml substrat çözeltileri ile 10 µl örnek birleştirilerek 37 °C’de 5 saat tutulmuş ve her saat başı açığa çıkan pNP miktarı 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar hazırlanan standart pNP eğrisi (Bölüm 3.5.11) ile değerlendirilmiştir. Dakikada 1 nM pNP açığa çıkartan enzim miktarı 1 ünite olarak kabul edilmiş ve hesaplamalar bu veri göz önünde bulundurularak yapılmıştır (Aragon ve diğ., 2000). Pozitif kontrol olarak deneylerde *Escherichia coli* tip III-L alkali fosfataz ve patates tip IV-S asit fosfataz enzimleri kullanılmıştır.

3.5.8. Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi

Lipaz aktivitesinin belirlenmesi için üç farklı yöntem kullanılmıştır (Aragon ve diğ., 2000).

3.5.8.1. P-nitrofenil Kaprilat ve P-nitrofenil Palmitat Bileşikleri Üzerine

Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi

L. pneumophila bakterilerinin lipaz aktivitesini belirlemek amacıyla ilk olarak p-nitrofenil esterlerin parçalanma özelliği incelenerek bakterilerin lipaz aktivitesi mi yoksa basit esteraz aktivitesi mi gösterdikleri tespit edilmiştir. Bakteriye lipazların gücü parçaladıkları ester bileşiklerinin uzunluğu ile ilişkili olduğundan p-nitrofenole C₈ konumunda bağlı p-nitrofenil kaprilat ve p-nitrofenole C₁₄ konumunda bağlı p-nitrofenil palmitat substratları kullanılmıştır. Bu nedenle *L. pneumophila* bakterilerinin hücre lizatları ile süpernatantlarının bu bileşikler parçalama özellikleri değerlendirilmiştir. Bu deney için % 0.2 Triton X-100 içeren 100 mM Tris (pH 8) içerisine 1 mM p-nitrofenil

kaprilat ve p-nitrofenil palmitat substratlarından biri eklenmiştir. Substrat içeren 1 ml tampon, 0.1 ml örnek ile bir araya getirilmiş ve 5., 10. ve 15. dakikalarda açığa çıkan pNP miktarı 410 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar hazırlanan standart pNP eğrisi (Bölüm 3.5.11) ile değerlendirilmiştir. Dakikada 1 nM pNP açığa çıkartan enzim miktarı 1 ünite olarak kabul edilmiş ve hesaplamalar bu veri göz önünde bulundurularak yapılmıştır (El Khattabii ve diğ., 1999).

3.5.8.2. 1,2-dilauril-racglisero-3-glutarik Asit Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi

Lipaz aktivitesini tespit etmek amacıyla kullanılan ikinci yöntemde 1,2-dilauril-racglisero-3-glutarik asit resorufin esterden kırmızı renkli bir bileşik olan resorufin açığa çıkaran resorufin esteraz aktivitesi incelenmiştir. Bu amaçla 50 µl örnek, 0.1 ml 1 mg/ml ester solüsyonu içeren 0.85 ml 100 mM KH₂PO₄ (pH 6.8) çözeltisi ile biraraya getirilmiş, 5 ve 10 dk oda sıcaklığında tutulduktan sonra resorufin esteraz aktivitesi 572 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Jaeger ve diğ., 1999).

3.5.8.3. 1-monopalmitolgliserol ve 1,2-dipalmitolgliserol Bileşikleri Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi

Lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan üçüncü yöntemde bakterinin sahip olduğu lipaz türünün (1 veya 2 açilli gliserol lipaz) belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 0.1 ml örnek, içerisinde 3 mM sodyum azid, 0.5% Triton X-100, 2 mg 1-monopalmitolgliserol (1-MG) veya 1.6 mg 1,2-dipalmitolgliserol (1,2-DG) bulunan 1 ml 20 mM Tris-HCl ile bir araya getirilmiş ve 37 °C'de 15 saat tutulduktan sonra oluşan serbest yağ asidi miktarı NEFA HR2 test kiti kullanılarak (Bölüm 3.5.9) spektrofotometrik olarak (550 nm) ölçülmüştür. Elde edilen değerler standart oleik asit eğrisi (Bölüm 3.5.10) göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir (Hoffmann ve diğ., 1986).

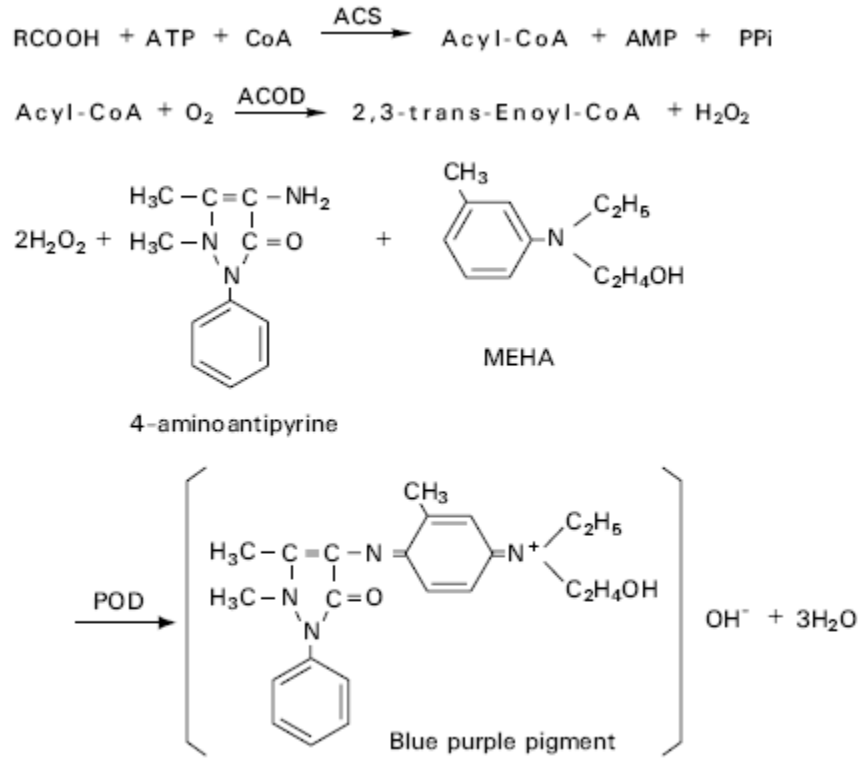
Her üç deney grubunda da pozitif kontrol olarak *Rhizopus arrhizus* (kontrol 1) ve *Pseudomonas* sp. (kontrol 2) lipaz enzimleri kullanılmıştır (Aragon ve diğ., 2000).

3.5.9. NEFA HR2 Serbest Yağ Asidi Belirleme Kitinin Kullanımı

NEFA HR2 kiti, esterlenmemiş yağ asitlerinin (Nonesterified fatty acids; NEFA) konsantrasyonunu spektrofotometrik olarak belirlemek için kullanılır. Kitin çalışma prensibi koenzim A (CoA)'nın açıl-CoA sentataz (ACS) enzimi varlığında serbest yağ

asitlerince açılmasına dayanır. ATP varlığında gerçekleşen bu reaksiyonun ürünü olan açıl-CoA, ortama açıl-CoA oksidaz (ACOD) eklendiğinde bir ünite hidrojen peroksit açığa çıkarak oksitlenir. Oluşan hidrojen peroksit, ortama katılan 4-aminoantipirin ve 3-metil-N-etil-N(β-hidroksietil)-anilin (MEHA) ile peroksidaz (POD) enzimi vasıtasıyla reaksiyona girer ve mavi mor bir renk oluşturur (Şekil 3.2). Oluşan ürün 550 nm dalga boyunda ölçülmektedir.

Kit içerisinde iki farklı ayıraç ve bunlara ait çözücüler yer almaktadır. Ayıraç A, ACS, CoA, ATP içermektedir. Çözücüsü % 0.05 sodyum azid içeren 50 mM fosfat tamponudur. Ayıraç B ise ACOD ve POD içerir ve 2.4 mM MEHA çözeltisi ile çözülür (Şekil 3.2). Eşit hacimde çözücüsü ile karıştırılan ayıraçlar bekletilmeden kullanılmıştır.

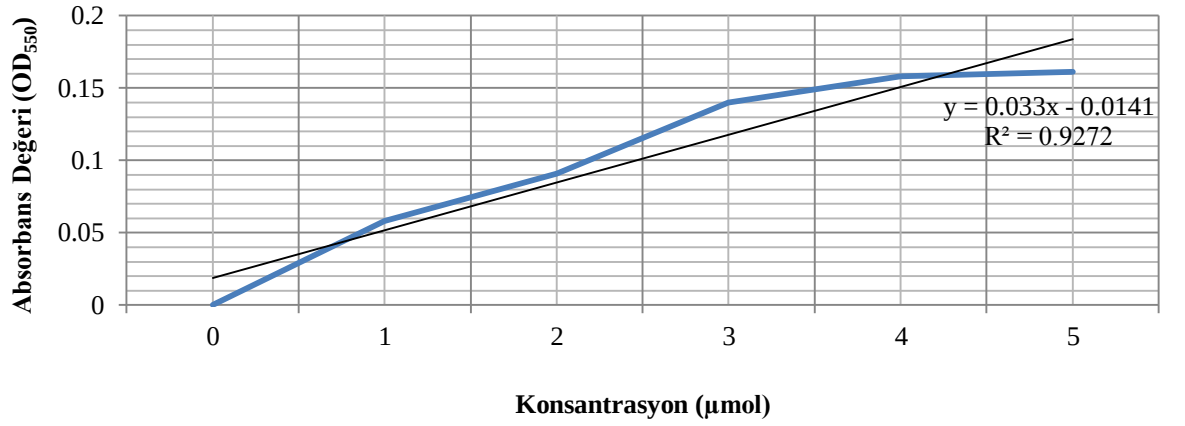


Şekil 3.2: NEFA kiti ile serbest yağ asitlerinin açılmesi

Reaksiyonlar 24 kuyucuklu düz tabanlı mikropleytlerde incelenmiştir. 950 µl ayıraç A ile karıştırılan 50 µl örnek 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve 1950 µl ayıraç B eklenmiştir. Karışım 30 dk oda sıcaklığında tutulduktan sonra 550 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Bunun yanı sıra standart oleik asit çözeltisi distile su ile sulandırılıp pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Johnson ve Peters, 1993).

3.5.10. Standart Oleik Asit Eğrisinin Hazırlanması

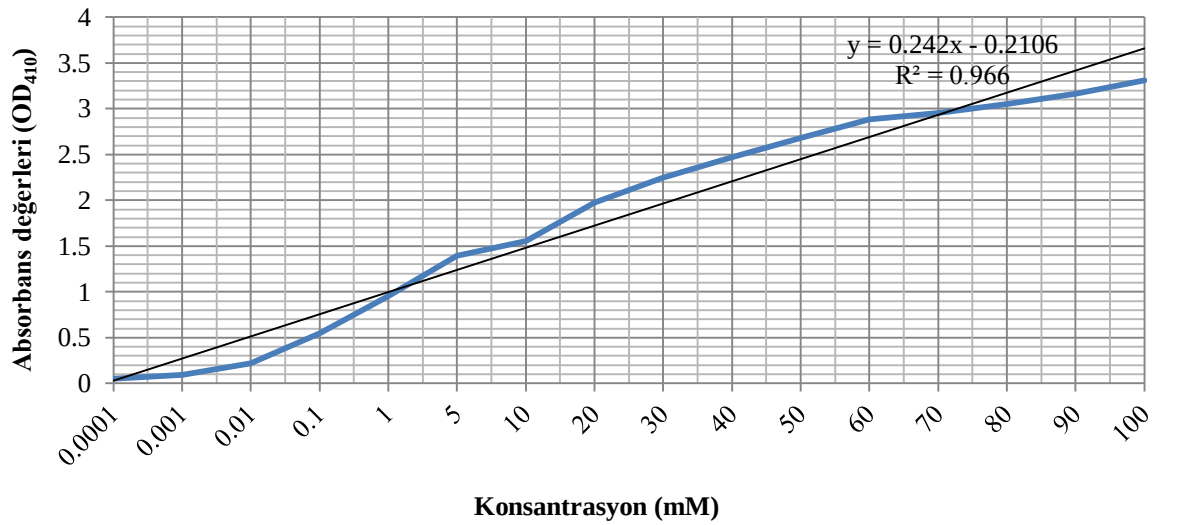
Serbest yağ asidi miktarını değerlendirmek amacıyla standart oleik asit eğrisi kullanılmıştır. Bu amaçla 1, 2, 3, 4 ve 5 μmol konsantrasyonlarda oleik asit süspansiyonları hazırlanmış ve süspansiyonlar bekletilmeden NEFA HR test kiti kullanılarak spektrofotometrik olarak (550 nm) ölçülmüştür (Johnson ve Peters, 1993). Elde edilen değerler yardımıyla hazırlanan standart oleik asit eğrisi Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3: Standart oleik asit eğrisi

3.5.11. Standart p-nitrofenol (pNP) Eğrisinin Hazırlanması

Standart pNP eğrisini hazırlamak için steril bidistile su içerisinde 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 ve 1 mM konsantrasyonlarda pNP çözeltileri hazırlanmıştır. Kör olarak bidistile su kullanılmış, süspansiyonlar bekletilmeden 410 nm'de ölçülmüştür (Kim ve diğ., 1994) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Standart pNP eğrisi

3.6. *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİ İLE KONAK HÜCRELER ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN İNCELENMESİ

3.6.1. Deneyde Kullanılacak Bakterilerin Hazırlanması

L. pneumophila bakterileri ile periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) arasındaki ilişkiyi incelemek üzere geç logaritmik fazdaki bakteri kültürleri kullanılmıştır. Bu amaçla -20 °C’de saklanan stok bakteri solüsyonu oda sıcaklığında erimeye bırakılmıştır. Eriyen süspansiyonun 100 µl’si BCYE Agar besiyeri üzerine ekilmiş, Petri kutuları 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 3-4 gün bekletilmiştir. Elde edilen taze kültürlerden % 15 iFBS (sıcaklık ile inaktive edilmiş Fetal Bovine Serum) eklenmiş steril RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 doku kültürü medyumunu içerisinde bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır (Coxon ve diğ., 1998).

3.6.2. *L. pneumophila* Bakterileri ile İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

3.6.2.1. İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin (PKMH) Eldesi

Deneylerde kullanılmak üzere gönüllü kişilerden toplanan lityum heparinli insan kanından mononükleer hücreler elde edilmiştir. Hücrelerin kandan ayrılması için öncelikle 3 ml insan kanı ile 3 ml steril PBS (phosphate buffered saline) karıştırılmıştır. İçerisine 6 ml steril Histopaque 1077 konan 15 ml hacimli steril plastik santrifüj tüplerine 6 ml kan-PBS karışımı tüpün cidarından dikkatlice eklenmiştir. Bu sayede altta histopaque üstte kan-PBS karışımı olacak şekilde iki tabaka oluşmuştur. 400 g’de 20 dk santrifüj edilen örneklerde tüpün en altında eritrosit ve granülositler, hemen üstünde şeffaf renkli Histopaque tabakası, bunun üzerinde bulanık beyaz mononükleer hücre tabakası ve son olarak en üstte şeffaf sarı renkli plazma tabakası oluşumunun kontrolü yapılmıştır. Steril Pastör pipeti kullanılarak mononükleer hücre tabakası yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Steril PBS ile 10 ml hacime tamamlanan tüpler 100 g’de 10 dk santrifüj edilmiştir (Coxon ve diğ., 1998; Almeida ve diğ., 2002; Elkord ve diğ., 2005). Üst sıvılar döküldükten sonra tüp hacmi PBS ile tekrar 10 ml’ye tamamlanarak 100 g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı döküldükten sonra çökelti 1 ml % 10 iFBS içeren RPMI 1640 ile sulandırılmıştır. % 1 Tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılan hücre süspansiyonu Thoma-Zeiss sayım kamerası kullanılarak incelenmiştir (Weinbaum ve diğ., 1984). Işık mikroskopunda 40x büyütme ile canlı hücrelerin sayımı

yapılmış ve hücre süspansiyonu, % 10 iFBS içeren RPMI 1640 ile 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde sulandırılmıştır (Şekil 3.5). Canlı hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Gürgün ve Halkman, 1988).

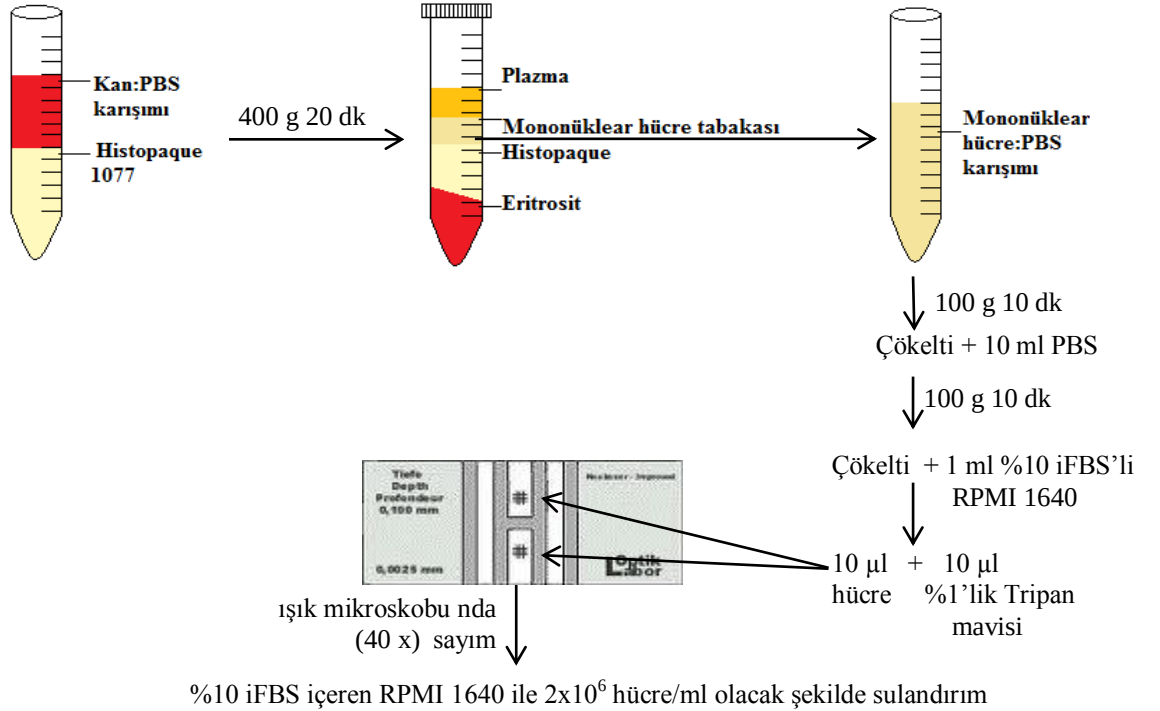
(3.1)

$$\text{Hücre sayısı/ml} = A \times SF \times 10.000$$

A : 16 büyük karede sayılan boyanmamış canlı hücre sayısı

SF : sulandırım faktörü

24 kuyucuklu steril doku kültürü kuyucuklarına 1'er ml hücre süspansiyonu dağıtılmış ve mononükleer hücrelerin (fagositer hücreler) yapışması amacıyla pleytler 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 2 saat bekletilmiştir.



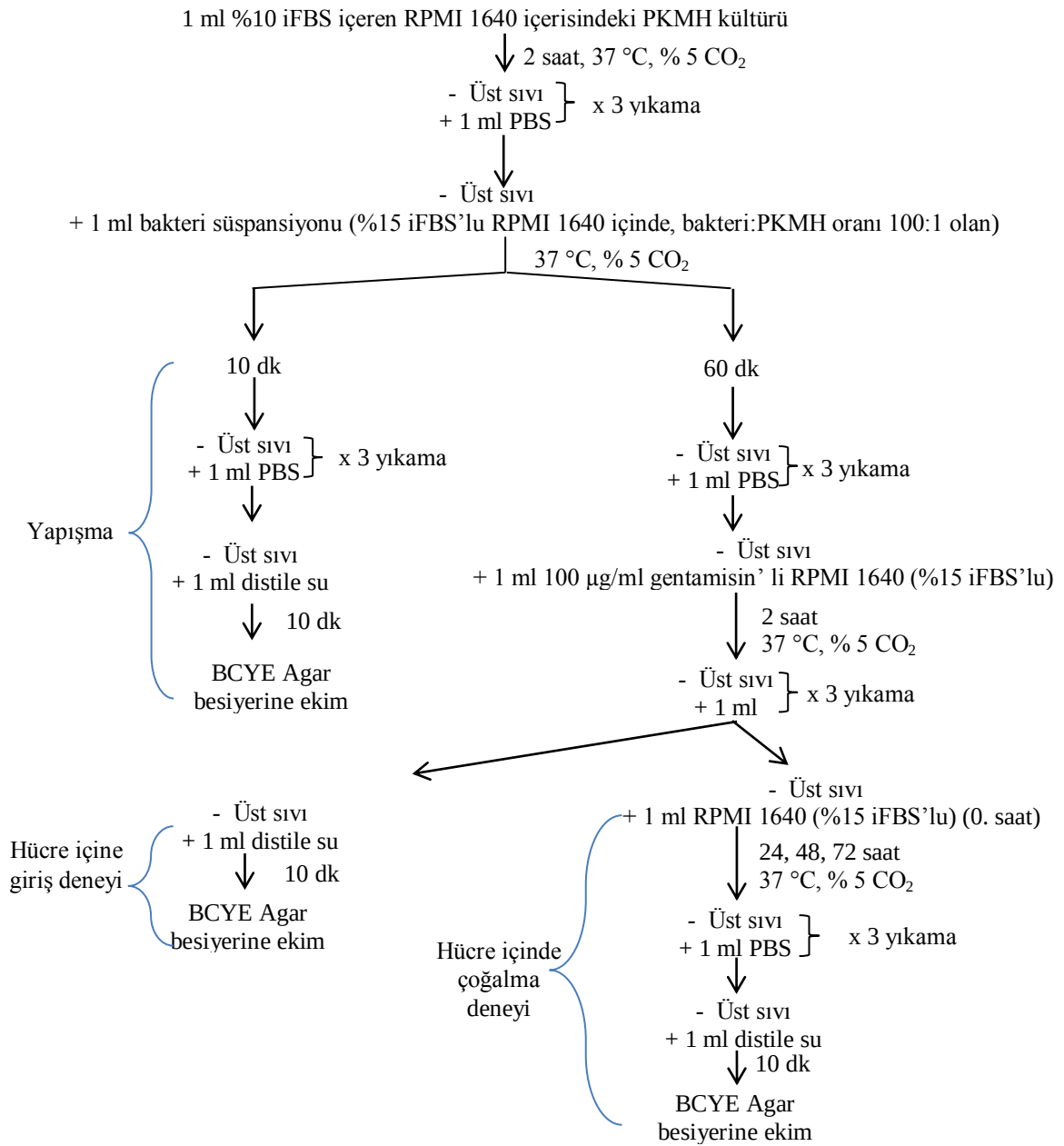
Şekil 3.5: İnsan periferel mononükleer hücrelerinin (PKMH) eldesi

3.6.2.2. *L. pneumophila* Bakterilerinin Periferel Kan Mononükleer Hücrelerine (PKMH) Karşı Patojenitelerinin İncelenmesi

PKMH izolasyon metodu (Almeida ve diğ., 2002) ile kandan izole edilen fagositler ve lenfositlerden sadece fagositer hücreler düz tabanlı doku kültürü pleytlerine yapışacağı için bekleme süresi sonunda PKMH kültüründeki üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen fagositer hücre serileri, hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmamalarına dikkat

edilerek steril PBS ile üç kez yıkanmıştır. 3. yıkamanın ardından üst sıvılar atılmış ve yerlerine 1'er ml % 15 iFBS içeren RPMI 1640 içerisinde hazırlanan bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Bu süspansiyonlarda bakteri:PKMH oranı 100:1 olacak şekilde ayarlanmıştır (Cirillo ve diğ., 1999).

L. pneumophila bakterilerinin PKMH'ine karşı patojenitelerini değerlendirmek amacıyla bakterilerin (i) PKMH'ine yapışma, (ii) hücre içine giriş ve (iii) hücre içinde çoğalma yeteneklerinin incelenmesi şeklinde üç deney grubu kurulmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH'ne karşı patojenitelerinin değerlendirilmesi

Yapışma deneyinde, kuyucuklara bakteri süspansiyonu eklendikten sonra doku kültürü pleytleri 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 10 dk bekletilmiştir. Süre bitiminde üst sıvılar atılmış ve kuyucuklar steril PBS ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben sayım için ayrılan kuyucuklara 1 ml steril distile su konmuş ve PKMH'nin patlaması için oda sıcaklığında 10 dk beklenmiştir. Patlatma ile serbest kalan bakterilerin sayımı için kuyucuklardan BCYE Agar besiyerine direkt ve seri sulandırım (10⁻¹ ve 10⁻²) yayma ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan Petri kutuları 37 °C'deki % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 3-4 gün bekletilerek oluşan koloniler sayılmıştır. Elde edilen sonuçlar koloni oluşturan birim (kob) cinsinden değerlendirilmiştir. Aynı zamanda mikroskopik inceleme için ayrılan kuyucuklara ise 0.5 ml PBS eklenmiş ve pipetaj ile tüm tutunmuş PKMH'i toplanarak preparat hazırlanmıştır. Bakterilerin PKMH'ne yapışma oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Coxon ve diğ., 1998).

(3.2)

$$\text{Yapışma oranı} = \frac{\text{Yapışan bakteri sayısı}}{\text{Kontrol kuyucuğundaki bakteri sayısı}} \times 100$$

Hücre içine girişin değerlendirilmesi için bakteri süspansiyonu eklenen hücre kültürü 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 60 dk bekletilmiştir. Süre bitiminde üst sıvılar atılmış ve kuyucuklar steril PBS ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonunda her kuyucuğa 1 ml 100 µg/ml gentamisin içeren % 15 iFBS'lu RPMI 1640 eklenmiş, 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 2 saat beklenerek hücre dışında kalan bakterilerin ölmesi sağlanmıştır. Bekleme süresi sonunda tüm kuyucuklar üç kez PBS ile yıkanmış, hücre içine giren bakteri sayısını belirlemek için ayrılan kuyucuklara 1 ml steril distile su eklenerek 10 dk beklenmiştir. PKMH'nin patlatılması ile serbest kalan bakterilerin sayımı için kuyucuklardan direkt, 10⁻¹ ve 10⁻² sulandırımlar hazırlanıp BCYE Agar besiyeri üzerine yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Aynı zamanda mikroskopik inceleme için ayrılan kuyucuklara 0.5 ml PBS eklenmiş ve pipetaj ile tüm tutunmuş PKMH'i toplanarak preparat hazırlanmıştır. *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH içine giriş (0. saat) oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Chang ve diğ., 2005).

(3.3)

$$\text{Hücre içine giriş oranı} = \frac{\text{Hücre içine giren bakteri sayısı}}{\text{Hücre zarına yapışan bakteri sayısı}} \times 100$$

Hücre içinde çoğalma yeteneğinin incelenmesi için hücre içine giriş deneyindeki gibi hücreler yıkanıp gentamisin ile muamele edilmiştir. Tekrar üç kez PBS ile yıkandıktan sonra deney kuyucuklarına 1 ml % 15 iFBS'lu RPMI 1640 eklenmiş ve bu an 0. saat olarak değerlendirilmiştir. 24, 48 ve 72. saatler sonunda kuyucuklar üç kez PBS ile yıkanmıştır. Sayım için ayrılan kuyucuklar 1 ml steril distile su ile 10 dk muamele edilerek PKMH patlatılmış, serbest kalan bakterilerin sayımı için kuyucuk içeriğinden hazırlanan direkt, 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırımından BCYE Agar besiyeri üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Mikroskopik inceleme için ayrılan kuyucuklardaki PKMH ise 0.5 ml PBS ile kaldırılarak preparat hazırlanmıştır (Smith ve diğ. 1997). 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre içi üremeyi değerlendirmek için, bu saatler sonunda tespit edilen bakteri sayıları ile 0. saatteki bakteri sayılarının farkı göz önünde bulundurulmuştur.

PKMH'ne karşı *L. pneumophila* bakterilerinin patojenitesinin değerlendirildiği deneylerde negatif kontrol olarak bakteri eklenmemiş PKMH yapışık kuyucuklar kullanılmıştır. Pozitif kontrol için ise deney kuyucuklarına eklenen % 15 iFBS'lu RPMI 1640 içindeki bakteri süspansiyonları kullanılmıştır. Tüm deneylere (yapışma, 0., 24., 48. ve 72. saat) paralel olarak bu kuyucuklardan 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} oranında hazırlanan seri sulandırımlar BCYE Agar besiyeri üzerine yayma yöntemiyle ekilmiştir. Negatif kontrol kuyucuklarından ise tüm deneylere paralel olarak hem BCYE Agar besiyerine yayma ekim yapılmış hem de mikroskopik inceleme için preparat hazırlanmıştır.

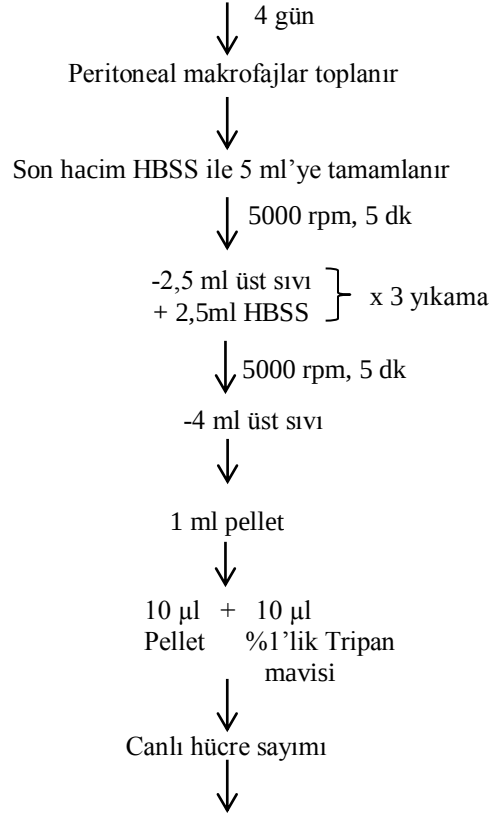
Mikroskopik inceleme için kuyucuklardan toplanan hücre süspansiyonları temiz steril lam üzerine konup yayılmadan 37°C sıcaklıkta kurutulmuştur. Metil alkol ile kimyasal tespiti yapılan preparatlar Gimenez yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda veya Acridine orange boyası ile boyanarak epifloresans mikroskopunda incelenmiştir.

3.6.3. *L. pneumophila* Bakterileri ile Fare Peritoneal Makrofajları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

3.6.3.1. Fare Peritoneal Makrofajlarının (PM) Eldesi

Deney koşulları İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan prosedüre (Karar no: 2011/87) göre yapılmıştır. Peritoneal makrofajları elde etmek için 6-8 haftalık Balb/c ırkı dişi farelerin peritoneal boşluklarına 2 ml steril % 3'lük thioglycolate (TGC) sıvı medyum enjekte edilmiştir (Şekil 3.7). Enjeksiyondan 4 gün sonra servikal dislokasyon uygulanan hayvanlardan toplanan peritoneal makrofajlar, Hanks'Buffered Salt Solution (HBSS) ile 5 ml'ye tamamlandıktan sonra 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, hücrelerin üst sıvısının yarısı atılarak HBSS ile son hacim tekrar 5 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır.

Balb/c ırkı dişi yetişkin farelere peritoneal enjeksiyon (2 ml steril % 3'lük TGC medyum)



%10 iFBS içeren RPMI 1640 ile 10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırım

Şekil 3.7: Fare peritoneal makrofajlarının (PM) eldesi

Son santrifüjden sonra dipte 1 ml sıvı kalacak şekilde tüm üst sıvı atılmış ve çökelti içindeki hücreler nazikçe bu sıvıda süspansiyon edilmiştir. 1:1 oranında % 1'lik Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonları, Thoma Zeiss sayım kamarası kullanılarak

x40 büyütmede ışık mikroskopunda incelenmiştir. Canlı hücre sayımı Bölüm 3.6.2.1’de belirtildiği şekilde (3.1) hesaplanan makrofaj süspansiyonları mililitrede 10^5 hücre olacak şekilde % 10 iFBS içeren RPMI 1640 içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonu 1’er ml olacak şekilde steril 24 kuyucuklu doku kültürü pleytlerine dağıtılmış ve 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 95 nemli ortamda 2 saat bekletilerek hücrelerin yapışması sağlanmıştır (Yamamoto ve diğ., 1988).

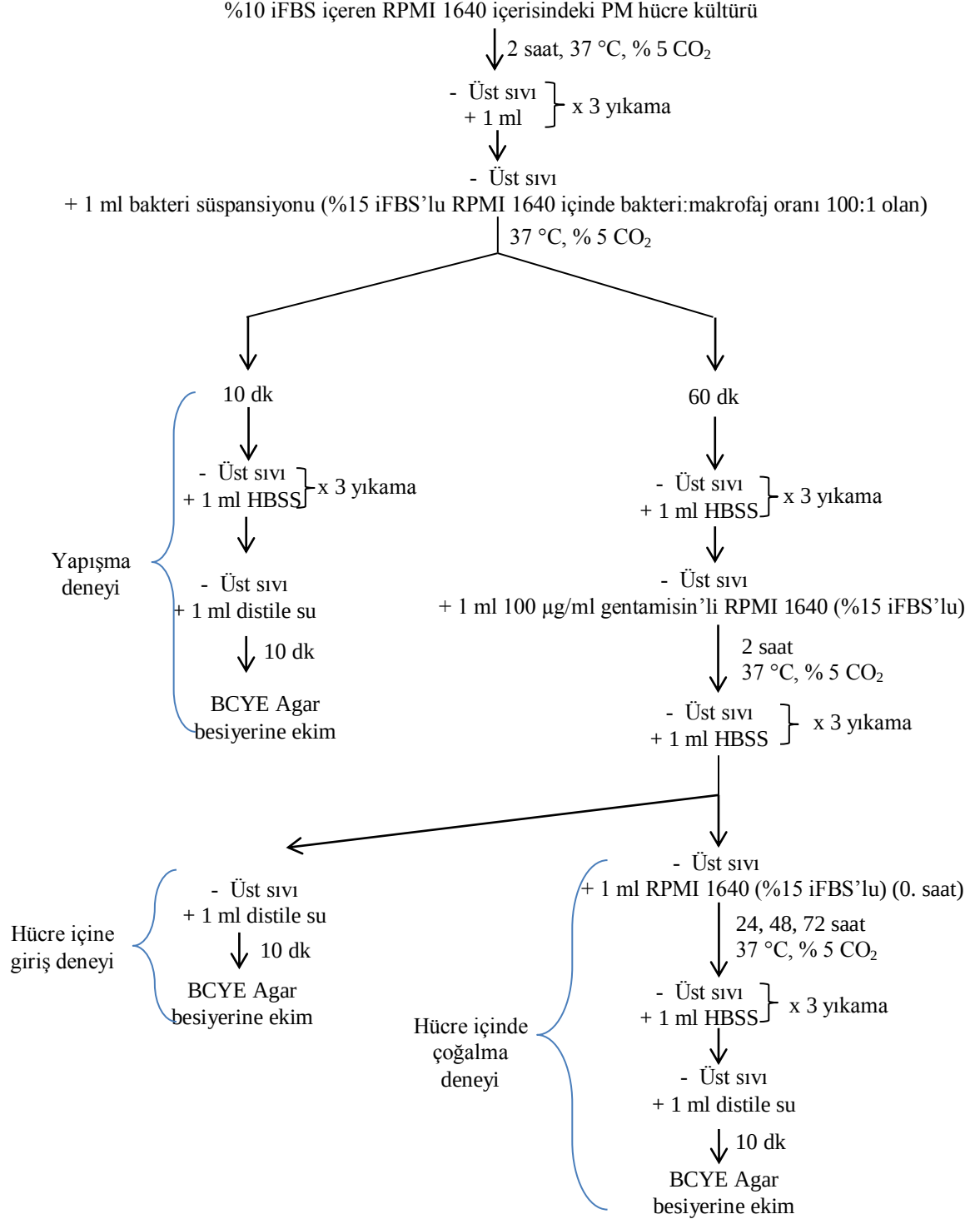
3.6.3.2. *L. pneumophila* Bakterilerinin Fare Peritoneal Makrofajlarına (PM) Karşı Patojenitelerinin İncelenmesi

Fare peritoneal boşluğundan toplanan hücre süspansiyonundan sadece makrofajlar kuyucukların dibine yapışacağı için bekleme süresi sonunda makrofaj dışı hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla kuyucuklar 3 kez steril HBSS ile yıkanmıştır. Son yıkamanın ardından üst sıvıları uzaklaştırılan PM kültürleri üzerine 1 ml, bakteri:PM oranı 100:1 olacak şekilde % 15 iFBS içeren RPMI 1640 içerisinde hazırlanmış bakteri süspansiyonu eklenmiştir.

L. pneumophila bakterilerinin PM’a karşı patojenitelerini değerlendirmek amacıyla bakterilerin (i) PM’a yapışma, (ii) hücre içine giriş ve (iii) hücre içinde çoğalma yeteneklerinin incelenmesi şeklinde üç deney grubu kurulmuştur (Şekil 3.8). Deneylerde kültür yönteminin yanı sıra ışık ve epifloresans mikroskobu incelemeleri için de preparatlar hazırlanmıştır (Yamamoto ve diğ., 1988).

Yapışma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla PM kültürü üzerine 1’er ml % 15 iFBS içeren RPMI 1640’ta hazırlanmış bakteri süspansiyonu eklenen pleytler 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 95 nemli ortamda 10 dk tutulmuştur. Süre sonunda üst sıvılar uzaklaştırılarak kuyucuklar steril HBSS ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra yapışma kapasitesini belirlemek için ayrılan kuyucuklara 1 ml steril distile su eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardan direkt, 10^{-1} ve 10^{-2} oranında sulandırımalar hazırlanarak BCYE Agar besiyeri üzerine yayma ekim yapılmıştır. Ekim yapılan Petri kutuları 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 95 nemli ortamda 3-4 gün bekletildikten sonra gelişen koloniler sayılmıştır. Elde edilen sonuçlar koloni oluşturan birim (kob) cinsinden değerlendirilmiştir. *L. pneumophila* bakterilerinin PM’na yapışma oranı formül (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır (Coxon ve diğ., 1998).

Mikroskopik inceleme için ayrılan kuyucuklara ise 0.5 ml PBS eklenmiş ve pipetaj ile tüm tutunmuş PM toplanarak preparat hazırlanmıştır.



