

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BİNA SU SİSTEMLERİNDEN İZOLE EDİLEN FARKLI *LEGIONELLA*
TÜRLERİNİN A549 ALVEOLER EPİTEL HÜCRELERİNE SİTOPATOJENİK
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Betül GÜMÜŞLÜOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BİNA SU SİSTEMLERİNDEN İZOLE EDİLEN FARKLI *LEGIONELLA* TÜRLERİNİN A549 ALVEOLER EPİTEL HÜCRELERİNE SİTOPATOJENİK ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Betül GÜMÜŞLÜOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Su kaynaklı çevresel patojen olan *Legionella* bakterileri insanlarda ölümle sonuçlanabilen Lejyoner hastalığına sebep olmaları nedeniyle, halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedirler. Bu çalışmada hastane, otel, sanayi merkezlerinin su sistemlerinde *Legionella* türlerinin dağılımı ve *Legionella*'nın A549 hücrelerine sitotoksik etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. 2014, 2015, 2016 yıllarında hastane, otel, sanayi merkezlerinin su sistemlerine ait 1357 su örneği ISO 17731-2 standardına göre filtre edilmiş; besiyerine ekimi yapılmış, lateks aglütinasyon ve monoklonal antikor yöntemine dayalı Direkt Floresan Antikor (DFA) yöntemi ile serolojik tiplendirmeleri yapılarak serogrup ve subgrupları belirlenmiştir. 2014' de *Legionella* pozitif oranı %7.2; %7.8 *L. pneumophila* serogrup-1, %92.1 *L. pneumophila* serogrup 2-14 bulunmuştur. 2015' de *Legionella* pozitif oranı %8.6 olup; %28.2 *L. pneumophila* serogrup-1, %64.1 *L. pneumophila* serogrup 2-14, %7.7 *Legionella* species bulunmuştur. 2016' da *Legionella* pozitif oranı %10.4; *L. pneumophila* serogrup-1 %28.6, *L. pneumophila* serogrup 2-14 %66.6 ve *Legionella* species %4.7 saptanmıştır. Su sistemlerinde bulunan *Legionella* bakterileri insanlara solunum yolu ile geçerek pnömoniye kadar ilerleyen Lejyoner hastalığına neden olmaktadır. Bu nedenle A549 alveoler epitel hücrelere sitotoksik etkilerinin bilinmesi önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, su sistemlerinde bulunan *Legionella pneumophila* SG-1, *L. pneumophila* SG 2-14 ve *Legionella* species' in 500 MOI ve 96-120 saat uzun süreli enfeksiyonda A549 hücrelerine sitotoksik etkileri MTT kolorimetrik yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, temas ve zaman bağımlı sitotoksik etkinin değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. *Legionella*'nın serolojik tiplendirilmesi, özellikle hastalığa neden olabilecek türlerin belirlenmesi bakımından önem kazanmaktadır. Çalışma sonuçlarının, belli bölgedeki *Legionella*'nın dağılımını ve A549 hücrelerine sitotoksik etkilerini göstermesi nedeniyle önemli olduğu ve ileride yapılacak araştırmalara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Kasım 2022, 146 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Legionella*, A549 hücreleri, serolojik tiplendirme, sitopatojenik etki

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

COMPARISON OF THE CYTOPATHOGENIC EFFECTS OF DIFFERENT *LEGIONELLA* TYPES ISOLATED FROM BUILDING WATER SYSTEMS ON THE A549 ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS

Betul GUMUSLUOGLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin OZSOY ERDAS

Legionella bacteria, a water-borne environmental pathogen, are considered a public health problem because they cause Legionnaires' disease, which result to death in humans. The aim of this study is to determine the distribution of *Legionella* species in hospitals, hotels, industrial centers water systems and the cytotoxic effects of *Legionella* on A549 cells. In 2014, 2015, 2016, 1357 water samples belonging to hospital, hotel, industrial centers water systems were filtered according to ISO 17731-2 standard, plated on agar, serological typed with latex agglutination, subgroups were determined using Direct Fluorescent Antibody (DFA) method based on monoclonal antibody technique. In 2014, the *Legionella* positivity rate was 7.2%, of which 7.8% were *L. pneumophila* serogroup-1, 92.1% *L. pneumophila* serogroup 2-14 were found. In 2015, the *Legionella* positivity rate was 8.6%, of which 28.2% were *L. pneumophila* serogroup-1, 64.1% *L. pneumophila* serogroup 2-14 and *Legionella* species were found in 7.7%. In 2016, 10.4% of those who were *Legionella* positive, 28.6% *L. pneumophila* serogroup-1, 66.6% *L. pneumophila* serogroup 2-14 and *Legionella* species were detected in 4.7%. *Legionella*, found in water systems are transmitted to humans through the respiratory tract, causing Legionnaires' disease, which progresses to pneumonia. Therefore, it is important to know the cytotoxic effects of *Legionella* on A549 alveolar epithelial cells. In this study, the cytotoxic effects of *Legionella pneumophila* SG-1, *L. pneumophila* SG 2-14 and *Legionella* species on A549 have been investigated long term infection of bacteria such as 500 MOI and 96-120 hours using MTT colorimetric method. Our results indicated that, cytotoxic effect is dose and time-dependent. The serological typing of *Legionella* gains importance, especially in terms of determining species that may cause disease. It is thought that the results of the study are important because it shows the distribution of *Legionella* in a particular region and their effects on A549 cells and will contribute to future research.

November 2022, 146 pages

Key Words: *Legionella*, A549 cells, cytopathogenic effect, serological typing

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında yardım ve desteği ile yanımda olan, çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarım sırasında değerli bilgilerini benimle paylaşan, güzel fikir ve önerileri ile her zaman çalışmalarına katkıda bulunan, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ' a, TİK sunumlarımda bilgi ve önerilerini benimle paylaşarak destek olan değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Zekiye SULUDERE ve Sayın Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK' a sonsuz teşekkürlerimi sunmak isterim.

Araştırmayı 16L0430010 no' lu proje ile destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi (BAP)' ne çok teşekkür ederim.

Deneylerimi yaparken bilgileri ve yardımları ile çalışmalarına büyük katkıları olan, Anti Mikrop Laboratuvar sorumlusu Prof. Dr. Murat ERTÜRK ve aynı laboratuvarda çalışan tüm arkadaşlara teşekkür etmek isterim. Çalışmalarım sırasında destekleri ile bana çok yardımcı olan Prof. Dr. Çağatay KARAASLAN ve Arş. Gör. Başak Ezgi SARAÇ' a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında değerli destekleri için Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Tüketici Güvenliği ve Halk Sağlığı Laboratuvarları Daire Başkanımız Sayın Dr. Edibe Nurzen NAMLI BOZKURT' a çok teşekkür etmek isterim.

Yardımları için Doç. Dr. Selin NAR ÖTGÜN ve aynı laboratuvarda çalışan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve önerileri ile bana her zaman yardımcı olan, sorduğum her soruya cevap veren Doç. Dr. Bekir ÇELEBİ ve aynı laboratuvarda çalışan diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında, destek ve fedakarlıkları, ayrıca güler yüz ve samimiyetleri ile daima yanımda olan, Tüketici Güvenliği Referans Laboratuvarları Su ve Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarında birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum çok sevgili iş arkadaşlarım başta olmak üzere aynı bölümde çalışan tüm meslektaş ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatımın en değerli varlıkları anneme ve babama, benim için verdikleri emeklerden dolayı çok teşekkür ediyor, sonsuz sevgi ve minnettarlığımı sunmaktan mutluluk duyuyorum.

Bu tez çalışması, ‘‘Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi (BAP) [Proje numarası: 16L0430010] tarafından desteklenmiştir.

Betül GÜMÜŞLÜOĞLU
Ankara, Kasım 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Tarihçe ve Keşif.....	3
1.2 Morfoloji ve Mikrobiyoloji.....	4
1.3 Ekoloji	5
1.4 Amip ve Protozoalarla Etkileşim	6
1.5 Yaşam Döngüsü	9
1.6 Bulaşma Alanları.....	11
1.7 Biyofilm	11
1.8 Virülans Etkenler ve Patojenez	12
1.9 Flagella ve Pili.....	13
1.10 Hücre Zarı.....	15
1.10.1 İç zar	15
1.10.2 Periplazma	15
1.10.3 Dış zar (Outer Membran-OM)	16
1.11 Lipopolisakkaritler (LPS)	17
1.12 Mip Proteini.....	18
1.13 Sekresyon Sistemleri	18
1.14 Dot/Icm.....	21
1.15 Efektörler	23
1.16 LCV (<i>Legionella</i> Containing Vacuol).....	25
1.17 Fagositoz	26
1.18 Konak Hücreler	26

1.19 <i>Legionella</i> Etkili Hastalıklar	30
1.20 Bağışıklık Sistemi ve Tedavi.....	36
1.21 Epidemiyoloji.....	38
1.22 İnsidans	39
1.23 Salgınlar	42
1.24 Su Sistemlerinde Dezenfeksiyon	44
1.25 Halk Sağlığı ve Önlem	48
2. KAYNAK ÖZETLERİ	50
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	60
3.1 Materyal.....	60
3.1.1 Su örnekleri	60
3.1.2 Besiyerleri	60
3.2 Yöntem	61
3.2.1 Suların filtrasyonu ve ön işlemler.....	62
3.2.1.1 Soğutma kulesinden alınan su örneklerinde ekim	62
3.2.1.2 Sıcak ve soğuk su tanklarından alınan su örneklerinde ekim	62
3.2.1.3 Musluk ve duşlardan alınan su örneklerinde ekim.....	63
3.2.2 İnkübasyon	64
3.2.3 Mikroskopik identifikasyon	65
3.2.4 Lateks Aglutinasyon testi	67
3.2.5 Direkt Floresan Antikor (DFA) testi	61
3.2.6 Floresan mikroskopta inceleme	71
3.2.7 Bakteri saklama.....	72
3.2.8 A549 hücresinin kültür ekimi	72
3.2.9 A549 hücrelerini pasajlama.....	73
3.2.10 Thoma lamında hücre sayımı.....	76
3.2.11 A59 hücrelerinin saklanması.....	78
3.2.12 <i>Legionella</i> bakterilerinin kültürlenmesi.....	79
3.2.13 <i>Legionella</i> bakterilerinin ekstrasellüler ekimleri	79
3.2.14 A549 hücrelerin <i>Legionella</i> ile enfekte edilmesi	72
3.2.15 Bakteri enfeksiyonu ve invazyon	73
3.2.16 Sitotoksite testi.....	83