Şekil 3.8: *L. pneumophila* bakterilerinin PM'na karşı patojenitelerinin değerlendirilmesi

L. pneumophila bakterilerinin PM içine giriş yeteneklerini değerlendirmek amacıyla PM kültürü üzerine % 15 iFBS içeren RPMI 1640'ta hazırlanmış bakteri süspansiyonu eklenen pleytler 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 95 nemli ortamda 60 dk tutulmuştur. Süre sonunda üst sıvılar uzaklaştırılarak kuyucuklar steril HBSS ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben her kuyucuğa 1 ml 100 µg/ml gentamisin içeren % 15 iFBS'lu RPMI 1640 eklenmiş, 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 2 saat bekletilerek hücre dışında kalan bakterilerin ölmesi sağlanmıştır. Bekleme süresi sonunda tüm kuyucuklar üç kez HBSS ile yıkanmış ve hücre içine giren bakteri sayısını belirlemek için ayrılan kuyucuklara PM'ı patlatmak amacıyla 1 ml steril distile su eklenmiş ve 10 dk beklenmiştir. Bu işlem sonucunda serbest kalan bakteri sayısını belirlemek amacıyla kuyucuklardan direkt, 10⁻¹ ve 10⁻² sulandırımalar hazırlanarak BCYE Agar besiyeri üzerine yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. *L. pneumophila* bakterilerinin PK içine giriş (0. saat) oranları formül (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda mikroskopik inceleme için ayrılan kuyucuklara 0,5 ml HBSS eklenmiş ve pipetaj ile tüm tutunmuş PM toplanarak preparat hazırlanmıştır (Chang ve diğ., 2005).

Bakterilerin hücre içi üreme aktivitelerini belirlemek amacıyla PM kültürü üzerine bakteri içeren RPMI 1640 (% 15 iFBS'li) süspansiyonu eklenen pleytler 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 95 nemli ortamda 60 dk tutulmuştur. Süre sonunda üst sıvılar uzaklaştırılarak üç kez HBSS ile yıkanan deney kuyucuklarına 1 ml 100 µg/ml gentamisin içeren % 15 iFBS'lu RPMI 1640 eklenerek 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 2 saat beklenmiştir. Gentamisinli üst sıvılar uzaklaştırılıp üç kez HBSS ile yıkanan kuyucuklara % 15 iFBS'li RPMI 1640 eklenmiş ve bu an 0. saat olarak kabul edilmiştir. 24., 48. ve 72. saatler sonunda kuyucuklar 3 kez HBSS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemini takiben hücre içine giren bakteri sayısının tayini için ayrılan kuyucuklar 1 ml steril distile su ile 10 dk muamele edilerek PM patlatılmış, kuyucuk içeriğinden hazırlanan direkt, 10⁻¹ ve 10⁻² sulandırımlardan BCYE Agar besiyeri üzerine yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre içi üremeyi değerlendirmek için, bu saatler sonunda tespit edilen bakteri sayıları ile 0. saatteki bakteri sayıları arasındaki fark göz önünde bulundurulmuştur (Chang ve diğ., 2005). Aynı zamanda mikroskopik inceleme için ayrılan kuyucuklara 0.5 ml HBSS eklenmiş ve pipetaj ile tüm tutunmuş PM toplanarak preparat hazırlanmıştır.

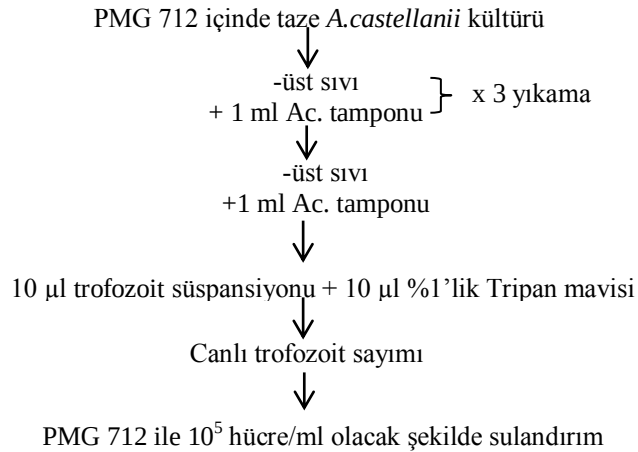
PM'a karşı *L. pneumophila* bakterilerinin patojenitesinin değerlendirildiği deneylerde negatif kontrol olarak bakteri süspansiyonu eklenmemiş PM kültürleri, pozitif kontrol olarak da % 15 iFBS'lu RPMI 1640 içindeki bakteri süspansiyonları eklenmiş PM içermeyen deney kuyucukları kullanılmıştır. Tüm deney sürelerinde negatif kontrol kuyucuklarından ekim ve preparat hazırlanırken pozitif kontrol kuyucuklarından sadece ekim yapılmıştır.

Mikroskopik inceleme için kuyucuklardan toplanan hücre süspansiyonları temiz steril lam üzerine konup yayılmadan 37°C sıcaklıkta kurutulmuştur. Metil alkol ile kimyasal tespiti yapılan preparatlar Gimenez yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda veya Acridine orange boyası ile boyanarak epifloresans mikroskopunda incelenmiştir.

3.6.4. *L. pneumophila* Bakterileri ile *A. castellanii* Amip Türü Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

3.6.4.1. *A. castellanii* Kültürünün Hazırlanması

Bölüm 3.1.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan taze amip kültürü steril *A. castellanii* (Ac.) tamponu eklenmiş PMG 712 sıvı besiyeri içeren 75 cm³'lük doku kültürü şişelerinde 30 °C'de üretilmiştir.



Şekil 3.9: *A. castellanii* kültürünün hazırlanması

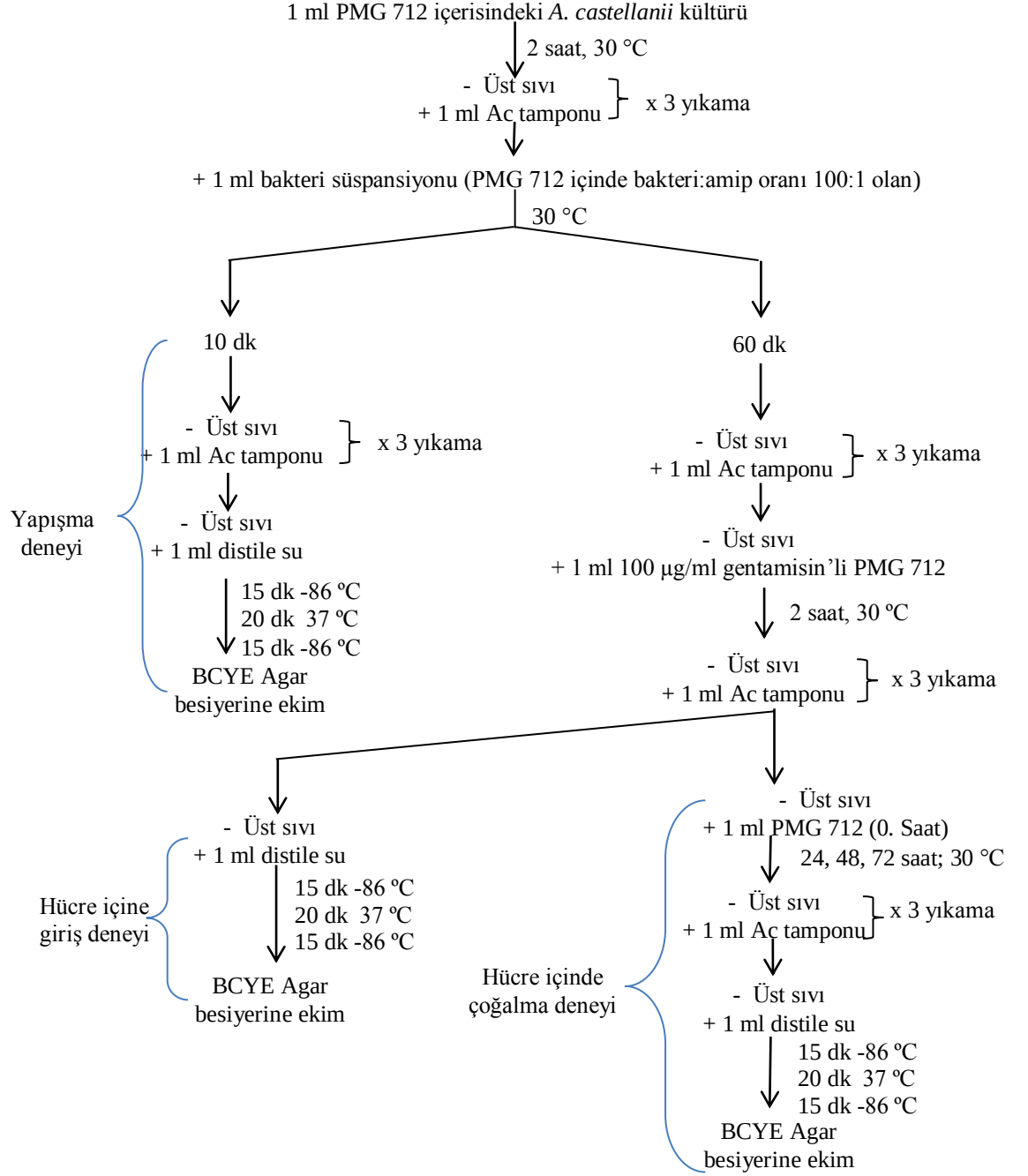
İnvert mikroskop ile amip trofozoitlerinin çoğaldığı görüldükten sonra doku kültürü şişelerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış, hücreler dikkatli bir şekilde 3 kez Ac. tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonunda 1 ml taze Ac. tamponu ile dikkatlice kaldırılan amip trofozoitleri % 1'lik Tripan mavisi ile 1:1 oranında boyanarak Thoma

Zeiss sayım kamerasıyla incelenmiştir (Şekil 3.9). Bölüm 3.6.2.1’de belirtildiği şekilde canlı hücre sayısı formül (3.1) kullanılarak hesaplanan amip kültürü steril PMG 712 besi ortamı içerisinde ml’de 10^5 hücre olacak şekilde sulandırılmıştır (Moffat ve Tompkins, 1992). Hazırlanan hücre süspansiyonundan 24 kuyucuklu doku kültürü pleyti kuyucuklarına 1’er ml olarak dağıtılmış ve 30 °C’de 2 saat bekletilerek trofozoitlerin yapışması sağlanmıştır.

3.6.4.2. *L. pneumophila* Bakterilerinin *A. castellanii* Amip Türüne Karşı Patojenitelerinin incelenmesi

Doku kültürü pleytlerine aktarılan amip süspansiyonlarından sadece trofozoitler kuyucukların dibine yapışacağı için bekleme süresi sonunda amip kistlerinin uzaklaştırılması amacıyla kuyucuklar Ac tamponu ile 3 kez yıkanmış ve *A. castellanii* trofozoit kültürü elde edilmiştir. Son yıkamanın ardından üst sıvıları uzaklaştırılan *A. castellanii* kültürü üzerine bakteri:amip oranı 100:1 olacak şekilde PMG 712 içerisinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 1 ml eklenmiştir. Bölüm 3.6.2.2’de anlatıldığı şekilde *L. pneumophila* bakterilerinin amip hücrelerine yapışma, hücre içine giriş ve hücre içinde çoğalma özellikleri kültür, ışık ve floresans mikroskobu yöntemleri ile incelenmiştir.

Bakterilerin amip hücrelerine yapışma kapasitelerini belirlemek amacıyla trofozoit kültürü üzerine bakteri süspansiyonu eklendikten sonra pleytler 30 °C’de 10 dk bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda kuyucuklar Ac tamponu ile üç kez yıkanarak yapışmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır. Yapışan bakteri sayısını belirlemek amacıyla ayrılan kuyucuklara 1 ml distile su eklenip tabana yapışık durumdaki trofozoitler pipetaj yardımıyla toplanarak steril bir tüp içerisine aktarılmış ve dondurma çözme metodu uygulanarak trofozoitlerin patlatılması sağlanmıştır (Binay, 2010). Tüpler sırasıyla -86 °C’de 15 dk, 37 °C’de 20 dk ve -86 °C’de 15 dk tutulmuş, son aşamadan sonra oda sıcaklığında çözülen süspansiyonlardan direkt, 10^{-1} ve 10^{-2} oranında sulandırımalar hazırlanarak BCYE Agar besiyerine ekim yapılmıştır (Şekil 3.10). Ekim yapılan Petri kutuları 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 95 nemli ortamda 3-4 gün bekletildikten sonra besiyeri üzerinde gelişen koloniler sayılmıştır. *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitlerine yapışma oranı formül (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır. Yapışmanın mikroskobik olarak incelemesi için ayrılan deney kuyucuklarındaki trofozoitler ise Ac tamponu ile toplanarak preparat hazırlanmıştır.



Şekil 3.10: *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* amip türüne karşı patojenitelerinin değerlendirilmesi

L. pneumophila bakterilerinin amip hücreleri içine giriş yeteneklerini değerlendirmek için bakteri süspansiyonu eklenen amip kültürü 30 °C sıcaklıkta 60 dk bekletilip üst sıvılar atılmış ve kuyucuklar steril Ac tamponu ile üç kez yıkanmış ve her kuyucuğa 1 ml 100 µg/ml gentamisin içeren PMG 712 eklenerek 30 °C sıcaklıkta 2 saat

beklenmiştir. Bekleme süresi sonunda tüm kuyucuklar üç kez Ac tamponu ile yıkanmış ve hücre içine giren bakteri sayısını belirlemek amacıyla ayrılan kuyucuklara 1 ml distile su ile pipetaj yapılarak trofozoitler kaldırılıp steril bir tüp içerisine toplanmış ve dondurma çözme metodu uygulanarak trofozoitler patlatılmıştır. Patlatma sonrası açığa çıkan bakterilerin sayısını belirlemek amacıyla patlatılmış trofozoit içeriğinin direkt, 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırımından BCYE Agar besiyeri üzerine yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitleri içine giriş (0. saat) oranları formül (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda mikroskopik inceleme için ayrılan kuyucuklara 0.5 ml Ac tamponu eklenmiş ve pipetaj ile tüm tutunmuş amip trofozoitleri toplanarak preparat hazırlanmıştır.

L. pneumophila'nın amip trofozoitleri içerisinde çoğalma yeteneğinin incelenmesi için hücre içine giriş deneyindeki gibi hücreler yıkanıp gentamisin ile muamele edilmiştir. Tekrar üç kez Ac tamponu ile yıkandıktan sonra deney kuyucuklarına 1 ml PMG 712 eklenmiş ve bu an 0. saat olarak değerlendirilmiştir. 24, 48 ve 72. saatler sonunda kuyucuklardaki trofozoitler yukarıda anlatılan şekilde üç kez Ac tamponu ile yıkanmış ve 1 ml steril distile su ile toplanıp dondurma çözme metodu ile patlatılmıştır. Amip hücrelerinin patlatılması sonucu serbest kalan bakterilerin sayımı için patlatılmış trofozoit içeriğinin direkt, 10^{-1} ve 10^{-2} sulandırımından BCYE Agar besiyeri üzerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre içi üremeyi değerlendirmek içinse bu saatlerdeki bakteri sayıları ile 0. saatteki bakteri sayılarının farkı göz önünde bulundurulmuştur. Mikroskopik incelemeler için ayrılan kuyucuklardaki trofozoitler 0.5 ml Ac tamponu ile kaldırılarak preparat hazırlanmıştır (Smith ve diğ. 1997).

Amip hücrelerine karşı *L. pneumophila* bakterilerinin patojenitesinin değerlendirildiği deneylerde negatif kontrol olarak bakteri eklenmemiş trofozoit kültürleri kullanılmıştır. Tüm deneylere paralel olarak (yapışma, 0., 24., 48. ve 72. saat) hem BCYE Agar besiyeri üzerine ekim yapılmış hem de mikroskopik inceleme için preparat hazırlanmıştır. Pozitif kontrol için ise deney kuyucuklarına eklenen PMG 712 içindeki bakteri süspansiyonlarından kullanılmış ve tüm deneylerle paralel (yapışma, 0., 24., 48. ve 72. saat) olarak bu kuyucuklardan hazırlanan 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} oranında seri sulandırımlardan BCYE Agar besiyerleri üzerine ekim yapılmıştır.

Mikroskobik inceleme için kuyucuklardan toplanan hücre süspansiyonları temiz steril lam üzerine konup yayılmadan oda sıcaklığında kurutulmuştur. Metil alkol ile kimyasal tespiti yapılan preparatlar Gimenez yöntemi ile boyanarak ışık mikroskobunda veya Acridine orange boyası ile boyanarak epifloresans mikroskobunda incelenmiştir.

3.6.5. Mikroskobik İnceleme

3.6.5.1. Preparat Hazırlanması

Kromik asit ile temizlenip % 50 etil alkol içerisinde bekletilen lamalar yakılarak steril edilmiş ve soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan steril lam üzerine mikropipet yardımı ile toplanan hücreler bırakılmış ve yayılmadan 37 °C'lik etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kurumanın ardından preparatlar 3-4 dk saf metil alkol ile muamele edilerek kimyasal olarak tespit edilmiştir. Süre sonunda lam yüzeyindeki alkol dökülmüş ve kalan alkolün uçması beklenmiştir.

3.6.5.2. Gimenez Yöntemi

Tamamen kuruyan preparatlar öncelikle Gimenez'in karbol fuksini ile 1 dk boyanmış, ardından çeşme suyu ile fazla boya uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada preparatın rengi koyu pembe'dir. Yüzeydeki suyun fazlası dikkatli bir şekilde filtre kağıdı ile alındıktan sonra 45 sn % 1'lik malaşit yeşili uygulanmıştır. Süre bitiminde çeşme suyu ile durulanan preparatların rengi kontrol edilmiştir. Hazırlanan preparat malaşit yeşili ile uygun oranda boyandığında açık yeşil-mavi bir renk alır. Renk değişimini sağlamak amacıyla 45 sn malaşit yeşili ve çeşme suyu ile preparatın durulanıp renginin kontrol edilmesi uygulamasına devam edilmiştir. İşlem sonunda kurutulan lamalar ışık mikroskobunda 100x büyütme ile incelenmiştir (Garduno ve diğ., 2002).

3.6.5.3. Acridine Orange Boyama Yöntemi

Bölüm 3.6.5.1'de belirtildiği şekilde hazırlanıp kimyasal olarak tespit edilen preparatlar taze hazırlanan Acridine orange boyası ile karanlık ortamda 1 dk boyanıp çeşme suyu ile durulanmış ve fazla suları filtre kağıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler bekletilmeden epifloresans mikroskobu ile 100x büyütme ile incelenmiştir (Cirillo ve diğ., 1999).

3.6.6. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler en az üç tekrarlı olarak uygulanmıştır. Elde edilen sonuçların standart hataları hesaplanmıştır. Tablolarda standart hata değerleri deney sonuçlarının yanında “±” işareti ile belirtilmiştir. Bununla birlikte deneyde kullanılan *L. pneumophila* SG1 bakterilerinin incelenen virülans özellikleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığı *Student's t* testi ile incelenmiştir. Ayrıca gerek tip II gerekse tip IV sekresyon sisteminin araştırılan virülans faktörleri arasındaki ilişki, sonuçların normal dağılım gösterip göstermemesine bağlı olarak Spearman veya Pearson korelasyon katsayıları testi ile değerlendirilmiştir (Albayrak ve diğ., 2005). Tüm istatistik hesaplamalar SPSS 16.0 programı kullanılarak çalışılmıştır.

3.7. DENEYLERDE KULLANILAN BESİYERİ VE TAMPONLARIN HAZIRLANIŞI

3.7.1. Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) Agar Besiyeri

L. pneumophila bakterilerinin üretilmesi amacıyla kullanılan besiyeridir (Diederer, 2008).

Maya özütü	10.0 g
Agar	12.0 g
Aktif kömür	2.0 g
a-ketoglutarat, monopotasyum tuzu	1.0 g
ACES tamponu	10.0 g
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
Distile su	1000 ml

pH: 6.9±0.02

Maya özütü, agar ve aktif kömürü içeren hazır besiyerine (CYE Agar, Oxoid) 900 ml distile su eklenerek besiyeri eriyene kadar 100 °C’lik su banyosunda bekletilmiştir. Eriyen besiyeri otoklavda 121 °C’de 1-1.5 atmosfer basınçta 15-30 dk steril edilip 45 °C’ye soğutulmuştur. Besiyeri tablosunda belirtilen diğer kimyasallar tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözülüp 1 N KOH ile pH 6.9’a ayarlanmıştır. 45 °C’ye gelene kadar

ısıtılan çözelti 0.22 µm por çaplı enjektör ucuna takılan steril filtre ile steril edilip soğumadan steril koşullarda CYE Agar içerisine katılmış iyice karıştırıldıktan sonra steril Petri kutularına paylaştırılmıştır. Oda sıcaklığında donması için beklenen besiyerleri 37 °C’de 1 gece bekletilerek sterilite kontrolü yapılmış ve iki hafta içerisinde kullanılmıştır.

3.7.2. Triptik Soya Agar (TSA) Besiyeri

L. pneumophila bakterilerinin doğrulanması amacıyla kullanılan besiyeridir (McDade ve diğ., 1977).

Tripton	15.0 g
Soya pepton	5.0 g
Sodyum klorit	5.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

pH:7.3±0.2

Hazırlanan besiyeri eriyene kadar kaynatıldıktan sonra 121 °C’de 1 atmosfer basınçta 15 dk steril edilmiştir. Steril Petri kutularına dökülerek donması beklenen besiyerleri 37 °C’de bir gece sterilite kontrolü için bekletilmiştir. Besiyeri +4 °C’de 30 gün saklanabilmektedir.

3.7.3. % 2 Mannoz İçeren % 3’lük Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanışı

MR-HA, dolayısı ile tip IV fimbriyanın tespiti için kullanılmıştır (Kimiran, 1993).

D-mannoz	0.2 g
% 100’lük insan eritrositi çözeltisi	0.3 ml
PBS	10 ml

3.7.3.1. Deneylerde Kullanılan Eritrositlerin Eldesi

Eritrosit eldesi için defibrine insan veya koyun kanı 15 ml hacimli vida kapaklı plastik santrifüj tüplerine alınarak 800 g’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra dipte kalan eritrositler steril fosfat tamponu (PBS) ile sulandırılarak 800 g’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra tekrar PBS ile iki yıkama daha yapılarak üst sıvı atılmış ve dipte kalan eritrosit süspansiyonu % 100’lük eritrosit solüsyonu olarak değerlendirilmiştir.

3.7.4. Buffered Yeast Extract Broth (BYEB) Besiyeri

L. pneumophila bakterilerinin enzimatik aktivitelerini incelemek için, bakteriyel lizatlar ve süpernatantların elde edilmesinde kullanılan seçici besiyeridir (Aragon ve diğ., 2000).

Maya özütü	5.0 g
α -ketoglutarat	0.50 g
ACES Buffer	5.0 g
Demir (III) pirofosfat [$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$]	0.125 g
L-sistein hidroklorid monohidrat	0.2 g
Distile su	500 ml

pH: 6.9 $\pm$ 0.02

10 dakika kaynatılan besiyeri steril 0.22 μm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. 37 °C’de bir gece sterilite kontrolü için bekletilen besiyeri, +4 °C’de 15 gün saklanabilmektedir (Aragon ve diğ., 2000).

3.7.5. İnsan veya Koyun Eritrositi İçeren Buffered Yeast Extract Agar (eBYEA) Besiyeri

L. pneumophila bakterilerinin hemolitik aktivitesinin incelenmesi amacıyla koyun ve insan eritrositleri içeren BYE Agar (eBYEA) besiyerleri kullanılmıştır (Keen ve Hoffman, 1989).

3.7.5.1. BYEA Hazırlanışı

Maya özütü	5.0 g
α -ketoglutarat	0.50 g
ACES tamponu	5.0 g
Demir (III) pirofosfat [$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$]	0.125 g
L-sistein hidroklorid monohidrat	0.2 g
Agar	5 g
Distile su	500 ml

pH: 6.9 $\pm$ 0.02

400 ml distile su içerisine katılan 5 g agar kaynatılarak eritildikten sonra otoklavda 121 °C’de 1 atmosfer basınçta 15 dk steril edilip 45 °C’ye soğutulmuştur. Besiyerinin içeriğindeki diğer maddeler 100 ml distile su içerisinde çözülüp 1 N KOH ile pH’sı

ayarlandıktan sonra 45 °C'ye kadar ısıtılmış, 0.22 µm por çaplı steril enjektör ucu filtre ile steril edilerek soğumadan steril agar süspansiyonuna katılmıştır.

3.7.5.2. *eBYEA Hazırlanışı*

45 °C'ye kadar soğutulup steril tamponları eklenen 500 ml BYEA besiyeri içerisine beklemeden % 5 oranında Bölüm 3.7.3.1'de belirtilen şekilde hazırlanan eritrosit süspansiyonu katılmış, donmasına izin verilmeden besiyeri 9 cm çaplı steril Petri kutularına paylaştırılmıştır. Oda sıcaklığında donması beklenen besiyeri 37 °C'de 24 saat tutularak sterilite kontrolü yapılmış ve hemoliz deneylerinde kullanılmıştır. Besiyeri +4 °C'de 7 gün saklanabilmektedir (Keen ve Hoffmann, 1989).

3.7.6. Noble Agar Besiyeri

Bakteri süpernatantlarının nükleaz aktivitelerini saptamak amacıyla kullanılan besiyeridir. BD Difco™ Noble Agar'ın 5 gramı 500 ml distile suya katılıp besiyeri eriyene kadar kaynatıldıktan sonra 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk steril edilmiştir. Noble Agar'ın 45 °C'ye kadar soğuması beklendikten sonra içerisine % 0.15 torula mayasının tip II-C RNA'sı veya % 0.1 buzağı timusunun tip 1 DNA'sı katılarak steril koşullarda Petri kutularına dökülmüştür. Nükleik asit katılmış besiyeri saklanamadığından donan taze besiyerine 6 mm çaplı delikler açılarak nükleaz deneyi hemen yapılmıştır (Thorpe ve Miller, 1981).

3.7.7. Isıyla İnaktive Fetal Bovine Serum (iFBS) içeren RPMI 1640 Besiyeri

Ticari olarak steril halde satılan 20 mM L-glutaminli, sodyum bikarbonat içermeyen RPMI 1640 (Sigma) sıvı besiyeri içerisine % 10 veya 15 oranında iFBS eklendikten sonra pH 7.2'ye ayarlanmıştır. Bir gece sterilite kontrolü için 37 °C'de bekletilen besiyeri, +4 °C'de 15 gün saklanabilmektedir (Cirillo ve diğ., 1999).

3.7.8. Pepton Maya Özütü Glukoz (PMG) 712 besiyeri

A.castellanii kültürü için kullanılan besiyeridir (Moffat ve Tompkins, 1992).

Proteaz pepton	20 g
Maya özütü	1 g
2 M glukoz	50 ml
0.4 M MgSO ₄ x 7H ₂ O	10 ml
0.05 M CaCl ₂	8 ml
0.1 M sodyum sitrat x 2 H ₂ O	34 ml
0.005 M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	10 ml
0.25 M Na ₂ HPO ₄ x7 H ₂ O	10 ml
0.25 M KH ₂ PO ₄	10 ml
Distile su	950 ml

pH:6.5 ± 0.02

Hazırlanan besiyeri 121 °C’de 1 atmosfer basınçta 15 dk steril edilmiştir. 37 °C’de bir gece sterilit kontrolü için bekletilen besiyeri +4 °C’de 15 gün saklanabilmektedir.

3.7.9. Liziz Tamponu

BYEB besiyeri içerisinde üretilen bakterilerin hücre lizatlarının hazırlanması için kullanılan tampondur (Molmeret ve diğ., 2002).

Steril PBS (pH:7,2)	20 ml
Triton X-100	0.02 ml
Lizozim	4 mg

3.7.10. Etidyum Bromür Çözeltisi

Nükleaz aktivitesinin tespiti için nükleik asitlerin boyanmasında kullanılan çözeltidir (Thorpe ve Miller, 1981).

Trisma base	5.4 g
Borik asit	2.75 g
Na ₂ EDTAx2H ₂ O	0.372 g
Etidyum bromür (% 1’lik çözelti)	0.05 ml
Distile su	500 ml

pH: 8.0 ± 0.02

Noble Agar plakları taze olarak hazırlanan etidyum bromid çözeltisi ile karanlık bir ortamda 20-30 dk muamele edilir. Bu süre zarfında baz dizileri arasına giren etidyum bromür UV ışık altında floresans parlamaya sebep olur.

3.7.11. Fosfolipaz A Substratı

Hücre lizatları ve süpernatantlarının fosfolipaz A aktivitesinin tayini için kullanılmıştır (Flieger ve diğ., 2001).

Trisma base	0.242 g
Sodyum azid	0.02 g
Triton X-100	0.5 ml
Distile su	100 ml

pH: 8.0 ± 0.02

1 ml tampona deney anında 5 mg dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) eklenerek kullanılmıştır.

3.7.12. Fosfolipaz C Substratı

Hücre lizatları ve süpernatantlarının fosfolipaz C aktivitesinin tayini için kullanılmıştır (Flieger ve diğ., 2000).

Trisma base	1.21 g
Sodyum azid	0.02 g
CaCl ₂	0.077 g
Distile su	100 ml

pH: 7.65 ± 0.05

1 ml tampona 0.006 g p-nitrofenil fosforil kolin (pNPPC) eklenerek hemen kullanılmıştır.

3.7.13. Alkali ve Asit Fosfataz Substratları

Hücre lizatları ve süpernatantlarının fosfataz aktivitesinin tayini için kullanılmışlardır (Aragon ve diğ., 2000).

Sitrik asit	1.05 g
Distile su	100 ml

Hazırlanan çözeltinin 50 ml'si pH:5, 50 ml'si ise pH:10'a ayarlandıktan sonra 121 °C 1 atmosfer basınçta 15 dk steril edilmiştir. Hazırlanan çözeltilere deney esnasında 7.6 mM p-nitrofenil fosfat eklenmiştir.

3.7.14. Lipaz Substratları

Hücre lizatları ve süpernatantlarının lipaz aktivitesinin tayini için kullanılmışlardır (Aragon ve diğ., 2000).

3.7.14.1. P-Nitrofenil Kaprilat ve P-Nitrofenil Palmitat İçeren Substratlar

Trisma base	1.211 g
Triton X-100	0.2 ml
Distile su	100 ml

pH: 8.0 ± 0.02

Tampona deney anında 0.027 g p-nitrofenil kaprilat veya 0.038 g p-nitrofenil palmitat eklenerek kullanılmıştır.

3.7.14.2. 1,2-Dilaüril-racglisero-3-glutarikasit Resorufin Ester İçeren Substrat

KH ₂ PO ₄	0.289 g
Resorufin ester	0.0025 g
Distile su	21.25 ml

pH: 6.8 ± 0.02

Deney anında hazırlanan substrat çözeltisi beklenmeden kullanılmıştır.

3.7.14.3. 1-Monopalmitolgliserol (1-MG) ve 1,2-Dipalmitolgliserol (1,2-DG) İçeren Substratlar

Trisma base	0.242 g
Sodyum azid	0.02 g
Triton X-100	0.5 ml
Distile su	100 ml

pH: 8.0 ± 0.02

1 ml tampona deney anında 2 mg 1-MG veya 1.6 mg 1,2-DG eklenerek kullanılmıştır.

3.7.15. PBS (Phosphate Buffered Saline)

L. pneumophila bakterilerinin PKMH üzerine patojenitesini belirlemek için yapılan deneylerde yıkama tamponu olarak kullanılmıştır (Coxon ve diğ., 1998).

NaCl	0.8 g
KCl	0.02 g
Na ₂ HPO ₄ x12 H ₂ O	0.29 g
KH ₂ PO ₄	0.02 g
Distile su	100 ml

pH: 7.2 ± 0.02

Distile su içerisinde çözülüp pH'sı ayarlanan çözelti 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk steril edilmiştir. +4 °C'de 30 gün saklanabilmektedir.

3.7.16. HBSS (Hank's Buffered Salt Solution)

L. pneumophila bakterilerinin PM üzerine patojenitesini belirlemek için yapılan deneylerde yıkama tamponu olarak kullanılmıştır (Yamamoto ve diğ., 1988).

NaCl	0.8 g
KCl	0.04 g
Na ₂ HPO ₄	0.004 g
KH ₂ PO ₄	0.006 g
CaCl ₂	0.014 g
MgSO ₄ x7 H ₂ O	0.025 g
NaHCO ₃	0.035 g
Distile su	100 ml

pH:7.4± 0.02

Distile su içerisinde çözülüp pH'sı ayarlanan çözelti 121 °C'de 1 atmosfer basınçta 15 dk steril edilmiştir. +4 °C'de 30 gün saklanabilmektedir.

3.7.17. Ac Tamponu

L. pneumophila bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitleri üzerine patojenitesini belirlemek için yapılan deneylerde yıkama tamponu olarak kullanılmıştır (Moffat ve Tompkins, 1992).

0.4 M $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	10 ml
0.05 M CaCl_2	8 ml
0.1 M sodyum sitrat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$	34 ml
0.005 M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
0.25 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
0.25 M KH_2PO_4	10 ml
Distile su	1000 ml

pH: 6.5 ± 0.02

Distile su içerisinde çözülüp pH'sı ayarlanan çözelti 121°C 'de 1 atmosfer basınçta 15 dk steril edilmiştir. Çözelti $+4^\circ\text{C}$ 'de 30 gün saklanabilmektedir.

3.7.18. Kromik Asit Çözeltisi

Mikroskopik inceleme amacı ile kullanılan lamaların temizliği için hazırlanmıştır (Clark, 1976).

Potasyum bikromat	20 g
Sülfirik asit	100 ml
Distile su	100 ml

Distile su içinde çözülen potasyum bikromat çözeltisinin üzerine dikkatli bir biçimde sülfirik asit çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında rengi turuncudan yeşile dönene kadar saklanarak kullanılabilmektedir.

3.7.19. Leifson'un Flagella Boyası

L. pneumophila bakterilerinin flagella yapılarının ışık mikroskopunda incelenmesi için kullanılan boyadır (Leifson, 1951).

Tannik asit	1 g
NaCl	0.5 g
Bazik fuksin	0.4 g
Absolü alkol	33 ml
Distile su	67 ml

Tannik asit, NaCl ve bazik fuksin absolü alkol içerisinde bir havan yardımıyla iyice çözülmüştür. Karışım distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra pH:5'e ayarlanmıştır. Karışım $+4^\circ\text{C}$ 'de 2-3 hafta saklanabilmektedir.

3.7.20. Leifson'un Metilen Mavisi

L. pneumophila bakterilerinin flagella yapılarının ışık mikroskopunda incelenmesi için zıt boya olarak kullanılmıştır (Leifson, 1951).

Metilen mavisi	1.5 g
Absolü alkol	100 ml

Bir havan yardımı ile iyice çözölen boya 1 gece oda sıcaklığında bekletilip süzölmüştür. Boya hava geçirmeyen bir şişede uzun süre saklanabilmektedir.

3.7.21. Giemenez'in Karbol Fuksini

L. pneumophila bakterilerinin konak hücreler ile olan ilişkilerini ışık mikroskopunda incelemek için hazırlanan preparatların boyanmasında kullanılmıştır (Garduno ve diğ., 2002).

0,1 M NaH ₂ PO ₄ (pH:7,5)	8.75 ml
0,1 M Na ₂ HPO ₄ (pH:7,5)	38.75 ml
Bazik fuksin	1 g
% 5'lik fenol	10 ml
Absolü alkol	10 ml

Taze olarak hazırlanan boya 0.22 µm por çaplı filtreden süzölerek kullanılmıştır.

3.7.22. % 1'lik Malaşit Yeşili

L. pneumophila bakterilerinin konak hücreler ile olan ilişkilerini ışık mikroskopunda incelemek için Giemenez'in karbol fuksininin zıt boyası olarak kullanılmıştır (Garduno ve diğ., 2002).

Malaşit yeşili	0.8 g
Distile su	10 ml

Hazırlanan boya 0.22 µm por çaplı filtreden süzölerek kullanılmıştır. Oda sıcaklığında 6 ay saklanabilmektedir.

3.7.23. Acridine Orange Boyası

L. pneumophila bakterilerinin konak hücre ile olan ilişkilerini epifloresan mikroskopunda incelemek için hazırlanan preparatların boyanmasında kullanılmıştır (Cirillo ve diğ., 1999).

0.2 M asetik asit	14.8 ml
0.2 M sodyum asetat	35.2 ml
% 1'lik acridine orange süspansiyonu	0.5 ml

Karanlık ortamda hazırlanan boya hemen kullanılmaktadır.

4. BULGULAR

4.1. *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN STATİK KOŞULLAR ALTINDA TUTUNMA VE BİYOFİLM İÇİNDE ÜREME YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ

4.1.1. Tutunma Kapasitesinin İncelenmesi

96 kuyucuklu mikropleytlerde yapılan deney sonucunda *L. pneumophila* bakterilerinin tutunma kapasitelerinin 6. ve 24. saatlerde anlamlı ölçüde ($p<0.05$) arttığı görülmektedir (Tablo 4.1). Standart *L. pneumophila* bakterisi (ATCC 33152) ile izolatlar arasında tutunma kapasitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Stepanovic ve diğ. (2000) tarafından tanımlanan kriterler göz önünde bulundurulduğunda, 6. saat sonunda tutunma kapasitesi en yüksek olan bakterinin izolat 4 olduğu, bunu sırasıyla ATCC 33152, izolat 1=2=6, 5=8, 3=7=9'un takip ettiği saptanmıştır. Absorbans değerleri göz önünde bulundurulduğunda 24. saatte izolat 4 dışındaki tüm bakterilerin orta derecede tutunma kapasitesi gösterdiği, güçlü tutunma kapasitesi gösteren 4 numaralı izolatı ise sırasıyla 2=7, ATCC 33152 ve 1, 3=9, 5, 8, 6 numaralı izolatların takip ettiği saptanmıştır (Şekil 4.1).

Tablo 4.1: *L. pneumophila* bakterilerinin tutunma kapasiteleri

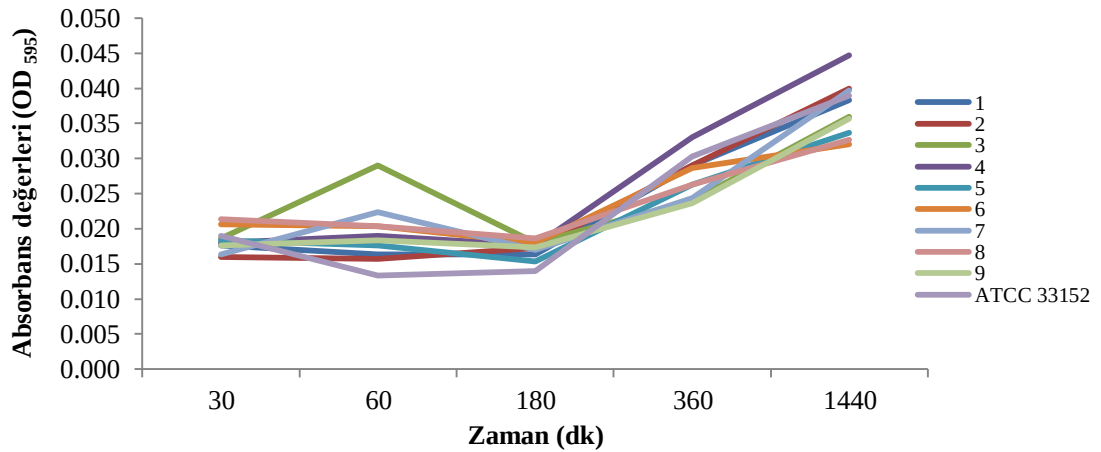
Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₅₉₅)				
	Zaman (dk)				
	30	60	180	360	1440
1	0.018±0.002 ^b	0.016±0.005 ^b	0.016±0.003 ^a	0.029±0.003 ^b	0.038±0.002 ^c
2	0.016±0.002 ^b	0.016±0.002 ^b	0.017±0.003 ^b	0.029±0.006 ^b	0.040±0.003 ^c
3	0.019±0.004 ^b	0.029±0.008 ^c	0.018±0.003 ^b	0.024±0.005 ^b	0.036±0.002 ^c
4	0.018±0.003 ^b	0.021±0.002 ^b	0.020±0.001 ^b	0.033±0.008 ^c	0.045±0.001 ^d
5	0.018±0.005 ^b	0.018±0.010 ^b	0.015±0.001 ^a	0.026±0.003 ^b	0.034±0.001 ^c
6	0.021±0.005 ^b	0.020±0.006 ^b	0.018±0.003 ^b	0.029±0.001 ^b	0.032±0.002 ^c
7	0.016±0.001 ^b	0.022±0.003 ^b	0.017±0.007 ^b	0.024±0.005 ^b	0.040±0.001 ^c
8	0.021±0.004 ^b	0.020±0.009 ^b	0.019±0.005 ^b	0.026±0.007 ^b	0.033±0.006 ^c
9	0.018±0.006 ^b	0.018±0.005 ^b	0.017±0.002 ^b	0.024±0.001 ^b	0.036±0.002 ^c
ATCC 33152	0.019±0.003 ^b	0.013±0.002 ^a	0.014±0.003 ^a	0.030±0.005 ^b	0.039±0.004 ^c

a :non-aderent

b :zayıf tutunma kapasitesi

c :orta derecede tutunma kapasitesi

d :güçlü tutunma kapasitesi

Şekil 4.1: *L. pneumophila* bakterilerinin tutunma kapasiteleri

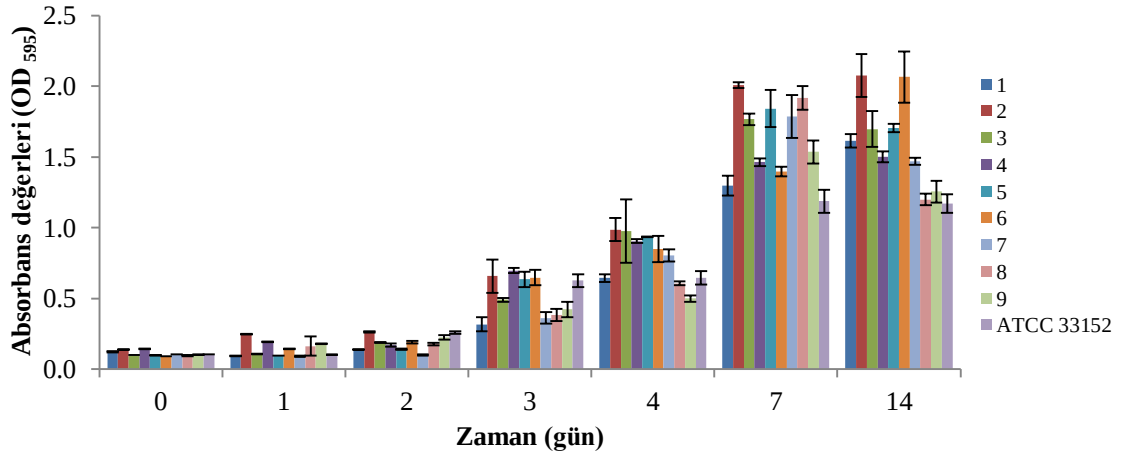
4.1.2. Biyofilm İçerisinde Üreme Kapasitesinin İncelenmesi

Tutunma için 6 saat beklendikten sonra uygun oranlarda steril BYEB besiyeri eklenen ortamlarda 14 gün boyunca takip edilen *L. pneumophila* bakterilerinin biyofilm tabakası içerisinde üreme kapasiteleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de verilmiştir. Standart bakteri ile izolatlar arasında biyofilm oluşturma kapasiteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.2: *L. pneumophila* bakterilerinin biyofilm içerisinde üreme kapasiteleri

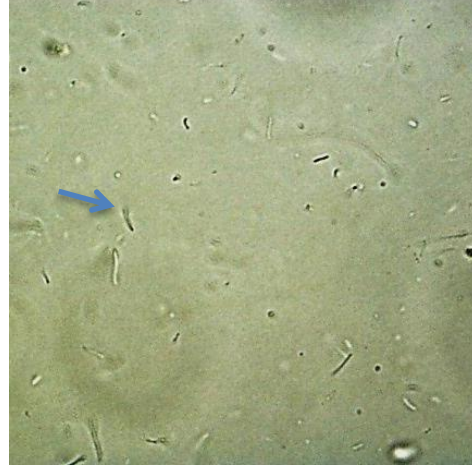
Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₅₉₅)						
	Zaman (gün)						
	0	1	2	3	4	7	14
1	0.123±0.004	0.095±0.001	0.140±0.001	0.318±0.051	0.644±0.028	1.297±0.070	1.614±0.048
2	0.139±0.001	0.248±0.002	0.264±0.006	0.659±0.117	0.982±0.081	2.008±0.020	2.076±0.153
3	0.101±0.001	0.109±0.001	0.189±0.001	0.491±0.015	0.975±0.223	1.767±0.042	1.698±0.127
4	0.145±0.001	0.193±0.003	0.172±0.011	0.698±0.019	0.905±0.014	1.463±0.026	1.499±0.038
5	0.099±0.001	0.096±0.001	0.143±0.005	0.635±0.052	0.935±0.002	1.841±0.131	1.704±0.028
6	0.093±0.001	0.144±0.002	0.192±0.010	0.648±0.053	0.851±0.093	1.397±0.035	2.065±0.180
7	0.105±0.001	0.092±0.004	0.102±0.004	0.363±0.042	0.804±0.042	1.785±0.151	1.471±0.025
8	0.098±0.004	0.184±0.069	0.180±0.009	0.384±0.043	0.608±0.013	1.917±0.084	1.200±0.042
9	0.103±0.001	0.182±0.002	0.226±0.016	0.423±0.054	0.500±0.023	1.536±0.082	1.256±0.078
ATCC 33152	0.105±0.001	0.104±0.004	0.262±0.009	0.626±0.045	0.646±0.046	1.188±0.082	1.171±0.067

Sonuçlar incelendiğinde ATCC 33152 bakterisinin biyofilm içerisinde sayısını 2 günde arttırdığı, izolatların ise anlamlı ($p<0.05$) bir artışa ancak 3. günde ulaştıkları tespit edilmiştir. 14 günlük bekleme süresi sonunda biyofilm yoğunluğunu en fazla arttıran bakterinin 2 numaralı izolat olduğu, bunu izolat 6'nın takip ettiği ancak istatistiksel olarak izolat 2 ile 6 arasında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır. *L. pneumophila* bakterilerinin 14. günde biyofilm içerisinde üreme kapasiteleri kıyaslandığında biyofilm içerisinde en fazla çoğalan bakteri olan izolat 2'yi sırasıyla izolat 6, 5, 3, 1, 4, 7, 9, 8 ve ATCC 33152 bakterisinin takip ettiği saptanmıştır (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2).

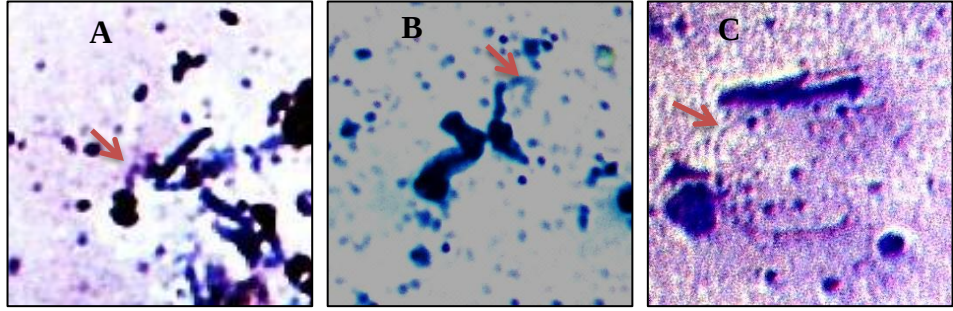
Şekil 4.2: *L. pneumophila* bakterilerinin biyofilm içerisinde üreme kapasiteleri

4.2. *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN HAREKETLERİNİN VE FLAGELLA YAPILARININ IŞIK MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ

Lam-lamel arası canlı inceleme metodu kullanılarak yapılan incelemelerde tüm bakterilerin hareketli olduğu saptanmıştır. Taze bakteri kültürlerinden hazırlanan preparatlar flagella boyası ile boyanarak incelendiğinde ise tüm bakterilerin polar flagellaya sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3: *L. pneumophila* bakterisinin lam-lamel arası canlı inceleme görüntüsü (izolat 2) (100x)



Şekil 4.4: *L. pneumophila* bakterilerinin flagella boyama görüntüleri (A: izolat 2; B:izolat 6; C: ATCC 33152) (100x)

4.3. *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN HEMAGLUTİNASYON YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ

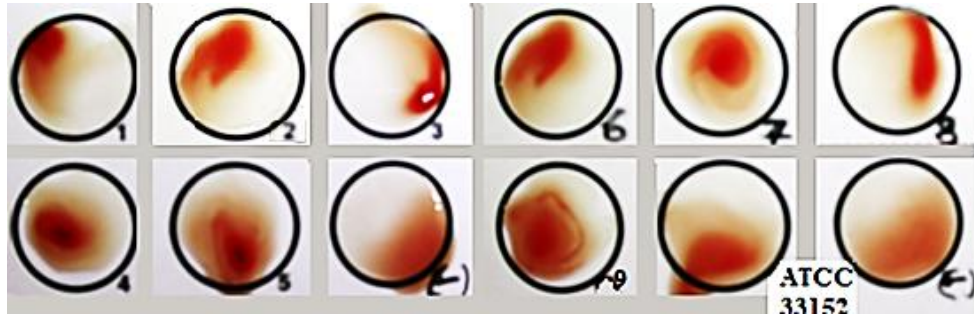
L. pneumophila bakterilerinin tip IV fimbriyaya sahip olup olmadıkları lamda tannik asit kaplanmamış eritrositlerle hemaglutinasyon deneyleri ile incelenmiştir. Deney sonuçları incelendiğinde tüm bakterilerin insan eritrositleri ile hemaglutinasyon oluşturdukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte izolat 1, 2, 4 ve 5'in 2 dk içerisinde,

izolat 6 ve 7'nin ise 10 dk içerisinde güçlü hemaglutinasyon gösterdikleri saptanmıştır (Tablo 4.3). Bununla birlikte en hızlı hemaglutinasyon izolat 2'de kaydedilmiştir.

Tablo 4.3: *L. pneumophila* bakterilerinin hemaglutinasyon özellikleri

Bakteri no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	ATCC 33152
Hemaglutinasyon şiddeti	++++	++++	++	++++	++++	+++	+++	+	+	++

MR-HA özelliğini incelemek amacıyla % 2 D-mannoz içeren PBS içerisinde hazırlanan % 3'lük insan eritrositleri ile *L. pneumophila* bakteri süspansiyonlarının hemaglutinasyon oluşturma dereceleri incelenmiştir. Deney sonucunda, tüm bakterilerin 2 dk içerisinde MR-HA oluşturduğu, dolayısıyla tip IV fimbriyaya sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: *L. pneumophila* bakterilerinin MR-HA özellikleri

4.4. *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİNİN ENZİMATİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Tez çalışması kapsamında standart ATCC 33152 bakterisi ile dokuz *L. pneumophila* izolatının tip II sekresyon sistemi içerisinde değerlendirilen farklı enzimatik aktiviteleri incelenmiştir. *L. pneumophila* bakterilerinin insan ve koyun eritrositleri üzerindeki hemoliz yeteneği ile proteaz aktivitesi, taze kültür ile çalışılmıştır. Bununla birlikte bakterilerin sekrete nükleaz aktiviteleri süpernatantlarla; fosfolipaz A ve C, asit ve alkali fosfataz ile lipaz aktiviteleri ise süpernatant ve hücre lizatları ile incelenmiştir.

4.4.1. Hemolitik Aktivitenin İncelenmesi

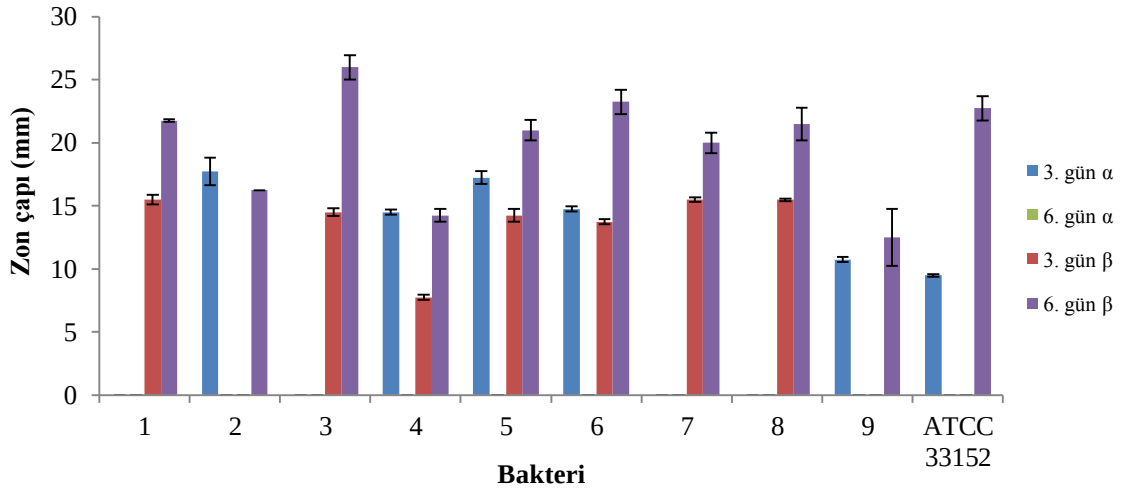
Hemolitik aktivite deneyleri, geç logaritmik faza kadar üretilen *L. pneumophila* kültürlerinin % 5 insan veya koyun eritrositi içeren eBYEA besiyerine batırma yöntemiyle ekilmesi ile çalışılmıştır. 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ içeren nemli ortamda 3 ve 6 günlük bekleme süreleri sonunda besiyerlerinde oluşan alfa ve beta hemoliz zonları ölçülmüştür.

4.4.1.1. Koyun Eritrositi İçeren eBYEA Besiyeri Üzerinde Hemolitik Aktivitenin İncelenmesi

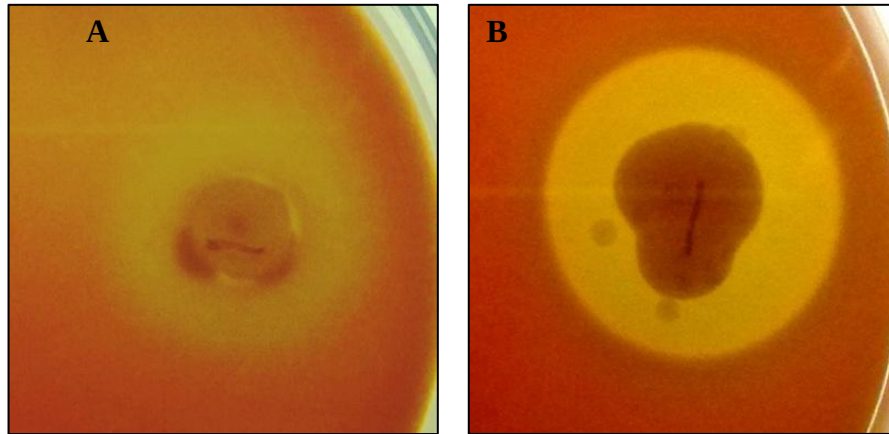
% 5 koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerine ekilen bakterilerin 3 ve 6 günlük bekleme süreleri sonunda ölçülen hemoliz zonları Tablo 4.4'te gösterilmiştir. 3. günde 1, 3, 7 ve 8 numaralı izolatların, 6. günde ise bakterilerin hiçbirinin α -hemoliz oluşturmadığı saptanmıştır. Üç günlük üreme sonunda bakterilerin β -hemolitik aktivite açısından 1=7=8>3>5=6>4, altıncı günde ise 3>6=ATCC 33152>1=8>5>7>2>4>9 şeklinde sıralama gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.4 ve Şekil 4.6). 3 günlük inkübasyon sonunda sadece α -hemoliz oluşturan standart ATCC 33152 bakterisi ile 2 ve 9 numaralı izolatların inkübasyonun 6. gününde β -hemolitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.7).

Tablo 4.4: Koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde *L. pneumophila* bakterilerinin hemolitik aktiviteleri

Bakteri no	Hemoliz tipleri ve zon çapları (mm)			
	3. gün		6. gün	
	α	β	α	B
1	0±0	16±3	0±0	22±1
2	18±1	0±0	0±0	16±1
3	0±0	15±1	0±0	26±1
4	15±3	8±1	0±0	14±1
5	17±1	14 ±1	0±0	21±1
6	15±1	14±1	0±0	23±1
7	0±0	16±1	0±0	20±1
8	0±0	16±1	0±0	22±1
9	11±3	0±0	0±0	13±2
ATCC 33152	10±1	0±0	0±0	23±1



Şekil 4.6: Koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde *L. pneumophila* bakterilerinin hemolitik aktiviteleri



Şekil 4.7: Koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde farklı hemoliz görünümleri [A: 3. gündeki α hemoliz zonu (izolat 2); B: 6. gündeki β hemoliz zonu (izolat 2)]

L. pneumophila bakterilerinin koyun eritrositleri üzerine hemolitik indeksleri değerlendirildiğinde 3. gün izolat 2'nin en güçlü α hemolitik aktiviteye sahip olduğu ve bunu izolat 5, 4, 6, ATCC 33152 ve izolat 9'un takip ettiği belirlenmiştir. β hemolitik aktivite açısından ise izolat 7'nin 3. gün, izolat 3'ün ise 6. gün en güçlü aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde *L. pneumophila* bakterilerinin hemolitik indeksleri

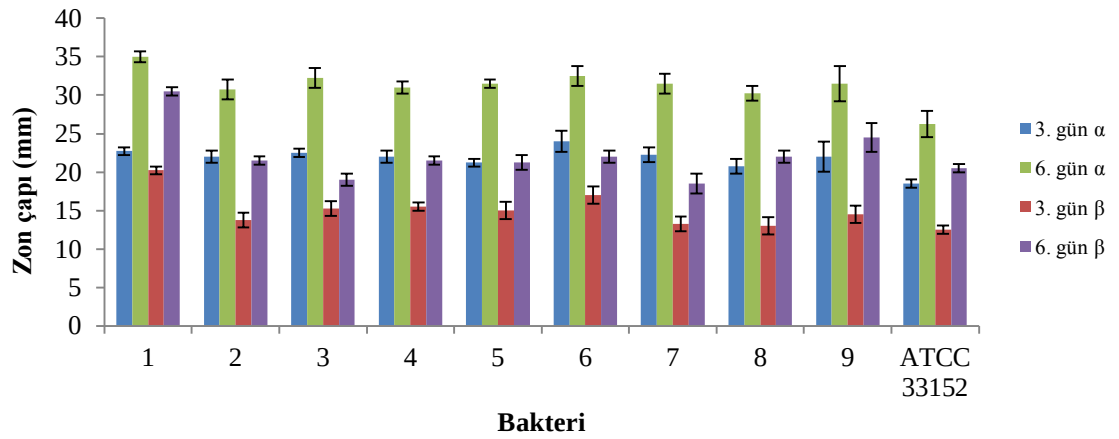
Bakteri no	3. gün		6. gün	
	α	β	α	β
1	0	2.2±0.4	0	2.0±0.1
2	2.8±1.1	0	0	1.5±0.0
3	0	2.0±0.3	0	3.2±0.5
4	2.3±0.2	1.3±0.2	0	1.8±0.1
5	2.7±0.5	2.2±0.5	0	2.5±0.1
6	2.2±0.2	2.1±0.2	0	3.0±0.1
7	0	2.3±0.2	0	2.6±0.1
8	0	2.2±0.1	0	2.3±0.1
9	1.7±0.2	0	0	1.4±0.1
ATCC 33152	1.9±0.1	0	0	2.4±0.1

4.4.1.2. İnsan Eritrositi İçeren eBYEA Besiyeri Üzerinde Hemolitik Aktivitenin İncelenmesi

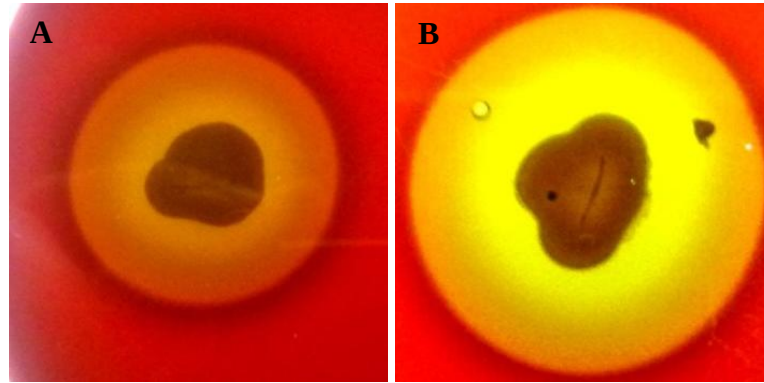
L. pneumophila bakterilerinin % 5 insan eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde üç ve altı günlük bekleme süreleri sonundaki hemolitik aktivite sonuçları Tablo 4.6’da verilmiştir. İncelenen tüm bakterilerin 3 ve 6 günlük bekleme süreleri sonunda α ve β hemolitik aktivite gösterdikleri görülmüştür. 6 numaralı izolatın 3. günde, 1 numaralı izolatın ise 6. günde en güçlü α hemolitik aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır (Şekil 4.8). Aynı zamanda 1 numaralı izolatın 3. ve 6. günlerde en güçlü β hemolitik aktiviteye de sahip olduğu tespit edilmiştir. Gerek α gerekse β hemolitik aktivite açısından izolatların çoğunun ATCC 33152 bakterisinden daha büyük çapta hemoliz zonları oluşturdukları belirlenmiştir (Şekil 4.8 ve 4.9).

Tablo 4.6: İnsan eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde *L. pneumophila* bakterilerinin hemolitik aktiviteleri

Bakteri no	Hemoliz türleri ve zon çapları (mm)			
	3. gün		6. gün	
	α	β	α	β
1	23±0.5	20±0.5	35±0.7	31±0.6
2	22±0.8	14±1	31±1.3	22±0.6
3	23±0.6	15±1	32±1.3	19±0.8
4	22±0.8	16±0.6	31±0.8	22±0.6
5	21±0.5	15±1.2	32±0.6	21±1
6	24±1.4	17±1.2	33±1.3	22±0.8
7	22±1	13±1	32±1.3	19±1.3
8	21±1	13±1.2	30±1	22±0.8
9	22±2	15±1.2	32±2.3	25±1.9
ATCC 33152	19±0.6	13±0.6	26±1.7	21±0.6



Şekil 4.8: İnsan eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde *L. pneumophila* bakterilerinin hemolitik aktiviteleri



Şekil 4.9: İnsan eritrositi içeren eBYEA besiyeri üzerinde farklı hemoliz görünümleri [A: 3. günde α ve β hemoliz zonları (izolat 3); B: 6. günde α ve β hemoliz zonları (izolat 6)]

Deneyde kullanılan *L. pneumophila* bakterilerinin insan eritrositleri üzerine hemolitik aktivitesi hemolitik indeks hesaplanarak incelendiğinde tüm bakterilerin hemolitik aktiviteye sahip oldukları, 3. ve 6. günde en güçlü α ve β hemolitik aktivite gösteren bakterinin ise izolat 1 olduğu saptanmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: İnsan eritrositi içeren eBYEA üzerinde *L. pneumophila* bakterilerinin hemolitik indeksleri

Bakteri no	3. gün		6. gün	
	α	β	α	β
1	2.8±0.1	2.5±0.1	3.5±0.4	2.8±0.1
2	2.3±0.1	1.5±0.2	2.9±0.1	2.0±0.1
3	2.7±0.1	1.8±0.1	3.3±0.1	2.0±0.1
4	2.6±0.1	1.8±0.1	3.2±0.2	2.3±0.1
5	2.0±0.1	1.4±0.0	2.9±0.1	1.9±0.1
6	2.3±0.1	1.6±0.0	2.8±0.1	1.9±0.1
7	2.2±0.1	1.3±0.1	3.0±0.1	1.8±0.1
8	2.1±0.1	1.3±0.1	2.6±0.1	1.9±0.1
9	2.6±0.2	1.7±0.0	3.4±0.1	2.7±0.1
ATCC 33152	2.3±0.1	1.6±0.1	3.1±0.1	2.4±0.1

4.4.2. Proteaz Aktivitesinin İncelenmesi

L. pneumophila bakterilerinin enzimatik aktiviteleri API ZYM test sistemi kullanılarak Tablo 4.8’de belirtilen özelliklere göre de değerlendirilmiştir. Bakterilerin proteaz aktivitelerini değerlendirmek amacıyla striplerdeki 6, 7, 8, 9 ve 10 no’lu küpüller kullanılmıştır. *L. pneumophila* bakterilerinin lösin, valin ve sistin üzerinde proteolitik aktiviteye sahip oldukları, ancak tripsin ve kimotripsin enzimlerine sahip olmadıkları belirlenmiştir (Tablo 4.8). Proteaz aktivitesi en zayıf olan bakterinin valin ve sistin aminoasitlerini kullanamayan izolat 2 olduğu saptanmıştır. Proteaz aktivitesi yanında stripde yer alan küpüllerdeki diğer reaksiyonlar değerlendirildiğinde bakterilerin fosfataz, fosfohidrolaz ve esteraz aktivitesine sahip olduğu, 2-naftil-miristat üzerinde lipaz aktivitesine sahip olmadıkları ve stripde yer alan şekerleri kullanamadıkları tespit edilmiştir.

API ZYM test sistemi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde en güçlü enzimatik aktivite 6 numaralı izolatta tespit edilmiştir. İzolat 5 ile 8’e ait test sonuçları benzerlik gösterirken 3, 4, 6 ve 7 numaralı izolatların da standart ATCC 33152 bakterisi ile benzer enzimatik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 4.8 ve Şekil 4.10).

Tablo 4.8: *L. pneumophila* bakterilerine ait API ZYM sonuçları

Bakteri no	Küpül no																			
	1	2	3	4	5	6*	7*	8*	9*	10*	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	-	+	+	x	-	+	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	x	x	-	x	-	-	-	-	x	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	x	x	-	+	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	x	x	-	+	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	x	x	-	+	x	x	-	-	+	x	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	x	x	-	+	+	x	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	x	x	-	+	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	x	x	-	+	x	x	-	-	+	x	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	+	x	-	+	x	x	-	-	x	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 33152	-	+	x	x	-	+	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-

*: proteaz enzimleri
 +: güçlü pozitif sonuç
 x: pozitif sonuç
 -: negatif sonuç



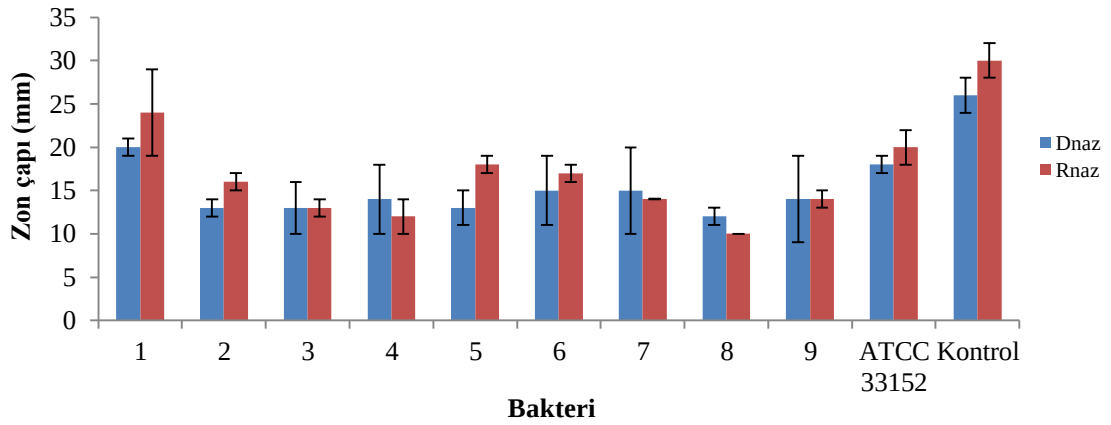
Şekil 4.10: *L. pneumophila* bakterilerine ait API ZYM stripleri (Yukarıdan aşağıya sırasıyla izolat 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve ATCC 33152)

4.4.3. Nükleaz Aktivitesinin İncelenmesi

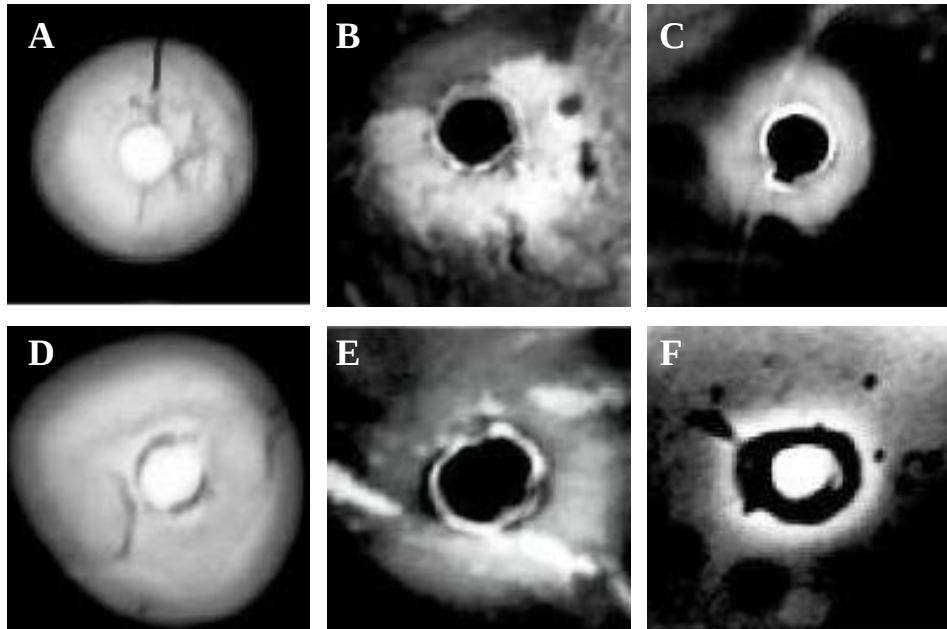
L. pneumophila bakterilerinin nükleaz aktivitesini belirlemek amacıyla % 0.15 RNA veya % 0.1 DNA içeren Noble agar kullanılmıştır. *L. pneumophila* süpernatantlarının pozitif kontrole kıyasla daha küçük nükleaz zonları oluşturdukları tespit edilmiştir. Zon çapları incelendiğinde izolat 1'in en güçlü DNaz (20 mm zon çapı) ve RNaz aktivitesine (24 mm zon çapı), 8 numaralı izolata ise en zayıf DNaz ve RNaz (sırasıyla 12 ve 10 mm zon çapı) aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 4.9, Şekil 4.11 ve 4.12).

Tablo 4.9: *L. pneumophila* süpernatantlarının nükleaz aktiviteleri

Bakteri no	Zon çapları (mm)	
	DNaz	RNaz
1	20±1	24±5
2	13±1	16±1
3	13±3	13±1
4	14±4	12±2
5	13±2	18±1
6	15±4	17±1
7	15±5	14±0
8	12±1	10±0
9	14±5	14±1
ATCC 33152	18±2	20±2
Pozitif kontrol	26±1	30±2



Şekil 4.11: *L. pneumophila* süpernatantlarının nükleaz aktiviteleri



Şekil 4.12: *L. pneumophila* süpernatantlarının farklı nükleaz aktivite görüntüleri [A: DNaz pozitif; B ve C: DNaz aktivitesi (sırasıyla izolat 1 ve 8); D: RNaz pozitif; E ve F: RNaz aktivitesi (sırasıyla izolat 1 ve 8)]

4.4.4. Fosfolipaz A Aktivitesinin İncelenmesi

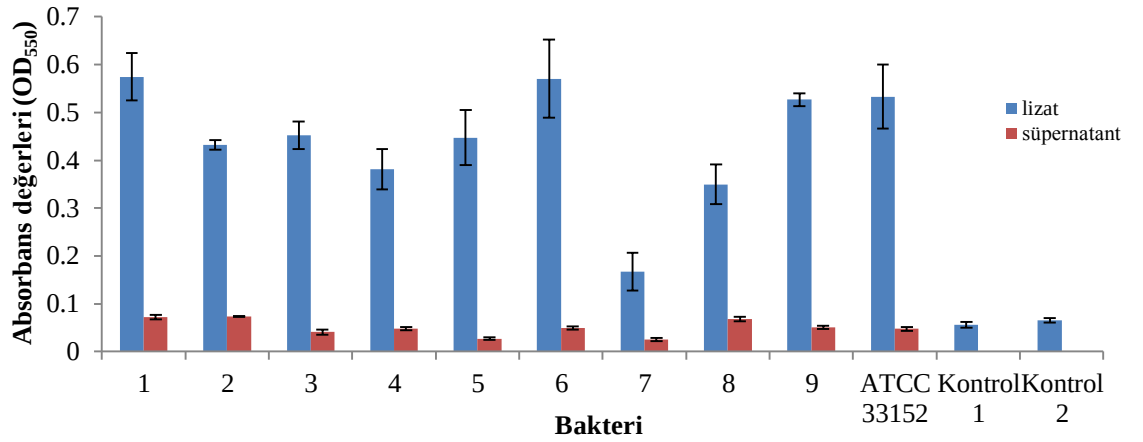
Fosfolipaz A (PLA) aktivitesinin belirlenmesi amacıyla *L. pneumophila* hücre lizatları ve süpernatantlarının dipalmitoilfosfatidilkolin'den serbest yağ asidi oluşturma yetenekleri incelenmiştir (Tablo 4.10 ve Şekil 4.13). Açığa çıkan serbest yağ asidi miktarı NEFA HR test kiti yardımıyla spektrofotometrik olarak ölçülmüş, sonuçlar standart oleik asit eğrisi göz önünde bulundurularak yorumlanmıştır. İzolat 1 ve 6'ya ait hücre lizatlarının standart ATCC 33152 bakterisine kıyasla daha güçlü enzimatik etki gösterdiği ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$).

Bununla birlikte güçlü enzimatik aktivite gösteren bu izolatlar ile diğer bakteriler arasında ise PLA aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır. En zayıf PLA aktivitesi ise 7 numaralı izolatın hücre lizatında kaydedilmiştir.

L. pneumophila süpernatantlarının PLA aktivitesi pozitif kontroller ile kıyaslandığında sadece izolat 1, 2 ve 8'in hücre dışına PLA enzimi salgıladığı belirlenmiştir. Ancak izolat 1 ile 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), izolat 8 ile her iki bakteri arasında ise anlamlı bir fark bulunduğu ($p<0.05$) saptanmıştır. Bu durum izolat 1 ile 2'nin benzer sekrete PLA aktivitesine sahip olduğu şeklinde yorumlanmaktadır.

Tablo 4.10: *L. pneumophila* hücre lizatları ile süpernatantlarının fosfolipaz A aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₅₅₀)		Açığa çıkan yağ asiti miktarı (μmol)	
	lizat	süpernatant	lizat	süpernatant
1	0.574±0.049	0.074±0.004	19.2±0.9	1.5±0.0
2	0.432±0.009	0.073±0.001	14.2±0.0	1.4±0.0
3	0.452±0.028	0.041±0.006	15.1±0.6	0.8±0.0
4	0.381±0.041	0.048±0.004	12.5±0.8	0.9±0.0
5	0.447±0.057	0.027±0.003	14.6±1.0	0.6±0.0
6	0.570±0.081	0.049±0.004	19.2±1.5	0.9±0.0
7	0.167±0.039	0.025±0.004	5.1 ± 0.8	0.6±0.0
8	0.349±0.041	0.068±0.004	11.2±0.8	1.1±0.0
9	0.526±0.013	0.050±0.004	17.6±0.4	0.9±0.0
ATCC 33152	0.533±0.066	0.047±0.004	17.7±1.1	0.8±0.0
Kontrol 1	0.056±0.004		1±0.0	
Kontrol 2	0.065±0.001		1.1±0.0	



Şekil 4.13: *L. pneumophila* hücre lizatları ve süpernatantlarının PLA aktiviteleri

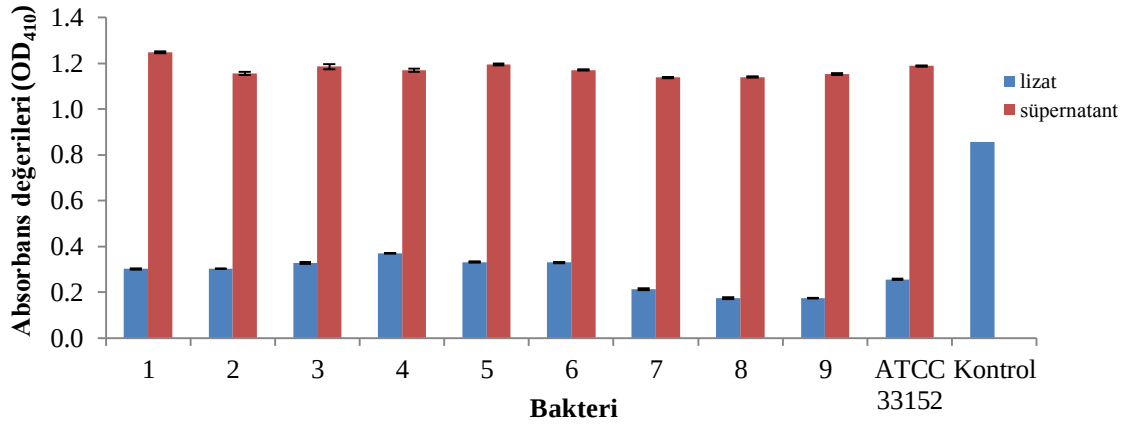
4.4.5. Fosfolipaz C Aktivitesinin İncelenmesi

L. pneumophila bakterilerinin fosfolipaz C (PLC) aktivitesini belirlemek amacıyla hücre lizatları veya süpernatantları ile p-nitrofenilfosforilkolin (pNPPC) bir araya getirilmiş ve bir gece sonra açığa çıkan p-nitrofenol (pNP) miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Absorbans değerleri göz önünde bulundurulduğunda *L. pneumophila* bakterilerine ait hücre lizatlarının kontrolle kıyasla PLC aktivitesi göstermediği saptanmıştır. PLC aktivitesi bakımından en güçlü enzimatik aktiviteyi izolat 1'in süpernatantının gösterdiği, bunu sırasıyla izolat 5, ATCC 33152, izolat 3, 4, 6, 2, 9, 8, 7'nin takip ettiği saptanmıştır (Tablo 4.11 ve Şekil 4.14). *L. pneumophila* bakterilerinin hücre lizatlarının kontrole kıyasla daha düşük oranda pNP açığa çıkardığı saptanmıştır.