3.2.17 Besiyerleri ve kimyasalların hazırlanması.....	75
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	82
4.1 Lateks Aglutinasyon Testine Göre Serotiplendirme.....	91
4.2 DFA ile Serogrup ve Subgrupların Belirlenmesi	94
4.3 <i>Legionella</i> Bakterilerinin Ekstrasellüler Büyümesi	98
4.4 MTT ile Sitotoksosite Belirlenmesi.....	91
4.5 İstatiksel Analiz	105
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	106
KAYNAKLAR	132
ÖZGEÇMİŞ.....	146



SİMGELER DİZİNİ

CO ₂	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik Asit
NaOH	Sodyumhidroksit
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
KCl	Potasyum Klorür
L	Litre
M	Molarite
N	Normalite
Nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
µm	Mikrometre
°C	Santigrat
Rpm	Dakikada Devir

Kısaltmalar

ACES	N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid
BCYE	Buffered Charcoal yeast extract
CDC	Center Disease Control
CFU	Colony Forming Unit
Cu-Zn-SOD	Bakır çinko Super oksit dismutaz
CR	Kompleman reseptörü
CYE	Charcoal yeast extract
DGVP	Dye-Glycine-Vancomycin-Polymyxin B
DFA	Direkt Floresan Antikor
DMSO	Dimetil sülfoksit
Dot	Defective in organelle trafficking
Dot/Icm	Type IV B secretion system
ECDC	European Center Disease Control
ED	Entner-Doudoroff
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELNet	European <i>Legionella</i> Surveillance Net
EMP	Embden–Meyerhof–Parnas
ER	Endoplazmik Retikulum
EWGLI	European Working Group <i>Legionella</i> Infection
FBS	Fetal Bovin Serum
FCS	Fetal Calf Serum
Hsp60	Heat shock protein 60
Icm	Intracellular multiplication
LCV	<i>Legionella</i> containing vacuole

LD	Legionnaires' Disease
LPS	Lipopolisakkaritler
Lss	Type I secretion system
Lsp	Type II secretion system
Lvh	Type IV A secretion system (<i>Legionella</i> vir homologues)
MAb	Monoclonal Antibody
Mip	Macrophage infectivity potentiator
MOI	Multiplication of Infection
MOMP	Major Outer Membrane Protein
MspA	Metalloproteaz
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NLR	Nod like receptors
NF-KB	Nuclear factor KB
OD	Optik Dansite
OM	Outer membrane
OMV	Outer membrane vesicles
PAIs	Pathogenicity islands locus
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PI	Propidium iodide
PilD	Prepilin Peptidaz
PL	Phospholipid
PPlase	Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase
SBT	Sequence Based Typing
SG	Serogrup
SOD	Super oksit dismutaz
Spp	Species
TLR	Toll like receptors
TSA	Tryptic Soy Agar
T4SS	Type IV secretion system
VBNC	Viable But Non Culturable

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Besiyeri için kimyasal maddelerin tartılması.....	61
Şekil 3.2 Besiyerinin erlen içinde hazırlanması.....	61
Şekil 3.3 Suların filtre edildiği filtrasyon cihazı	63
Şekil 3.4 Legionella kültüründe kullanılan etüv	64
Şekil 3.5 Etüvde besiyerine ekimi yapılan petriler	65
Şekil 3.6 Koloni mikroskobu	66
Şekil 3.7 Legionella' nın koloni mikroskop görüntüsü	66
Şekil 3.8 Legionella Lateks aglütinasyon kiti	68
Şekil 3.9 Legionella pozitif aglütinasyon görüntüsü	68
Şekil 3.10 Lamaların kurutulması.....	70
Şekil 3.11 Lamaları PBS içinde yıkama	71
Şekil 3.12 Lamaları yıkama sonrası kurutma	71
Şekil 3.13. a, b Legionella' nın floresan mikroskop görüntüsü (Scale Bar: 20 µm).....	72
Şekil 3.14 A549 hücrelerinin mikroskop görüntüsü	74
Şekil 3.15 A549 hücrelerinin pasajının yapılması	75
Şekil 3.16 A549 hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması	75
Şekil 3.17 A549 hücrelerinin mikroskopta hareketli görüntüsü	76
Şekil 3.18 A549 hücrelerinin Thoma lamına pipetlenmesi.....	77
Şekil 3.19 Thoma lamında A549 hücre sayımı yapılması	77
Şekil 3.20 A549 hücrelerinin Thoma lamında mikroskop görüntüsü.....	78
Şekil 3.21 Ekstrasellüler Legionella üremeleri	81
Şekil 4.1 2014 yılında suların alınma yerleri	89
Şekil 4.2 2015 yılında suların alınma yerleri	90
Şekil 4.3 2016 yılında suların alınma yerleri	90
Şekil 4.4 2014 yılı L. pneumophila Serogrupların dağılımı.....	91
Şekil 4.5 2015 yılı Legionella Serogrup ve tür dağılımı.....	92
Şekil 4.6 2016 yılı Legionella Serogrup ve tür dağılımı.....	92
Şekil 4.7 2014 yılı L. pneumophila serogrup yüzde oranları	93
Şekil 4.8 2015 yılı Legionella serogrup ve türlerin yüzde oranları	93
Şekil 4.9 2016 yılı Legionella serogrup ve türlerin yüzde oranları	94

Şekil 4.10 <i>L. pneumophila</i> SG-1 subgruplarının dağılımı	95
Şekil 4.11 <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 serogrupların dağılımı	96
Şekil 4.12 2015-2016 yıllarında <i>Legionella</i> species dağılımı	96
Şekil 4.13 <i>L. pneumophila</i> SG 2-14 olan bakterilerin zamana bağlı büyüme grafiği (620 nm OD).....	99
Şekil 4.14 <i>L. pneumophila</i> SG-1 olan bakterilerin zamana bağlı büyüme grafiği (620 nm OD).....	99
Şekil 4.15 <i>Legionella</i> species olan bakterilerin zamana bağlı büyüme grafiği (620 nm OD)	100
Şekil 4.16 A bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma	101
Şekil 4.17 A bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı sitotoksosite	101
Şekil 4.18 B bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma.....	102
Şekil 4.19 B bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı sitotoksosite	103
Şekil 4.20 C bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma.....	104
Şekil 4.21 C bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı sitotoksosite	104
Şekil 4.22 D bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma	105
Şekil 4.23 D bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı sitotoksosite.....	106
Şekil 4.24 A bakterisinde 120 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	106
Şekil 4.25 B bakterisinde 120 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	107
Şekil 4.26 C bakterisinde 120 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	108
Şekil 4.27 D bakterisinde 120 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	108
Şekil 4.28 E bakterisinde 72 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	109
Şekil 4.29 F bakterisinde 72 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	110
Şekil 4.30 G bakterisinde 72 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	111

Şekil 4.31 H bakterisinde 72 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	112
Şekil 4.32 H bakterisinde 108 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki	112
Şekil 4.33 Gözlenen değerler ile zaman grafiği	114
Şekil 4.34 Gözlenen değerler ile MOI grafiği.....	114
Şekil 4.35 Gözlenen değerler ile <i>Legionella</i> grafiği	115



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Suların filtrasyonu ve kültür öncesi ön işlemler	64
Çizelge 4.1 2015 yılı <i>Legionella pneumophila</i> serogrup ve subgrupların bulunduğu sular	97
Çizelge 4.2 2016 yılı <i>Legionella pneumophila</i> serogrup ve subgrupların bulunduğu sular	97
Çizelge 4.3 2015-2016 <i>Legionella</i> species bakterilerin bulunduğ u sular	98
Çizelge 4.4 Post-Hoc Tukey testine göre MTT sonucunun istatistiksel analizi	113



1. GİRİŞ

Legionella bakterileri insanlarda solunum sistemine yerleşerek grip benzeri (Fricke vd. 2020) Pontiak ateşine ve pnömoni benzeri Lejyoner hastalığına sebep olmaktadır. İlk olarak 1976 yılında Amerika'nın Philadelphia eyaletinde Lejyoner kongresinin olduğu otelde görülen salgın sonucu yapılan araştırmalar, hastalığın sulardan kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır. Otel sularından izole edilen bakteriye "*Legionella*" (Joshi ve Swanson 1999), sebep olduğu hastalığa da Lejyoner hastalığı (Legionnaires Disease- LD) ismi verilmiştir (Scaturro vd. 2020, Felice vd. 2019). Sulardan bulaşması nedeniyle *Legionella*, su kaynaklı çevresel patojen olarak kabul edilmektedir (Graham vd. 2020, Zhan vd. 2014). Protozoa ve amiplerin bulunduğu ılık, sıcak, durgun sular ve biyofilm katmanları Lejyoner hastalığı bakımından potansiyel tehlike oluşturmaktadır (Buse ve Ashbolt 2011, Tachibana vd. 2013). *Legionella*, su kaynakları ve su dağıtım sistemlerinde çoğalarak aerosol yolu ile insanlara bulaşmaktadır (Felice vd. 2019). Ayrıca insandan insana geçebileceği de belirtilmiştir (Swart vd. 2018). *Legionella* nemli ortamlarda, toprakta ve balçıkta, doğal ve tatlı su kaynaklarında (Eisenreich ve Heuner 2016) serbest halde bulunduğu gibi ayrıca amip ve protozoaların parazitleri (Tao vd. 2013, Joshi ve Swanson 1999, Abu Kwaik vd. 1998) şeklinde yaşamaktadırlar (Felice vd. 2019). Su sistemlerinde bulunan biyofilm katmanlarında (Graham vd. 2020) koloniler oluşturmaktadırlar (Felice vd. 2019). İnsanlar için en büyük tehlike biyofilm yapılarında çoğalmaları sonucu ortaya çıkmaktadır (Fricke vd. 2020).