Aragon ve diğ. (2000), PLC aktivitesini değerlendirmek için dakikada 1 nM pNP açığa çıkartan enzim miktarının 1 ünite olduğunu belirtmişlerdir. Buradan yola çıkarak standart pNP eğrisi göz önünde bulundurularak sonuçlar değerlendirildiğinde en güçlü enzimatik aktivitenin hücre lizatları içerisinde izolat 4'e (3 ünite), süpernatantlar arasında ise izolat 1'e (600 ünite) ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca enzim miktarları göz önünde bulundurulduğunda izolat 7, 8 ve 9 dışındaki tüm *L. pneumophila* hücre lizatlarında zayıf bir PLC aktivitesi bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: *L. pneumophila* hücre lizatları ve süpernatantlarının PLC aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)		Enzimatik aktivite (ünite)	
	lizat	süpernatant	lizat	süpernatant
1	0.301±0.002	1.248±0.005	2	600
2	0.303±0.002	1.157±0.007	2	300
3	0.328±0.004	1.186±0.010	2	400
4	0.369±0.003	1.171±0.007	3	400
5	0.332±0.003	1.195±0.003	2	500
6	0.329±0.003	1.170±0.003	2	400
7	0.212±0.004	1.138±0.004	0	200
8	0.174±0.005	1.140±0.003	0	200
9	0.173±0.002	1.154±0.005	0	300
ATCC 33152	0.255±0.003	1.188±0.003	1	400
Kontrol	0.857±0.073		50	



Şekil 4.14: *L. pneumophila* hücre lizatları ve süpernatantlarının PLC aktiviteleri

4.4.6. Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi

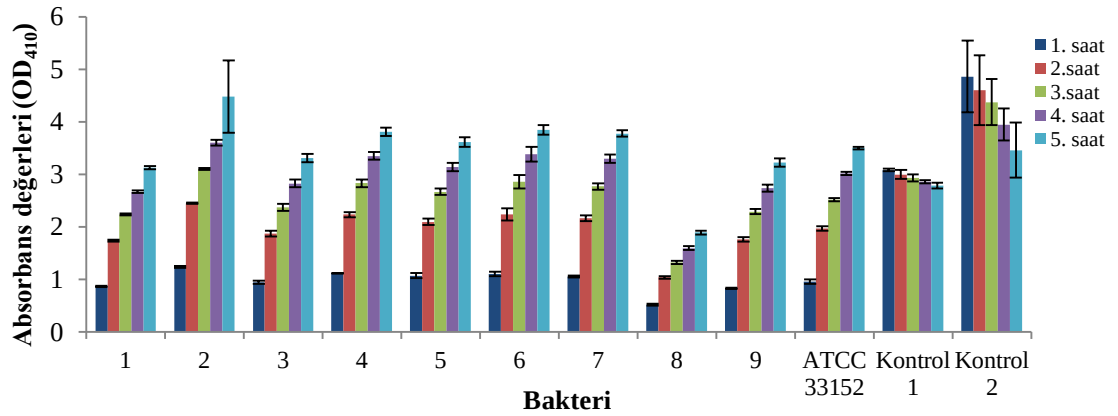
4.4.6.1. Alkali Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi

Alkali fosfataz aktivitesinin saptanması amacıyla hücre lizatları ve süpernatantlarının pH 10'a ayarlanmış ortamda p-nitrofenilfosfattan pNP açığa çıkarma kapasiteleri incelenmiştir.

Sonuçlar standart pNP eğrisine göre değerlendirildiğinde *L. pneumophila* hücre lizatlarının alkali fosfataz aktivitesinin zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Standart bakteri ile izolatların hücre lizatlarının alkali fosfataz aktiviteleri karşılaştırıldığında sonuçlar arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) ve tüm ölçüm sürelerinde en güçlü enzimatik aktivitenin izolat 2'ye, en zayıf etkinin ise izolat 8'e ait olduğu saptanmıştır (Tablo 4.12, Şekil 4.15).

Tablo 4.12: *L. pneumophila* hücre lizatlarının alkali fosfataz aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)					Enzimatik aktivite (ünite)				
	1. saat	2.saat	3.saat	4. saat	5. saat	1. saat	2.saat	3.saat	4. saat	5. saat
1	0.86±0.01	1.74±0.02	2.24±0.02	2.67±0.02	3.12±0.03	383.333	466.667	388.889	354.167	326.667
2	1.23±0.02	2.45±0.01	3.10±0.02	3.61±0.05	4.48±0.69	583.333	641.667	555.556	475.000	483.333
3	0.94±0.03	1.87±0.06	2.37±0.06	2.83±0.08	3.31±0.08	416.667	475.000	400.000	379.167	346.667
4	1.11±0.01	2.23±0.05	2.83±0.07	3.35±0.07	3.81±0.08	566.667	583.333	505.556	441.667	456.667
5	1.07±0.04	2.10±0.06	2.67±0.06	3.14±0.08	3.61±0.09	550.000	575.000	472.222	408.333	380.000
6	1.11±0.03	2.24±0.11	2.86±0.13	3.38±0.14	3.84±0.09	566.667	583.333	505.556	445.833	460.000
7	1.05±0.01	2.17±0.06	2.77±0.07	3.30±0.08	3.78±0.06	550.000	583.333	494.444	433.333	393.333
8	0.52±0.01	1.04±0.02	1.33±0.03	1.59±0.03	1.89±0.04	166.667	266.667	200.000	183.333	190.000
9	0.83±0.01	1.76±0.04	2.29±0.05	2.74±0.07	3.22±0.08	383.333	450.000	394.444	366.667	340.000
ATCC 33152	0.95±0.04	1.96±0.04	2.52±0.03	3.02±0.03	3.50±0.02	416.667	491.667	450.000	408.333	370.000
Kontrol 1	3.08±0.05	2.99±0.21	2.93±0.17	2.86±0.09	2.79±0.13	1.666.667	808.333	538.889	379.167	296.667
Kontrol 2	4.86±0.70	4.60±0.66	4.37±0.09	3.95±0.75	3.46±0.31	2.616.667	1.258.333	794.444	583.333	363.333



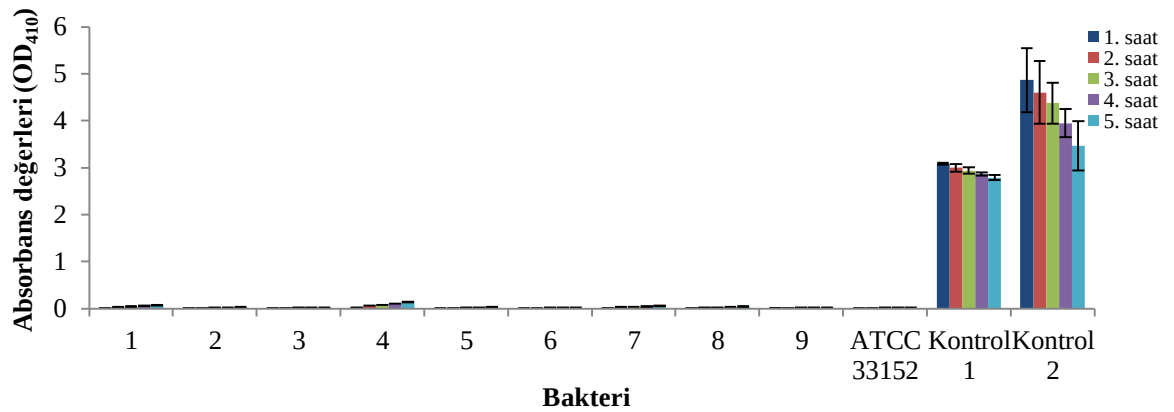
Şekil 4.15: *L. pneumophila* hücre lizatlarının alkali fosfataz aktiviteleri

L. pneumophila süpernatantlarının alkali fosfataz aktivitesi değerlendirildiğinde sadece izolat 4'ün 2. saatten itibaren yaklaşık 1 ünite enzimi hücre dışına saldıgı tespit edilmiştir. Diğer *L. pneumophila* süpernatantlarının alkali fosfataz aktivitesine sahip olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.13 ve Şekil 4.16).

Tablo 4.13: *L. pneumophila* süpernatantlarının alkali fosfataz aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)				
	1. saat	2.saat	3.saat	4. saat	5. saat
1	0.012±0.002	0.030±0.003	0.042±0.004	0.055±0.004	0.072±0.006
2	0.007±0.002	0.012±0.004	0.015±0.004	0.019±0.005	0.023±0.007
3	0.006±0.002	0.013±0.001	0.017±0.002	0.021±0.002	0.024±0.002
4	0.024±0.003	0.059±0.002*	0.081±0.003*	0.106±0.004*	0.137±0.005*
5	0.006±0.003	0.012±0.004	0.017±0.005	0.022±0.005	0.027±0.005
6	0.007±0.001	0.013±0.001	0.016±0.001	0.018±0.002	0.022±0.002
7	0.009±0.001	0.026±0.004	0.033±0.003	0.044±0.006	0.054±0.003
8	0.006±0.002	0.018±0.003	0.025±0.002	0.031±0.001	0.043±0.002
9	0.003±0.002	0.008±0.004	0.013±0.005	0.015±0.005	0.020±0.007
ATCC 33152	0.005±0.001	0.012±0.002	0.016±0.001	0.021±0.001	0.026±0.002
Kontrol 1	3.084±0.059	2.996±0.214	2.934±0.172	2.860±0.085	2.790±0.134
Kontrol 2	4.863±0.705	4.600±0.667	4.372±0.093	3.948±0.751	3.462±0.312

*: Enzimatik aktivite (ünite): pozitif



Şekil 4.16: *L. pneumophila* süpernatantlarının alkali fosfataz aktiviteleri

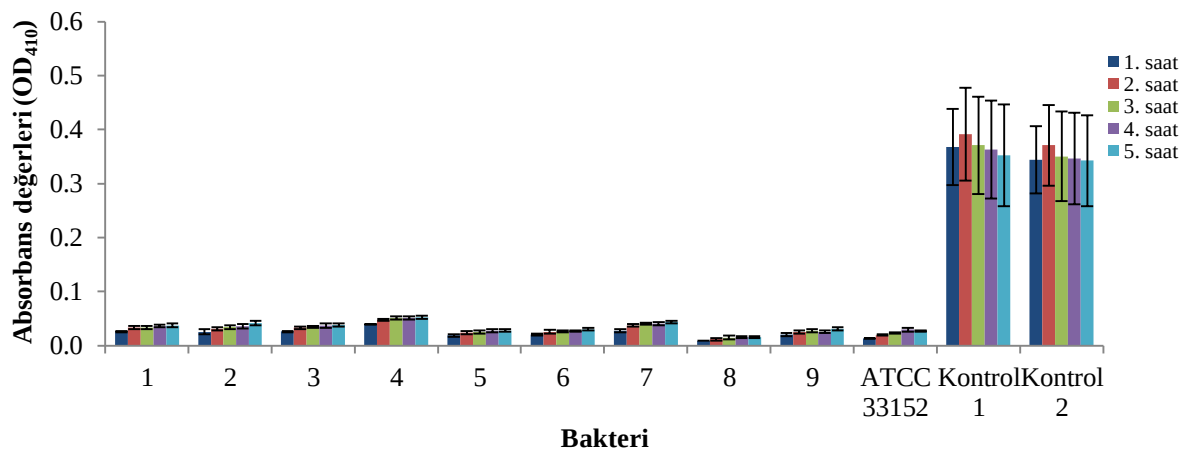
4.4.6.2. Asit Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi

Asit fosfataz aktivitesini tespit etmek amacıyla *L. pneumophila* hücre lizatları veya süpernatantları pH değeri 5'e ayarlanmış 50 mM sitrik asit çözeltisi içerisinde p-nitrofenilfosfat ile bir araya getirilerek açığa çıkan pNP miktarları spektrofotometrik olarak kaydedilmiştir. Tablo 4.14 ve 15'te görüldüğü gibi gerek hücre lizatları gerekse süpernatantlarda asit fosfataz aktivitesi gözlenmemiştir (Şekil 4.17 ve 4.18). Elde edilen sonuçlar pNP standart eğrisi ile değerlendirildiğinde de *L. pneumophila* hücre lizatlarının ve süpernatantlarının asit fosfataz aktivitesine sahip olmadıkları tespit edilmiştir.

Tablo 4.14: *L. pneumophila* hücre lizatlarının asit fosfataz aktiviteleri

Bakteri no*	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)				
	1. saat	2. saat	3. saat	4. saat	5. saat
1	0.025±0.001	0.033±0.003	0.033±0.003	0.036±0.002	0.037±0.003
2	0.026±0.005	0.031±0.003	0.034±0.004	0.036±0.004	0.041±0.004
3	0.026±0.001	0.033±0.002	0.034±0.002	0.037±0.004	0.038±0.003
4	0.039±0.001	0.048±0.002	0.052±0.003	0.051±0.003	0.052±0.003
5	0.019±0.002	0.024±0.003	0.025±0.003	0.027±0.003	0.028±0.003
6	0.021±0.002	0.026±0.003	0.026±0.002	0.027±0.001	0.030±0.002
7	0.028±0.003	0.037±0.002	0.041±0.002	0.041±0.003	0.044±0.003
8	0.009±0.000	0.012±0.002	0.015±0.003	0.016±0.002	0.015±0.002
9	0.021±0.003	0.025±0.003	0.027±0.003	0.026±0.002	0.031±0.003
ATCC 33152	0.013±0.001	0.020±0.001	0.023±0.001	0.029±0.004	0.026±0.001
Kontrol 1	0.368±0.071	0.392±0.086	0.371±0.091	0.363±0.091	0.353±0.094
Kontrol 2	0.345±0.062	0.371±0.075	0.351±0.083	0.347±0.085	0.343±0.084

*: Enzimatik aktivite (ünite): negatif

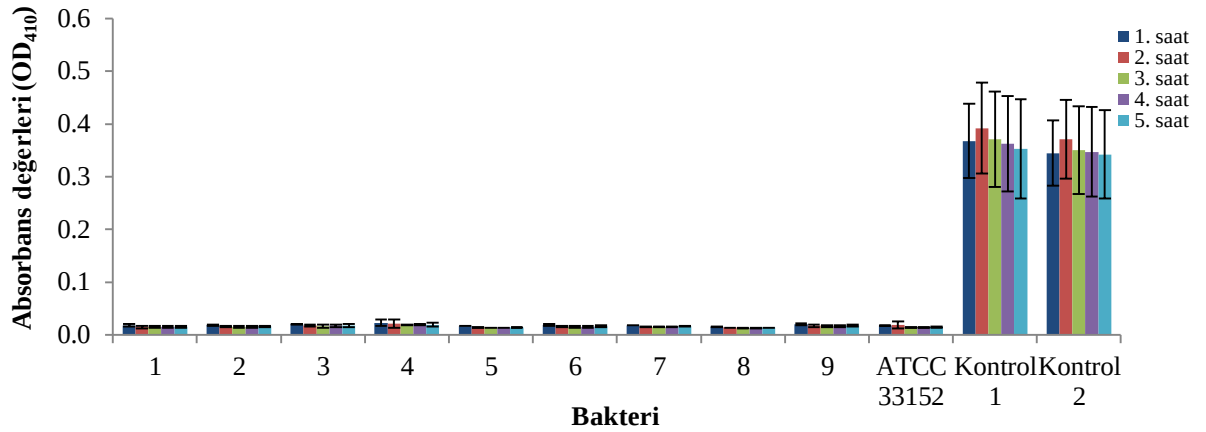


Şekil 4.17: *L. pneumophila* hücre lizatlarının asit fosfataz aktiviteleri

Tablo 4.15: *L. pneumophila* süpernatantlarının asit fosfataz aktiviteleri

Bakteri no*	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)				
	1. saat	2. saat	3. saat	4. saat	5. saat
1	0.018±0.002	0.015±0.002	0.015±0.002	0.015±0.002	0.016±0.002
2	0.019±0.001	0.016±0.001	0.015±0.002	0.015±0.002	0.016±0.002
3	0.020±0.001	0.018±0.002	0.017±0.003	0.017±0.003	0.018±0.003
4	0.023±0.006	0.021±0.008	0.019±0.001	0.020±0.001	0.020±0.003
5	0.017±0.000	0.014±0.001	0.014±0.001	0.014±0.001	0.015±0.001
6	0.019±0.002	0.016±0.001	0.016±0.002	0.016±0.002	0.017±0.002
7	0.018±0.000	0.016±0.001	0.015±0.001	0.015±0.001	0.016±0.001
8	0.016±0.001	0.014±0.001	0.013±0.001	0.013±0.001	0.014±0.001
9	0.020±0.002	0.017±0.003	0.017±0.002	0.017±0.002	0.018±0.002
ATCC 33152	0.018±0.001	0.019±0.007	0.015±0.001	0.015±0.001	0.015±0.001
Kontrol 1	0.368±0.071	0.392±0.086	0.371±0.091	0.363±0.091	0.353±0.094
Kontrol 2	0.345±0.062	0.371±0.075	0.351±0.083	0.347±0.085	0.343±0.084

*: Enzimatik aktivite (ünite): negatif

Şekil 4.18: *L. pneumophila* süpernatantlarının asit fosfataz aktiviteleri

4.4.7. Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi

4.4.7.1. *P*-nitrofenil Kaprilat ve *P*-nitrofenil Palmitat Bileşikleri Üzerine

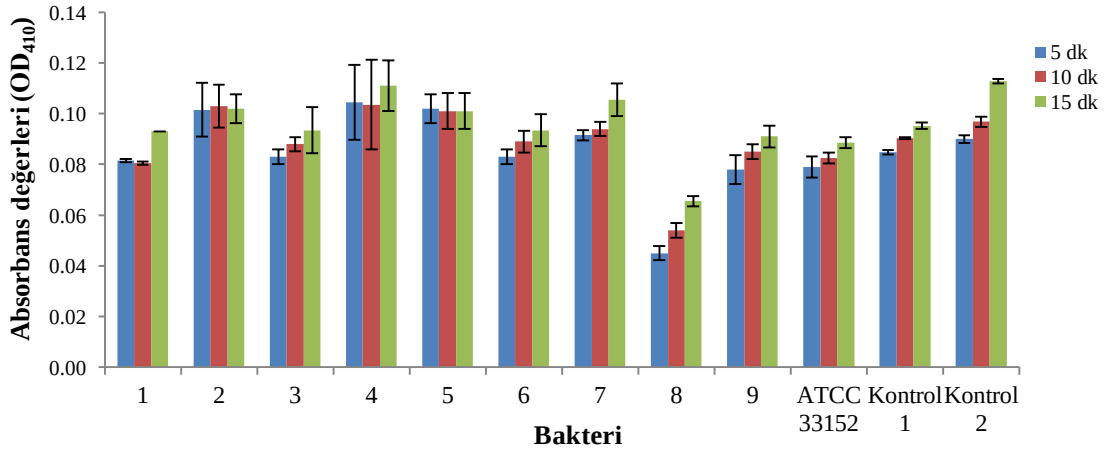
Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi

Lipaz aktivitesini tespit etmek amacıyla yapılan ilk deneyde 1 mM substrat (p-nitrofenil kaprilat veya p-nitrofenil palmitat) ile bir araya getirilen *L. pneumophila* hücre lizatları veya süpernatantlarının açığa çıkardığı pNP miktarları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Tablo 4.16 ve 4.17, Şekil 4.19 ve 4.20). *L. pneumophila* bakterilerinin gerek p-nitrofenil kaprilat gerekse p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktivite deneylerinin sonuçları incelendiğinde tüm bakteriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) saptanmıştır. Elde edilen spektrofotometrik değerler, standart pNP eğrisi göz önünde bulundurularak ünite enzim cinsine çevrilmiştir (Tablo 4.16 ve 4.17).

Enzimatik aktivite sonuçları incelendiğinde hücre lizatlarının p-nitrofenil kaprilat üzerinde lipaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Tablo 4.16 incelendiğinde en güçlü enzimatik aktive 5 dk sonunda izolat 4'ün (600 ünite), 10. dk'da izolat 2, 4 ve 5'in (200 ünite), 15. dk'da ise izolat 2, 4, 5 ve 7'nin (133 ünite) hücre lizatlarında saptanmıştır. Her üç ölçüm süresinde de (5, 10 ve 15 dk) en zayıf enzimatik aktivitenin izolat 8'e (sırasıyla 20, 30 ve 27 ünite) ait olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.16: *L. pneumophila* hücre lizatlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)			Enzimatik aktivite (ünite)		
	5 dk	10 dk	15 dk	5 dk	10 dk	15 dk
1	0.082±0.001	0.081±0.001	0.093±0.000	180	90	67
2	0.102±0.011	0.103±0.008	0.102±0.006	400	200	133
3	0.083±0.003	0.088±0.003	0.094±0.009	180	90	67
4	0.105±0.015	0.104±0.018	0.111±0.010	600	200	133
5	0.102±0.006	0.101±0.007	0.101±0.007	400	200	133
6	0.083±0.003	0.089±0.004	0.094±0.006	180	100	67
7	0.092±0.002	0.094±0.003	0.106±0.006	200	100	133
8	0.045±0.003	0.054±0.003	0.066±0.002	20	30	27
9	0.078±0.006	0.085±0.003	0.091±0.004	140	90	67
ATCC 33152	0.079±0.004	0.083±0.002	0.089±0.002	140	90	60
Kontrol 1	0.085±0.001	0.090±0.001	0.095±0.001	180	100	67
Kontrol 2	0.090±0.002	0.097±0.002	0.113±0.001	180	100	200



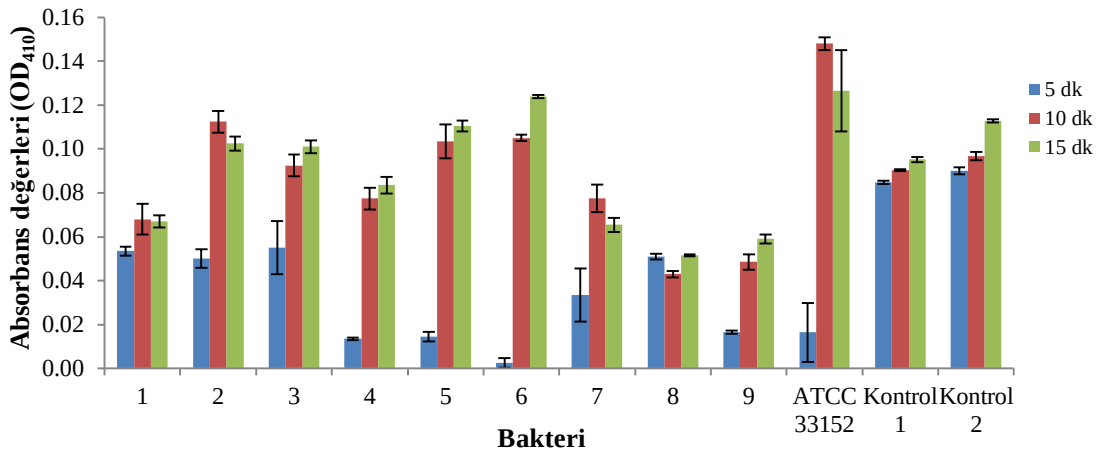
Şekil 4.19: *L. pneumophila* hücre lizatlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri

L. pneumophila süpernatantlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri değerlendirildiğinde (Tablo 4.17, Şekil 4.20) ilk 5 dk sonunda en güçlü enzimatik aktivitenin izolat 1 ve 3'e (60 ünite) ait olduğu, izolat 6'nın ise enzimatik aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. 10. dk'da ATCC 33152 (600 ünite) bakterisine, 15.

dk'da ise izolat 6 ve ATCC 33152 (267 ünite)'ye ait süpernatantların en güçlü enzimatik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.17: *L. pneumophila* süpernatantlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)			Enzimatik aktivite (ünite)		
	5 dk	10 dk	15 dk	5 dk	10 dk	15 dk
1	0.054±0.002	0.068±0.007	0.067±0.003	60	40	27
2	0.050±0.004	0.113±0.005	0.103±0.003	20	300	133
3	0.055±0.012	0.093±0.005	0.101±0.003	60	100	133
4	0.014±0.001	0.078±0.005	0.084±0.004	1	70	60
5	0.015±0.002	0.104±0.008	0.111±0.002	0.8	200	133
6	0.003±0.002	0.105±0.001	0.124±0.001	0	200	267
7	0.034±0.012	0.078±0.006	0.066±0.003	8	70	27
8	0.051±0.001	0.043±0.001	0.052±0.000	40	10	13
9	0.017±0.001	0.049±0.004	0.059±0.002	1.4	20	20
ATCC 33152	0.016±0.013	0.148±0.003	0.127±0.019	1.2	600	267
Kontrol 1	0.085±0.001	0.090±0.001	0.095±0.001	180	100	67
Kontrol 2	0.090±0.002	0.097±0.002	0.113±0.001	180	100	200

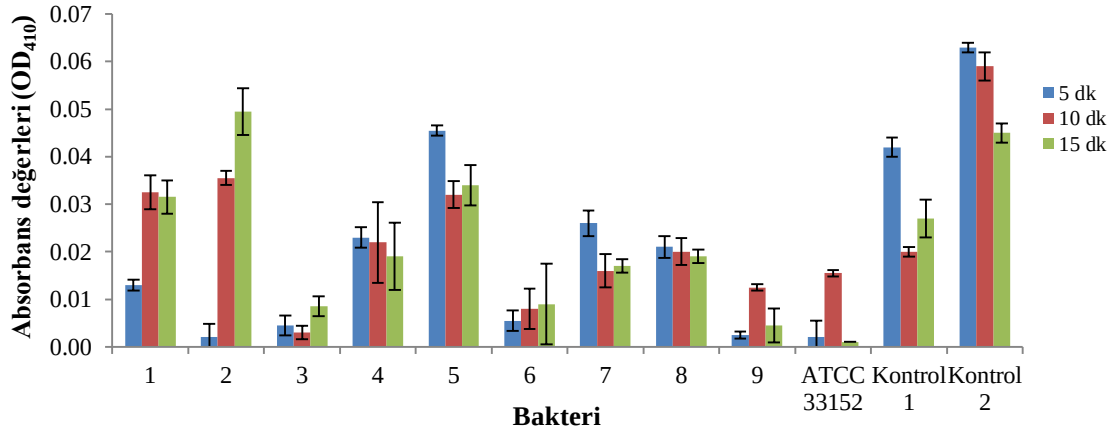


Şekil 4.20: *L. pneumophila* süpernatantlarının p-nitrofenil kaprilat üzerine lipaz aktiviteleri

L. pneumophila hücre lizatlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktivitelerinin p-nitrofenil kaprilat üzerine olan lipaz aktivitelerine kıyasla zayıf olduğu saptanmıştır. Enzimatik aktivite göz önünde bulundurulduğunda ilk 5 dk'da izolat 5'in (20 ünite) hücre lizatının en güçlü enzimatik aktiviteye sahip olduğu, izolat 2, 3, 6, 9 ve ATCC 33152 hücre lizatlarının ise enzimatik aktivite göstermedikleri belirlenmiştir. 10. dk'da izolat 1, 2 ve 5 (40 ünite), 15. dk'da ise izolat 2 (7 ünite) hücre lizatının en güçlü enzimatik aktiviteye sahip olduğu, her üç ölçümde de izolat 3 ve 6 hücre lizatlarının enzimatik aktiviteye sahip olmadıkları tespit edilmiştir (Tablo 4.18, Şekil 4.21).

Tablo 4.18: *L. pneumophila* hücre lizatlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktiviteleri

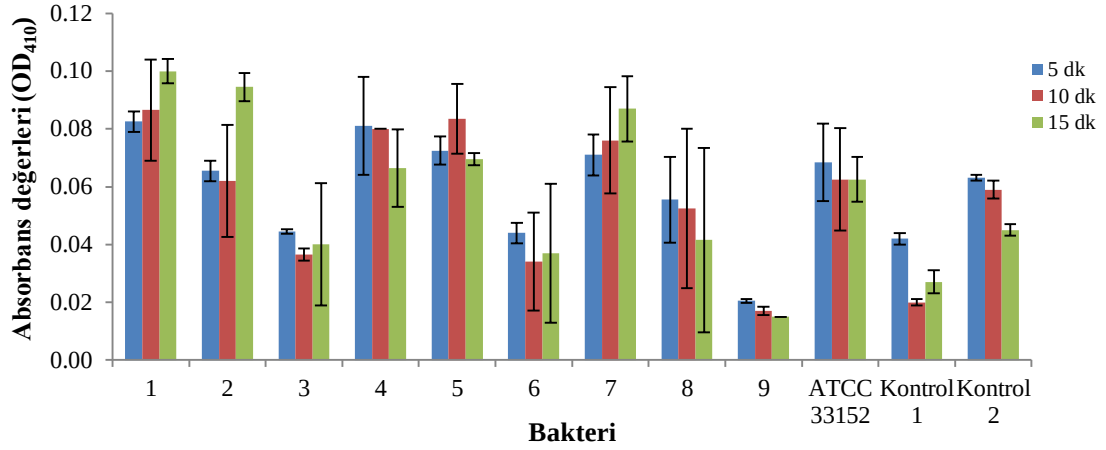
Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)			Enzimatik aktivite (ünite)		
	5 dk	10 dk	15 dk	5 dk	10 dk	15 dk
1	0.013±0.011	0.033±0.004	0.032±0.035	1	4	3
2	0.002±0.003	0.036±0.015	0.050±0.005	0	4	7
3	0.005±0.002	0.003±0.014	0.009±0.002	0	0	0
4	0.023±0.021	0.022±0.008	0.019±0.007	4	2	1
5	0.046±0.011	0.032±0.003	0.034±0.004	20	4	3
6	0.006±0.002	0.008±0.004	0.009±0.008	0	0	0
7	0.026±0.027	0.016±0.035	0.017±0.001	4	0.5	1
8	0.021±0.023	0.020±0.003	0.019±0.014	2	1	1
9	0.003±0.001	0.013±0.001	0.005±0.004	0	0.5	3
ATCC 33152	0.002±0.004	0.016±0.001	0.001±0.001	0	0.5	3
Kontrol 1	0.042±0.003	0.020±0.001	0.027±0.004	20	2	1
Kontrol 2	0.063±0.001	0.059±0.002	0.045±0.002	80	30	7

Şekil 4.21: *L. pneumophila* hücre lizatlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktiviteleri

Tablo 4.19 incelendiğinde *L. pneumophila* süpernatantlarının hücre lizatlarına göre p-nitrofenil palmitat üzerinde daha güçlü bir lipaz aktivitesine sahip oldukları saptanmıştır. En güçlü lipaz aktivitesinin 5. dk'da izolat 1 ve 4'ün (180 ünite), 10. ve 15. dakikalarda ise izolat 1'in süpernatantına ait olduğu saptanmıştır. p-nitrofenil palmitat üzerinde en zayıf lipaz aktivitesini izolat 9'un süpernatantının sergilediği tespit edilmiştir (Tablo 4.19 ve Şekil 4.22).

Tablo 4.19: *L. pneumophila* süpernatantlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₄₁₀)			Enzimatik aktivite (ünite)		
	5 dk	10 dk	15 dk	5 dk	10 dk	15 dk
1	0.083±0.004	0.087±0.018	0.100±0.004	180	100	133
2	0.066±0.004	0.062±0.019	0.095±0.005	80	60	67
3	0.045±0.001	0.037±0.002	0.040±0.021	20	4	7
4	0.081±0.017	0.080±0.000	0.067±0.013	180	90	40
5	0.073±0.005	0.084±0.012	0.070±0.002	100	90	47
6	0.044±0.004	0.034±0.017	0.037±0.024	20	4	3
7	0.071±0.007	0.076±0.018	0.087±0.011	120	60	67
8	0.056±0.015	0.053±0.028	0.042±0.032	60	30	7
9	0.021±0.001	0.017±0.001	0.015±0.000	4	1	0
ATCC 33152	0.069±0.013	0.063±0.018	0.063±0.008	100	40	27
Kontrol 1	0.042±0.003	0.020±0.001	0.027±0.004	20	2	1
Kontrol 2	0.063±0.001	0.059±0.002	0.045±0.002	80	30	7

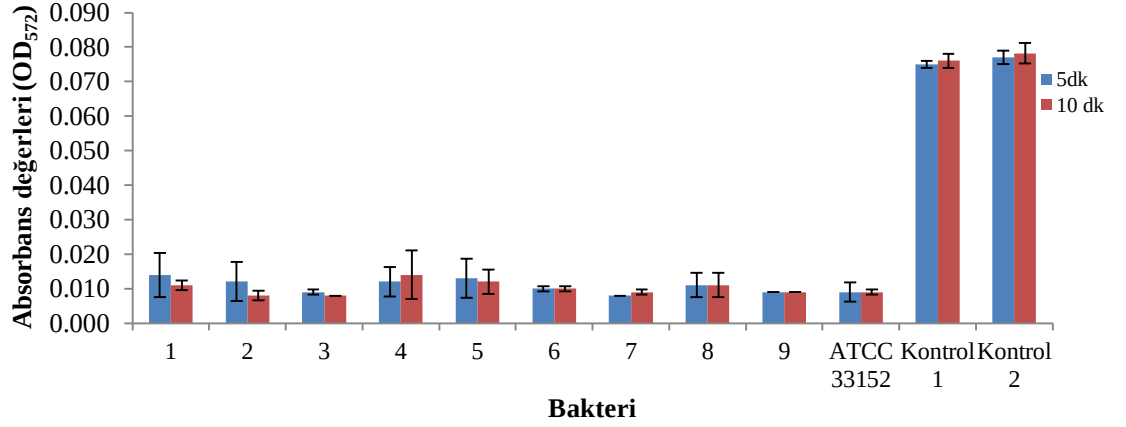
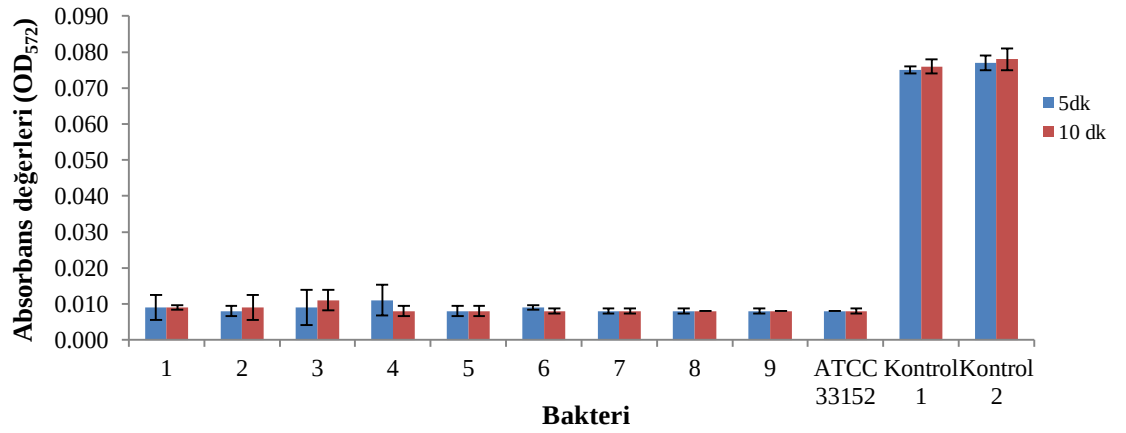
Şekil 4.22: *L. pneumophila* süpernatantlarının p-nitrofenil palmitat üzerine lipaz aktiviteleri

4.4.7.2. 1,2-dilauril-racglisero-3-glutarik Asit Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi

Lipaz aktivitesinin belirlenmesi için yapılan diğer bir deneyde *L. pneumophila* hücre lizatları ile süpernatantlarının 1,2-dilauril-racglisero-3-glutarik asitten kırmızı renkli bir madde olan resorufin açığa çıkarma yeteneği spektrofotometrik olarak incelenmiştir (Tablo 4.20). *L. pneumophila* bakterilerinin gerek hücre lizatlarında gerekse süpernatantlarında herhangi bir resorufin esteraz aktivitesi saptanmamıştır (Şekil 4.23 ve 4.24).

Tablo 4.20: *L. pneumophila* bakterilerinin hücre lizatları ve süpernatantlarının resorufin esteraz aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₅₇₂)			
	lizat		süpernatant	
	5dk	10 dk	5dk	10 dk
1	0.014±0.006	0.011±0.001	0.009±0.004	0.009±0.001
2	0.012±0.006	0.008±0.001	0.008±0.001	0.009±0.004
3	0.009±0.001	0.008±0.000	0.009±0.005	0.011±0.003
4	0.012±0.004	0.014±0.007	0.011±0.004	0.008±0.001
5	0.013±0.006	0.012±0.004	0.008±0.001	0.008±0.001
6	0.010±0.001	0.010±0.001	0.009±0.001	0.008±0.001
7	0.008±0.000	0.009±0.001	0.008±0.001	0.008±0.001
8	0.011±0.004	0.011±0.004	0.008±0.001	0.008±0.000
9	0.009±0.000	0.009±0.000	0.008±0.001	0.008±0.000
ATCC 33152	0.009±0.003	0.009±0.001	0.008±0.000	0.008±0.001
Kontrol 1	0.075±0.001	0.076±0.002	0.075±0.001	0.076±0.002
Kontrol 2	0.077±0.002	0.078±0.003	0.077±0.002	0.078±0.003

Şekil 4.23: *L. pneumophila* hücre lizatlarının resorufin esteraz aktiviteleriŞekil 4.24: *L. pneumophila* süpernatantlarının resorufin esteraz aktiviteleri

4.4.7.3. 1-monopalmitolgliserol ve 1,2-dipalmitolgliserol Bileşikleri
Üzerine Lipaz Aktivitesinin İncelenmesi

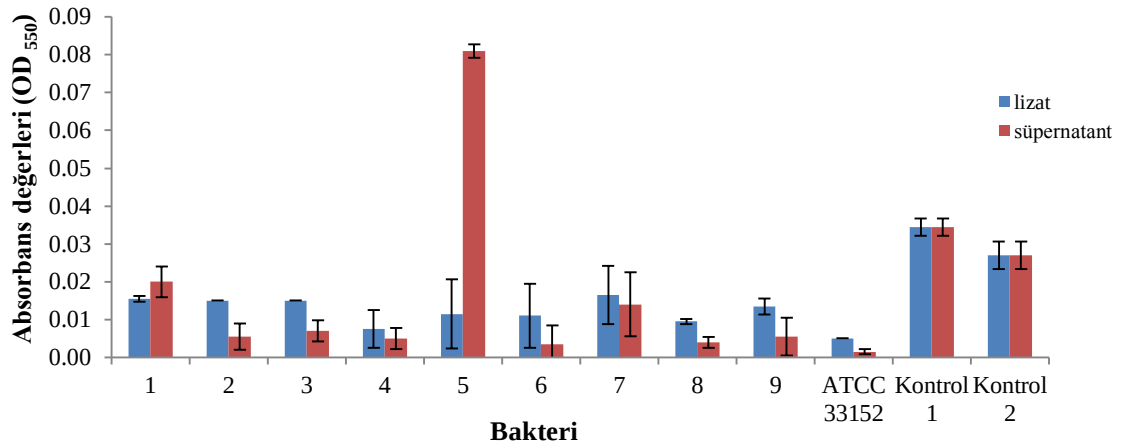
Lipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan diğer bir deneyde *L. pneumophila* hücre lizatları veya süpernatantlarının 1-monopalmitolgliserol (1-MG) veya 1,2-dipalmitolgliserol (1,2-DG)'den serbest yağ asidi oluşturma kapasiteleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde hücre lizatlarının 1-MG'den serbest yağ asidi oluşturma kapasitesine sahip olmadıkları, süpernatantlardan ise sadece izolat 5'in süpernatantının 1-MG'ü parçalayabildiği saptanmıştır (Tablo 4.21 ve Şekil 4.25).