Lejyoner hastalığı dünyanın birçok yerinde %15-20 ölüm oranı ile hayatı tehdit eden bir pnömoniye (Alli vd. 2003, Abu Kwaik 1998) sebep olmaktadır. *Legionella* son 50 yılda patojenite ve virülansı artan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Felice vd. 2019). Şehirlerin endüstrileşmesi, havuz, spa, klima ve duş sistemlerinin daha fazla kullanılması ve su kaynaklarında kirlenme, ayrıca spor merkezleri, yaşlı bakım ve barınma merkezleri gibi toplu yaşama alanlarının artması, Lejyoner hastalığının daha fazla görülmesine neden olmaktadır (Felice vd. 2019).

Legionella farklı konak hücreler ve çevresel ortamlarda yaşamasını sağlayacak gelişmiş bir mekanizmaya sahiptir (Oliva vd. 2018). Farklı tür ve suşlar arasında DNA değişimi

ve yüksek rekombinasyon oranı nedeniyle genetik olarak iyi donanımlı olması yanında, genomundaki efektör protein çeşitliliğinden dolayı, farklı ökaryot konakları enfekte ederek onların korunmuş hücresel yollarını kullanabilmektedir (Paranjape vd. 2020). *L. pneumophila* pleomorfik yapıda olduğu için, aynı türün bireyleri arasında farklı morfolojik özelliklere sahiptir, bu nedenle farklı fizyolojik ve virülans özellikler göstermektedir (Prashar vd. 2012). Bu durum bakterinin tanımlanması ve canlılara etkilerinin belirlenmesinde zorluklara sebep olabilmektedir.

Legionella'nın akciğer epitel hücrelerinde replikasyona uğradığı bilinmesine rağmen bu hücrelere etkileri hakkında bilinenler oldukça azdır. Enfeksiyon sırasında aktive olan alveoler epitel hücrelerin, çok miktarda proinflamatör maddenin açığa çıkmasını sağlayarak immün cevabın düzenlenmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (Schmeck vd. 2008). Alveoler epitelde bulunan tip 1 ve tip 2 hücreler, alveoler yüzeyin %95'inden fazlasını oluşturmalarına rağmen in vivo ortamda bakterinin intrasellüler replikasyondaki potansiyel rolü büyük oranda gözden kaçırılmıştır (Abu Kwaik 1998).

Bu çalışma ile, Türkiye' nin İç Anadolu Bölgesi' nde yer alan çeşitli şehirlerindeki hastane, otel ve sanayi tesislerinin su sistemlerinde *Legionella* bakterileri tespit edilerek, tür ve alt türleri belirlenmiştir. Ayrıca farklı *Legionella* bakterileri ile A549 alveoler Tip II hücreleri enfekte edilerek, alveoler epitel hücrelere sitotoksik etkileri gösterilmiştir.

Bina su sistemleri *Legionella* bakterisinin insanlara bulaşması açısından oldukça etkili ortamlardır. Bu nedenle özellikle su sistemlerinde yaygın olarak bulunan çevresel *Legionella* türlerinin serolojik tiplendirmeleri yapılarak, alveoler epitel hücrelere sitotoksik etkilerinin belirlenmesi toplum sağlığı bakımından önem taşımaktadır. Bakterinin özelliklerini ve sitopatojenik etkilerini iyi tanıyabilmek, sebep olduğu hastalığın daha hızlı tespit edilmesini sağlamak açısından ve etkili tedavinin uygulanması yönünden önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye' nin İç Anadolu Bölgesi' nde bulunan farklı illerindeki hastane, otel, oto ve kimya sanayilerine ait su sistemlerinde bulunan *Legionella* bakterileri tespit

edildikten sonra tür, serogrup ve subgrupları tanımlanmıştır. Daha sonra bu bakterilerin A549 tip 2 alveoler epitel hücrelerine sitotoksik etkileri MTT kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir.

1.1 Tarihçe ve Keşif

1940' da Georgia' da görülen ve tipik olmayan ateşli salgın hastalık "Brushy Creek fever" olarak tanımlanmıştır. 1942 yaz aylarında, North Carolina' da tipik olmayan ateşli bir salgın hastalık olan Fort Bragg görülmüştür. Aynı hastalığın 1943 yaz mevsiminde tekrar Fort Bragg' da görülmesi üzerine, bilim insanı Lieutenant Hugh Tatlock, 7 hasta kanından, zayıf boyanan, gram negatif ve çubuk şeklinde yapılara sahip, Rickettsia benzeri bir organizma izole etmiştir. İlerleyen çalışmalar sonucunda izole edilen bu bakteri ilk olarak CYE (Charcoal Yeast Extract) besiyerinde karakterize edilmiştir. Tatlock, bu mikroorganizmanın Fort Bragg ateşine sebep olduğunu o yıllarda gösterememişti fakat ilk buluşlarını yayımlayarak organizmanın bilinen özelliklerini kaydetmenin, gelecekteki gelişmeler için önemli olacağını ifade etmişti (Hebert vd. 1980). Böylece *Legionella* hakkında ilk keşifler 1947'de başlamış ve "rickettsia benzeri organizma" olarak tanımlanmıştır. Bu bakteri türü, 1968'de Michigan eyaletinin Pontiac şehrinde, sağlık merkezi çalışanlarını ve hastalarını enfekte etmiştir. Solunum semptomları hafif seyreden, pnömoni ve ölüm görülmeyen hastalık Pontiac ateşi olarak isimlendirilmiştir. Enfeksiyon etkileri az olmasına rağmen, sağlık çalışanları arasında %95 oranında enfeksiyon görülmesi patojenin aerosol ile yayıldığını ortaya çıkarmıştır (Walker ve McDermott 2021).

1976 yaz aylarında, Philadelphia' nın Pennsylvania şehrinde, Amerikan Lejyonerler kongresinin yapıldığı otelde, solunum yolu enfeksiyonu ile birlikte, 182 hastada görülen pnömoni, 29 kişinin ölmesine neden olmuştur (McDade vd. 1977, Ulleryd vd. 2012). Salgının, otel sularından kaynaklandığı düşünülmüştür. 1977' de CDC (Center for Disease Control)' den Dr. Joseph McDade' nin çalışmaları sonucunda atipik pnömoni nedeniyle 6 hastanın ölmesi üzerine yapılan biyopsi çalışmalarında, 4' ünün akciğer dokularından gram negatif özellikte bakteri izole edilmiştir (Vural 2014). İlk olarak Lejyonerlerde hastalığa sebep olan bu mikroorganizma, Lejyoner hastalığı bakterisi

olarak tanımlanmıştır (McDade vd. 1977). Hiçbir taksonomik gruba uymadığından bakteriye yeni bir familya adı olan *Legionellaceae*, yeni cins adı *Legionella* ve tür adı *pneumophila* verilmiştir (Vural 2014). McDade ve arkadaşlarının çalışmaları ile Lejyoner hastalığı bakterisi, gine domuzları ve embriyolu tavuk yumurtası kullanılarak izole edilmiştir (Feeley vd. 1979). İlerleyen çalışmalar sonucunda, pnömoni nedeniyle ilk olarak Lejyoner ölümlerine sebep olan bakteri, *Legionella pneumophila* olarak adlandırılmıştır (Eisenreich ve Heuner 2016, Walker ve McDermott 2021). *Legionella pneumophila*'nın ilk suşu, hastalığın ilk kez Philadelphia'da ortaya çıkmasından dolayı, Philadelphia 1 olarak adlandırılmıştır (Brenner vd. 1979, Winn 1988).

1.2 Morfoloji ve Mikrobiyoloji

Legionellaceae familyası, *Proteobacteria*'nın γ -2 subgrubunun içinde yer almaktadır (Mekkour vd. 2013a, Vural 2014). *Legionellaceae* familyası üyeleri gram-negatif, aerob, sporlanmayan, kapsül oluşturmeyen, 0-68 °C sıcaklıklarda, nemli ortamlarda, 5- 8,5 pH'da uzun süre yaşayan (Tachibana vd. 2013), çubuk şeklinde, 0.3-0.9 μ m genişlikte ve 2-20 μ m uzunlukta, hareketli, fırsatçı ve yayılma özelliği gösteren (Prashar vd. 2012) bakterilerdir (Pancer 2013, Mekkour vd. 2013a). Katalaz ve oksidaz enzimlerine sahiplerdir (Talapko vd. 2022, Mraz ve Weir 2018). Gram negatif olarak tanımlanmalarına rağmen hücre duvarının yan zincirlerine 9-14 izopren birimleri bağlanmış, %80'den fazla dallanmış hücresel yağ asitleri içermesi nedeniyle diğer gram negatif bakterilerden ayrıcalıklı özellik kazanmışlardır. Bu yapı, bakterilerin gram boyama ile zor boyanmasına neden olmaktadır (Pancer 2013, Mekkour vd. 2013a, Vural 2014).

L. pneumophila büyümesi sırasında glukozu kullanamamaktadır. Amino asitler bakterinin çevresel ortamlarda gelişmesinde temel karbon ve enerji kaynaklarıdır. Enerjilerini Krebs döngüsü ile katabolize edilen amino asitlerden, şekerleri ise Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) ve Entner-Doudoroff (ED) yolağındaki glukoneojenik enzimlerden sentezlemektedirler (Manske ve Hilbi 2014, Vural 2014).

Legionella, proteaz enzimlere sahiptir ancak sakkarozu parçalayamaz (sakkaroz negatif). DNA' sı, %38 ile %52 arasında G+C içermektedir (Talapko vd. 2022). *Legionella oakridgensis* dışında kalan diğer *Legionella* türleri tek polar flagella ve çok sayıda fimbria yapılarına sahiplerdir. Flagellanın yapısı sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. *Legionella* içte ve dışta bulunan trilaminer membran, peptidoglikan tabaka ve bazı türlerde ise polisakkarit yapıda olan kapsül içermektedirler (Vural 2014).

L. pneumophila' nın optimum büyüme sıcaklığı 35 °C' dir. pH 6.0-8.0 olmalıdır. 25-42 °C sıcaklıklar çoğalması için uygun olmaktadır (Mraz ve Weir 2018, Fields vd. 2002). Ayrıca 4-60 °C arası sıcaklıklar ve pH 2.7-8.3 arasında yaşayabildiği belirlenmiştir. Sıcaklıklar 70 °C' ye ulaştığında, bakteri anında ölmektedir. *L. pneumophila*' nın, 37 °C' den az sıcaklıklarda hareketliliği ve konak hücrelere teması optimaldir. Su sıcaklığının artması, bakterinin çoğalmasına neden olmaktadır. Besinlerin az olduğu ortamlara toleranslıdır. Bu durum, *L. pneumophila*' nın yaşam döngüsü sırasında pH, sıcaklık ve konak savunması gibi çevresel koşullara dayanıklı olduğunu göstermektedir (Mraz ve Weir 2018, Oliva vd. 2018).

1.3 Ekoloji

Legionella, doğal su kaynaklarında, toprakta, çamurda yaşadığı gibi, özellikle insan yapımı su sistemlerinde daha fazla bulunmaktadır (Gruas vd. 2013, Chang vd. 2009, Oliva vd. 2018, Appelt ve Heune 2017, Talapko vd. 2022). Doğada tatlı sularda, göl ve akarsularda, balçık (Eisenreich ve Heuner 2016) ve toprakta, en az 13 amip türü (Gao ve Kwaik 1999a) ve protozoa parazitleri (Tao vd. 2013, Joshi ve Swanson 1999, Abu Kwaik 1998) olarak yaşamaktadırlar. Ayrıca çeşme, fısıkye, dekoratif havuzlar gibi yapay sularda bulunmaktadır (Wang vd. 2015). Sularda planktonik olarak serbest halde ve biyofilm yapılarında, genellikle tatlı su protozoası ile birlikte bulunmaktadır (Oliva vd. 2018), ancak bu ortamlarda çoğaldığı gösterilmemiştir (Talapko vd. 2022, Appelt ve Heune 2017, Boamah vd. 2017).

Yüksek sıcaklık, inorganik ve organik su içeriği ve protozoa varlığı, yaşamaları ve çoğalmalarında önemli rol oynamaktadır. *L. pneumophila*' nın, 30 °C ile 40 °C arasında

(Talapko vd. 2022), ayrıca 70 °C' ye kadar olan sıcaklıklarda (Yavuz 2018) yaşadığı ve 0 ° C' de antarktika tatlı su göllerini, 60 °C ve aşırı asidik su kaynaklarını kolonize ettiği bulunmuştur (Oliva vd. 2018). Optimal üreme sıcaklığı, 32 °C ve 42 °C arasında olup, 20 °C ve 50 °C arasında üreyebildiği, su sıcaklığı 20 °C üzerine çıkınca suda çoğalmaya başladığı belirtilmiştir (Yavuz 2018).

L. pneumophila, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilmler içinde büyüme yeteneğindedir (Appelt ve Heune 2017). Birçok protozoa türü ile yaşaması, *L. pneumophila*' nın farklı konak hücrelerini işgal etmesinde ve insanlarda enfeksiyona neden olan mekanizmalar geliştirmesinde etkili olmaktadır (Talapko vd. 2022).

L. longbeachae, toprakta daha yaygın olup, bahçe ve saksı toprağı ile ilişkili sularda daha fazla bulunur. *L. longbeachae*' nin, toprakta yaşamak için sahip olduğu enzimlerin, bitkilerin bozulmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Mraz ve Weir 2018). Avrupa' da *L. longbeachae* ve diğer türler, yağmur suyu birikintilerinde, toprakla kirlenmiş suda ayrıca Porto Riko' da yerden 30 metre yükseklikteki yağmur ormanlarında, tatlı suda ve deniz sularında bulunmuştur. İsviçre' de *Legionella*' nın depolama tesislerine rüzgâr ve yağmur yoluyla getirilebileceği öne sürülmüştür. *L. longbeachae*, kompost atıklarda nadiren bulunur. Bu çalışmalar, kompost atıkların patojenik *Legionella* türlerinin önemli bir rezervuarı ve insanlarda enfeksiyon kaynağı olduğunu göstermekte, ancak Lejyoner hastalığını kompost üretimine bağlayan önemli veriler bulunmamaktadır (Chambers vd. 2021).

1.4 Amip ve Protozoalarla Etkileşim

L. pneumophila ve amipler arasındaki ilişki, bakterinin ekolojisinde ve patojenitesinde önemli rol oynamaktadır (Richards vd. 2013). *L. pneumophila*' nın protozoa ile etkileşimi, insanda hastalığa sebep olmasında önemli bir mekanizmadır. Protozoanın hücre içi ortamı, *L. pneumophila*' yı çevre koşullarından korumakta ve besin açısından zengin ortam sağlamaktadır (Boamah vd. 2017).

Protozoonların, biyofilm yapısında bulunan bakterilerle beslenmeleri, *L. pneumophila*'nın çoğalmak için yararlandığı önemli bir özelliktir (Abdel-Nour vd. 2013). Düşük sıcaklık, yetersiz besin gibi olumsuz şartlarda *L. pneumophila*, protozoanın trofozoit formunu enfekte etmektedir. Bu form, bakterinin hücre içi replikasyonunu kolaylaştıran kist formuna farklılaşmaktadır (Richards vd. 2013, Boamah vd. 2017). Kistler, bakterilerin taşıma veziküllerinde paketlenerek kesecikler halinde atılmasını sağlamaktadırlar. Enfeksiyöz etkili bu veziküller donmaya, sonikasyona ve biyositlere dirençli olduğu için, vezikül içinde atılan *L. pneumophila*, 6 ay sonra tekrar canlılığını kazanabilmekte, ayrıca daha kısa yapıda, hareketli olup, konak hücrelerini enfekte etme kabiliyeti artmaktadır (Richards vd. 2013). Böylece amipler *Legionella*'nın kimyasal ve fiziksel etkilere direnç göstererek yaşamını sürdürmesi ve patojenitesinin artmasında etkili olmaktadır (Boamah vd. 2017, Nisar vd. 2020).

Protozoa ile evrim bakterinin genomunu etkilemektedir çünkü *L. pneumophila* protozoadan, ökaryotik proteinler kodlayan genler kazanması, farklı konak hücrelerde kolonize olmasında etkili strateji sağlamaktadır. *Legionella*, konak hücrenin sinyal yollarını ve temel hücresel süreçlerini etkileyen yüzlerce efektör proteinini konak hücreye salgılayarak konak hücrenin transkripsiyon ve translasyon süreçlerini değiştirebildiği gibi, epigenetik mekanizmalarını da kullanabilmektedir. Hücreye alındıktan sonra bakteriler, konak hücrenin bozulmasını sağlayan endozomal–lizozomal yolu yeniden programlamaktadırlar (Talapko vd. 2022, Oliva vd. 2018).

Endositik taşımadaki değişim pmi, mil, dot ve icm gen bölgeleri tarafından kodlanan proteinlerle sağlanmaktadır. Bakterinin intrasellüler enfeksiyonu sırasında gen ekspresyonunda ciddi değişimler görülmektedir. Bu değişimler bakterinin intrasellüler ortama uyum sağlamasında ve replikasyonun sonlanması sonucu konak hücrenin ölümünde temel rol oynamaktadır (Gao ve Kwaik 1999a).

Doğal çevrenin etkileri sonucu, *Legionella* tarafından geliştirilen moleküler taklit yeteneği, bakterinin virülansında önemli olmaktadır (Talapko vd. 2022, Oliva vd. 2018). *Legionella* ve konak hücre arasındaki yatay gen transferi nedeniyle, protozoadan memeli

makrofajlarına geçen *Legionella*, daha bulaşıcı özellik göstermektedir (Mraz ve Weir 2018).

Varyasyonlara uyum göstermesini sağlayan geniş bir gen havuzuna sahip olması, virülans özellikteki gen bileşimini sürekli geliştirme ve değiştirme yeteneği, *Legionella*'nın çok farklı konak hücrelerde yaşamasını sağlamaktadır (Boamah vd. 2017). *L. pneumophila*'nın en az 20 tür amip, iki tür siliyer protozoa ve bir tür sümük içinde parazit olarak yaşadığı bilinmektedir (Lau ve Ashbolt 2009). *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Hartmannella vermiformis*, *Dictyostelium discoideum*, ve *Naegleria spp.* gibi serbest yaşayan amipler, *Legionella* için doğal konaklar (Simon ve Hilbi 2015, Appelt ve Heune 2017) olup ayrıca *Vermamoeba vermiformis*, bakteriyi ısı ve dezenfektanların etkilerinden koruyarak, enfeksiyonda etkili olmasına yol açmaktadır (Talapko vd. 2022).