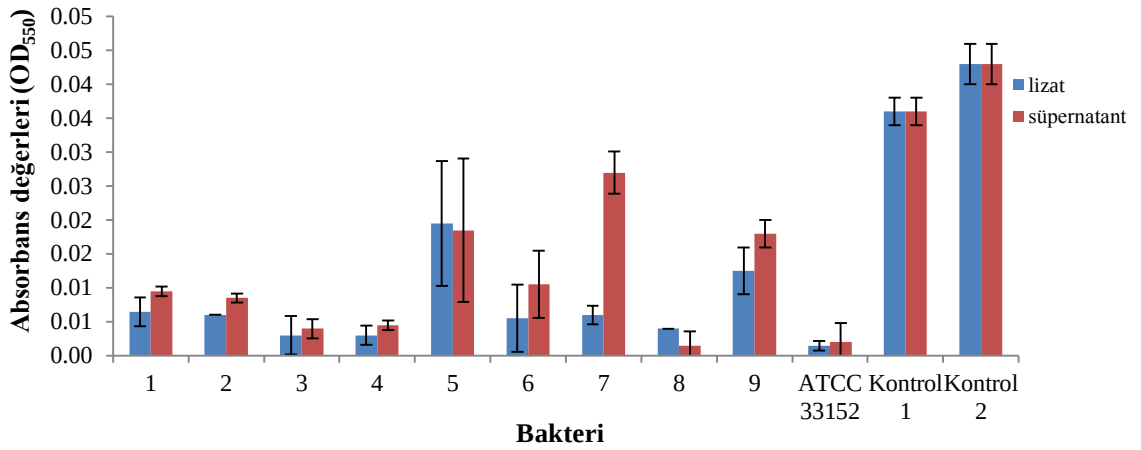
İncelenen bakterilerinin gerek hücre lizatlarının gerekse süpernatantlarının 1,2-DG'den serbest yağ asiti açığa çıkartamadıkları saptanmıştır (Tablo 4.21 ve Şekil 4.26). Ayrıca, elde edilen absorbans değerlerinin çok düşük olması nedeniyle sonuçlar standart oleik asit eğrisi (Şekil 3.3) yardımı ile değerlendirilememiştir.

Tablo 4.21: *L. pneumophila* hücre lizatları ve süpernatantlarının 1-monopalmitolgliserol (1-MG) veya 1,2-dipalmitolgliserol (1,2-DG) bileşikleri üzerine lipaz aktiviteleri

Bakteri no	Absorbans değerleri (OD ₅₅₀)			
	1-MG		1,2-DG	
	lizat	süpernatant	lizat	süpernatant
1	0.016±0.001	0.020±0.004	0.006±0.002	0.009±0.001
2	0.015±0.000	0.006±0.004	0.006±0.000	0.008±0.001
3	0.015±0.000	0.007±0.003	0.003±0.003	0.004±0.001
4	0.008±0.005	0.005±0.003	0.003±0.001	0.005±0.001
5	0.012±0.009	0.081±0.002	0.020±0.009	0.019±0.011
6	0.011±0.008	0.004±0.005	0.006±0.005	0.011±0.005
7	0.017±0.008	0.014±0.008	0.006±0.001	0.027±0.003
8	0.009±0.001	0.004±0.001	0.004±0.000	0.002±0.002
9	0.014±0.002	0.006±0.005	0.013±0.003	0.018±0.002
ATCC 33152	0.005±0.000	0.002±0.001	0.002±0.001	0.002±0.003
Kontrol 1	0.034±0.002		0.036±0.002	
Kontrol 2	0.027±0.004		0.043±0.003	



Şekil 4.25: *L. pneumophila* hücre lizatları ve süpernatantlarının 1-monopalmitolgliserol (1-MG) üzerine lipaz aktiviteleri



Şekil 4.26: *L. pneumophila* hücre lizatları ve süpernatantlarının 1,2-dipalmitolgliserol (1,2-DG) üzerine lipaz aktiviteleri

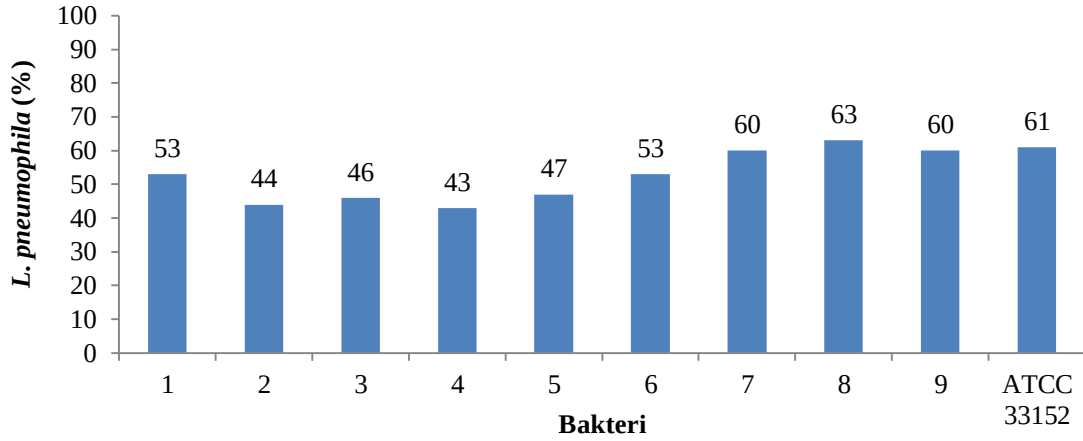
4.5. *L. PNEUMOPHILA* BAKTERİLERİ İLE KONAK HÜCRELER ARASINDAKİ İLİŞKİLERİN İNCELENMESİ

4.5.1. *L. pneumophila* Bakterileri ile İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

4.5.1.1. *L. pneumophila* Bakterilerinin PKMH'ne Yapışma Kapasitelerinin İncelenmesi

Hazırlanan periferik mononükleer hücre kültürü ile bir araya getirilen *L. pneumophila* bakterilerinin yapışma kapasiteleri Tablo 4.22'de verilmiştir. Tüm bakteriler arasında PKMH'ne yapışma kapasiteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir fark olduğu saptanmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek yapışma kapasitesinin

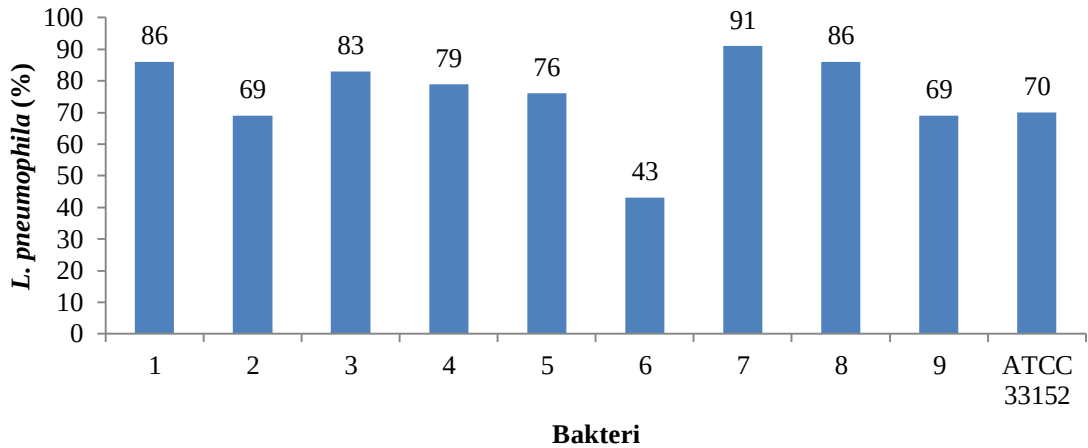
% 63 ile izolat 8'e, en düşük yapışma kapasitesinin ise % 43 ile 4 numaralı izolata ait olduğu saptanmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27: *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH'ine yapışma yüzdeleri

4.5.1.2. *L. pneumophila* Bakterilerinin PKMH İçine Giriş ve Hücre İçi Üreme Kapasitelerinin İncelenmesi

PKMH kültürüne eklenen bakterilerin Bölüm 3.6.2.2'de belirtilen şekilde hücre içine giriş ve hücre içinde üreme kapasiteleri koloni sayım yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. PKMH içine giren bakteri sayıları Tablo 4.22'de 0. saat sütununda belirtilmiştir. Yapışan bakteri sayıları göz önünde bulundurulduğunda hücre içine en fazla giren bakterinin % 91 ile 7 numaralı izolat olduğu, bunu sırasıyla izolat 1=8, 3, 4, 5, ATCC 33152, izolat 2=9 ve 6'nın takip ettiği saptanmıştır (sırasıyla % 86, 83, 79, 76, 70, 69, 43) (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH içine giriş yüzdeleri

Tablo 4.22: *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH'ne yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme kapasiteleri

Bakteri no	<i>L. pneumophila</i> [kob/ml ($\log_{10}$)]				
	Yapışma	0. saat (Giriş)	24. saat	48. saat	72. saat
1	4.767±0.251	4.080±0.129	5.351±0.031	5.738±0.063	6.013±0.052
Kontrol	9.000±0.049	8.308±0.486	8.000±0.085	8.171±0.034	8.134±0.050
2	3.671±0.130	2.536±0.127	4.363±0.151	4.857±0.135	5.300±0.121
Kontrol	8.411±0.060	8.184±0.070	8.099±0.099	8.037±0.073	8.014±0.024
3	4.004±0.050	3.342±0.078	4.315±0.339	4.640±0.158	5.029±0.095
Kontrol	8.639±0.012	8.164±0.117	7.308±0.012	7.638±0.083	7.609±0.022
4	3.562±0.093	2.821±0.176	3.803±0.047	4.202±0.080	4.465±0.095
Kontrol	8.359±0.079	8.429±0.203	8.116±0.151	7.654±0.056	7.693±0.019
5	3.952±0.166	3.022±0.135	3.880±0.082	4.318±0.034	4.626±0.049
Kontrol	8.494±0.034	8.060±0.045	8.141±0.027	7.850±0.604	8.142±0.069
6	4.402±0.128	1.883±0.093	2.529±0.176	2.896±0.047	3.050±0.080
Kontrol	8.253±0.048	8.052±0.058	8.346±0.061	8.063±0.075	8.072±0.078
7	5.083±0.536	4.617±0.048	5.558±0.192	5.796±0.131	5.824±0.127
Kontrol	8.423±0.040	8.424±0.035	8.296±0.094	7.944±0.578	8.030±0.075
8	5.542±0.107	4.781±0.043	6.231±0.330	6.674±0.240	7.045±0.220
Kontrol	8.798±0.086	8.781±0.072	8.392±0.088	8.430±0.048	8.425±0.089
9	4.896±0.126	3.383±0.107	4.793±0.108	5.180±0.027	5.454±0.027
Kontrol	8.193±0.127	8.108±0.090	8.020±0.084	8.025±0.064	8.049±0.028
ATCC 33152	5.231±0.132	3.648±0.118	4.833±0.062	5.212±0.071	5.304±0.048
Kontrol	8.511±0.454	8.499±0.039	8.374±0.580	8.262±0.036	8.262±0.036

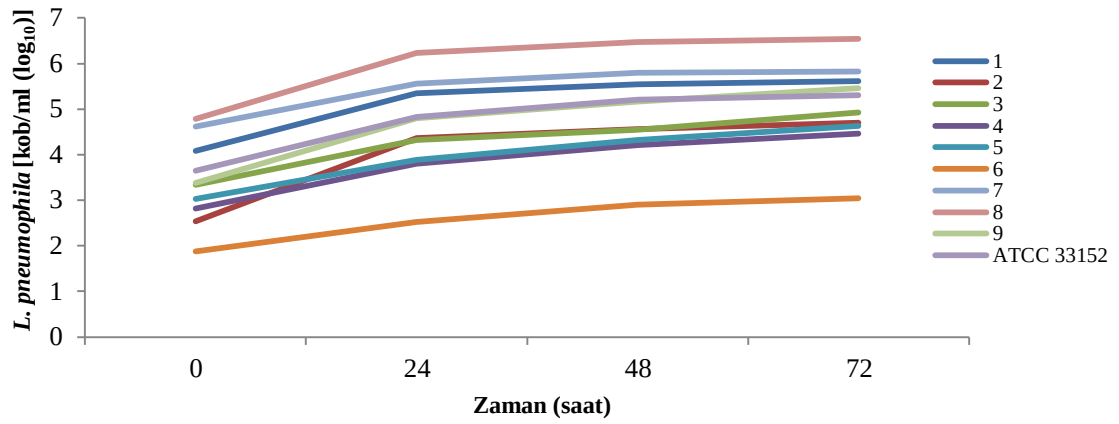
L. pneumophila bakterilerinin PKMH içinde üreme yetenekleri incelendiğinde, bakterilerin sayılarını 3 gün boyunca arttırdıkları, en hızlı üremenin ilk 24 saatlik sürede gerçekleştiği ve 6 numaralı izolat dışında bakterilerin hücre içi üreme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0.05$) saptanmıştır (Tablo 4.22 ve Şekil 4.29). Bununla birlikte incelenen tüm saatler arasında hücre içi üreme kapasiteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir fark olduğu saptanmıştır.

24. saat sonunda PKMH içerisinde çoğalan bakteri sayıları ile hücre içine giren bakteri sayıları kıyaslandığında hücre içi üreme yeteneği en yüksek olan bakterinin 1.83 log artışı izolat 2 olduğu, bunu sırasıyla izolat 8, 9, 1, ATCC 33152, izolat 4, 3, 7, 5, 6'nın (sırasıyla 1.450; 1.410; 1.271; 1.184; 0.981; 0.974; 0.941; 0.858 ve 0.647 log) takip ettiği saptanmıştır (Tablo 4.22 ve Şekil 4.29).

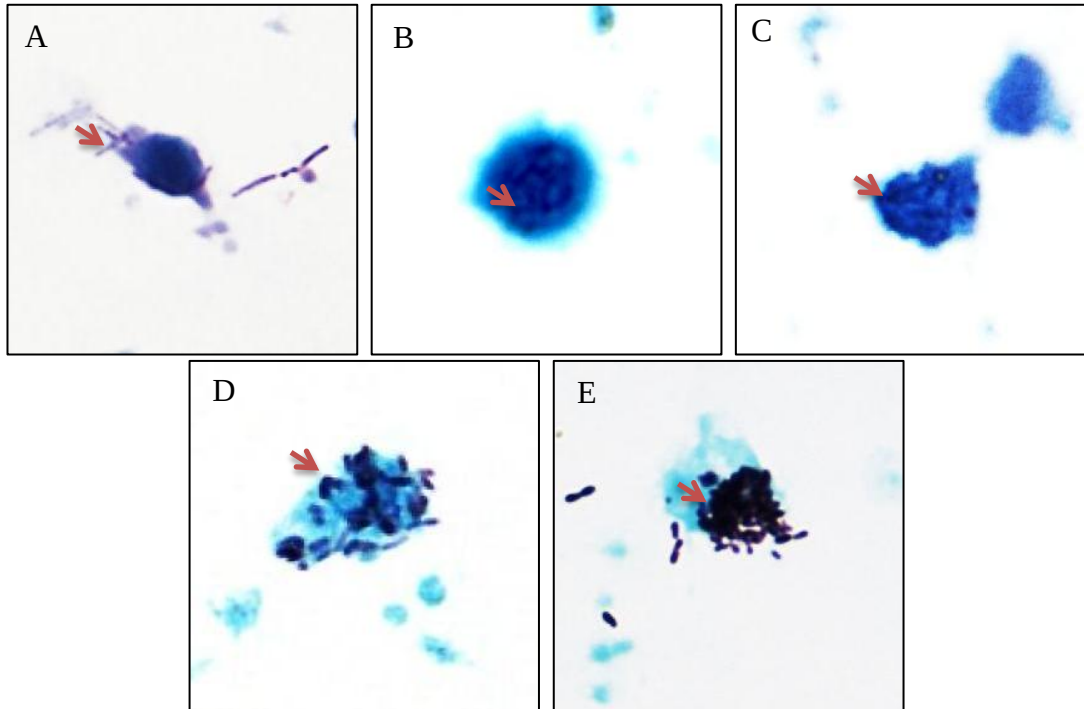
48. saat sonunda PKMH kültürü içerisinde *L. pneumophila* sayıları hücre içine giren bakteri sayıları ile kıyaslandığında hücre içi üreme yeteneği en yüksek olan bakterinin 2.02 log artışı ile yine izolat 2 olduğu, bunu sırasıyla izolat 8, 9, 1, ATCC 33152, izolat

4, 3, 5, 7 ve 6'nın (sırasıyla 1.89; 1.80; 1.66; 1.56; 1.38; 1.30; 1.30; 1.18 ve 1.01 log) takip ettiği saptanmıştır (Tablo 4.22 ve Şekil 4.29).

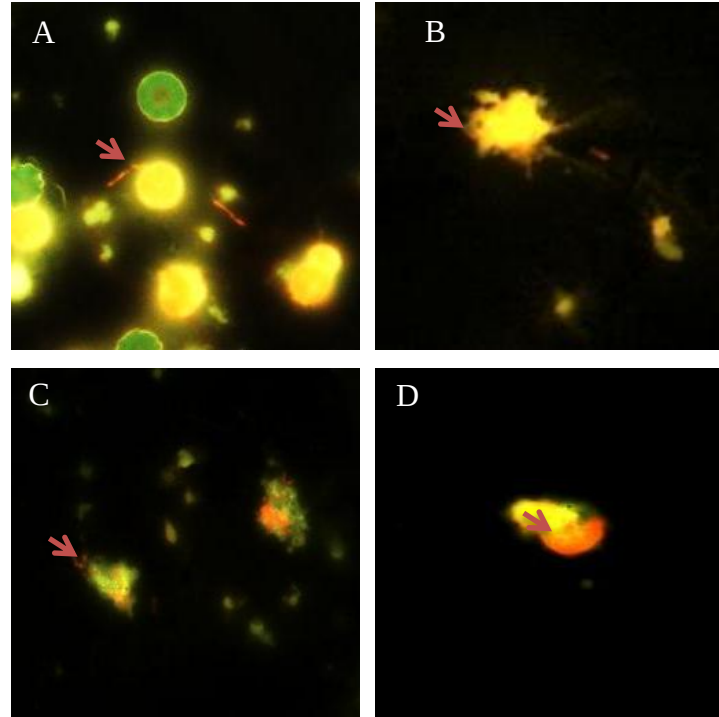
72 saat sonuçları incelendiğinde izolat 2'nin 2.16 log artışla PKMH içerisinde en yüksek üreme yeteneği gösteren bakteri olduğu, bunu sırasıyla izolat 8, 9, 1, 3, ATCC 33152, izolat 4, 5, 7, 6'nın (sırasıyla 2.26; 2.07; 1.93; 1.69; 1.66; 1.64; 1.60; 1.21 ve 1.17) izlediği saptanmıştır (Tablo 4.22 ve Şekil 4.29). PKMH içerisinde sayısını en fazla arttıran bakteri olan izolat 2'ye ait ışık ve epifloresan mikroskobu görüntüleri Şekil 4.30 ve 4.31'de sunulmuştur.



Şekil 4.29: *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH içinde üreme kapasiteleri



Şekil 4.30: *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH'ne yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin ışık mikroskobu görüntüleri (izolat 2) (100x) [A: yapışma ve giriş; B: 24. saat; C: 48. saat; D: 72. saat; E: konak hücrenin patlaması ile bakterilerin hücre dışına çıkışı]

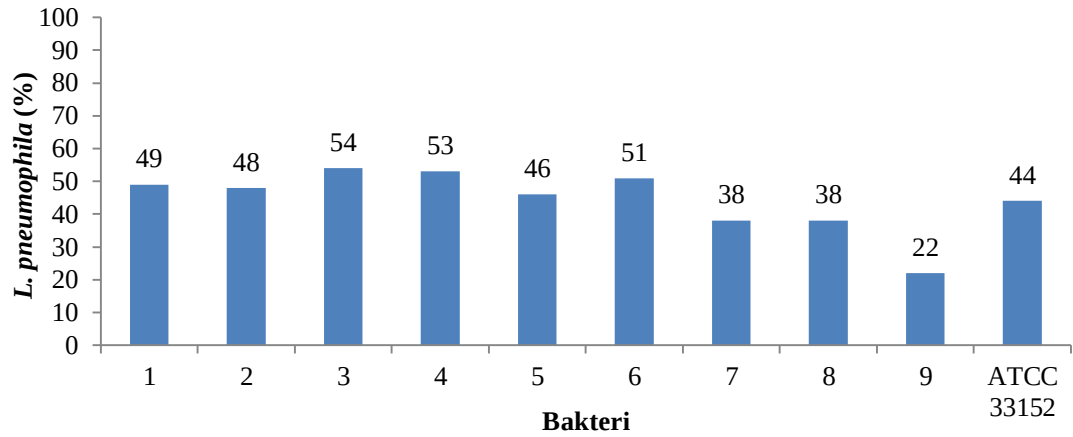


Şekil 4.31: *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH'ne yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin epifloresan mikroskobu görüntüleri (izolat 2) (100x) [A: yapışma ve giriş; B: 24. saat; C: 48. saat; D: 72. saat]

4.5.2. *L. pneumophila* Bakterileri ile Fare Peritoneal Makrofajları (PM) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

4.5.2.1. *L. pneumophila* Bakterilerinin PM'a Yapışma Kapasitelerinin İncelenmesi

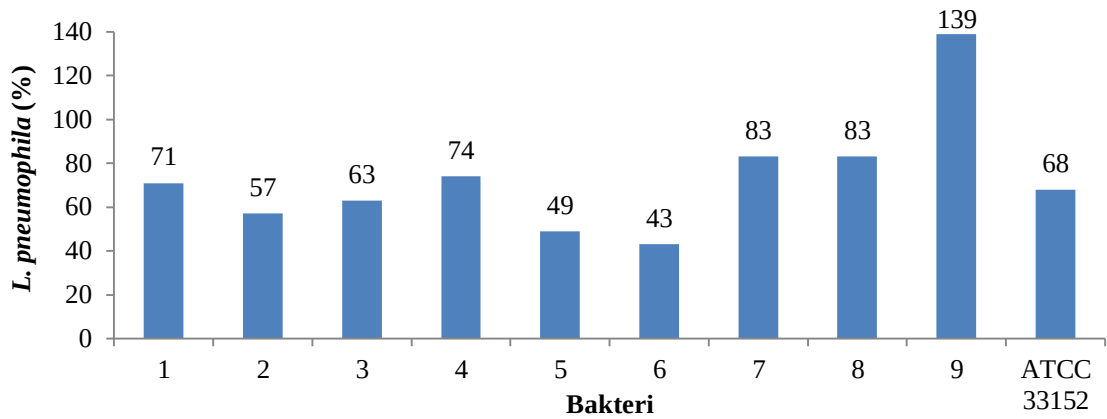
L. pneumophila izolatları ile standart ATCC 33152 bakterisinin PM'a yapışma kapasiteleri Tablo 4.23'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde yapışma kapasitesi en yüksek bakterinin izolat 3 olduğu (% 54), yapışma kapasitesi en düşük bakterinin ise 9 numaralı izolat (% 22) olduğu tespit edilmiştir. *L. pneumophila* bakterilerinin PM'a yapışma kapasiteleri bakımından 3, 4, 6, 1, 2, 5, ATCC 33152, 7=8 ve 9 (sırasıyla % 54, 53, 51, 49, 48, 46, 44, 38, 38 ve 22) şeklinde sıralandıkları (Şekil 4.32), izolat 1 ile 6 arasında, 2 ile 8 arasında ve 3 ile 4 arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır. Diğer *L. pneumophila* bakterileri arasında PM'a yapışma kapasiteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir fark olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.32: *L. pneumophila* bakterilerinin PM'a yapışma yüzdeleri

4.5.2.2. *L. pneumophila* Bakterilerinin PM İçine Giriş ve Hücre İçinde Üreme Kapasitelerinin İncelenmesi

L. pneumophila bakterilerinin PM içine giriş ve hücre içinde üreme yetenekleri koloni sayım yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. PM içine giren bakteri sayıları Tablo 4.23'te 0. saat sütununda belirtilmiştir. Yapışan bakteri sayıları göz önünde bulundurulduğunda (Tablo 4.23) hücre içine en fazla giren bakterinin % 139 ile izolat 9 olduğu, bunu sırasıyla izolat 8=7, 4, 1, ATCC 33152, izolat 3, 2, 5 ve 6'nın (sırasıyla % 83, 74, 71, 68, 63, 57, 49 ve 43) takip ettiği saptanmıştır (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: *L. pneumophila* bakterilerinin PM içine giriş yüzdeleri

Tablo 4.23: *L. pneumophila* bakterilerinin PM'a yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme kapasiteleri

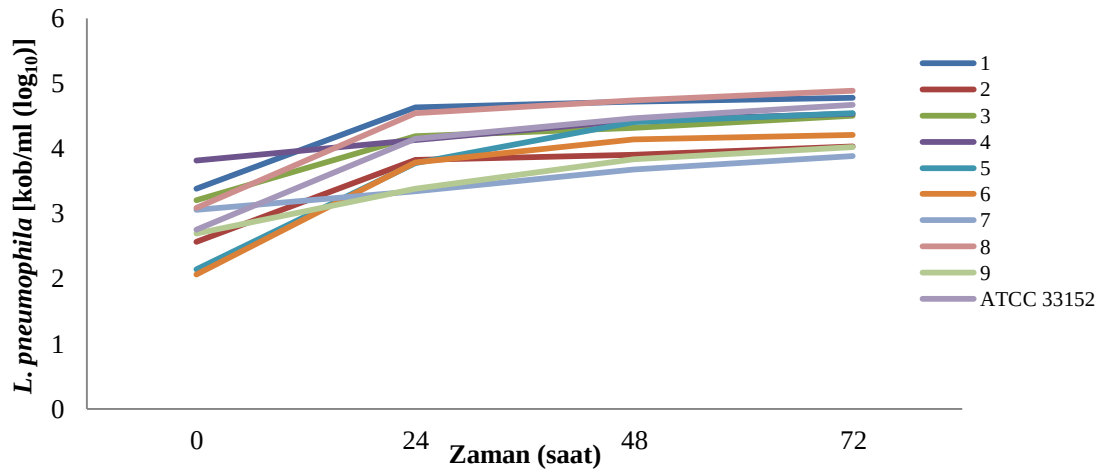
Bakteri no	<i>L. pneumophila</i> [kob/ml ($\log_{10}$)]				
	Yapışma	0 saat (Giriş)	24 saat	48 saat	72 saat
1	4.795±0.161	3.384±0.118	4.634±0.025	4.720±0.011	4.775±0.016
Kontrol	9.696±0.059	9.357±0.044	9.387±0.080	8.659±0.188	8.842±0.228
2	4.487±0.064	2.569±0.098	3.830±0.150	4.202±0.078	4.441±0.045
Kontrol	9.395±0.018	9.496±0.198	9.012±0.637	8.037±0.065	8.560±0.072
3	5.062±0.048	3.208±0.193	4.190±0.029	4.311±0.019	4.506±0.011
Kontrol	9.361±0.038	8.931±0.546	8.460±0.151	8.259±0.241	8.634±0.055
4	5.146±0.164	3.813±0.051	4.128±0.138	4.429±0.123	4.532±0.142
Kontrol	9.762±0.020	9.485±0.319	9.567±0.356	9.153±0.051	8.597±0.123
5	4.362±0.019	2.142±0.139	3.780±0.040	4.400±0.072	4.544±0.060
Kontrol	9.515±0.380	9.534±0.178	9.416±0.143	8.450±0.425	8.168±0.153
6	4.797±0.060	2.068±0.490	3.683±0.028	4.136±0.009	4.358±0.004
Kontrol	9.459±0.341	8.751±0.045	8.949±0.079	8.460±0.151	8.094±0.102
7	3.702±0.011	3.061±0.019	3.347±0.029	3.676±0.059	3.882±0.025
Kontrol	9.644±0.181	9.620±0.502	9.956±0.031	8.251±0.066	8.425±0.458
8	3.703±0.077	3.088±0.030	4.543±0.047	4.937±0.037	5.181±0.056
Kontrol	9.805±0.025	8.614±0.297	9.704±0.060	8.652±0.266	8.397±0.253
9	1.947±0.083	2.697±0.058	3.378±0.169	3.832±0.124	4.076±0.063
Kontrol	8.960±0.448	8.647±0.087	8.712±0.031	8.085±0.088	8.177±0.157
ATCC 33152	4.076±0.030	2.757±0.038	4.145±0.018	4.460±0.006	4.674±0.012
Kontrol	9.340±0.267	9.314±0.279	8.564±0.067	8.557±0.061	8.284±0.172

L. pneumophila bakterilerinin PM içerisinde üreme yetenekleri incelendiğinde bakterilerin 3 gün boyunca sayılarını arttırdıkları, ancak üremenin en hızlı olduğu dönemin ilk 24 saatlik süre olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.23 ve Şekil 4.34). Bununla birlikte hücre içi üreme kapasiteleri açısından bakterilerin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

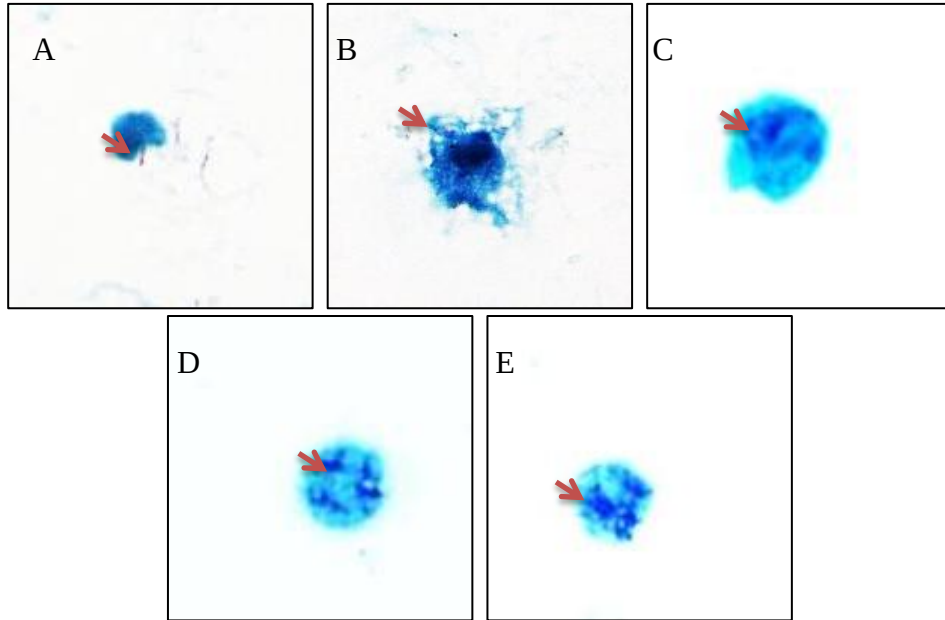
24. saat sonunda PM içerisinde çoğalan bakteri sayıları ile hücre içine giren bakteri sayıları kıyaslandığında en hızlı hücre içi üreme aktivitesinin 1.64 log artış ile izolat 5'e ait olduğu ve bunu sırasıyla izolat 6, 8, ATCC 33152, izolat 2, 1, 3, 9, 4 ve 7'nin (sırasıyla 1.61; 1.46; 1.39; 1.26; 1.25; 0.98; 0.68; 0.32 ve 0.29 log) takip ettiği saptanmıştır (Tablo 4.23 ve Şekil 4.34).

48. saat sonunda PM içerisinde *L. pneumophila* sayıları hücre içine giren bakteri sayıları ile kıyaslandığında hücre içinde en fazla üreyen bakterinin izolat 5 (2.26 log) olduğu, bunu sırasıyla izolat 6, 8, ATCC 33152, izolat 2, 1, 9, 3, 4 ve 7'nin (sırasıyla 2.07; 1.85; 1.70; 1.63; 1.34; 1.14; 1.10; 0.62 ve 0.61 log) takip ettiği saptanmıştır (Tablo 4.23 ve Şekil 4.34).

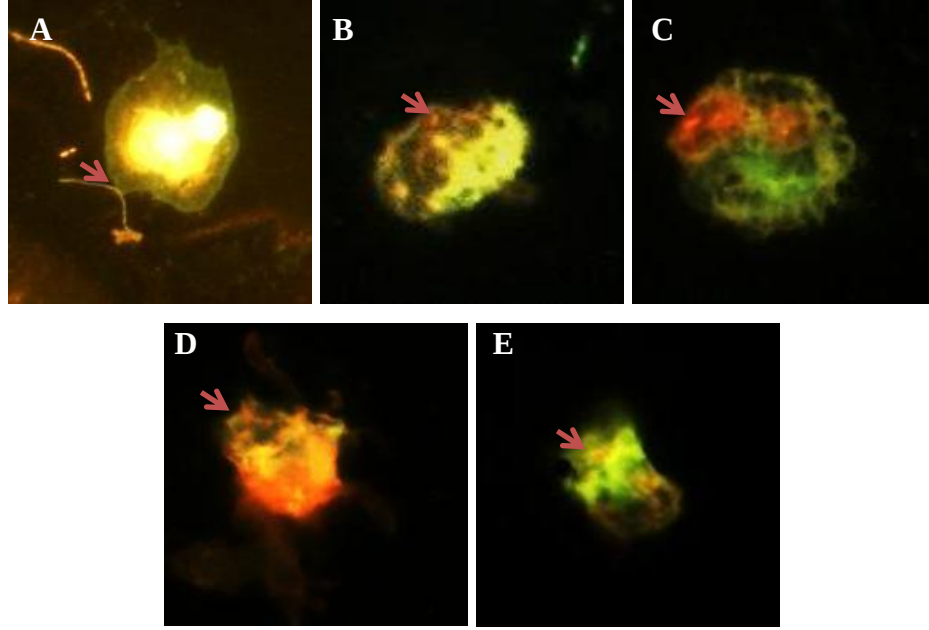
72. saat sonuçları incelendiğinde izolat 5'in (log 2.4) PM içerisinde sayısını en çok arttıran bakteri olduğu, bunu sırasıyla izolat 6, 8, ATCC 33152, izolat 2, 1, 9, 3, 7 ve 4'ün (sırasıyla 2.29; 2.09; 1.92; 1.87; 1.39; 1.38; 1.3; 0.82 ve 0.72 log) izlediği saptanmıştır (Tablo 4.23 ve Şekil 4.34). PM içerisinde sayısını en fazla arttıran bakteri olan izolat 5'e ait ışık ve epifloresans mikroskobu görüntüleri Şekil 4.35 ve 4.36'da sunulmuştur.



Şekil 4.34: *L. pneumophila* bakterilerinin PM içinde üreme kapasiteleri



Şekil 4.35: *L. pneumophila* bakterilerinin PM'a yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin ışık mikroskobu görüntüleri (izolat 5) (100x) [A: yapışma; B: giriş; C: 24. saat; D: 48. saat; E: 72. saat]

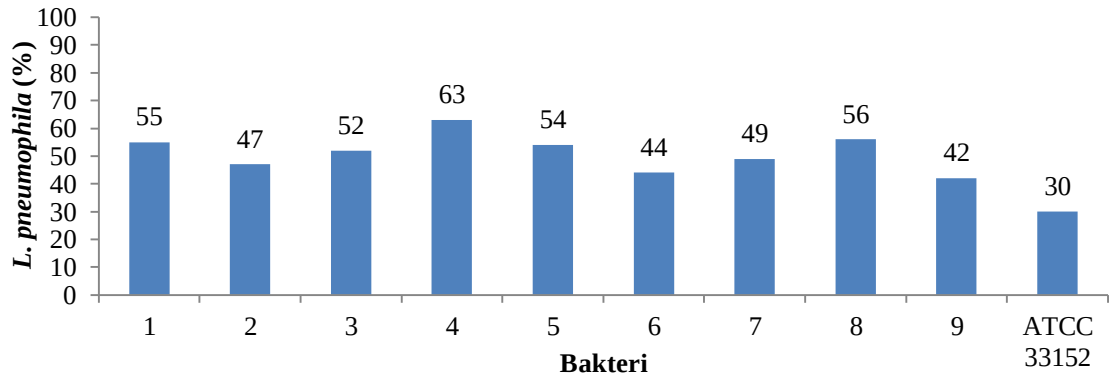


Şekil 4.36: *L. pneumophila* bakterilerinin PM'a yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin epifloresan mikroskobu görüntüleri (izolat 5) (100x) [A: yapışma; B: giriş; C: 24. saat; D: 48. saat; E: 72. saat]

4.5.3. *L. pneumophila* Bakterileri ile *A. castellanii* Amip Türü Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

4.5.3.1. *L. pneumophila* Bakterilerinin *A. castellanii* Trofozoitlerine Yapışma Kapasitelerinin İncelenmesi

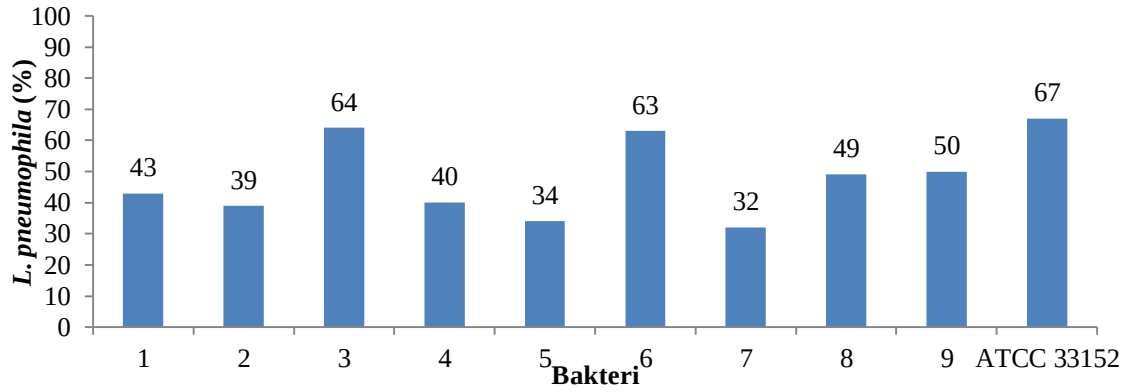
L. pneumophila bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitlerine yapışma kapasiteleri Tablo 4.24'te verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında yapışma kapasitesi en yüksek olan bakterinin izolat 4 olduğu (% 63), bunu sırasıyla izolat 8, 1, 5, 3, 7, 2, 6, 9, ATCC 33152'nin (sırasıyla % 56, 55, 54, 52, 49, 47, 44, 42 ve 30) takip ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.37). *L. pneumophila* bakterileri arasında trofozoitlere yapışma kapasiteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.05$) saptanmıştır.