L. pneumophila hem farklı konak hücrelerde hem de hücre dışı çevrede replikasyon yapması ve hayatta kalmasını sağlayan gelişmiş bir mekanizmaya sahiptir (Oliva vd. 2018). *Hartmannella vermiformis*'e *L. pneumophila*'nın tutunma ve saldırması protozoa yüzeyindeki lektin reseptörlerinin defosforilasyonu ile olmaktadır (Gao vd. 1997). Besinler protozoada kıt hale geldiğinde, *L. pneumophila* geçirgen form olan transmissive forma, daha sonra kamçılı spor benzeri, strese dirençli ve metabolik olarak neredeyse uykuda olan olgun enfeksiyöz forma (Mature Infection Form-MIF) farklılaşmaktadır (Eisenreich ve Heuner 2016). Ortamdaki besin maddeleri tükendiğinde MIF yapısı, *L. pneumophila*'nın yaşamasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca hastalıklara neden olan bu yapı, yeni konak hücrede ikinci bir döngüyü başlatmak için gerekmektedir (Richards vd. 2013, Oliva vd. 2018). MIF'ler uzun süre yaşayabilme özelliğine sahiptirler, ayrıca amipler tarafından alındığında tekrar canlanabilen VBNC (viable but not culturable) yapısına dönüşebilmektedirler (Eisenreich ve Heuner 2016).

L. pneumophila sulara 14 aya kadar yaşama yeteneğindedir. İlk birkaç ay sonra canlılığında azalma olmasına rağmen uzun dönemde, amipler için enfeksiyöz özellikte olan VBNC formunda yaşayabilirler. Bakterinin amipler ve memeli hücrelerinde hücre içi büyümesi enfeksiyon yeteneğini arttırmaktadır. Enfekte özelliğindeki bu artış bakteri morfolojisi, hücre duvarı yapısı, makrofajlara girişi gibi özelliklerden etkilenmektedir.

L. pneumophila'nın amiplerde büyümesi pnömoni ile sonuçlanmaktadır. Fare akciğerlerinde bakterinin artan replikasyonu enfeksiyona sebep olmuştur. *L. pneumophila* oldukça gelişmiş bir programa sahiptir. *Legionella*'nın enfeksiyona sebep olması, replikatif fazdan hızlı bir şekilde enfeksiyöz özelliğe sahip transmisive forma geçmesi ile gerçekleşmektedir (Garduño vd. 2002)

1.5 Yaşam Döngüsü

L. pneumophila'nın yaşam döngüsü; replikasyon fazı ve post eksponansiyel faz olarak 2 adımda gerçekleşmektedir. *L. pneumophila*'nın enerji seviyelerini sınırlamak için kullandığı ve *Legionella* içeren vakuol (*Legionella* containing vacuole) olarak bilinen vakuolde (LCV) meydana gelen yaşam döngüsü, yüksek seviyede birçok faktör tarafından düzenlenmekte, ayrıca fenotipik olarak önemli değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Replikatif ve transmisiv faz arasındaki geçiş, besin sınırlaması ile gerçekleşen koordineli bir süreçtir. Replikatif fazda *L. pneumophila*, Dot/Icm salgılama sistemi (T4SS) yoluyla salgılanan efektör proteinleri ile konak hücre fonksiyonlarını değişime uğratmakta ve LCV içinde aktif olarak çoğalmaktadır. Replikasyon fazında, besin yönünden zengin konak hücrelerde, koşullar çoğalmaya uygun olduğu için, virülans ve bulaşma ile ilgili genlerin ekspresyonu yapılmamakta ve bakteri üssel sayıda replikasyona uğramaktadır. İnce çubuk şeklinde ve hareketsizdir, pürüzlü hücre duvarına sahiptir. Metabolizması aktif olduğundan amino asitlerin parçalanması, şekerin asimilasyonu, hücre bölünmesi gerçekleşirken, sitotoksiste ve lizozomdan kaçma özellikleri gerekli olmamaktadır (Oliva 2018, Chauhan ve Shames 2021, Molofsky ve Swanson 2004, Mou ve Leung 2018).

L. pneumophila konak hücrede besinlerin azalması ve hücre ölümü üzerine hücre dışına çıkmaya hazır hale geldiğinde, transmisiv faz olarak bilinen post-eksponansiyel faza geçmektedir (Mou ve Leung 2018). Bu form, kısa ve küt uçlu çubuklar şeklinde, hareketli, pürüzsüz ve kalın hücre duvarı, enerji bakımından zengin polimerlerden oluşmaktadır (Chauhan ve Shames 2021, Molofsky ve Swanson 2004).

Çoğalmanın durduğu transmisiv fazda bakteriler, virulansı sağlayan efektör, flagella, Tip IV pilus genlerinin ekspresyonu sonucu bulaşıcı özellik kazanmaktadırlar. Ayrıca bakterinin lizozomdan kaçması ve konak hücreden çıkarak planktonik formda yaşamasını sağlayan düzenleyici proteinler sentezlenmektedir (Oliva vd. 2018, Chauhan ve Shames 2021).

L. pneumophila, konak hücreden çıktığında gözenek oluşumu ve nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Dot/Icm proteini IcmT, konak hücrelerin gözenek oluşumu sonucu parçalanmasına, LepA ve LepB efektörleri ise amiplerden litik olmayan ekzositoz yoluyla çıkışına katkıda bulunmaktadır. Bilinen intrasellüler replikasyon stratejisinin tersine hücre ölümü, *L. pneumophila* içeren konak hücrenin, hücrel mekanizması tarafından başlatılmaktadır (Chauhan ve Shames 2021, Mou ve Leung 2018).

L. pneumophila'nın hücrelerde ölümüne neden olması 2 şekilde gerçekleşmektedir. Biri, enfeksiyonun erken evrelerinde kaspaz-3 aracılı apoptozu başlatması diğeri ise, hücrede intrasellüler replikasyonunun sonlanması üzerine konak hücrede por oluşumuna yol açarak konak hücrenin parçalanmasını tetiklemesi şeklinde meydana gelmektedir (Zink vd. 2002, Gao vd.1998).

L. pneumophila'nın fazlar arasındaki geçişi transkriptomik değişikliklerle sağlanmakta ve genlerinin yaklaşık yarısının ekspresyonu, replikatif fazdan transmisiv faza geçişte yapılmaktadır. Yaşam döngüsü, gen ifadesini kontrol eden düzenleyici proteinler tarafından denetlenmektedir (Richards vd. 2013, Oliva vd. 2018).

L. pneumophila'nın sitolitik ve hemolitik özellikte olan legiolizin, RtxA, metalloproteaz (MspA), fosfolipaz enzimleri, konak hücreyi parçalamaktadır (Eisenreich ve Heuner 2016). Bakterinin yeni bir hücrede replikatif faza dönmesi ile yaşam döngüsü devam etmektedir (Oliva vd. 2018).

1.6 Bulaşma Alanları

25-55 °C sıcakların olduğu akuatik ortamlar, spa banyoları ve klimalar, binalarda az dezenfekte edilen ve biyofilm katmanları oluşturan su sistemleri *Legionella*'nın yaşamasına uygun ortamlar sağlar ve *Legionella* etkili salgınların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Buse ve Ashbolt 2011, Eisenreich ve Heuner 2016). *Legionella*'nın en fazla görüldüğü ortamlar hastane ve otel su sistemleri, dış merkezleri, diyaliz ve solunum cihazları gibi medikal ekipmanların kullanıldığı üniteler, klimalar, dekoratif havuzlar hastalığın yayılması için riskli ortamlardır (Sikora vd. 2015).

Legionella'nın bulaşmasında musluklar gibi içilebilir sular, ayrıca duşlar, kaplıcalar, soğutma kuleleri ve kondansatörler gibi içilemez su kaynakları etkili olmaktadır. *L. pneumophila*, klima sistemlerinde, soğutma kulelerinde, çeşmelerde, kaplıcalarda, fiskiyelerde, buz makinelerinde, bitki püskürtücülerinde, dış cihazlarında ve duş başlıklarında yaşamaya adapte olmuştur. Bu ortamlarda bulunan kirlenmiş aerosollerin solunması özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış, kişilerde ayrıca yaşlı ve duyarlı insanlarda ciddi zatürre ile sonuçlanabilen Lejyoner hastalığına sebep olmaktadır (Oliva vd. 2018, Talapko vd. 2022).

1.7 Biyofilm

L. pneumophila su sistemlerinde, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium breve* ve siyanobakteri gibi (Abdel-Nour vd. 2013) farklı bakterilerin ekzopolisakkaritlerinden oluşan biyofilm yapısında kolonize olarak hayatta kalmaktadırlar. Bu mikrobiyal yapıda bulunan amino asit ve organik karbon kaynaklarını kullanarak besin elde etmektedirler. Biyofilm oluşumu sıcaklık ve yüzey materyali tarafından düzenlenmektedir. Biyofilmler, su kanalları içeren mantar benzeri yapılara dönüşürler (Abu Khweek ve Amer 2010, Appelt ve Heune 2017).

Biyofilmler ayrıca bakterilerin dış etkenlere karşı direncini arttıran koruyucu mekanizmalardır. *Legionella* fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı biyofilmler ile direnç

göstermekte, böylece yüksek virülans özelliği kazanarak hayatta kalmaktadır (Talapko vd. 2022, Swart vd. 2018).

Biyofilm kolonizasyonu için gerekli etkenlerden biri sıcaklıktır. Biyofilm oluşumu için ayrıca demir gerekli olmakla birlikte yüksek konsantrasyonda demir bulunması, biyofilm oluşumunu engelleyebilmektedir (Abdel-Nour vd. 2013). Demir, bakterinin hayatta kalması ve gelişmesi, ayrıca protozoada hücre içi replikasyonu için gerekmektedir (Abdel-Nour vd. 2013, Mraz ve Weir 2018).

Su sistemlerinde biyofilm oluşumunda suyun durgunluğu ve akış hızı da önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle durgun sular *L. pneumophila* kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Suyun akış hızının artması, *L. pneumophila*'nın yüzeye bağlanmasını önleyerek bakteriyi azaltmasına rağmen, yine de türbülanslı sularda biyofilmler, *L. pneumophila* popülasyonunu korumaya yardımcı olmaktadır. Biyofilm oluşumunda önemli diğer etken *Legionella* kollajen benzeri (Lcl-*Legionella* collagen like) proteindir. Lcl, abiyotik substratlara bağlanmayı sağlayarak biyofilm üretimini kolaylaştırmaktadır. Biyofilm oluşumunda etkili diğer faktör Tat salgılama sistemidir (Abdel-Nour vd. 2013, Talapko vd. 2022). Biyofilm oluşumunda ayrıca *Legionella* mip protein ekspresyonunun da etkili olduğu bilinmektedir (Talapko vd. 2022).

1.8 Virülans Etkenler ve Patojenez

L. pneumophila'nın virülans etkenlerinin, genomunda bulunan birçok faktör tarafından kodlandığı belirlenmiştir. *L. pneumophila*'nın en önemli virülans mekanizması, 300'den fazla efektör proteinin, Dot/Icm Tip IV salgı sistemi tarafından konak hücreye gönderilmesine dayanmaktadır (Zayed vd. 2021).

Yapılan birçok çalışma *L. pneumophila*'nın enfeksiyon döngüsünü etkileyen çeşitli virülans faktörlere sahip olduğunu göstermektedir. *Legionella* enfeksiyonu ve patojenezinde etkili olan konak hücrelere tutunma, hücre içinde yaşama, replikasyon ve hücreden hücreye yayılma gibi birçok sürecin virülans faktörlerle bağlantılı olduğu

bilinmektedir. Bu faktörler patojen bakterinin genomunda DNA' nın PAIs (Pathogenicity Island Locus) olarak bilinen ayrı bir bölgesinde kodlanırken, aynı veya benzer bir türün patojen olmayan suşunda bulunmamaktadır. PAIs' ler ve virülans genlerle kodlanan virülans faktörlerin, *Legionella* patojenezi ile bağlantılı oldukları belirtilmektedir (Zhan vd. 2015).

Legionella enfeksiyonunun patojenezi oldukça komplekstir. *Legionella* solunumla vücuda girdikten sonra ya fagositik özelliğe sahip makrofajlar tarafından fagositoza uğramakta ya da fagositik olmayan alveoler epitel hücrelere saldırarak hücrelere tutunmaktadır. Hücre içine giren bakterilerin çoğalması ve bakteri tarafından salgılanan zinc metalloproteaz, fosfolipaz C, legiolizin, sitolitik toksin gibi faktörlerin etkisiyle, hücresel cevabın sonucu olarak akciğer fonksiyonunda yapısal değişimler gözlenmekte ve hastalık ortaya çıkmaktadır. Epitel hücre yüzeyinin bileşimi, enfeksiyonun gerçekleşmesinde ilk adımdır. Konak-patojen etkileşimleri genellikle mikrobiyal yüzeyde bulunan lektinlerin, ökaryot hücre yüzeyinde glikolipid ve glikoproteinlerde yer alan oligosakkarit zincirlerine bağlanması ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle bakterinin hücreye tutunması enfeksiyon oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Thomas ve Brooks 2004).

1.9 Flagella ve Pili

Birçok virülans etkili bakteri konağını enfekte ederken, flagella yapısını kullanmaktadır. Flagella, bakterinin uygun ortamlara doğru hareketini sağlamakla birlikte adezyon, invazyon ve toksin dağılımı, lizozomdan kaçma, pigment üretimi, yüzey modifikasyonları ve sitotoksiste olaylarını düzenleyerek çeşitli virülans etkilerinin oluşmasına katkıda bulunmakta böylece bakteriyel enfeksiyonun artmasında ve bakteri patojenitesinde anahtar element olarak görev almaktadır (Molofsky vd. 2005).

Hücre yüzeyi reseptörlerine yapışma, bakterinin flagella, pili, lipopolisakkaritler ve dış membran proteinleri ile sağlanmaktadır. *L. pneumophila*, bazal membran tarafından, dış ve iç zarın (OM, IM), ayrıca peptidoglikan tabakanın içine sabitlenmiş flagellum yapısına sahiptir. Flagella, virulans özelliğin bir göstergesi olup, *Legionella*' nın konak hücrelerle

temasını sağlamaktadır (Talapko vd. 2022). Flagella intrasellüler çoğalma için gerekli olmamasına rağmen, bakterinin konak hücreye adezyon ve invazyonunu sağlamaktadır. Böylece bakterinin enfeksiyon etkisini arttırmakta, ayrıca biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Shevchuk vd. 2011, Talapko vd. 2022).

Su ortamlarında yaşayan *L. pneumophila* flagella yapısına sahip iken, özellikle toprakta bulunan *L. longbeachae* de ise flagella bulunmamaktadır (Appelt ve Heune 2017). Amipler için, transmisiv fazda ve hareketli olan *Legionella*, replikatif fazda ve hareketli olmayan *Legionella* dan daha bulaşıcı özelliktedir. FliA, *L. pneumophila* nın koşullar uygun olmadığında biyofilm oluşturma yeteneğini sağlamaktadır (Appelt ve Heune 2017).

Bakterilerin replikatif fazdan transmisiv faza geçişi flagella ile düzenlenmektedir. Flagella düzenleyicileri ayrıca konak hücrede bakterinin lizozomdan kaçmasını ve sitotoksisite gibi önemli virülans özelliklerini kontrol etmektedirler (Shevchuk vd. 2011, Talapko vd. 2022).

L. pneumophila yüzeyindeki pililer uzun (0.8–1.5 µm) ve kısa (0.1–0.6 µm) olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Pili proteinleri *L. pneumophila* biyofilmlerinin oluşumunu kolaylaştırmaktadırlar. Pile proteini, Tip IV pili nin uzun formunun bileşenidir. *L. pneumophila* nın konak hücrelere tutunma ve bağlanmasında rol oynamaktadır. Prepilin peptidaz (PilD) proteini, hücre içi proliferasyondan ve Tip II salgı sisteminin aktivitesinden sorumludur. (Shevchuk vd. 2011, Talapko vd. 2022). Protozoa ve memeli hücrelerine bağlanmada ise Tip IV pili rol oynamaktadır (Mraz ve Weir 2018).

Flagella, LPS, pile, adezinler, rtxA, MOMP gibi yapılar ile bakterinin konak hücre yüzeyine bağlanması gerçekleşmektedir. Bakterinin Pil yapısındaki mutasyon, alveoler epitel hücrelere tutunmasını %50 azaltmaktadır. Hücrelere *L. pneumophila* bağlanması muhtemelen birçok faktör tarafından sağlanmakta ve konak hücre yüzeyi ile çoklu adezinlerin etkileşimini gerektirmektedir (Thomas ve Brooks 2004).

1.10 Hücre Zarı

Bakteri hücre zarları, bakteriyi çevresel tehlikelerden koruma, besinlerin hücre içine seçici şekilde geçmesi, atık ürünlerin ve salgı sistemi substratlarının hücre dışına salgılanması gibi temel işlevleri yerine getirmektedir. *Legionella pneumophila*'nın hastalığa neden olma yeteneği hücre zarının bileşenlerine ve özelliklerine bağlıdır. *Legionella pneumophila*'nın dahil olduğu gram negatif bakterilerin sitoplazması, 3 katmanlı zar yapısı ile çevrelenmiştir (Shevchuk vd. 2011). *Legionella pneumophila*'nın hücre zarında; fosfolipidler (PL), lipopolisakkaritler (LPS) ve lipoproteinler olmak üzere lipid içeren 3 çeşit molekül bulunmaktadır (Kowalczyk vd. 2021).

1.10.1 İç zar

Periferik proteinler ve lipoproteinler içeren iki fosfolipid tabakasından meydana gelmektedir. İçteki katman, plazma zarı olarak adlandırılan iç zardır. Demir alımı, *L. pneumophila* büyümesinde çok önemli bir süreçtir. Fe (II) alımı, demir taşıyıcı FeoB tarafından gerçekleştirilmektedir. Çift lipid tabakası demir alımının düzenlenmesini sağlar ve salgı sistemlerinin başlangıç noktasıdır. Solunum zinciri, detoksifikasyon, protein sekresyonu gibi hücresel süreçlere aracılık ederek virülans fonksiyonlarını etkilemektedir (Shevchuk vd. 2011).

1.10.2 Periplazma

Dış ve iç membran arasında bulunan periplazmik boşluk, güçlü ve çapraz bağlanmış peptidoglikan yapısından oluşan jel benzeri ince bir tabakadır. Çözünür proteinleri ve çevredeki zararlı maddeleri parçalayan detoksifiye enzimleri içermektedir. İç zarı geçen proteaz, nükleaz ve salgı maddeleri periplazmik boşluktan geçmektedirler (Shevchuk vd. 2011). Periplazmada metalloproteaz, fosfataz, izomeraz gibi enzimler, Dot/Icm bileşenleri, konak hücrelere girişi sağlayan ve virülansı etkileyen proteinler bulunmaktadır. Peptidoglikan yapısında muramik asit, glukozamin, glutamik asit, alanin ve mezodiaminopimelik asit bulunmaktadır. Peptidoglikan, lizozime dirençlidir, zor

şartlarda bakterinin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Periplazma, bakteriye giren zararlı maddeleri parçalayan bakır-çinko-süperoksit dismutaz (Cu-Zn-SOD) gibi birçok enzimi içermektedir. Cu-Zn-SOD, *Legionella*'nın konak hücre dışında olduğu zamanlarda, oksidatif strese karşı uzun süre hayatta kalmasına yardımcı olabilir. Periplazmada bulunan ve Dot/Icm bileşeni olan IcmX, makrofaj zarında *Legionella* içeren vakuol (LCV) ve gözenek oluşmasında rol oynamaktadır (Shevchuk vd. 2011).