Şekil 4.37: *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitlerine yapışma yüzdeleri

4.5.3.2. *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* Trofozoitlerine Giriş ve Hücre İçi Üreme Kapasitelerinin İncelenmesi

L. pneumophila bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitleri içerisine giriş ve hücre içi üreme kapasiteleri Tablo 4.24'te verilmiştir. Tabloda 0. saat sütununda belirtilen hücre içine giriş sonuçları yapışma sonuçları ile karşılaştırıldığında hücre içine en fazla giren bakterinin % 67 ile standart ATCC 33152 bakterisi olduğu ve bunu sırasıyla izolat 3, 6, 9, 8, 1, 4, 2, 5 ve 7'nin (sırasıyla 64, 63, 50, 49, 43, 40, 39, 34 ve 32) (Şekil 4.38) takip ettiği saptanmıştır.



Şekil 4.38: *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitleri içine giriş yüzdeleri

Tablo 4.24: *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitlerine yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme kapasiteleri

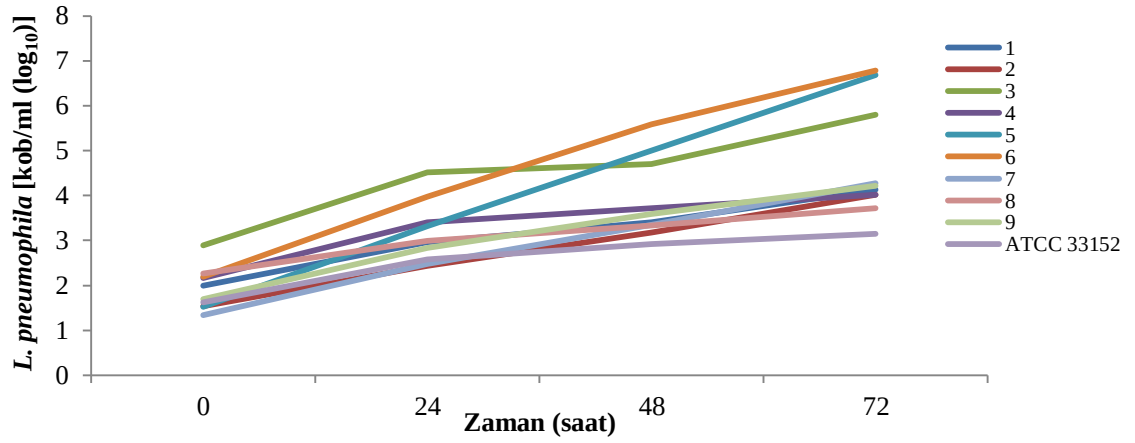
Bakteri no	<i>L. pneumophila</i> [kob/ml (log ₁₀)]				
	Yapışma	0. saat (Giriş)	24. saat	48. saat	72. saat
1	4.624±0.062	1.993±0.063	2.957±0.080	3.407±0.102	4.127±0.134
Kontrol	8.460±0.028	8.757±0.032	8.436±0.009	8.202±0.176	8.051±0.024
2	3.908±0.115	1.535±0.098	2.431±0.030	3.178±0.087	4.016±0.052
Kontrol	8.257±0.112	8.677±0.058	8.616±0.003	7.049±0.084	7.221±0.040
3	4.515±0.110	2.899±0.093	4.514±0.081	4.705±0.099	5.797±0.011
Kontrol	8.755±0.121	8.687±0.005	4.514±0.014	7.294±0.013	7.314±0.033
4	5.445±0.064	2.163±0.138	3.399±0.091	3.713±0.049	4.024±0.038
Kontrol	8.673±0.092	8.163±0.046	8.196±0.104	7.277±0.046	7.293±0.034
5	4.528±0.123	1.518±0.116	3.313±0.133	5.003±0.100	6.687±0.082
Kontrol	8.442±0.112	8.601±0.023	8.558±0.014	8.348±0.029	8.307±0.032
6	3.450±0.101	2.192±0.115	3.973±0.107	5.580±0.021	6.777±0.038
Kontrol	7.828±0.078	7.553±0.067	7.292±0.045	7.314±0.033	7.293±0.034
7	4.206±0.082	1.338±0.090	2.481±0.054	3.356±0.080	4.278±0.066
Kontrol	8.638±0.043	8.394±0.052	8.429±0.099	8.098±0.021	8.121±0.043
8	4.558±0.106	2.264±0.199	2.986±0.134	3.329±0.086	3.725±0.045
Kontrol	8.208±0.020	8.883±0.078	8.305±0.090	7.488±0.063	7.486±0.022
9	3.413±0.163	1.701±0.072	2.841±0.094	3.597±0.105	4.221±0.019
Kontrol	8.217±0.057	8.651±0.063	8.199±0.046	8.085±0.039	8.118±0.033
ATCC 33152	2.417±0.099	1.624±0.092	2.578±0.057	2.928±0.036	3.147±0.028
Kontrol	8.109±0.058	7.360±0.052	7.160±0.089	7.324±0.082	7.312±0.063

L. pneumophila bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitleri içerisinde üreme yetenekleri incelendiğinde bakterilerin 3 gün boyunca sayılarını arttırdıkları, ancak üremenin en hızlı olduğu dönemin ilk 24 saatlik süre olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.24 ve Şekil 4.39). İncelenen tüm bakteriler arasında hücre içi üreme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

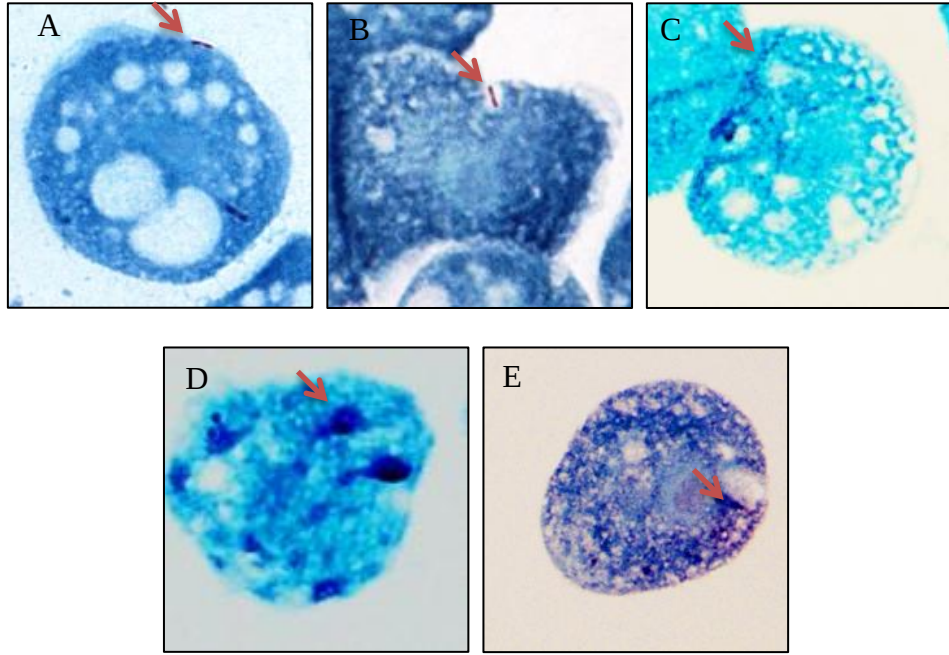
24. saat sonunda *A. castellanii* trofozoitleri içinde üreyen bakteri sayıları ile hücre içine giren bakteri sayıları kıyaslandığında hücre içi üreme yeteneği en yüksek olan bakterinin 1.80 log artış sağlayan izolat 5 olduğu, bunu sırasıyla izolat 6, 3, 4, 7, 9, 1, ATCC 33152, izolat 2 ve 8'in (sırasıyla 1.78; 1.62; 1.24; 1.14; 0.96; 0.95; 0.90 ve 0.72 log) takip ettiği tespit edilmiştir (Tablo 4.24 ve Şekil 4.39).

48. saat sonunda *A. castellanii* trofozoitleri içerisindeki *L. pneumophila* sayıları hücre içine giren bakteri sayıları ile kıyaslandığında hücre içi üreme yeteneği en yüksek olan bakterinin izolat 5 (3.49 log) olduğu, bunu sırasıyla izolat 6, 7, 9, 3, 2, 4, 1, ATCC 33152 ve izolat 8'in (sırasıyla 3.39; 2.02; 1.90; 1.81; 1.64; 1.55; 1.41; 1.30 ve 1.06 log) takip ettiği saptanmıştır (Tablo 4.24 ve Şekil 4.39).

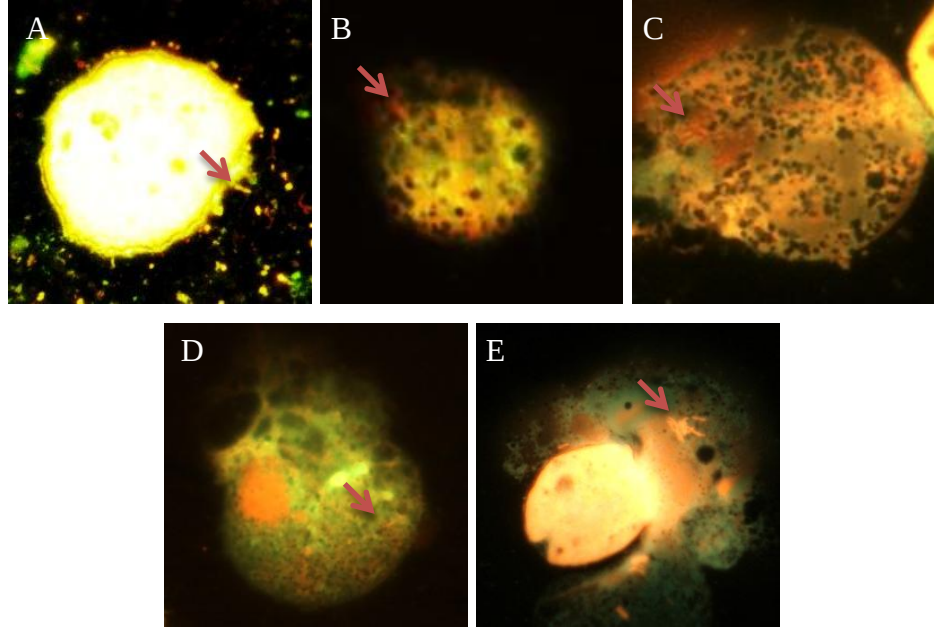
72. saat sonuçları incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitleri içerisinde üreme yeteneği en yüksek olan bakterinin izolat 5 (log 5.17) olduğu, bunu sırasıyla izolat 6, 7, 3, 9, 2, 1, 4, ATCC 33152 ve izolat 8'in (sırasıyla 4.58; 2.94; 2.90; 2.52; 2.48; 2.13; 1.86; 1.52 ve 1.46) izlediği saptanmıştır (Tablo 4.24 ve Şekil 4.39). *A. castellanii* trofozoitleri içerisinde en yüksek üreme yeteneği gösteren bakteri olan izolat 5'e ait ışık ve epifloresans mikroskobu görüntüleri Şekil 4.40 ve 4.41'de sunulmuştur.



Şekil 4.39: *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitleri içinde üreme kapasiteleri



Şekil 4.40: *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitlerine yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin ışık mikroskobu görüntüleri (izolat 5) (100x) [A: yapışma; B: giriş; C: 24. saat; D: 48. saat; E: 72. saat]



Şekil 4.41: *L. pneumophila* bakterilerinin *A. castellanii* trofozoitlerine yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi üreme deneyinin epifloresan mikroskobu görüntüleri (izolat 5) (100x) [A: yapışma; B: giriş; C: 24. saat; D: 48. saat; E: 72. saat]

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Legionellaceae ailesinin tek cinsi olan *Legionella*, 20'si hastalık etkeni 50'den fazla türe ve 70'in üzerinde serogruba sahiptir. Cinsin en iyi bilinen üyesi olan *L. pneumophila*'nın 16 serogrubu tanımlanmıştır. Bu serogruplar içerisinde en patojen olarak bilineni serogrup 1'dir (Benson ve Fields, 1998). Legionellosis salgını tehlikei açısından bakterinin türü ve serogrubu kadar aerosol yoluyla alınan bakterinin sayısı da çok önemlidir.

Legionella cinsi bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların önüne geçebilmek için başta oteller, hastaneler ve fabrikalar olmak üzere pek çok işyeri, soğutma kuleleri gibi çevreye aerosol yayabilecek ünitelerini düzenli olarak *Legionella* varlığı açısından incelettirmekte, bu bakterinin sistemlerinde kolonize olup çoğalmasını önlemek için temizleme ve dezenfeksiyon yöntemleri uygulamaktadırlar. Ülkemizde ve diğer Avrupa ülkelerinde *Legionella* cinsi bakteriler ile yapılan çalışmalar daha çok su sistemlerinde bakterinin varlığının araştırılması ve onunla mücadelesi üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak su sistemlerinde bakterilerin var olması her zaman salgınlara sebep olmamaktadır. Bu nedenle her ne kadar bu bakterinin su çevrelerine kolonize olup çoğalmasının engellenmesi öncelikli bir aşama olsa da bu bakterilerin virülansının değerlendirilmesi de önemlidir. Son yıllarda moleküler yöntemlerdeki gelişmelerle özellikle bakterinin hastalık yapma yeteneği daha detaylı olarak incelenmeye başlanmıştır. *L. pneumophila*'nın virülansını belirlemeye yönelik çalışmalarda bakterinin hareket yeteneği, yapışma ve biyofilm oluşturma kapasitesi, konak hücre içine girişi ve çoğalması, sahip olduğu ekstraselüler enzimler ve toksinler gibi virülans faktörleri incelenmiştir (Dowling ve diğ., 1992; Steinert ve diğ., 2002; Diederer, 2008). *L. pneumophila* patojenitesi üzerine yapılan çalışmalar; bakterinin doğada nasıl hayatta kaldığını, konak hücreye girişinde hangi mekanizmaların rol oynadığını, fago-lizozom oluşumunun nasıl engellendiğini, hangi şartlarda ve nasıl konak hücreyi terkettiğini anlamaya yönelik çalışmalardır. Bakterinin patojenite derecesinin yani virülans

özelliğinin belirlenmesi *Legionella* bakterilerine karşı daha etkili ve hızlı mücadele yöntemlerinin geliştirilmesinde ve bakterinin daha iyi anlaşılmasında hiç şüphesiz büyük fayda sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmamızda İstanbul ilindeki insan yapımı su sistemlerinden izole edilmiş dokuz farklı *L. pneumophila* SG1 izolatu ile standart *L. pneumophila* SG1 bakterisinin (ATCC 33152) virölansları incelenmiştir. Çalışmamız kapsamında bakterinin hem doğada hayatta kalmasını sağlayan hem de konak hücreye girişini düzenleyen flagella yapısı ile biyofilm oluşturma kapasitesi, tip II sekresyon sisteminde yer alan ve bakterinin konak içi üremesini sağlayan enzimatik aktiviteleri ile farklı konak hücrelerine karşı gösterdiği patojenite özellikleri incelenmiştir.

Mikroorganizmaların canlı ya da cansız bir yüzeye tutunarak polisakkarit ürünler salmaları sonucu oluşan biyofilm tabakası, bakterilerin besin maddelerine kolay ulaşmasını, sıcaklık, pH, kimyasal maddeler ve avcı organizmalardan korunmasını sağlayan bir yapıdır. Bununla birlikte olgun bir biyofilmden, ortak yaşama adapte olmuş mikroorganizma kominiteleri parçalar halinde koparak yeni yüzeylere dağılır ve burada çok daha hızlı bir biyofilm tabakası oluşturarak yaşamlarına devam ederler (Sutherland, 2001; Donlan, 2002). Doğal yaşam ortamındaki biyofilm oluşumu, doku kültürü pleytlerinde yapılan monospesifik biyofilme kıyasla çok daha uzun bir sürede meydana gelmektedir. Türetgen (2005), laboratuvar ölçekli soğutma kulesi model sisteminde yürüttüğü çalışmasında gerek heterotrofik canlı bakterilerin gerekse *L. pneumophila* bakterisinin farklı yüzeylerde biyofilm oluşturabildiğini, ancak biyofilm içerisindeki bakterilerin yaklaşık 100 gün sonra plato evresine girdiğini saptamıştır.

Doğal yaşam ortamında biyofilm oluşturduğu bilinen *L. pneumophila*'nın yapay besiyeri içerisinde tek tip hücreli (monospecies) biyofilm oluşturmaya yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (Mampel ve diğ., 2006; Piao ve diğ., 2006; Hindre ve diğ., 2008). Bakterinin doğada oluşturduğu gerçek kompleks biyofilm yapısını yansıtmayan monospesifik biyofilm deneylerinin amacı ise bakterinin serbest formdan biyofilm formuna adaptasyonunu anlamak ve bu durumun bakterinin yaşamı üzerine olan etkisini saptamaktır. Yapılan çalışmalar planktonik bakterilerin biyofilm içerisine adapte olma eğiliminin olduğunu ve bu durumun bakteri türüne, serogrubuna ve hatta alttürüne bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (Mampel ve diğ., 2006; Piao ve diğ., 2006).

Tez çalışmamızda *L. pneumophila* bakterilerinin tek tip hücreli biyofilm oluşturma kapasitesini belirlemek için yapılan deneylerde bu bakterilerin cansız yüzeye tutunma kapasitesinin 6. ve 24. saatlerde anlamlı ölçüde ($p<0.05$) arttığı görülmüştür. Gerek 6. gerekse 24. saatler sonunda tutunma kapasitesi en yüksek olan bakterinin izolat 4 olduğu saptanmıştır.

Legionella cinsi bakterilerin su kaynaklarındaki konağı olan amipler, bu bakterinin diğer konaklarından farklı olarak fagositozu savunma değil beslenme amacıyla kullanır. Bu durum *Legionella* bakterilerinin memeli fagositer hücrelerine göre amibe tutunması ve hücre içerisine alınmasının farklı olmasına neden olmaktadır (Dowling ve diğ., 1992). Konak hücre tipleri arasındaki en önemli farklardan biri de bakterinin amip hücresine yapışması esnasında herhangi bir aracıya ihtiyaç duymayıp memeli fagositer hücrelerine yapışmasında ve hücre içine alınmasında opsonizasyonun önemli bir role sahip olmasıdır (Husmann ve Johnson, 1992). Bununla birlikte bakterinin su kaynaklarında hayatta kalmak için biyofilm tabakası içine yerleştiği ve üremek için bu tabaka içinde yer alan amip türlerini konak olarak kullandığı bilinmektedir (Hsu ve diğ., 2011). Bakterinin özellikle biyofilm içerisinde tutunmuş durumdaki amip trofozoitlerini enfekte edebilmesi de önemli bir noktadır. Bu durum izolat 4'ün cansız yüzeye yapışma kapasitesi ile *A. castellanii* trofozoitlerine yapışma kapasitesi açısından arasındaki korelasyonu da açıklayabilir. Ayrıca bakterinin doğal su ortamlarında hayatta kalabilmesi için kullandığı iki faktör olan biyofilm oluşturma ve amip trofozoitlerine yapışma özelliği açısından bir korelasyon olması, bu iki durumda yapışmanın bakteri yüzeyindeki yapışma faktörlerine bağlı olduğunu da göstermektedir.

Deneyde kullanılan *L. pneumophila* bakterilerinin biyofilm içerisindeki 14 günlük üreme kapasiteleri ile PKMH, PM ve amip trofozoitleri içerisinde üreme kapasiteleri kıyaslandığında, sadece biyofilm içerisinde üreme ile amip trofozoitleri içerisinde üreme arasında anlamlı, pozitif yönlü güçlü bir korelasyon ($r = 0.72$, $p < 0.05$) olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, cansız yüzeye tutunma ile konak hücreye yapışma deneylerinde olduğu gibi bakterilerin üreme özelliklerinin de yaşam alanına bağlı olarak benzerlikler gösterdiğini, yani biyofilm ve amip içerisinde üreme özellikleri arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda ilk 6 saatte yüzeye tutunan *L. pneumophila* bakterilerinin oluşturdukları biyofilm içerisinde üreme yetenekleri incelendiğinde, ATCC 33152 bakterisinin biyofilm içerisindeki sayısını 2. günde arttırdığı, izolatların ise anlamlı bir artışa 3. günde ulaştıkları saptanmıştır. ATCC 33152 bakterisinin biyofilm içerisinde sayısını izolatlara oranla daha kısa sürede arttırmasına rağmen üreme hızında 3. günden sonra yavaşlama meydana geldiği, 7. ve 14. günlerde ise biyofilm içerisinde üreme kapasitesi en düşük bakteri olduğu saptanmıştır. Bakterilerin cansız yüzeye tutunma ve biyofilm içerisinde üreme kapasitelerinin farklılık göstermesinin nedeni standart bakterinin 1976 Philadelphia salgınından sonra ölen hastalardan birinin akciğer örneğinden izole edilmiş, incelenen diğer *L. pneumophila* bakterilerinin ise doğadan izole edilmiş olması olabilir. Her ne kadar ATCC’nda bakteriler fenotipik ve genotipik özellikleri mutasyon geçirmeyecek şekilde muhafaza edilmiş olsa da izolasyonundan bu yana 35 sene geçtiği, kullanılan diğer bakterilerin ise 2006-2009 yılları arasında izole edildiği de göz önünde bulundurulmalıdır. İzole edildiğinden çalışıldığı tarihe kadar geçen dönemde bakterinin uğrayabileceği mutasyonlar fenotipik özelliklerine yansıyabileceği için standart bakteri ile izolatlar arasındaki farklılıkların genetik açıdan da değerlendirilmesi önemlidir.

L. pneumophila bakterilerinin biyofilm içerisinde 14 günlük üreme kapasiteleri değerlendirildiğinde izolat 2’nin biyofilm içerisindeki sayısını 3. günde en fazla arttıran bakteri olduğu, 4. gün üreme hızını azaltmasına rağmen 7. ve 14. günlerde üreme kapasitesi en yüksek bakteri olduğu tespit edilmiştir. Bakterilerin biyofilm içerisindeki üreme hızlarını sürekli değiştirmeleri, bulundukları ortamda ne denli zayıf tutunduklarını göstermektedir. Bu durum bakterilerin tek başına gevşek tutunmalar yaptığını ve karışık kominiteler oluşturamadıklarında yüzeye sıkı bağlanmalar yapamadıklarını düşündürmektedir. Ayrıca bir diğer faktör olarak sıcaklık da göz önünde bulundurulmalıdır. Hindre ve diğ. (2008) yaptıkları bir çalışmada, *L. pneumophila* için en ideal biyofilm oluşum sıcaklığının 20 °C olduğunu ve 37 °C’de biyofilm içerisinde üremenin daha az stabil olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Mampel ve diğ. (2006) de 37 °C’deki biyofilm oluşumunun 30 °C’dekine oranla % 30 daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu bakterinin yapışmadan sorumlu flagella ve tip IV pili sekresyonunu sıcaklığa bağlı olarak düzenlemesine bağlamaktadır (Mampel ve diğ., 2006).

Cansız yüzeye tutunma kapasitesi en yüksek bakteri olan izolat 4'ün ise özellikle 7. ve 14. günlerde biyofilm içerisinde üreme hızını azalttığı saptanmıştır. Elde edilen deney sonuçları bakterilerin cansız yüzeye yapışma kapasiteleri ile biyofilm içerisinde üreme yetenekleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

L. pneumophila bakterilerinin virülanslarını değerlendirmek için tez çalışmamız kapsamında bu bakterilerin hareket özellikleri ve flagellaya sahip olup olmadıkları incelenmiştir. *Legionella* cinsi bakteriler, FlaA olarak adlandırılan 48 kDa'luk bir subüniteden oluşan monopolar bir flagellaya sahiptir. *Legionella* bakterilerinin flagellaya sahip olup olmaması virülanslarında önemli bir yere sahiptir. Bakterinin hareketli oluşu, doğada konak hücrelerini bulmasını ve biyofilm içerisinde kolonizasyonunu kolaylaştıran bir faktördür (Ott ve diğ., 1991; Bangsberg ve diğ., 1995; Heuner ve diğ., 1999). Ayrıca bakterinin ürettiği ortam koşulları veya konak organizma da hareket ve flagella üzerine etkili olan faktörlerdir. Rowbotham (1986), besiyeri içeriği yeterince uygun olmayan ortamda üretilen *L. pneumophila*'ların flagella yapılarını kaybettiklerini, üreme özelliğini ve hareket yeteneklerini kaybetmiş olan bu bakterilerin ise amip enfeksiyonundan sonra hareketli ve replikatif forma dönüştüklerini saptamıştır. Tez çalışmamız kapsamında incelenen çevresel *L. pneumophila* izolatların tümünün hareketli ve polar flagellaya sahip olmaları incelenen bu bakterilerin virulent suşlar olma ihtimallerinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Fimbriyalar (pililer), bakterilerin konak organizmanın mukoza yüzeylerine yapışmasından sorumlu organelleridir. Mukoza yüzeyine yapışma özelliği, bir bakterinin konak organizmada enfeksiyon ve enfeksiyon hastalığı oluşturabilmesinin birincil koşulu olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Bakteri fimbriyaları farklı hücre tipleri arasında eritrositlere de yapışabilme ve böylelikle eritrositleri aglutine etme (hemaglutinasyon) yetenekleri ile bakteri hemaglutininleri arasında yer almaktadırlar. Bu bağlamda, fimbriyaların varlıklarını ve yapışmada oynadıkları rolü göstermeye yönelik *in vitro* araştırmalarda kullanılan yöntemlerden biri de bakterilerin hemaglutinasyon yeteneklerinin gösterilmesine dayanır (Kimiran ve Anđ-Küçüker, 2002). Çalışmamızda *Legionella* bakterilerinde bulunduğu bilinen yapışmadan sorumlu tip IV fimbria varlığını incelemek amacıyla ATCC 33152 ile *L. pneumophila*

izolatlarının insan eritrositleri üzerine mannoza dirençli hemaglutinasyon özellikleri incelenmiştir.

Stone ve Abu Kwaik, 1998’de yaptıkları bir çalışmada *L. pneumophila*’nın yüzeyinde 0.8-1.5 mm ile 0.1-0.6 mm uzunluğunda iki farklı pili bulunduğunu saptamıştır. Bu iki pili bir bakterinin yüzeyinde aynı anda bulunmadıkları gibi aynı kültürdeki hücrelerin bazılarının yüzeyinde de pili oluşumuna rastlanamamaktadır. Bu pililerden biri CAP (competence- and adherence-associated pili) olarak tanımlanan tip IV pilidir. Araştırmacılar *Legionella* bakterilerinin sahip olduğu bu fimbriyayı oluşturan tip IV pilin proteininin, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Pseudomonas aeruginosa* tip IV pilin proteinleri ile benzerlik gösterdiğini saptamıştır. *L. pneumophila*’nın sahip olduğu tip IV pilinin memeli konak hücresine komplement gerektirmeyen bağlanmadan sorumlu olduğu bilinmektedir (Abu Kwaik, 1998). Bakterinin sahip olduğu diğer pilinin yapışmadaki rolü ise henüz netlik kazanmamıştır.

Çalışmamızda tüm bakterilerin hemaglutinasyon özelliğine sahip olduğu, bununla birlikte izolat 1, 2, 4 ve 5’in 2 dk içerisinde güçlü hemaglutinasyon oluşturduğu tespit edilmiştir. En zayıf hemaglutinasyon özelliği gösterten bakterilerin 8 ve 9 numaralı izolatlar olduğu saptanmıştır. *L. pneumophila* bakterilerinin hemaglutinasyon özellikleri göz önünde bulundurulduğunda virülansı en yüksek olan dört bakterinin (izolat 1, 2, 4 ve 5) hemaglutinasyon yeteneği en yüksek bakteriler olduğu görülmektedir. Ayrıca deney esnasında en hızlı hemaglutinasyon oluşturan izolat 2, tüm testler göz önünde bulundurulduğunda virülansı en yüksek olan bakteridir. Bununla birlikte çalışmamızda incelenen tüm *L. pneumophila* bakterilerinin 2 dk içerisinde MR-HA oluşturduğu, dolayısı ile tip IV fimbriyaya sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum hemaglutinasyon yapma yeteneğinin ve dolayısıyla virülans faktörleri arasında yer alan ve yapışmadan sorumlu tip IV fimbria oluşumunun *L. pneumophila* bakterilerinin patojenitesi hakkında bilgi vermesi yönünden çok önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

L. pneumophila bakterilerinin virülans faktörlerini değerlendirmek için sekresyon sistemlerinin de incelenmesi gereklidir. *Legionella* cinsi bakterilerin patojenitelerinin bir parçası olarak enfeksiyon sırasında ürettikleri birçok enzim, pigment ve toksini uygun besiyerlerinde üretildikleri zaman da sentezledikleri saptanmıştır (Friedman ve

diğ., 1980; Thorpe ve Miller, 1981; Blanchard ve diğ., 1989; Aragon ve diğ., 2000). *Legionella* cinsi bakterilerin en iyi bilinen pigmenti hemolitik aktiviteye sahip legiolizin'dir (Wintermeyer et al., 1994; Steinert et al., 1995). 1991 yılında Rdest ve diğ. tarafından tanımlanan bu enzimin hücre içi üremede etkili olduğu ve akciğerlerde doku harabiyetine sebep olduğu belirtilmektedir. Keen ve Hoffman (1989) hemoliz aktivitesine sahip olduğu bilinen çinko-metalloproteazın *L. pneumophila* bakterisinde de hemoliz ve sitotoksiteden sorumlu olduğunu saptamışlardır.

Hemolitik aktivitenin belirlenmesi amacıyla çalışmamızda % 5 insan veya koyun eritrositi içeren eBYEA besiyeri kullanılmıştır. Ön denemelerde bakterilerin 3 günlük inkübasyon süresi sonunda α ve β hemoliz zonları oluşturdukları, oluşan bu zonların 6. güne kadar genişlemeye devam ettiği, daha sonra ise zon çaplarında bir değişiklik meydana gelmediği saptanmıştır. Bu nedenle tüm bakteriler için hemoliz aktivitesi 3. ve 6. günde oluşan zonların ölçümü ile belirlenmiştir.

L. pneumophila bakterilerinin hemolitik özelliği ilk kez Baine ve diğ. (1979) tarafından farklı memeli kanları ekledikleri Feeley Gorman Agar (FG Agar) üzerinde belirlenmiştir. Bu araştırmacılar hemoliz zonlarının bizim sonuçlarımızın aksine inkübasyonun 2. günü görünür hale geldiğini ancak gelişiminin 3. gün tamamlandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada *L. pneumophila*'nın at ve koyun eritrositlerine kıyasla tavşan ve kobay eritrositleri üzerine daha güçlü hemolitik aktiviteye sahip olduğu, en düşük hemolitik aktivitenin ise insan eritrositleri üzerine görüldüğü tespit edilmiştir. Çalışmamızda, *L. pneumophila* bakterileri tarafından hemolitik enzimlerin salınımının 6. güne kadar devam ettiği ve genel olarak *L. pneumophila* bakterilerinin insan eritrositleri üzerine koyun eritrositlerine göre daha güçlü hemolitik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Araştırmacıların modifiye FG Agar içerisine % 5 oranında defibrine kan ekleyerek hazırladıkları besiyerinin aksine çalışmamızda % 5 oranında yıkanmış eritrosit süspansiyonu içeren BYE Agar besiyeri kullanılmıştır. Sadece kullanılan besiyerleri arasındaki fark değil eritrosit süspansiyonu kullanımının da sonuçları etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, bazı eBYEA Petri kutularında β hemoliz zonları etrafında yarı şeffaf yeşilimtrak α hemoliz zonları da tespit edilmiştir. Bu tip durumlarda zon çapı ölçümü α hemoliz alanının çapı alınarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle hem α hem de β hemoliz gözlenen sonuçlarda α hemoliz zon çapı daha büyük olarak tespit edilmiştir.

Eritrosit içeren besiyerinde iç içe α ve β hemoliz zonlarının gözükmesi durumuna geniş-zonlu β hemoliz (wide-zone β hemolysis) denilmektedir. Bazı durumlarda alfa hemolitik bir bakteri kanlı agarda ürettiğinde, oluşturduğu koloninin etrafındaki eritrositleri etkilemezken daha uzaktakileri kısmen parçalar ve bu durum geniş-zonlu α hemoliz olarak adlandırılır. Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde insan patojeni streptokoklar, *Corynebacterium pseudotuberculosis* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilerin ve *Candida albicans*'ın geniş-zonlu β hemoliz oluşturdıkları saptanmıştır. Araştırmalar özellikle patojen bakterilerin geniş-zonlu β hemoliz yaptığını göstermektedir (Hebert ve Hancock, 1985; Özekinci ve diğ., 2007). *Legionella* bakterilerinin hemolitik özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde bu bakterilerin geniş-zonlu β hemoliz oluşturdıklarına dair bir veriye rastlanmamıştır.

Koyun eritrositleri içeren eBYEA üzerinde 6. gün sadece β hemoliz zonlarının görülmesi önemli bir faktördür. Bu durum bakterilerin koyun eritrositleri üzerinde β hemolitik özelliklerinin daha güçlü olduğunu kanıtlamaktadır. Bununla birlikte insan eritrositleri üzerinde hem 3. hem de 6. günlerde her iki hemoliz türünün gözükmesine rağmen koyun eritrositlerinde bazı bakterilerin sadece bir tip hemoliz oluşturabilmesi bakterilerin farklı hemolitik enzimlere sahip olduğunu ve bu enzimlerin daha detaylı incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Bu bakterilerin birden fazla hemolizine sahip oldukları bilinmektedir. Temel olarak eritrosit yüzeyindeki porlar ile bağlanarak bu porları genişleten hemolizinler hücre permeabilitesini bozarak eritrositlerin parçalanmasına sebep olmaktadır. Bununla birlikte genelde patojen mikroorganizmaların konak organizma hücreleri üzerine sahip oldukları litik aktiviteyi yansıtan hemolitik aktivitenin hangi moleküler yollarla hücreye bağlandığı netlik kazanmamıştır. Aslında bakterilerde farklı hemoliz çeşitlerini oluşturan litik enzimler farklı proteinlerdir (Winn ve diğ., 2006). Bu nedenle incelenen *L. pneumophila* bakterilerinin gerek alfa gerekse beta hemolizden sorumlu litik enzimlerinin farklı olduğu, aynı zamanda bu enzimlerin koyun ve insan eritrositleri için seçici etki

gösterdiği veya bu aktivitenin farklı enzimler tarafından oluşturulduğunu söylemek mümkündür. Çalışmanın devamında bu bakterilerin sahip olduğu hemolitik enzimlerin saflaştırılması, izolatlar arasındaki farklılıkların belirlenmesine ve virülansın daha detaylı olarak karşılaştırılmasına yardımcı olabilir.

L. pneumophila bakterilerinin hemolitik aktiviteleri değerlendirildiğinde bu bakterilerin koyun eritrositleri üzerinde zamana bağlı olarak değişen hemolitik aktiviteye sahip oldukları, ancak insan eritrositleri üzerinde özellikle izolat 1'in hem 3. hem de 6. günde en güçlü α ve β hemolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Legionella cinsi bakterilerin hemolitik özelliklerini belirleme amacıyla yapılan deneylerde hemoliz çeşidi ve zon çaplarının ölçümü göz önünde bulundurulmuştur. Bununla birlikte son yıllarda gerek mikroorganizmaların gerekse antimikrobik maddelerin hemolizleri ile ilgili yapılan çalışmalarda hemolitik indeks de kullanılmaktadır (Adderson ve diğ., 2003; Şeker, 2010; Azad ve diğ., 2011; Ferreira-Paim ve diğ., 2011; Kumar ve diğ., 2011). Sonuçlar incelendiğinde ölçülen hemoliz zon çapları ile hemolitik indeks değerleri arasında anlamlı bir korelasyon olduğu ($r = 0.761-0.996$; $p < 0.05$) saptanmıştır. Yapılan literatür incelemesinde mikrobiyal hemoliz aktivitesi için sadece β hemoliz zon çapları kullanılarak hemolitik indeks değerlerinin hesaplandığı belirlenmiştir (Şeker, 2010; Ferreira-Paim ve diğ., 2011). Bununla birlikte 3. ve 6. günlerdeki α ve β hemolitik indeks sonuçları arasındaki ilişki incelendiğinde insan eritrositleri üzerine elde edilen hemolitik indeks değerleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunduğu ($r = 0.733-0.903$; $p < 0.01$), koyun eritrositleri üzerine ise anlamlı bir korelasyon bulunmadığı ($p > 0.05$) tespit edilmiştir. Bu durum hemolitik indeksin her iki hemoliz tipine uygulanabilirliğini kanıtlarken *L. pneumophila* bakterilerinin hemolitik aktivitesinin tespit edilmesinde insan eritrositlerinin kullanılmasının daha doğru sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Legionella cinsi bakterilerin sahip olduğu bir diğer enzim ise proteazdır. Aslında hemolitik etki ile yakın ilişkili olduğu düşünülen bu enzim, zayıf bir virülans faktörü olarak değerlendirilmektedir. Kemotaksis ve polimorf nüklear lökositlerin oksidatif aktivitesini engelleyen enzim, sitotoksositeye ve IL-2 gibi bazı maddelerin yıkımına yol

açmakta, bakteri bu sayede konağın bağışıklık sistemine karşı kendini koruyabilmektedir (Conlan ve diğ., 1986; Blander ve diğ., 1990; Moffat ve diğ., 1994).

Çalışmamızda *L. pneumophila* bakterilerinin proteaz aktivitelerini karşılaştırmak amacıyla API ZYM test sistemi kullanılmıştır. API ZYM test stripleriyle lösin, valin ve sistin aminopeptidaz ile tripsin ve kemotripsin aktiviteleri incelenebilmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde incelenen *L. pneumophila* bakterinin tripsin ve kemotripsin aktivitesine sahip olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar *Legionella* cinsi bakterilerin proteolitik aktivitelerini inceleyen diğer araştırmacıların sonuçları ile uyum göstermektedir (Muller, 1981; Nolte ve diğ., 1982). İncelenen virülans faktörleri açısından en virulent bakteri olan izolat 2'nin proteolitik aktivite bakımından, diğer *L. pneumophila* bakterilerinden daha zayıf enzimatik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bakterinin lösin aminopeptidaz enzimi dışındaki diğer proteolitik enzimlere sahip olmadığı saptanmıştır. Biyofilm içerisinde üreme hızı en fazla olan bu bakterinin zayıf proteolitik etki göstermesi *L. pneumophila* bakterilerinin virülans faktörleri arasında yer alan proteolitik enzimleri ile biyofilm içerisinde üreme yetenekleri arasında bir ilişki olmadığını düşündürmektedir. İncelenen diğer bakteriler arasında proteolitik bakımdan tek fark izolat 6'nın güçlü valin aminopeptidaz reaksiyonu göstermesidir.

L. pneumophila bakterilerinin proteaz aktivitesi sonuçları ile insan ve koyun eritrositleri üzerine hemolitik indeksleri arasındaki ilişki incelendiğinde proteaz aktivitesi ile hemoliz aktivitesi arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı ($p > 0.05$) saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç, proteaz aktivitesi ile bakterinin sahip olduğu hemolizinler arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte proteaz aktivitesi ile hücre içi üreme arasında bir ilişki olup olmadığını saptamak için *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH, PM ve amip trofozoitleri içerisinde 72 saatlik üreme özellikleri ile proteaz aktiviteleri arasındaki korelasyon incelenmiştir. Sonuçlar, proteaz aktivitesi ile bir tek PKMH içerisinde üreme arasında anlamlı ve negatif bir korelasyon olduğunu ($r = -0.634$; $p < 0.05$) göstermektedir. Bu durum, virülans faktörlerinin bakteriye ve konağa bağlı olarak ne kadar değişkenlik gösterebildiğini kanıtlayan bir diğer sonuçtur.

Tez çalışmamız kapsamında incelediğimiz bir diğer faktör ise tip II sekresyon sisteminde kontrol edilen nükleaz aktivitesidir. *L. pneumophila*'nın DNaz ve RNaz

aktivitesine sahip olduğu ilk kez Thorpe ve Miller (1981) tarafından saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda DNaz aktivitesinin *L. pneumophila* virölansına etkisi kesin olarak saptanamamıştır (Aragon ve diğ., 2000; Rossier ve Cianciotto, 2001). Aslında *Legionella* cinsi bakterilerde nükleaz aktivitesinin hangi gen bölgesince kodlandığına dair çalışmalar henüz tamamlanmamıştır.

Çalışmamızda ATCC 33152 ile kıyaslandığında sadece izolat 1'in güçlü DNaz ve RNaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte izolat 3 ve 9'un her iki nükleik asiti eşit oranda parçaladığı, izolat 4, 7 ve 8'in ise DNaz aktivitesinin RNaz aktivitesinden daha güçlü olduğu, diğer bakterilerde bu durumun tam tersi olduğu görülmüştür. Aragon ve diğ. (2000), geç logaritmik evre bakterilerinden elde ettikleri süpernatantlarda nükleaz aktivitesini inceledikleri çalışmalarında bir diğer Philadelphia-1 standart bakterisi olan 130b (ATCC BAA-74) standart bakterisinin RNaz aktivitesinin DNaz aktivitesinden daha güçlü olduğunu belirtmişlerdir.

Birçok Gram pozitif patojenin ve *E. coli*, *Shigella* gibi Gram negatif bazı fırsatçı patojenlerin bu enzime sahip olduğu bilinmektedir (Sriskandan ve diğ., 2000; Russel ve Herward, 2005). Özellikle streptokokların patogeneğinde önemli bir yere sahip ekstraselular DNaz, bakterilerin çoğalmak için ihtiyaç duydukları nükleik asitlere daha kolay ulaşmalarını sağlayabildiği gibi doğal bağışıklık sisteminde yer alan nütrofillerin parçalayıcı etkilerinden de bakterinin korunmasını sağladığı belirlenmiştir (Sumbly ve diğ., 2005; Hasegawa ve diğ., 2009). Brinkmann ve diğ. (2004), *Shigella flexneri* ve *S. aureus*'a karşı nütrofillerin ekstraselular bakterisidal aktivitelerinin bu bakterilerce salınan DNaz aktivitesi ile yok edildiğini belirtmişlerdir.

Patojen bakteriler üzerinde yürütülen ribonükleaz çalışmaları, bu bakterilerin gerek endo- gerekse ekzo-ribonükleazlara ihtiyaç duyduklarını belirtmektedir (Tsao ve diğ., 2009; Lawal ve diğ., 2011). Özellikle konak organizma içinde sentez faaliyetleri sırasında RNA stabiliteğini korumak için endo-ribonükleazlara ihtiyaç duyan bu bakteriler stres faktörü olarak tanımlanan ekzo-ribonükleazları ile özellikle mRNA stabilitesini düzenlemektedirler (Domingues ve diğ., 2009). Erova ve diğ. (2008), yaptıkları bir çalışmada ekzo-ribonükleaz enziminden yoksun *Aeromonas hydrophila* mutantlarının fare üzerinde daha az virulent olduğunu (hayvanların hayatta kalma

oranları % 70) saptamıştır. Araştırmacılar özellikle pürin nükleosid fosforilaz enziminin fosforilasyonundan sorumlu bu ribonükleazların bakterinin virülans gen ekspresyonlarını düzenlemede gerekli olduğunu belirtmektedir.

Yapılan çalışmalar *L. pneumophila*'da RNaz aktivitesinin yapışma ve hücre içi patojeniteyi düzenleyen *pilD* genince düzenlendiğini göstermektedir (Aragon ve diğ., 2000). Rossier ve Cianciotto (2001) yaptıkları çalışmada RNaz aktivitesi göstermeyen mutantların besiyerinde ve insan fagositer hücre kültüründe çoğaldığını ancak amip içerisinde çoğalamadıklarını saptamışlardır.

Çalışmamızda *L. pneumophila* bakterilerinin DNaz ve RNaz aktiviteleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla korelasyon analizi yapıldığında bu iki nükleaz aktivitesi arasında pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon olduğu ($r = 0.834$; $p < 0.01$) belirlenmiştir. Çalışmamız kapsamında en düşük RNaz aktivitesine sahip bakteri olan izolat 8'in amip trofozoitleri içerisinde çoğalma kapasitesi en düşük bakteri olması, Rossier ve Cianciotto (2001) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile uygunluk göstermesi, bakteri konak ilişkisinde rol oynayan faktörlerle nükleaz aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte *L. pneumophila* bakterilerinin nükleaz aktiviteleri ile üç farklı konak hücrelerine yapışma, hücre içine giriş ve hücre içinde üreme yetenekleri bakımından elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki ilişki incelendiğinde DNaz ve RNaz aktivitesi ile konak hücre patojenitesi arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç, *L. pneumophila* bakterilerinin konak hücre patojenitesinde nükleaz aktivitesinin gerekli olmadığını düşündürmektedir. Ancak bu çıkarımın doğru olup olmadığını anlamak için nükleaz aktivitesi göstermeyen mutantların konak hücre patojenitesi de değerlendirilmelidir. Ayrıca konak hücre patojenitesi *in vitro* şartlarda çalışıldığı için *in vivo* ortamda bu enzimlerin patojenite ile ilişkileri hakkında yorum yapamamaktayız. Dolayısıyla model organizma (kobay, fare, vb) enfeksiyonu ile nükleaz aktivitesini kıyaslamadan *L. pneumophila* bakterilerinin konak organizma üzerine patojeniteleri ile nükleaz aktiviteleri arasında ilişki olmadığı sonucunu doğrulayamayız.

Tip II sekresyon sisteminde yer alan fosfolipazlar, bir çok patojen bakterinin virülans faktörleri arasında önemli bir yere sahiptir. Bakteriyel fosfolipazlarla fosfolipitlerin

parçalanarak hücre bütünlüğünün bozulması ve hücre harabiyeti, bakteriyel enfeksiyonun temel unsurlarından biridir. Baine (1985), *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae* ve *L. jordanis* bakterilerinin, konak hücre membranında bulunan fosfotidil kolini parçalayacak PLC enzimlerini sayesinde, lökositlerde ve dokuda hasara sebep olduklarını belirtmiştir. Bununla birlikte Flieger ve diğ. (2000) yaptıkları çalışmada *Legionella* bakterilerinin akciğerlerde epitel hücrelerinin harabiyetinde rol oynayan güçlü bir PLA aktivitesine de sahip olduğunu saptamıştır.

Çalışmamızda *L. pneumophila* bakterilerinin hücre lizatları ile süpernatantlarında PLA ve PLC aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde membrana bağlı PLA'nın hücre dışına salınımının oldukça sınırlı olduğunu görülmüştür. Bu sonuç, Baine (1985)'in PLA'nın bakterinin hücre duvarında yer alan bir enzim olduğunu belirttiği çalışması ile uyum göstermektedir. Bununla beraber, Aragon ve diğ. (2000) yaptıkları bir çalışmada, elde ettiğimiz sonuçların tersine enzimin hücre dışına salınımının daha fazla olduğunu belirtmiştir. Bu farkın muhtemel sebebinin çalışmamızda geç logaritmik evredeki bakterilerin süpernatant ve hücre lizatları kullanılırken bu araştırmacıların durağan fazın ortalarındaki bakterilerden hazırlanan süpernatantların ve hücre lizatlarını kullanmaları olduğunu düşünmekteyiz.

Deneylerde kullanılan *L. pneumophila* bakterilerinin PLA aktiviteleri sonuçları göz önünde bulundurulduğunda izolat 1'in hem hücre lizatının hem de süpernatantının en güçlü enzimatik aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Flieger ve diğ. (2000), PLA enziminin PLC yerine salgılandığı sonucuna varmıştır. Çalışmamızda bakterilerin hücre lizatları ve süpernatantlarının PLA ve PLC aktiviteleri arasındaki ilişki incelendiğinde *L. pneumophila* hücre lizatlarının PLA aktivitesi ile süpernatantların PLC aktivitesi arasında pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon ($r = 0.648$; $p < 0.05$) olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla, bu sonuç *L. pneumophila* bakterilerinin PLA ve PLC aktivitelerinin benzer enzimler olduğu sonucunu düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmamızda en güçlü PLA ve PLC aktivitesi gösteren süpernatantın izolat 1'e ait olması da bu durumu destekler niteliktedir.

Çalışmamızda elde edilen bakteri süpernatantlarının PLC aktivitesinin hücre lizatlarına oranla daha yüksek olduğu sonucu Aragon ve diğ. (2000)'nin deney sonuçları ile uygunluk göstermektedir. Bu durumu değerlendiren Aragon ve diğ. (2000), saptadıkları PLC aktivitesinin fosfataz veya esteraz etkisi olabileceğini yorumlamışlardır.

L. pneumophila bakterilerinin PLA ve PLC aktivitelerinin konak hücre patojeniteleri ile olan ilişkisi incelendiğinde bakterilerin PM'a yapışma özellikleri ile PLC aktiviteleri arasında pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon olduğu ($r = 0.818$; $p < 0.01$) saptanmıştır. *L. pneumophila* bakterilerinin konak hücre patojenitelerinde sahip oldukları PLA ve PLC aktivitelerinin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

Legionella cinsi bakterilerin hücre içi üremesinde etkili olan ve bu nedenle virülanslarında önemli bir yere sahip bir diğer tip II sekresyon sistemi enzim grubu ise fosfatazlardır. *Legionella* cinsi bakterilerde hücreye bağlı alkali fosfataz ile hücreden salınan asit fosfataz aktivitesi saptanmıştır. Alkali fosfataz, periplazmik alanda aktivite gösteren ve bakterinin inorganik fosfatı kullanmasına olanak sağlayan bir enzimdir (Thorpe ve Miller, 1981; Aragon ve diğ., 2000; Flieger ve diğ., 2000). Broich ve diğ. (2006), *L. pneumophila*'nın sahip olduğu alkali fosfataz aktivitesinin bakterinin yeni konakları enfekte etmesinde rol oynayan LetA ve RpoS proteinlerinin ekspresyonu ile ilişkili olduğunu belirtmektedir.

Çalışmamızda incelenen *L. pneumophila* hücre lizatlarının p-nitrofenil fosfattan alkali ortamda p-nitrofenil açığa çıkartan alkali fosfataz aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca API ZYM test sistemi ile de *L. pneumophila* izolatlarının bu enzime sahip olduğu doğrulanmıştır. Yapılan diğer çalışmaların aksine çalışmamızda ATCC 33152 ve *L. pneumophila* izolatlarının ne hücre lizatlarında ne de süpernatantlarında asit fosfataz aktivitesi saptanamamıştır. Bu bakterilerin direkt kullanıldığı API ZYM test sisteminde izolat 5, 6 ve 8'in güçlü pozitif, diğer tüm bakterilerin ise asit fosfataz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. İncelenen *L. pneumophila* hücre lizat ve süpernatantlarının asit fosfataz aktivitesi göstermemesine karşın API ZYM test striplerinde asit fosfataz aktivitesi görülmesi ilk başta substratın bozuk olabileceğini düşündürmüştür. Ancak alkali fosfataz aktivitesi için de aynı p-nitrofenil fosfatın kullanıldığı ve bakterilerin hücre lizatlarında alkali fosfataz aktivitesinin saptanmış

olması, bu durumun kullanılan substrat ile ilgili bir problemten kaynaklanmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca deney esnasında pozitif kontrol olarak kullanılan ticari enzim solüsyonlarının bulunduğu kuyucuklarda da pozitif sonuç alınması önemlidir. Tüm bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda bu bakterilerde asit fosfataz aktivitesinin tayininde kullanılan yöntemin uygun olmadığını düşündürmektedir. İleride bir tarihte asit fosfataz aktivitesinin mevcut farklı yöntemler kullanılarak tekrarlanması planlanmaktadır.

L. pneumophila bakterilerinin alkali fosfataz aktivitesinin zamana bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Enzimatik aktivite ölçümleri zamana bağlı olarak ya substrat tüketimini veya ürün üretimini temel almaktadır. Enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonda substrat ve ürün konsantrasyonlarını sıcaklık, pH ve süreye bağlı olarak takip ederek enzimatik aktiviteyi tayin etmek mümkündür. Substrat ile enzimi bir araya getirince ilk olarak enzim aşırı miktarda bir substrat ile karşılaşır ve geçici bir dönem boyunca enzim-substrat ara ürünü hızla birikir. Ardından, reaksiyon sabit durum kinetiğine ulaşır, enzim-substrat ara ürün konsantrasyonu zaman içinde yaklaşık sabit kalır ve reaksiyon hızı nispeten yavaş değişir. Bu aşamadan sonra ikinci aşama olan substratların hızla yıkımı gerçekleşir. Bu hızlı yıkım döneminin ardından, reaksiyon dengeye ulaşır ve açığa çıkan substrat miktarı sabit kalır (Schnell ve diğ., 2006). Enzimatik aktivite spektrofotometrik, florometrik, kalorimetrik, kemilüminesans ve ışık saçılımı metotları ile ölçülebilir. Açığa çıkan ürünler bu yöntemlerden hangisi için uygun ise o yöntemle zamana bağlı olarak kaydedilerek enzimatik aktivite değerlendirilir. Ancak burada açığa çıkan ürünlerin yarılanma ömürleri ve ölçüm yöntemi ile ne kadar sürede değerlendirilmeleri gerektiğinin bilinmesi önemlidir (Passonneau ve Lowry, 1993). Çalışmamızda, 5 saat boyunca açığa çıkan ürün miktarı zamana bağlı olarak artmaya devam etse de bunu enzimatik aktivite olarak değerlendirdiğimizde enzimatik aktivitenin zamana bağlı olarak 2. saatten sonra azaldığını tespit edilmiştir. Bu durum, muhtemelen sabit substrat içeriğinin çoğunun 2 saat içerisinde katalizlenmesi ve açığa çıkan ürünlerin miktarının azalması olabilir. Bununla birlikte 5 farklı saate ait alkali fosfataz aktiviteleri arasındaki ilişkiyi incelediğimizde pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon olduğunu ($r = 0,953-0,976$; $p < 0,01$) belirlemiş bulunmaktayız. *L. pneumophila* bakterilerinin alkali fosfataz aktiviteleri ile konak hücre üzerine patojenite deneyleri arasındaki ilişki incelendiğinde alkali fosfataz

aktivitesi ile PKMH'lerine yapışma ve PM'a girişi arasında negatif yönlü anlamlı bir korelasyon (sırasıyla $r = -0.688$, -0.552 ; $p < 0.05$) olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda incelenen bir diğer enzimatik özellik ise lipaz aktivitesidir. *Legionella* cinsi birçok bakterinin lipaz aktivitesine sahip olduğu ilk kez 1979'da Baine ve diğ. tarafından belirlenmiştir. Bu tarihten sonra yapılan çalışmalarda (Baine, 1985; Keen ve Hoffman, 1989; Liles ve diğ., 1999) *Legionella* bakterilerinin lipaz aktivitesine sahip olduğu gösterilse de ilk kez 2000 yılında Aragon ve diğ., bu enzimi monoaçil esteraz lipaz olarak tanımlamıştır. *PilD* gen bölgesince düzenlenen enzim konakta doku harabiyetinde rol oynamaktadır.

Çalışmamızda ilk olarak lipaz esterazların varlığını tespit etmek amacıyla hücre lizatları ile süpernatantların p-nitrofenil kaprilat (p-NFK) ve p-nitrofenil palmitat'ı (p-NFP) parçalama özellikleri incelenmiştir. Çalışmamızda standart ATCC 33152 bakterisinin süpernatantının p-NFK üzerinde güçlü lipaz aktivitesi gösterdiği, hücre lizatının ise kontrole kıyasla daha zayıf bir lipaz aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir. İzolat 4'ün hücre lizatının 5. dk'da p-NFK üzerinde en güçlü lipaz etkisi gösterdiği, bu bakteriye ait süpernatantının ise p-NFK üzerine zayıf bir etki gösterdiği saptanmıştır. Bu durum bakteriler arasındaki enzimatik farkın bir diğer göstergesidir. Aragon ve diğ. (2000), yaptıkları çalışmada diğer bir standart Philadelphia-1 suşu olan 130b'nin sadece süpernatantında güçlü p-NFK lipaz etkisi saptamıştır. Bu araştırmacılar, bakterilerin lipaz özelliğini hem hücre içi hem de hücre dışı kullanabildiğini göstermişlerdir. Aynı ortam koşullarında ve aynı sürede üretilen bakterilerin lipaz aktivitelerinin farklılık göstermesi suşlar arasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Suşlar arasındaki bu farkın belirlenebilmesi için bu bakterilerin tip II sekresyon sistemlerini düzenleyen genlerin araştırılması gerekmektedir. Uzun zincirli bir bileşik olan p-NFP'ın parçalanması değerlendirildiğinde ise bakteri süpernatantlarının p-NFP üzerinde hücre lizatlarına oranla daha güçlü bir lipaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır.

Bakterilerin lipaz aktivitesini değerlendirmek için açıl grubu içeren gliserollerin parçalanması da incelenmiştir. Bu amaçla mono-, di- ve tri-açıl gliserol substratları ile çalışılmış ancak bakterilerin gliserol bileşiklerini parçalayacak lipaz enzimini üretmedikleri saptanmıştır. Sadece izolat 5'in süpernatantının 1-monoaçıl gliserol (1-

MG) üzerinde enzimatik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu bakterinin hücre lizatının ise p-NFP üzerinde 5 dk'da lipaz aktivitesi gösteren tek bakteri olduğu hatırlanmalıdır. İzolat 5'in peritoneal makrofajlar ve amip trofozoitleri içerisinde sayısını en fazla arttıran bakteri olması lipaz aktivitesi ile hücre içi üreme arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. *L. pneumophila* bakterilerinin p-NFK ve p-NFP aktiviteleri ile konak hücre patojenitesi arasındaki ilişki incelendiğinde hücre lizatlarının p-NFP aktivitesi ile *L. pneumophila* bakterilerinin amip trofozoitleri üzerine patojeniteleri arasında anlamlı bir korelasyon olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır. Ayrıca bakteri süpernatantlarının p-NFK aktivitesi ile PM'a giriş yetenekleri arasında da anlamlı negatif yönlü bir korelasyon olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Bu durum *L. pneumophila* bakterilerinin konak hücre patojenitesi ile lipaz aktivitesi arasında bir ilişki olduğu sonucunu düşündürmektedir.

Aragon ve diğ. (2002), yaptıkları bir çalışmada *L. pneumophila*'nın tip II sekresyon sisteminde düzenlenen PLC ve lipaz aktivitesinin birbirleri ile ilişkili olduklarını ve bakterinin konak organizma patogeneğinde önemli role sahip olduklarını belirtmişlerdir. Aslında bu ilişki ilk olarak 1981'de Thorpe ve Miller tarafından ortaya konulmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz PLC ve lipaz aktiviteleri arasındaki ilişki incelendiğinde *L. pneumophila* bakterilerinin hücre lizatlarının p-NFK üzerine lipaz aktivitesi ile PLC aktiviteleri arasında pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon ($p<0.05$) olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu veriler bakterilerin sahip olduğu PLC ve lipaz aktiviteleri arasındaki ilişkiyi doğrulamaktadır.

Tez çalışmamızda lipaz aktivitesinin değerlendirildiği diğer bir yöntem ise API ZYM test sistemidir. Striplerde yer alan 4 karbonlu p-naftil butirat (esteraz aktivitesi), 8 karbonlu p-naftil kaprilat (esteraz lipaz) ve 14 karbonlu p-naftil miristatın (lipaz) parçalanması değerlendirilmiştir. Sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda izolat 1 ve 9'un güçlü esteraz aktivitesine sahipken diğer tüm izolatların esteraz ve esteraz lipaz pozitif oldukları, ancak hiçbir bakterinin uzun zincirli p-naftil miristatı parçalayacak lipaz enzimine sahip olmadığı saptanmıştır. API ZYM test sistemi ile yapılan deneylerde bakterilerin daha güçlü enzimatik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bunun muhtemel nedeninin enzimatik aktiviteyi tayin etmek için BYE besiyerinde üretilen *L. pneumophila* bakterilerinin yeterince üretilmemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bununla birlikte Nolte ve diğ. (1982), API ZYM test sistemi kullanarak

yürüttükleri bir çalışmada *Legionella* cinsi bakterilerin butirat esterase pozitif, kaprilat esterase zayıf pozitif ve miristat lipaz negatif olduklarını ortaya koymaktadır. Bu çalışma, elde ettiğimiz sonuçları doğrular niteliktedir.

İnsan yapımı su sistemlerinden izole edilen *L. pneumophila* bakterilerinin virülansının değerlendirildiği çalışmamızda son olarak bu bakterilerin konak hücre ile etkileşimleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla konak hücre olarak insan periferik kan mononükleer hücreleri, fare peritoneal makrofajları ve *A. castellanii* trofozoitleri kullanılmıştır. Bakterilerin her üç konak hücreye yapışma, hücre içine giriş ve hücre içinde üreme yetenekleri incelenmiştir.

Friedman ve diğ. (1998), enfekte makrofaj içerisindeki bakterinin sayısını 48-72 saat içerisinde 100-1000 kat artırdığını bildirmişlerdir. *L. pneumophila* bakterileri ile konak hücreler arasındaki ilişkilerin incelenmesi deneylerinde bu bakterilerin 72 saatlik hücre içi üreme özellikleri incelendiğinde, her üç konak hücre tipinde de tüm bakterilerin sayılarını 1-5 log arttırdıkları saptanmıştır. PKMH ve PM içerisinde 72 saatte incelenen bakteriler sayılarını 1-2 log arttırmıştır. Bu sonuçlar Friedman ve diğ.'nin (1998) sonucu ile benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte bakterilerin amip trofozoitleri içerisindeki üreme yetenekleri incelendiğinde 72. saatte izolat 5'in sayısını 5 log arttırdığı görülmektedir. Bu durum üç farklı konak hücre tipinden bakterinin üremesini en fazla teşvik edenin *A. castellanii* trofozoitleri olduğunu göstermektedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde bakterilerin konak hücrelere yapışma, hücre içine giriş ve hücre içinde üreme yeteneklerinin hem konağa hem de incelenen *L. pneumophila* bakterilerine göre farklı olduğu tespit edilmiştir. Örneğin PKMH'ne yapışma kapasitesi en yüksek olan bakterinin izolat 8 olduğu saptanmıştır. Hücre içine giriş oranı en yüksek olan bakteri olan izolat 7'nin PKMH içinde üreme yeteneğinin ise oldukça zayıf olduğu tespit edilmiştir. Hücre içi üreme yeteneği en yüksek bakteri olan izolat 2'nin ise PKMH'lerine yapışma ve giriş oranının oldukça düşük oluşu çarpıcı bir sonuçtur. Bu durum bakterinin yapışma, hücre içine giriş ve hücre içinde üreme özelliklerinin farklı virülans faktörlerince düzenlenmesinden kaynaklandığı düşünülebilir. Yapışmadan tip II sekresyon sisteminde düzenlenen flagella (*flaA* geni) ve pili (tip IV *pilin* geni) sorumlu iken hücre içine giriş, ppGpp proteini ve rtxA (repeats in structural toxin;

yapısal toksin tekrarları) geni tarafından düzenlenmektedir (Hammer ve Swanson, 1999; Cirillo ve diğ., 2001; Lüneberg ve diğ., 2001). Dot ve icm proteinleri fago-lizozom oluşumunu engelleyerek replikatif vakuolünün oluşumunu sağlar (Steinert ve diğ., 2002). Bu bakterinin hücre içinde üreme yeteneğinin ise tip IV sekresyon sisteminde yer alan *dot/icm* lokusu tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Bitar ve diğ., 2004). Bakterilerdeki bu özellikleri kodlayan gen bölgelerinin araştırılması izolatlar arasındaki farkın daha iyi anlaşılması için gereklidir.

Bakterilerin mononükleer hücreler üzerine enfektivitesi değerlendirildiğinde izolat 6'nın hücre içine giriş ve hücre içinde üremede zayıf bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. Her üç konak hücresi içindeki üreme özelliği incelendiğinde bir tek izolat 6'nın tüm bakterilerden istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir farka sahip olduğu görülmektedir. Bu izolatın makrofaj ve amip içerisindeki üreme yeteneğinin de yüksek olması bakterilerin konak türüne göre farklı patojenite sergilediğini de kanıtlamaktadır. Harb ve diğ. (1998) konağa bağlı patojenitedeki bu farkın memeli ile amip arasında değil iki amip türü arasında bile oldukça önemli olduğunu saptamışlardır. *L. pneumophila*'nın farklı ortam koşullarında *H. vermiformis* ve *A. polyphaga* üzerindeki yapışma ve hücre içi üreme yeteneklerini inceleyen araştırmacılar *L. pneumophila*'nın bu iki amip türünü enfekte etmek için farklı mekanizmalara sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar elektron mikroskobu görüntülerine dayanarak bakterinin hücre içi endositoz yolunu bozma mekanizmasının ve üremenin ardından hücreyi parçalama yolunun benzer olduğunu tespit etmişlerdir.

Oldham ve Rodgers (1985), *Legionella* cinsi bakterilerin hücre içi patojenitelerini belirlemek için yaptıkları bir çalışmada alveolar epiteliyal hücre serilerini kullanmışlar ve bu hücrelerin bakteri için zayıf bir konak olduğunu kanıtlamışlardır. Araştırmacılar bakterilerin bu hücrelere daha zayıf yapışma kapasitesi gösterdiklerini, hücre içi üremenin ancak 48 saatte anlamlı ($p<0.05$) ölçüde arttığını saptamışlardır. Bu durum *L. pneumophila* bakterilerini birçok fagositer hücre içerisinde üreme yeteneği göstermesine rağmen her konakta farklı bir patojenite gösterdiğinin kanıtıdır.

L. pneumophila bakterilerinin konak hücreler üzerinde patojenite deneylerinin sonuçlarını karşılaştırdığımızda konağa bağlı fark daha da belirgin bir hal almaktadır.

Sonuçlar incelendiğinde *L. pneumophila* bakterilerinin PKMH'ne yapışma oranları ile PM'na yapışma oranları arasında anlamlı bir korelasyon ($r = 0.738$; $p < 0.01$); PKMH'nin hücre içine giriş özellikleri ile *A. castellanii* trofozoitlerine yapışma özellikleri arasında da anlamlı bir korelasyon ($r = 0.649$; $p < 0.05$) olduğu saptanmıştır. Her üç konak üzerinde *L. pneumophila* bakterilerinin yapışma, hücre içine giriş ve hücre içi çoğalma yetenekleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemesi, bakterinin konağına spesifik hareket ettiğini göstermekte, bu durum bakterilerin konak hücre enfektivitesinde birden fazla mekanizmanın rol oynadığını kanıtlamaktadır. *L. pneumophila*'nın konak hücre içine alınması esnasında iki farklı fagositozun söz konusu olduğu bilinmektedir. Bunlardan biri konvensiyonel diğeri ise coiling fagositozdur (Dowling ve diğ., 1992; Vogel ve Isberg, 1999). *L. pneumophila* bakterilerinin konak hücreler ile olan ilişkileri mikroskobik olarak değerlendirildiğinde üç farklı konaktan sadece PM'n bakterileri coiling fagositoz ile hücre içine aldıkları kaydedilmiştir. Benzer bir sonuç Vogel ve Isberg (1999) tarafından da belirtilmiştir. Araştırmacılar *L. pneumophila* bakterilerinin farklı konak hücre tipleri üzerine patogenezi değerlendirildikleri derlemede bu bakterilerin bir tek makrofajlar tarafından coiling fagositoz ile hücre içine alındığını belirtmektedirler.

Harb ve diğ. (1998), bakterinin konak hücreyi enfekte etmedeki bu farklılıklarının konağın cinsine bağlı olarak dahi çok farklılık gösterdiğini saptamıştır. Araştırmacılar, konak organizma olarak iki farklı amip türü olan *H. vermiformis* ve *A. polyphaga*'yı kullanmış ve *L. pneumophila*'nın bu iki konağı farklı mekanizmalar ile enfekte ettiklerini belirlemiştir. Ayrıca Abu Kwaik ve diğ. (1998a), hazırladıkları bir derlemede bakterinin konak hücre üzerine patojenitesinin pili ve yüzey proteinleri ile sahip olduğu enzimatik aktivitelere göre değişiklik gösterdiğini belirtmektedir. Tüm bu sonuçlar *L. pneumophila* bakterilerinin konak hücre çeşidine göre farklı mekanizmalarla patojenite gösterdiği sonucumuzu doğrulamaktadır.

Hücre içi patojeniteyi belirleyen bir faktör de bakterinin üretildiği ortamdır. Bazı araştırmacılar (Cirillo ve diğ., 1999; Neumeister ve diğ., 2000), amip içerisinde çoğalan bakterinin BCYE Agar besiyerinde üremeyene göre mononuklear hücreler üzerinde daha patojen olduğunu kanıtlamışlardır. Çalışmamızda BCYE Agar üzerinde üretilen bu bakteriler doğal ortamda amip içerisinde çoğalmaktadırlar. Bu durumda

enfektivitelerinin kesin olarak değerdendirilebilmesi için ilerde yapılacak çalışmalarda amip içerisinde üretilen izolatların mononklear hücreler ve peritoneal makrofajlar üzerine patojenitesinin değerdendirilmesi önemli sonuçlar verebilir. Ayrıca doğal ortamdaki epidemik riskin anlaşılması için model su sistemleri kurularak içerisine amip türleri eklenip bakterilerin virlanslarındaki değışiklikler incelenmelidir.

Benzer şekilde diğer virlans faktörlerinin de doğal ortamda nasıl düzenlendiğinin anlaşılması gereklidir. Tez çalışmamız süresince elde ettiğimiz sonuçlar yapay ortam koşullarının etkisi ile oluştuğu için fenotipik bir bilgi verse de bakterinin doğal ortamdaki patojenitesini tam olarak yansıtamayabilir. Bakterinin zayıf veya yoksun olduğu sonucuna varılan bazı virlans faktörleri doğal ortam koşulları sağlandığında farklılık gösterebilir. Aynı zamanda bu faktörlerin genotipik açıdan da değerdendirilmesi önemlidir.

Tez çalışmamız kapsamında incelenen virlans faktörleri değerdendirildiğinde her izolatın farklı virlans özelliklerine sahip olduğu saptanmıştır. Genel olarak *L. pneumophila* izolatları ile standart ATCC 33152 bakterisi virlans özellikleri açısından karşılaştırıldığında soğutma kulelerinden izole edilen bakterilerin daha patojen olduğu görülmektedir. Sonuçlar değerdendirildiğinde izolat 1, 2, 3, 4 ve 5'nin ATCC 33152 ve diğer izole bakterilere oranla daha yüksek patojenite gösterdikleri saptanmıştır (EK-A).

KAYNAKLAR

- ABU KWAİK, Y., 1998, Fatal attraction of mammalian cells to *Legionella pneumophila*, *Molecular Microbiology*, 30(4), 689-695.
- ABU KWAİK, Y., GAO, L.Y., STONE, B.J., VENKATARAMAN, C., HARB, O.S., 1998a, Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9), 3127-3133.
- ABU KWAİK, Y., VENKATARAMAN, C., HARB, O.S., GAO, L.Y., 1998b, Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9), 3134-3139.
- ADDERSON, E.E., TAKAHASHI, S., WANG, Y., ARMSTRONG, J., MILLER, D.V., BOHNSACK, J.F., 2003, Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*, *Infection and Immunity*, 71 (12), 6857-6863.
- ALBAYRAK, A.S., EROĞLU, A., KALAYCI, Ş., KAYIŞ, A., ÖZTÜRK, E., 2005, *SPSS uygulamalı çok değişkenli istatistik teknikleri*, Asil Yayın Dağıtım, ISBN 975-9091-14-3.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2002, *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Science, New York, ISBN 0-8153-3218-1.

- ALMEIDA, M.C., SILVA, A.C., BARRAL, AL., BARRAL NETTO, M., 2002, A Simple method for human peripheral blood monocyte isolation, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(2), 221-223.
- ARAGON, V., KURTZ, S., FLIEGER, A., NEUMEISTER, B., CIANCOTTO, N.P., 2000, Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD deficient *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 68, 1855-1863.
- ARAGON, V., ROSSIER, O., CIANCOTTO, N.P., 2002, *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities, *Microbiology*, 148, 2223-2231.
- ARATA S, NEWTON C, KLEIN TW, YAMAMOTO, Y., FRIEDMAN, H., 1993, *Legionella pneumophila* induced tumor necrosis factor (TNF) production in permissive vs. nonpermissive macrophages, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 203 (1), 26-29.
- ASCHTGEN, M.S., BERNARD, C.S., DE BENTZMANN,S., LLOUBE`S, R., CASCALES, E., 2008, SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 190 (22), 7523-7531.
- AZAD, M.A., HUTTUNEN-HENNELLY, H.E.K., FRIEDMAN, C.R., 2011, Bioactivity and the first transmission electron microscopy immunogold studies of short de novo-designed antimicrobial peptides, *Antimicrobial Peptids and Chemotherapy*, 55 (5), 2137-2145.
- BAINE, W.B., RASHEED, J.K., MACKEL, D.C., BOPP, C.A., WELLS, J.G., KAUFMANN, A.K., 1979, Exotoxin activity associated with the Legionnaires disease bacterium, *Journal of Clinical Microbiology*, 9(3), 453-456.
- BAINE, W.B., 1985, Cytolytic and phospholipase C activity in *Legionella* species, *Journal of General Microbiology*, 131, 1383-1391.

- BANDYOPADHYAY, P., STEINMAN, H. M., 2000, Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the katA gene and studies of KatA function, *Journal of Bacteriology*, 182, 6679-6686.
- BANGSBORG, J.M., HINDERSSON, P., SHAND, G., HOIBY, N., 1995, The *Legionella micdadei* flagellin: expression in *Escherichia coli* K12 and DNA sequence of the gene, *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 103, 869-877.
- BARKER, J., LAMBERT, P.A., BROWN, M.R., 1993, Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 61, 3503-3510.
- BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D., WOESSNER, J.F., 2003, *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd edition, Academic Press, ISBN 0-12-079610-4.
- BAUER, M., MATHIEU, L., DELOGE-ABARKAN, M., REMEN, T., TOSSA, P., HARTEMANN, P., 2008, *Legionella* bacteria in shower aerosols increase the risk of pontiac fever among older people in retirement homes, *Journal of Epidemiology and Community Health*, 62, 913-920.
- BELLINGER-KAWAHARA, C., HORWITZ, M.A., 1990, Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes, *The Journal of Experimental Medicine*, 172, 1201-1210.
- BENDER, L., OTT, M., DEBES, A., RDEST, U., HEESEMANN, J., HACKER, J., 1991, Distribution, expression, and long-range mapping of legiolysin gene (lly)-specific DNA sequences in *Legionellae*, *Infection and Immunity*, 59 (9), 3333-3336.

- BENSON, R.F., FIELDS, B.S., 1998, Classification of the genus *Legionella*, *Seminars in Respiratory Infections*, 13, 90-99.
- BERENDT, R.F., YOUNG, H.W., ALLEN, R.G., KNUTSEN, G.L., 1980, Dose-response of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*, *Journal of Infectious Disease*, 141, 186-192.
- BİNAY, A.R., 2010, Gram negative bakterilerin özgür yaşayan amipler içerisinde üreme yetenekleri, Yüksek Lisans Tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- BINGLE L.E.H., BAILEY, C.M., PALLAN, M.J., 2008, Type VI secretion: a beginner's guide, *Current Opinion in Microbiology*, 11 (1), 3-8.
- BITAR, D.M., MOLMERET, M., ABU KWAİK, Y., 2004, Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*, *International Journal of Medical Microbiology*, 293, 519-527.
- BİRTEKSÖZ, S., 2004, Antibiyotiklerin *Legionella pneumophila* suşlarına karşı *in vitro* etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- BLANCHARD, D.K., FRIEDMAN, H., KLEIN, T.W., DJEU, J.Y., 1989, Induction of interferon-gamma and tumor necrosis factor by *Legionella pneumophila*: augmentation of human neutrophil bactericidal activity, *The Journal of Leukocyte Biology*, 45, 538-545.
- BLANDER, S. J., SZETO, L., SHUMAN, H. A., HORWITZ, M. A., 1990, An immunoprotective molecule, the major secretory protein of *Legionella pneumophila*, is not a virulence factor in a guinea pig model of Legionnaires' disease, *Journal of Clinic Investigations*, 86, 817-824.
- BLATNY, J.M., HO, J., SKOGAN, G., FYKSE, E.M., AARSKAUG, T., WAAGEN, V., 2011, Airborne *Legionella* bacteria from pulp waste treatment plant: aerosol

particles characterized as aggregates and their potential hazard, *Aerobiologia*, 27 (2), 147-162.