1.10.3 Dış zar (Outer Membran-OM)

Dış zar (OM), fosfolipidler, lipoproteinler, lipopolisakkaritler (LPS) ve proteinlerden oluşan lipid tabakası olup, gram negatif bakterilerin ayırt edici yapılarıdır. Fosfolipidler ve lipoproteinler, dış zarı peptidoglikana bağlayan dış zarın iç kısmında bulunmaktadır (Kowalczyk vd. 2021). Dış zar, olgun LPS moleküllerinin ve dışarı atılan OMV (Outer Membran Vesiculates)'lerin olduğu yerde bulunmaktadır (Zhan vd. 2015). Bu veziküller bakterinin ökaryotik hücrelerle temasına aracılık etmekte, ayrıca toksinler ve virülans faktörlerin hücre yüzeylerine yapışmasını sağlamaktadırlar. OMV'ler lipolitik ve proteolitik aktivitelere sahip çok sayıda virülans protein içermekte, virülans faktörlerin uzakta bulunan konak hücre ve dokulara taşınmasına aracılık etmektedirler (Shevchuk vd. 2011, Jung vd. 2016).

OMV'ler ayrıca biyofilm oluşumu ve çekirdek algılama fonksiyonlarının modülasyonlarında etkilidirler. Hücrelerin bağışıklık tepkisi, sitokin profilleri, iltihaplanma, bakteriyel OMV'lerle temas sonucu değişikliğe uğramaktadır. Birçok protein, Tip II, III veya IV salgılama sistemlerinden başka, OMV'ler ile taşınmaktadır. OMV'lerin insan alveolar epitel hücrelerinin sitoplazmik membranı ile ilişkisi bulunmaktadır. OM'lerden dış zar veziküllerinin atılması sonucu, alveolar epitel hücrelerinden interlökin-6, -7, -8, -13 ile α G-CSF, IFN- γ ve MCP-1 gibi spesifik sitokinlerin salınmasıyla, konak organizmada hücrel tepki ortaya çıkabilmektedir. Özellikle IL-7 ve IL-8, sadece OMV'lerle uyarılma sonucu salgılanmaktadır. OMV'leri kaplayan lateks boncuklar, *Legionella* içeren vakuollerin (LCV), lizozomlarla füzyonunu inhibe etmekte böylece bakterilerin ölümüne engel olmaktadır. Bu özellik, *Legionella*

enfeksiyonlarına OMV' lerin aracılık ettiğini göstermektedir (Shevchuk vd. 2011, Jung vd. 2016).

Temel dış membran proteini olan MOMP (Major Outer Membrane Protein) ise, *L. pneumophila*'nın konak hücrelere tutunmasını, ısı şoku proteini (Heat shock protein) olan Hsp60 ise, HeLa hücrelerine tutunmasını ve hücreye girmesini sağlamaktadır (Zhan vd. 2015).

1.11 Lipopolisakkaritler (LPS)

Dış membranın dış kısmında bulunan lipopolisakkaritler, *Legionella*'nın temel antijenleridirler (Zhan vd. 2015). *L. pneumophila* LPS' leri benzersiz ve özgün yapılardır. LPS, konak hücrenin immün sistemi ile etkileşim sağlamada önemli rol oynamaktadırlar. LPS molekülü, az toksik potansiyele sahip endotoksin ile birleştirilmiş O-spesifik zincir, çekirdek ve lipid A olmak üzere 3 bileşenden oluşmaktadır. LPS birçok genişletilmiş, dallanmış yağ asidi ve O- ve N-asetil grubu içermektedir (Kowalczyk vd. 2021).

Oldukça hidrofobik yapıdadırlar. O zincir ve kor (core), polisakkarit bölgesini oluştururken, lipid A dış membrandaki LPS' lerin kökeni olan molekül olup, membrandaki LPS' lerin sabitlenmesini sağlamaktadır. O-antigen sistemine göre, *L. pneumophila*, 15 serogruba ayrılmaktadır. Her bir serogrup, monoklonal subgrup olarak adlandırılmaktadır. Örneğin, serogroup 1' in, 10 subgrubu bulunmaktadır (Talapko vd. 2022, Shevchuk vd. 2011). Konak hücrenin enfeksiyonunda etkili olan proteinlere ek olarak, lipidler de konak hücrelerle etkileşim sağlamada önemli rol oynamaktadırlar (Kowalczyk vd. 2021).

L. pneumophila SG-1 LPS' leri, Legionaminic asit bağlantılı olan O-sakkarit zincir içermektedir. Bu asitin yapısında, bakteri yüzeyinin hidrofobik olmasını sağlayan serbest hidroksil grupları eksiktir. Böylece Legionaminic asit, *Legionella*'nın hidrofobik yüzey kazanmasını sağlayarak hedef hücrenin membranına tutunmasına yardım etmektedir (Thomas ve Brooks 2004).

1.12 Mip Proteini

Mip (Macrophage infectivity potentiator) proteini, membran bağımlı homodimerik protein olup, bakteri yüzeyinde bulunmaktadır. Ayrıca intrasellüler enfeksiyonun erken evrelerinde makrofajlar, alveoler epitel hücreler ve protozoa gibi konak hücrelerde replikasyon yapması ve yaşaması için rol oynamaktadır (Talapko vd. 2022, Shevchuk vd. 2011).

L. pneumophila'nın hem memeli hem de protozoa hücrelerini etkili şekilde enfekte etmesi, Mip proteini ile olmaktadır. Bu protein mip geni tarafından kodlanmış olup, 35 *Legionella* türünde Mip sekansı %82 ile %99 amino asit seviyesinde korunmuştur. Mip, FK506 bağlayıcı enzim ailesine aittir ve C-terminal domaini, peptidyl-prolyl cis/trans izomeraz (PPIase) aktivitesi sağlamaktadır (Fields vd. 2002).

L. pneumophila'nın yüzeyinde bulunan mip proteini bakterinin enfekte etkisini sağlamaktadır. *L. pneumophila*'nın yüksek organizmalarda tam virülansa sahip olması için hem Mip proteini hem de PPIase aktivitesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Mip proteini, insan makrofajları ve protozoayı istila etme ve konak hücrelere yerleşme için önemlidir, ancak hücre içi replikasyon için gerekli değildir. Mip proteini, insan monositik hücresinin istilasından hemen sonra baskılanır, 24 saat hücre içi replikasyonun ardından aktivitesini yeniden kazanmaktadır. Mip aktivitesinin yeniden kazanılması, bakterilerin replikasyondan sonra tekrar enfekte olmasına izin vermektedir. Bu nedenle mip geni önemli bir virülans göstergesidir (Mraz ve Weir 2018).

1.13 Sekresyon Sistemleri

L. pneumophila enfeksiyonunda proteinlerin temel rol oynaması nedeniyle, salgı sistemleri özellikle incelenmiştir. *L. pneumophila*'da iç zar boyunca taşıma için, Sec ve Tat salgılama sistemlerinin her ikisi bulunmaktadır. Dış zar boyunca taşıma için, Tip II PilD'ye bağımlı Lsp, Tip IVB Dot/Icm salgı yolu ve Tip IVA Lvh sistemi ile *L. pneumophila* Paris suşunda tanımlanan Tip I ve Tip V salgılama sistemleri oldukça önemlidir (De Buck vd. 2007). *Legionella* türleri çeşitli pigmentler, toksinler ve proteaz,

lipaz, fosfataz, fosfolipaz, süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimleri salgılamaktadırlar. Ayrıca, ökaryot benzeri alanlar içeren efektör protein salgılar. Birçok efektör protein konak hücreye salgılanarak *Legionella*'nın hücre içi replikasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bu salgı sistemleri *L. pneumophila*'da temel virülans faktörleridir (Talapko vd. 2022).

L. pneumophila'nın hücre içi yaşam döngüsünün en önemli özelliklerinden biri, ER (Endoplazmik Retikulum) ile Golgi kompleksi arasında vezikül taşıma yeteneğine sahip olmasıdır. ER'den veziküllerin ayrılması, LCV plazma zarının ER özelliklerine sahip membranlara dönüştürülmesini kolaylaştırmaktadır. Bu veziküller ayrıca bakteri replikasyonu sırasında LCV'nin genişlemesini desteklemek için membran malzemeleri sağlamaktadırlar (Xu ve Lou 2013). Patojen-konak etkileşimi oluşturmak için, virülans proteinlerinin bakteri yüzeyine, hücre dışı ortama veya doğrudan konak hücreye taşınması gerekmektedir. Bu durum, gram negatif bakterilerde zor olmaktadır, çünkü salgılanan proteinler iç ve dış zarı geçmelidir (De Buck vd. 2007, Talapko vd. 2022).

Tip I salgı sistemi Lss, proteinleri her iki zar boyunca taşıyabilen, membran füzyon proteini ve dış zar proteinlerini içeren ABC (ATP bağlayan yapı) taşıyıcı proteinden oluşmaktadır. ABC transporter ve membran füzyon proteini içeren Lss gen kümesi (LssXYZABD), bütün *L. pneumophila* suşlarında bulunmaktadır (De Buck vd. 2007, Talapko vd. 2022).