BOSSEL, T.C., 1996, Serological cross reaction between *Legionella* and *Campylobacter* in the rapid microagglutination test, *Journal of Clinical Pathology*, 49, 584-586.

BOSSHARDT, S.C., BENSONB, R.F., FIELDS, B.S., 1997, Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*, *Microbial Pathogenesis*, 23 (2), 107-112.

BOUYER, S., IMBERT, C., RODIER, M.H., HECHARD, Y., 2007, Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles, *Environmental Microbiology*, 9, 1341-1344.

BRIELAND, J., FREEMAN, P., KUNKEL, R., CHRISP, C., HURLEY, M., FANTONE, J., ENGLEBERG, C., 1994, Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in intratracheally inoculated A/J mice. A murine model of human Legionnaires' disease, *American Journal of Clinical Pathology*, 145, 1537-1546.

BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., WEINRAUCH, Y., ZYCHLINSKY, A., 2004, Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, 303, 1532-1535.

BROICH, M., RYDZEWSKI, K., MCNEALY, T.L., MARRE, R., FLIEGER, A., 2006, The global regulatory proteins LetA and RpoS control phospholipase A, lysophospholipase A, acyltransferase, and other hydrolytic activities of *Legionella pneumophila* JR32, *Journal of Bacteriology*, 188 (4), 1218-1226.

BYRD, T.F., HORWITZ, M.A., 2000, Aberrantly low transferrin receptor expression on human is associated with nonpermissiveness for *Legionella pneumophila* growth, *Journal of Infection Disease*, 181, 1394-1400.

- CABEZA, L., 2005, *IEA-SHC Task 32 report: Legionella in Combisystems Tanks* [Online], International Energy Agency, Paris, France, <http://www.iea-shc.org> [Ziyaret Tarihi: 01.11.2011]
- CASCALES, E., CHRISTIE, P.J., 2003, The versatile type IV secretion systems, *Nature Reviews Microbiology*, 1 (2), 137-149.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2000, Legionnaires'disease associated with potting soil California, Oregon, and Washington, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49 (34), 777-778.
- CHANG, B., KURA, F., AMEMURA-MAEKAWA, J., KOIZUMI, N., WATANABE, H., 2005, Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 73 (7), 4272-4280.
- CHRISTIE, P.J., ATMAKURI, K., JABUBOWSKI, S., KRISHNAMOORTHY, V., CASCALES, E., 2005, Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems, *Annual Review of Microbiology*, 59, 451-485.
- CIANCIOOTTO, N.P., 2001, Pathogenicity of *Legionella pneumophila*, *International Journal of Medical Microbiology*, 291, 331-343.
- CIANCIOOTTO, N.P., ABU KWAIK, Y., EDELSTEIN, P.H., FIELDS, B.S., GEARY, D.F., HARRISON, T.G., BEROTTE JOSEPH, C., RATCLIFF, R.M., STOUT, J.E., 2006, *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*, Amer Society for Microbiology Press, Washington, D. C., ISBN 1555813909..
- CIRILLO, J.D., FALKOW, S., TOMPKINS, L.S., 1994, Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion, *Infection and Immunity*, 62 (8), 3254-3261.
- CIRILLO, J.D., CIRILLO, S.L., YAN, L., BERMUDEZ, L.E., FALKOW, S., TOMPKINS, L.S., 1999, Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects

monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 67 (9), 4427-4434.

CIRILLO, S.L.G., BERMUDEZ, L.E., EL-ETR, S.H., DUHAMEL, G.E., CIRILLO, J.D., 2001, *Legionella pneumophila* entry gene rtxA is involved in virulence, *Infection and Immunity*, 69 (1), 508-517.

CLARK, W.A., 1976, A Simplified Leifson flagella stain, *Journal of Clinical Microbiology*, 3 (6), 632-634.

COLLINS, M.T., MCDONALD, J., HOIBY, N., AALUND, O., 1984, Agglutinating antibody titers to members of the family *Legionellaceae* in cystic fibrosis patients as a result of cross-reacting antibodies to *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Clinical Pathology*, 19, 757-762.

CONLAN, J. W., BASKERVILLE, A., ASHWORTH, L.A.E., 1986, Separation of *Legionella pneumophila* proteases and purification of a protease which produces lesions like those of Legionnaires' disease in guinea pig lung, *Journal of General Microbiology*, 132, 1565-1574.

COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J., 1987, Bacterial biofilms in nature and disease, *Annual Reviews of Microbiology*, 41, 435-464.

COWGILL, K.D., LUCAS, C.E., BENSON, R.F., CHAMANY, S., BROWN, E.W., FIELDS, B.S., FEIKIN, D.R., 2005, Recurrence of Legionnaires disease at a hotel in the United States Virgin Islands over a 20-year period, *Clinical Infectious Diseases*, 40, 1205-1207.

COXON, P.Y., SUMMERSGILL, J.T., RAMIREZ, J.A., MILLER, R.D., 1998, Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes, *Infection and Immunity*, 66 (6), 2905-2913.

- ÇADIRCI, B.H., 2010, Ekstraselüler lipaz gen regülasyonu ve salgılama sistemleri, *Biyoteknoloji Elektronik Dergisi*, 1 (1), 35-40.
- DAVIS, C.P., FADER, R.C., AVOTS-AVOTINS, A.E., GRATZFELD, S., 1982, Expression of hemagglutination is dependent on environmental factors and bacterial concentration of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Current Microbiology*, 7, 161-164.
- DAVIS, G.S., WINN, W.C., GUMP, D.W., BEATY, H.N., 1983, The kinetics of early inflammatory events during experimental pneumonia due to *Legionella pneumophila* in guinea pigs, *Journal of Infectious Disease*, 148, 823-835.
- DE BUCK, E., MAES, L., MEYEN, E., VAN MELLAERT, L., GEUKENS, N., ANNE, J., LAMMERTYN, E., 2005, *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 tatB and tatC affect intracellular replication and biofilm formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, 1413-1420.
- DEN BOER, J.W., NIJHOF, J., FRIESEMA, I., 2006, Risk factors for sporadic community-acquired Legionnaires' disease. A 3-year national case-control study, *Public Health*, 120, 566-571.
- DIEDEREN, B.M.W., 2008, *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *Journal of Infection*, 56 (1), 1-12.
- DIETRICH, C., HEUNER, K., BRAND, B. C., HACKER, J., STEINERT, M., 2001, Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells, *Infection and Immunity*, 69, 2116-2122.
- DOMINGUES, S., MATOS, R.G., REIS, F.P., FIALHO, A.M., BARBAS, A., ARRAIANO, C.M., 2009, Biochemical characterization of the RNase II family of exoribonucleases from the human pathogens *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus pneumoniae*, *Biochemistry*, 48 (50), 11848-11857.

- DONLAN, R.M., 2002, Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerging Infectious Disease*, 8, 881-890.
- DOWLING, J.N., SAHA, A.K., GLEW, R.H., 1992, Virulence factors of the family *Legionellaceae*, *Microbiological Reviews*, 56 (1), 32-60.
- DROZANSKI, W., 1956, Fatal bacterial infection in soil amoebae, *Acta Microbiologica Polonica*, 5, 315-317.
- DROZANSKI, W., 1991, *Sarcobium lyticum* gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular bacterial parasite of small free-living amoebae, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 82-87.
- EDELSTEIN, P. H., M. A. C., HIGA, F., FALKOW, S., 1999, Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 8190-8195.
- EKŞİ, F., SÖZEN, E., BAYRAM, A., KARSLIĞİL, T., MALCI, İ., 2008, Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarında slime üretimi ve hemolitik aktivitenin araştırılması, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 38 (1), 27-32.
- EL KHATTABI, M., OCKHUIJSEN, C., BITTER, W., JAEGER, K.E., TOMMASSEN, J., 1999, Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor, *Molecular and General Genetics*, 261, 770-776.
- ELKORD, E., WILLIAMS, P.E., KYNASTON, H., ROWBOTTOM, A.W., 2005, Human monocyte isolation methods influence cytokine production from *in vitro* generated dendritic cells, *Immunology*, 114, 204-212.
- ENGLEBERG N. C., HOWE, D. C., ROGERS, J. E., ARROYO, J., EISENSTEIN, B. I., 1991, Characterization of a *Legionella pneumophila* gene encoding a lipoprotein antigen, *Molecular Microbiology*, 5, 2021-2029.

- ENGLEBERG N. C., DIRITA, V., DERMODY, T.S., 2006, *Schaechter's mechanisms of microbial disease*, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN 978-0781753425.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), 1999, *Legionella: human health criteria document*, Kasım ayı raporu (EPA-822-R-99-001).
- EROVA, T.E., KOSYKH, V.G., FADL, A.A., SHA, J., HORNEMAN, A.J., CHOPRA, A.K., 2008, Cold shock exoribonuclease R (VacB) is involved in *Aeromonas hydrophila* pathogenesis, *Journal of Bacteriology*, 190 (10), 3467-3474.
- EVENSON, L.J., 1998, Legionnaires' disease, *Primary Care Updates Ob/Gyns*, 5 (6), 286-289.
- FEELEY, J.C., GIBSON, R.J., GORMAN, G.W., LANGFORD, N.C., KAMILE RASHEED J., MACKEL, D.C., BAINE W.B., 1979, Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*, *Journal of Clinical Microbiology*, 10 (4), 437-441.
- FERREIRA-PAIM, K., ANDRADE-SILVA, L., MORA, D.J., LAGES-SILVA, E., PEDROSA, A.L., DA SILVA, P.R., ANDRADE, A.A., SILVA-VERGARA, M.L., 2011, Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil, *Mycopathologia*, DOI 10.1007/s11046-011-9500-0.
- FIELDS, B. S., 1996, The molecular ecology of *Legionellae*, *Trends of Microbiology*, 4, 286-290.
- FIELDS, B.S., BENSON, R.F., BESSER, R.E., 2002, *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (3), 506-526.

- FITZGEORGE, R.B., BASKERVILLE, A., BROSTER, M., HAMBLETON, P., DENNIS, P.J., 1983, Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence: comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection, *Journal of Hygiene*, 90 (1), 81-89.
- FLIEGER, A., GONG, S., FAIGLE, M., DEEG, M., BARTMANN, P., NEUMEISTER, B., 2000, Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* Species, *Journal of Bacteriology*, 182 (5), 1321-1327.
- FLIEGER, A., GONG, S., FAIGLE, M., STEVANOVIC, S., CIANCOTTO, N. P., NEUMEISTER, B., 2001, Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*, *Journal of Bacteriology*, 183, 2121-2124.
- FLIERMANN, C.B., 1996, Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with a little wisdom, *Microbial Ecology*, 32, 203-228.
- FRIEDMAN, R. L., IGLEWSKI, B.H., MILLER, R.D., 1980, Identification of a cytotoxin produced by *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 29, 271-274.
- FRIEDMAN, H., YAMAMOTO, Y., NEWTON, C., KLEIN, T.W., 1998, Immunologic response and pathophysiology of *Legionella* infection, *Seminars in Respiratory Infections*, 13 (2), 100-108.
- FRIEDMAN, H., YAMAMOTO, Y., KLEIN, T.W., 2002, *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity, *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 13 (4), 273-279.
- GAIA, A.V., CASATIA, S., TONOLLAA, M., 2011, Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting, *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 40-44.

- GAO, L.Y., ABU KWAİK, Y., 1999, Activity of caspase-3 during *Legionella pneumophila* induced apoptosis, *Infection and Immunity*, 67(9), 4886-4894.
- GAO, L.Y., SUSA, M., TICAC, B. ABU KWAİK, Y., 1999, Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells, *Microbial Pathogenesis*, 27, 273-287.
- GARDUNO, R.A., GARDUNO, E., HILTZ, M., HOFFMANN, P.S., 2002, Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms, *Infection and Immunity*, 70 (11), 6273-6283.
- GONPOT, P., SMITH, R., RICHTER, A., 2000, Diffusion limited biofilm growth, *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 8, 707-726.
- GÜRGÜN, V., HALKMAN, K., 1988, Mikrobiyolojide sayım yöntemleri, *Gıda Teknolojisi Derneği*, Yayın No: 7, San Matbaası, Ankara.
- HAMMER, B.K., SWANSON, M.S., 1999, Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp, *Molecular Microbiology*, 33 (4), 721-731.
- HARB, O.S., VENKATARAMAN, C., HAACK, B.J., GAO, L.Y., KWAİK, Y.A., 1998, Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires'disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts, *Applied Environmental Microbiology*, 64, 126-132.
- HASEGAWA, T., MINAMI, M., OKAMOTO, A., TATSUNO, I., ISAKA, M., OHTA, M., 2009, Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of *Streptococcus pyogenes*, *Microbiology*, 156 (1), 184-190.
- HEBERT, G.A., MOSS, C.W., MCDUGAL, L.K., BOZEMAN, F.M., MCKINNEY, R.M., BRENNER, D.J., 1980, The rickettsia-like organisms Tatlock (1943) and

- Heba (1959): bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from *Legionella pneumophila* and the WIGA bacterium, *Annals of Internal Medicine*, 92 (1), 45-52.
- HEBERT, G.A., HANCOCK, G.A., 1985, Synergistic hemolysis exhibited by species of *Staphylococci*, *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (3), 409-415.
- HENRICI, A.T., 1933, Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique, *Journal of Bacteriology*, 25, 277-286.
- HEUNER, K., BRAND, B.C., HACKER, J., 1999, The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors, *FEMS Microbiology Letters*, 175, 69-77.
- HEUNER, K., SWANSON, M., 2008, *Legionella: molecular microbiology*, Caister Academic Press, Norwich, UK, ISBN 978-1-904455-26-4.
- HICKEY, E.K., CIANCIOOTTO, N.P., 1997, An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases, *Infection and Immunity*, 65, 133-143.
- HINDRE, T., BRUGGEMANN, H., BUCHRIESER, C., HECHARD, Y., 2008, Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation, *Microbiology*, 154, 30-41.
- HOFFMANN, G.E., SCHMIDT, D., BASTIAN, B., GUDER, W.G., 1986, Photometric determination of phospholipase A, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 24, 871-875.
- HOOKEY, J.V., SAUNDERS, N.A., FRY, N.K., BIRTLES, R.J., HARRISON, T.G., 1996, Phylogeny of *Legionellaceae* based on small subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like

amoebal pathogens, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 526-531.

HORWITZ, M. A., SILVERSTEIN, S.C., 1981, Interaction of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. I. *L. pneumophila* resists killing by polymorphonuclear leukocytes, antibody, and complement, *Journal of Experimental Medicine*, 153, 386-397.

HSU, B.M., HUANG, C.C., CHEN, J.S., CHEN, N.H., HUANG, J.T., 2011, Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments, *Water Research*, 45, 5171-5183.

HUSMANN, L.K., JOHNSON, W., 1992, Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors, *Infection and Immunity*, 60 (12), 5212-5218 .

JAEGER, K.E., B.W., DIJKSTRA, M.T., REETZ, 1999, Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures, and biotechnological applications of lipases, *The Annual Review of Microbiology*, 53, 315-351.

JIMENEZ LUCHO, V., SHULMAN, M., JOHNSON, J., 1994, *Bordetella bronchiseptica* in an AIDS patient cross-reacts with *Legionella* antisera, *Journal of Clinic Microbiology*, 32, 3095-3096.

JOHN, D.T., JOHN, R.A., 2006, Viability of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* isolates during 10 years of cryopreservation, *Folia Parasitologica*, 53, 311-312.

JOHN, G., STEINMAN, H. M., 1996, Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival, *Journal of Bacteriology*, 178, 1578-1584.

- JOHNSON, M.M., PETERS, J.P., 1993, Technical note: an improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma, *Journal of Animal Science*, 71, 753-756.
- KASHUBA, A.D., BALLOW, C.H., 1996, *Legionella* urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy, *Diagnostic Microbiology and Infection Disease*, 24,129-139.
- KEEN, M.G., HOFFMAN, P.S., 1989, Characterization of a *Legionella pneumophila* extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities, *Infection and Immunity*, 57 (3), 732-738.
- KIM, M.J., J.E., ROGERS, M.C., HURLEY, N.C., ENGLEBERG, 1994, Phosphatase-negative mutants of *Legionella pneumophila* and their behavior in mammalian cell infection, *Microbial Pathogenesis*, 17, 51-62.
- KİMİRAN, A., 1993, *Salmonella enteritidis* suşlarında hemaglutinasyon etkinliği ve fimbriyalar, Yüksek Lisans Tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- KİMİRAN, A., ANĞ-KÜÇÜKER, M., 2002, *Salmonella enteritidis* suşlarında hemaglutinasyon etkinliği ve fimbriyalar, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 32, 270-274.
- KING, C.H., FIELDS, B.S., SHOTTS, E.B., WHITE, E.H., 1991, Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells, *Infection and Immunity*, 59, 758-763.
- KOZAK, N.A., BENSON, R.F., BROWN, E., ALEXANDER, N.T., TAYLOR, T.H., SHELTON, B.G., FIELDS, B.S., 2009, Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States, *Journal of Clinical Microbiology*, 4 (8), 2525-2535.

- KRINOS, C., HIGH, A.S., RODGERS, F.G., 1999, Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos, *Journal of Applied Microbiology*, 86, 237-244.
- KUBOTA, M., TOMII, K., TACHIKAWA, R., HARADA, Y., SEO, R., KAJI, R., TAKESHIMA, Y., HAYASHI, M., NISHIMURA, T., 2007, *Legionella longbeachea* pneumonia infection from home garden soil, *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 45 (9), 698-703.
- KUMAR, S., BISWAS, S., BANERJEE, S., MONDAL, N.B., 2011, Evaluation of safety margins of *Chenopodium album* seed decoction: 14-day subacute toxicity and microbicidal activity studies, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 102-110.
- LA SCOLA, B., BIRTLES, R.J., GREUB, G., HARRISON, T.J., RATCLIFF, R.M. AND RAOULT, D., 2004, *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 699-703.
- LAU, H.Y., ASHBOLT, N.J., 2009, The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water, *Journal of Applied Microbiology*, 107, 368-378.
- LAWAL, A., JEJELOWO, O., CHOPRA, A.K., ROSENZWEIG, J.A., 2011, Ribonucleases and bacterial virulence, *Microbial Biotechnology*, 4 (5), 558-571.
- LEIFSON, E., 1951, Staining, shape, and arrangement of bacterial flagella, *Journal of Bacteriology*, 62, 377-389.

- LILES, M.R., EDELSTEIN, P.H., CIANCIOOTTO, N.P., 1999, The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*, *Molecular Microbiology*, 31, 959-970.
- LIM, Y.H., RELUS KEK, Y.L., LIM, P.Y., YAP, H.M., VIVIEN GOH, T.L., NG, L.C., 2011, Environmental surveillance and molecular characterization of *Legionella* in tropical Singapore, *Tropical Biomedicine*, 28 (1), 149-159.
- LUNEBERG, E., MAYER, B., DARYAB, N., KOOISTRA, O., ZHRINGER, U., ROHDE, M., SWANSON, J., FROSC, M., 2001, Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*, *Molecular Microbiology*, 39, 1259-1271.
- MAIWALD, M., HELBIG, J.H., LUCK, P.C., 1998, Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections, *Journal of Microbiological Methods*, 33, 59-79.
- MAMPEL, J., SPIRIG, T., WEBER, S. S., HAAGENSEN, J. A., MOLIN, S., HILBI, H., 2006, Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions, *Applied Environmental Microbiology*, 72, 2885-2895.
- MARSHALL, K.C., 1976, *Interfaces in Microbial Ecology*. Cambridge, MA : Harvard University Press, ISBN 9780674458222.
- MARSTON, B.J., LIPMAN, H.B., BREIMAN, R.F., 1994, Surveillance for Legionnaires'disease: risk factors for morbidity and mortality, *Archives of Internal Medicine*, 154, 2417-2422.
- MATSIOTA-BERNARD, P., LEFEBRE, C., SEDQUI, M., CORNILLET, P., GUENOUNOU, M, 1993, Involvement of tumor necrosis factor alpha in

intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes, *Infection and Immunity*, 61, 4980-4983.

MCDADE, J.E., SHEPARD, C.C., FRASER, D.W., TSAI, T.R., REDUS, M.A., DOWDLE, W.R., 1977, Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease, *The New England Journal of Medicine*, 297 (22), 1197-1203.

MCDADE, J.E., BRENNER, D.J., BOZEMAN, F.M., 1979, Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947, *Annals of Internal Medicine*, 90, 659-661.

MCHUGH, S.L., YAMAMOTO, Y., KLEIN, T.W., FRIEDMAN, H., 2000, Murine macrophages differentially produce proinflammatory cytokines after infection with virulent vs. avirulent *Legionella pneumophila*, *Journal of Leukocyte Biology*, 67, 863-868.

MIYAMOTO, M., YAMAGUCHI, Y., SASATSU, M., 2000, Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculosis *Mycobacteria*, *Microbios*, 101, 7-13.

MOFFAT, J.F., EDELSTEIN, P.H., REGULA, D.P., CIRILLO, J.D., TOMPKINS, L.S., 1994, Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model, *Molecular Microbiology*, 12 (5), 693-705.

MOFFAT, J.F., TOMPKINS, L.S., 1992, A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*, *Infection and Immunity*, 60 (1), 296-301.

MOLMERET, M., TERRY ALLI, O.A., ZINK, S., FLIEGER, A., CIANCIOOTTO, N.P., ABU KWAIK, Y., 2002, icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells, *Infection and Immunity*, 70 (1), 69-78.

- MOLOFSKY, A.B., SHETRON-RAMA, L.M., SWANSON, M.S., 2005, Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death, *Infection and Immunity*, 73 (9), 5720-5734.
- MUDER, R.R., YU, V.L., 2002, Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*, *Emerging Infections*, 35, 990-998.
- MULLER, H.E., 1981, Enzymatic profile of *Legionella pneumophila*, *Journal of Clinical Microbiology*, 13 (3), 423-426.
- MULLER, D., EDWARDS, M.L., SMITH, D.W., 1983, Changes in iron and transferrin levels and body temperature in experimental airborne legionellosis, *Journal of Infectious Disease*, 147, 302-307.
- NASH, T.W., LIBBY, D.M., HORWITZ, M.A., 1984, Interaction between the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) and human alveolar macrophages, *Journal of Clinical Investigations*, 74, 771-782.
- NEUMEISTER, B., REIFF, G., FAIGLE, M., DIETZ, K., NORTHOFF, H., LANG, F., 2000, Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (3), 914-919.
- NOLTE, F.S., HOLLICK, G.E., ROBERTSON, R.G., 1982, Enzymatic activities of *Legionella pneumophila* and *Legionella*-like organisms, *Journal of Clinical Microbiology*, 15 (1), 17.
- O'CONNELL, W.A., HICKEY, E.K., CIANCOTTO, N.P., 1996, A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding, *Infection and Immunity*, 64, 842-848.

- ORY, F., ECHEVARRIA, J.M., PELAZ, C., TELLEZ, A., MATEO, M.A., LOPEZ, J., 2000, Detection of specific IgM antibody in the investigation of an outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila* serogroup 1, *Clinical Microbiology Infections*, 6, 64-68.
- OLDHAM, L.J., RODGERS, F.G., 1985, Adhesion, penetration and intracellular replication of *Legionella pneumophila*: an in vitro model of pathogenesis, *Journal of General Microbiology*, 131, 697-706.
- OTT, M., MESSNER, P., HEESEMANN, J., MARRE, R., HACKER, J., 1991, Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*, *Journal of General Microbiology*, 137, 1955-1961.
- ÖZEKİNCİ, T., AKPOLAT, N., METE, M., ATMACA, S., 2007, *Candida* türlerinin in vitro hemolitik aktivitesi, *İnfeksiyon Dergisi*, 21 (4), 201-203.
- PARK, M., YUN, S.T., KIM, M.S., CHUN, J., AHN, T.I., 2004, Phylogenetic characterization of *Legionella*-like endosymbiotic X-bacteria in *Amoeba proteus*: a proposal for '*Candidatus Legionella jeonii*'sp. Nov, *Environmental Microbiology*, 6, 1252-1263.
- PASSONNEAU, J.V., LOWRY, O.H., 1993, *Enzymatic analysis: a practical guide*, Humana Press, ISBN 978-0-89603-238-5.
- PAYNE, N. R., HORWITZ, M.A., 1987, Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors, *The Journal of Experimental Medicine*, 166, 1377-1389.
- PIAO, Z., SZE, C.C., BARYSHEVA, O., IIDA, K., YOSHIDA, S., 2006, Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*, *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2), 1613-1622.

- RDEST, U., WINTERMEYER, E., LUDWIG, B., HACKER, J., 1991, Legiolysin, a new hemolysin from *L. pneumophila*, *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A*, 274 (4), 471-474.
- RETZLAFF, C., YAMAMOTO, Y., OKUBO, S., HOFFMAN, P. S., FRIEDMAN, H., KLEIN, T.W., 1996, *Legionella pneumophila* heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 beta mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages, *Immunology*, 89, 281–288.
- RIGBY, E.W., PLOUFFE, J.F., HACKMAN, B.A., HILL, D.S., BENSON, R.F., BREIMAN, R.F., 1997, Stability of *Legionella* urinary antigens over time, *Diagnostic Microbiology and Infection Disease*, 28, 1-3.
- RITTIG, M.G., JAGODA, J.C., WILSKE, B., MURGIA, R., CINCO, M., REPP, R., BURMESTER, G.R., KRAUSE, A., 1998, Coiling phagocytosis discriminates between different spirochetes and is enhanced by phorbol myristate acetate and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Infection and Immunity*, 66 (2), 627-635.
- ROSSIER, O., CIANCIOOTTO, N.P., 2001, Type II protein secretion is a subset of the pilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 69, 2092-2098.
- ROWBOTHAM, T.J., 1980, Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *Journal of Clinical Pathology*, 33, 1179-1183.
- ROWBOTHAM, T.J., 1986, Current view on the relationship between amoebae, *Legionellae* and man, *Israel Journal of Medical Sciences*, 22, 678-689.
- RUSSELL, W., HERWARD, H., 2005, *Concepts in bacterial virulence*, S. Karger AG, Basel, Switzerland, ISBN 978-3805577861.

- SADOSKY, A. B., WILSON, J.W., STEINMAN, H. M., SHUMAN, H. A., 1994, The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability, *Journal of Bacteriology*, 176, 3790-3799.
- SAKARYA, S., 2005, Biyofilm yapısı ve enfeksiyon hastalıklarının virölans ve tedavisindeki Rolü, *XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, 16-20 Kasım 2005, Belek-Antalya, TÜRKİYE.
- SALINS, C., NEWTON, C., WIDEN, R., KLEIN, T.V., FRIEDMAN, H., 2001, Differential induction of IFN γ in *Legionella pneumophila* infected macrophages from BALB/c and A/J mice, *Infection and Immunity*, 69 (6), 3605-3620.
- SALYERS, A.A., WHITT, D.D., 2002, *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*, 2nd edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, ISBN 1-55581-171-X.
- SCHNELL, S., CHAPPELL, M.J., EVANS, N.D., ROUSSEL, M.R., 2006, The mechanism distinguishability problem in biochemical kinetics: the single-enzyme, single-substrate reaction as a case study, *Comptes Rendus Biologies*, 329 (1), 51-61.
- SCIENCEPHOTOLIBRARY, *TEM of bacterium Legionella pneumophila* [Online], Science Photo Library, <http://www.sciencephoto.com/media/12744/enlarge> [Ziyaret Tarihi: 08.11.2011].
- SHINOZAWA, Y., MATSUMOTO, T., UCHIDA, K., TSUJIMOTO, S., IWAKURA, Y., YAMAGUCHI, K., 2002, Role of interferon-gamma in inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*, *Journal of Medical Microbiology*, 51 (3), 225-230.
- SHIRTLIFF, M.E., MADER, J.T., CAMPER, A.K., 2002, Molecular interactions in biofilms, *Chemistry and Biology*, 9, 859-871.

- SMITH, R.P., BALTCH, A.L., FRANKE, M., HIOE, W., RITZ, W., MICHELSEN, P., 1997, Effect of levofloxacin, erythromycin or rifampicin pretreatment on growth of *Legionella pneumophila* in human monocytes, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40, 673-678.
- SRISKANDAN, S., UNNIKRISHNAN, M., KRAUSZ, T., COHEN, J., 2000, Mitogenic factor (MF) is the major DNase of serotype M89 *Streptococcus pyogenes*, *Microbiology*, 146, 2785-2792
- STEFFENSON, D.O., WEINBAUM, D.L., DOWLING, J.N., 1985, Opsonic requirements for phagocytosis of *Legionella micdadei* by polymorphonuclear leukocytes, *Infection and Immunity*, 49 (3), 695-699.
- STEINERT, M., ENGELHARD, H., FLUGEL, M., WINTERMEYER, E., HACKER, J., 1995, The Lly protein protects *Legionella pneumophila* from light but does not directly influence its intracellular survival in *Hartmannella vermiformis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (6), 2428-2430.
- STEINERT, M., HENTSCHEL, U., HACKER, J., 2002, *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray, *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (2), 149-162.
- STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B., SVABIC-VLAHOVIC, M., 2000, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175-179.
- STONE, B.J., 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, *Infection and Immunity*, 66, 1768-1775.
- SUMBY, P., BARBIAN, K.D., GARDNER, D.J., WHITNEY, A.R., WELTY, D.M., DANIEL LONG, R., BAILEY, J.R., PARNELL, M.J., HOE, N.P., ADAMS, G.G., DELEO, F.R., MUSSER, J.M., 2005, Extracellular deoxyribonuclease made

- by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response, *The National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 102 (5), 1679-1684.
- SUTHERLAND, I., 2001, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiology*, 147, 3-9.
- SWANSON, M.S., HAMMER, B.K., 2000, *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages, *Annual Review of Microbiology*, 54, 567-613.
- SWANSON, M.S., ISBERG, R.R., 1995, Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum, *Infection and Immunity*, 63 (9), 3609-3620.
- ŞEKER, E., 2010, Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in western Turkey, *Mycopathologia*, 169, 303-308.
- TAMAS, L., HUTTOVA, J., MISTRK, I., KOGAN, G., 2002, Effect of carboxymethyl chitin-glucan on the activity of some hydrolytic enzymes in maize plants, *Chemical Papers*, 56 (5), 326-329.
- THORPE, T.C., MILLER, R.D., 1981, Extracellular enzymes of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 33 (2), 632-635.
- TSAO, M.Y., LIN, T.L., HSIEH, P.F., WANG, J.T., 2009, The 3'-to-5' exoribonuclease (encoded by HP1248) of *Helicobacter pylori* regulates motility and apoptosis-inducing genes, *Journal of Bacteriology*, 191 (8), 2691-702.
- TÜRETGEN, İ., 2005, Su sistemlerinde mikrobiyal biyofilm oluşumunun incelenmesi, Doktora Tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.

- VISWANATHAN, V.K., CIANCOTTO, N.P., 2001, Role of iron acquisition in *Legionella pneumophila* virulence, *ASM News*, 67, 253-258.
- VOGEL, J.P., ANDREWS, H.L., WONG, S.K., ISBERG, R.R., 1998, Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*, *Science*, 279, 873-876.
- VOGEL, J.P., ISBERG, R.R., 1999, Cell biology of *Legionella pneumophila*, *Current Opinion in Microbiology*, 2 (1), 30-34.
- WATRICK, P., KOLTER, R., 2000, Biofilm, city of microbes, *Journal of Bacteriology*, 182 (10), 2675-2679.
- WEINBAUM, D.L., N-BENNER, R.R., DOWLIN, J.N., ALPERN, A., PASCULLE, A.W., DONOWITZ, G.R., 1984, Interaction of *Legionella micdadei* with human monocytes, *Infection and Immunity*, 46 (1), 68-73.
- WINN, W.C., 1988, Legionnaires disease: historical perspective, *Clinical Microbiology Reviews*, 1(1), 60-81.
- WINN, W.C., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G., 2006, *Konemans's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, Lippincott Williams and Wilkins Press, ISBN 0-7817-3014-7.
- WINOGRADSKY, S., 1928, The direct method in soil microbiology and its application to the study of nitrogen fixation, *Soil Science*, 25, 37-43.
- WINTERMEYER, E., FLUGEL, M., OTT, M., STEINERT, M., RDEST, U., MANN, K. H., HACKER, J., 1994, Sequence determination and mutational analysis of the *lly* locus of *Legionella pneumophila*, *Infection and Immunity*, 62, 1109-1117.

- WOO, A.H., GOETZ, A., YU, V.L., 1992, Transmission of *Legionella* by respiratory equipment and aerosol generating devices, *Chest*, 102, 1586-1590.
- WOOLDRIDGE K., 2009, *Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis*, Caister Academic Press, ISBN 978-1-904455-42-4.
- YAMAMOTO, Y., KLEIN, T.W., NEWTON, C.A., WIDEN, R., FRIEDMAN, H., 1988, Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice, *Infection and Immunity*, 56 (2), 370-374.
- YOSHIDA, S.I., MIZUGUCHI, Y., 1986, Multiplication of *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 in cultured peritoneal macrophages and its correlation to susceptibility of animals, *Canadian Journal of Microbiology*, 32 (5), 438-442.
- ZOBELL, C.E., ALLEN, E.C., 1933, Attachment of marine bacteria to submerged slides, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 30, 1409-1411.
- ZOBELL C.E., ALLEN, E.C., 1935, The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces, *Journal of Bacteriology*, 29, 239-251.
- ZOBELL C.E., ANDERSON, D.Q., 1936, Vertical distribution of bacteria in marine sediments, *Bulletin of the American Association of Petroleum Geologists*, 20, 258-269.

EK A

L. pneumophila bakterilerinin virölansını belirlemek amacıyla uygulanan deneylerde en yüksek aktiviteye sahip olan bakterilerin listesi

Deney		Bakteri no									ATCC 33152
		izolat 1	izolat 2	izolat 3	izolat 4	izolat 5	izolat 6	izolat 7	izolat 8	izolat 9	
1	tutunma(30 dk)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	tutunma(60 dk)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	tutunma(180 dk)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
4	tutunma(360 dk)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	tutunma(1440 dk)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6	biyofilm içerisinde çoğalma(1.gün)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7	biyofilm içerisinde çoğalma (2.gün)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
8	biyofilm içerisinde çoğalma (3.gün)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
9	biyofilm içerisinde çoğalma (4.gün)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	biyofilm içerisinde çoğalma (7.gün)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
11	biyofilm içerisinde çoğalma (14.gün)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
12	hemoliz (koyun, 3.g) (α)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
13	hemoliz (koyun, 3.g) (β)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
14	hemoliz (koyun,6.g) (β)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15	hemoliz (insan,3.g) (α)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	hemoliz (insan,3.g) (β)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	hemoliz (insan,6.g) (α)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	hemoliz (insan,6.g) (β)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	hemaglutinasyon	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
20	API ZYM	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

EK-A Devamı

Deney		Bakteri no									ATCC 33152
		izolat 1	izolat 2	izolat 3	izolat 4	izolat 5	izolat 6	izolat 7	izolat 8	izolat 9	
21	Dnaz	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	Rnaz	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	PLA (h.lizati)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	PLA (süpernatant)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	PLC (h.lizati)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
26	PLC (süpernatant)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	alkali fosfataz (1 h)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
28	alkali fosfataz (2 h)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
29	alkali fosfataz (3 h)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
30	alkali fosfataz (4 h)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
31	alkali fosfataz (5 h)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	pNFK (h.lizati) (5 dk)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
33	pNFK (h.lizati) (10 dk)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
34	pNFK (h.lizati) (15 dk)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
35	pNFK (süpernatant) (5 dk)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
36	pNFK (süpernatant) (10dk)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
37	pNFK (süpernatant) (15 dk)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
38	pNFP (h.lizati) (5 dk)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
39	pNFP (h.lizati) (10 dk)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
40	pNFP (h.lizati) (15 dk)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
41	pNFP (süpernatant) (5 dk)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
42	pNFP (süpernatant) (10 dk)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	pNFP (süpernatant) (15 dk)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	1-MG (süpernatant)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
45	PKMH'ne yapışma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
46	PKMH'ne giriş	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
47	PKMH içinde çoğalma (24 h)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
48	PKMH içinde çoğalma (48 h)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

EK-A Devamı

Deney		Bakteri no									ATCC 33152
		izolat 1	izolat 2	izolat 3	izolat 4	izolat 5	izolat 6	izolat 7	izolat 8	izolat 9	
49	PKMH içinde çoğalma (72 h)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
50	PM'a yapışma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
51	PM'a giriş	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
52	PM içinde çoğalma (24 h)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
53	PM içinde çoğalma (48 h)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
54	PM içinde çoğalma (72 h)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
55	trofozoitlere yapışma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
56	trofozoitlere giriş	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
57	trofozoitler içinde çoğalma (24 h)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
58	trofozoitler içinde çoğalma (48 h)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
59	trofozoitler içinde çoğalma (72 h)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Toplam		11	17	4	9	8	2	2	2	1	3
Virülans yüzdesi		19	29	7	15	14	3	3	3	2	5

ÖZGEÇMİŞ

01.04.1981 tarihinde Karabük’de doğdum. İlköğrenimimi 1986-1991 yılları arasında Fikret Yüzatlı İlköğretim Okulu’nda tamamladım. Orta öğrenimimi, 1991-1994 yılları arasında Kazım Karabekir İlköğretim Okulu’nda ve 1994-1997 yılları arasında Bakırköy Sabri Çalışkan Lisesi’nde tamamladım. 1997-2001 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans, 2001-2005 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Programı’nda yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Programı’nda doktora başladım.

Yayınlarım:

KİMİRAN-ERDEM, A., ARSLAN, E.O., ŞANLI-YÜRÜDÜ, N. O., ZEYBEK, Z., DOGRUOZ, N., COTUK. A., 2006, Isolation and identification of enterococci from seawater samples: assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals. *Environmental Monitoring and Assessment*, 125 (1-3), 219-228.

ARSLAN AYDOĞDU, E. Ö., ÇOTUK, A., 2008, Antibacterial and hemolytic activity of the coelomic fluid of *Dendrobaena venata* (Oligochaeta, Lumbricidae) living in different localities, *IUFS Journal of Biology*, 67 (1).

KİMİRAN-ERDEM, A., ŞANLI YÜRÜDÜ, N.Ö., ARSLAN AYDOĞDU, E.Ö., DOĞRUÖZ, N., ZEYBEK, Z., TÜRETGEN, İ., ÇOTUK, A., 2008, Quantitative microbiological analysis of biofilm communities from the surfaces of different cooling tower materials, *IUFS Journal of Biology*, 67 (1), 9-16.

ŞANLI-YÜRÜDÜ, N.O., KİMİRAN-ERDEM, A., ARSLAN-AYDOĞDU, E.O., ZEYBEK, Z., GURUN, S., Efficacy of colloidal silver-hydrogen peroxide and 2-bromo-2-nitroporopane-1,3-diol compounds against different serogroups of *Legionella pneumophila* strains, *Indian Journal of Microbiology*, 52 (1), 54-59.