Tip II salgı sistemi (T2SS), Lsp olarak adlandırılmaktadır. *L. pneumophila*'nın düşük sıcaklıklarda yaşaması ve virülans etki göstermesi için gerekmektedir. Tip II salgı sistemi 12 komponent (C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M ve O) içeren (Talapko vd. 2022) 4 alt kompleksten meydana gelmektedir. 1. subkompleks Secretin olup, T2S D oligomerlerinden oluşur ve dış membran boyunca substrat translokasyonunu sağlamaktadır. T2S D oligomerleri ikinci subkompleksin iç membrandaki heterooligomer ile ilişkilidir, ayrıca periplasmik kanal oluştururlar. 3. subkompleks, periplasmik pseudopilus olup T2S G, H, I, J ve K komponentlerinden oluşurlar, dış membran boyunca substratların ileri taşınması için piston görevi yaparlar. 4. subkompleks, T2S E proteinin heksameri olan bir ATPaz'dır (Chauhan ve Shames 2021).

Legionella, Dot/Icm' ye ek olarak, efektör proteinlerini hücre dışına yüzeye göndermek için Tip II salgı sistemini kullanmaktadır. Bu sistem tarafından salgılanan yaklaşık 27 proteinin varlığı tanımlanmıştır (Isaac ve Isberg 2014). Tip II salgı sistemi, iç zar boyunca taşınmanın iki aşamalı gerçekleştiği bir süreçtir. İlk önce Sec ve Tat sistemleri, daha sonra sinyal peptidinin türüne göre protein substratları, Tip II salgı sistemine girmektedir (De Buck vd. 2007).

T2SS, çeşitli virülans faktörler, toksinler, lipazlar, proteazlar, chitinazlar ve yeni oluşan proteinleri bakteri hücrelerinden dışarıya taşıyarak, patojenik etkisini sağlamakta ayrıca *L. pneumophila*'nın hem hücre içi hem de hücre dışı yaşamında önemli rol oynamaktadır (Chauhan ve Shames 2021). Bu nedenle T2S salgılama sistemi ve substratlarının, enfeksiyonda önemli rolü bulunmaktadır. T2S, enfeksiyon sırasında, memelilerde doğuştan bağışıklık tepkisini zayıflatmakta, böylece hem makrofajlar hem de akciğer dokusunun tahrip olmasını sağlayarak enfeksiyonda etkili olmaktadır. T2SS, konak hücrede sinyal iletimini, sitokin gen transkripsiyonunu ve sitokin yanıtını azaltarak, makrofaj ve epitel hücrelerde *L. pneumophila* büyümesini desteklemektedir (Chauhan ve Shames 2021, Mallama vd. 2017).

Tip III salgı sistemi, sitoplazmik substratların doğrudan konak hücre sitoplazmasına translokasyonunu sağlayan protein taşıma mekanizmasıdır. Tip IVB salgı sistemindeki DotD proteini ile homolog yapıda olup, Tip II salgı sisteminin bir parçası olarak, flagellum kodlayan genleri ve sekretinleri içermektedir (Talapko vd. 2022).

Tip IV salgı sistemi ilk olarak, *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transfer system (Vir system or type IVA system) ve I-tipi konjugasyon sistemiyle ilişkili olan sistemlerde tanımlanmıştır (Tra system or type IVB system). Transport proteinleri hedef hücrelere taşıyan Tip IV salgı sistemi, kanal ve pilus yapılarından oluşmaktadır (De Buck vd. 2007).

T4SS, genellikle ökaryotik konak hücrelerle etkileşime giren bakterilerde bulunurlar ve makromoleküler taşıma sistemleri olarak tanımlanırlar. Virülans proteinler olan efektörlerin, bakteri hücresinin dış zarı boyunca ve doğrudan ökaryotik konak hücrelere taşınmasını sağladıkları için, *L. pneumophila*'nın en iyi karakterize edilen virülans

faktörleridirler (Hubber ve Roy 2010). Tip IV salgı sistemi, Tip IVA (Lv_h) ve Tip IVB (Dot/Icm) olarak 2 alt gruptan oluşmaktadır (Talapko vd. 2022).

Tip IVA salgı sistemi, Lv_h (*Legionella* vir homologues) olarak bilinmekte ve *L. pneumophila*' da bulunmaktadır. 30 °C' de yaşayan *L. pneumophila*' nın konak hücreyi enfekte etmesi için önemlidir. Lv_h, çevresel ve klinik izolatlarda tespit edilen *L. pneumophila*' da bulunmuştur. Bu genlerin bakteri virülansında önemli olduğu düşünülmektedir (De Buck vd. 2007).

Lv_h salgı sistemi, hareket faktörlerini ve enzimleri kodlayan genleri içermektedir. *L. pneumophila*' nın hücre içi replikasyonunda önemli rolü bulunmaktadır. Lv_h, Dot/Icm salgı sisteminin fonksiyonuna yardımcı olabilmekte, böylece Dot/Icm yönünden mutant *L. pneumophila*' da Dot/Icm salgı sistemi yerine görev yapabilmektedir. Tip II ve IVB salgı sistemleri tüm *Legionella* suşlarında bulunurken, Tip I salgı sistemi *L. pneumophila*' ya özeldir. Bazı *Legionella* suşlarında Tip II ve IV salgı sistemleri bulunmaktadır. Bununla birlikte, Tip II, III ve IV salgı sistemlerinin bazı efektör proteinleri, Tip IVB salgı sisteminin bileşenleri ile homolog yapıda olup tüm *Legionella* suşlarında bulunmamaktadır (Talapko vd. 2022).

1.14 Dot/Icm

Tip IVB salgı sistemi, Dot (Defective in organelle trafficking) ve Icm (Intracellular multiplication) olmak üzere iki lokustan oluşan, 27 gen ürünlerini bir arada bulunduran makromoleküler bir taşıma kompleksidir (Speir vd. 2014).

1998 yılında Ralph Isberg ve Howard Shuman, *L. pneumophila*' da replikatif ortam oluşturma, hücre içinde replikasyon ve makrofajların öldürülmesini sağlayan, dot ve icm olarak adlandırılan 20' den fazla gen keşfetmişlerdir. 2002 yılında *L. pneumophila*' nın Dot/Icm sistemi ile RalF protein substratını konak hücre sitozolüne gönderdiği ve 100' den fazla *L. pneumophila* Dot/Icm proteininin translokasyona uğradığı deneysel olarak gösterilmiştir. Dot/Icm, Tip IVB sekresyon sistemini (T4BSS) ifade etmek için kullanılmaktadır (Nagai ve Kubori 2011).

Dot/Icm Tip IV salgı sistemi, *L. pneumophila*'nın endositik füzyondan kaçması ve LCV'nin pürüzlü endoplazmik retikulumdan (RER)'den oluşan bir yapı kazanması için gerekmektedir (Santic vd. 2007). Dot/Icm, *L. pneumophila*'nın virülansı için vazgeçilmez bir salgı sistemidir. Çeşitli konak hücrelerle doğrudan etkileşime giren substratlar sağlamakta ve bakteri replikasyonu için gereken vakuol (LCV) oluşmasında rol oynamaktadır (Xu ve Lou 2013). Dot/Icm sistemi, bakteri için besinden zengin LCV oluşmasında ve bakterinin lizozomal füzyondan kaçmasında kritik rol oynamakta ve fagozomun bütünlüğünü korumaktadır. Böylece apoptozun başlamasını ve konak hücrenin parçalanmasını sağlamaktadır (De Buck vd. 2007). Bakteri enzimleri, hücrelerin parçalanmasını ve konağın ölümünü sağlayarak akciğer dokusuna zarar verirler. Dot/Icm proteinleri, *Legionella* içeren vaküolün membran boyunca taşınması için gerekmektedir (Talapko vd. 2022).

Patojenin, kolesterol açısından zengin geniş vakuollere girmesi Dot/Icm sistemi ile sağlanmaktadır. Ayrıca bu vakuollerin endoplazmik retikulumun endozomal yolağa verilmesini önlemektedir (Molofsky ve Swanson 2004). *L. pneumophila*'nın alveoler makrofajları enfekte etmesi sonucunda Dot/Icm salgı sistemi, vezikül taşınması, doğal bağışıklık ve protein sentezi gibi konağın hücresel süreçlerini düzenlemek ve bakteri replikasyonunu sağlamak için genomunun ~%10'unu oluşturan yaklaşık 300 efektör proteini konak hücreye göndermektedir (Chauhan ve Shames 2021, Zhu vd. 2013, Swart ve Hilbi 2020). Bu nedenle Dot/Icm salgı sisteminde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu, *Legionella* türleri hücre içinde çoğalamazlar, ayrıca lizozomlarla füzyondan kaçamadıkları için enfeksiyonda etkili olamazlar (Hubber ve Roy 2010).

Tip IVA (Lvh) ve tip IVB (Icm/Dot) sistemi dışında, farklı *L. pneumophila* suşlarında yeni Tip IVA ve çeşitli Tra-like (Tip IVB) sistemleri tanımlanmıştır. Yeni Tip IVA salgı sistemi, Trb-1 olarak adlandırılan genomik bölgede kodlanmakta ve *L. pneumophila*'nın Corby serogrubunda bulunmaktadır. Yeni Tip IVB salgı sistemi ise, *L. pneumophila* AA100 suşunda olmasına rağmen Philadelphia serogrubunda bulunmamaktadır (De Buck vd. 2007).

1.15 Efektörler

L. pneumophila, enfeksiyonun farklı evrelerinde regülasyon, transkripsiyon, translokasyon, protein stabilitesi gibi konak hücre fonksiyonlarını değiştirebilme özelliğindedir. Bu aktiviteleri sağlayan protein substratlarına, efektörler adı verilmektedir. (Xu ve Lou 2013, Speir vd. 2014).

L. pneumophila'nın en önemli patojenik belirleyicisi olan efektör proteinler, Dot/Icm sisteminden salgılanmaktadır (Steinert vd. 2007). Biyokimyasal aktivite sağlayan bu proteinler, oldukça çeşitli yapıdadırlar, birçoğu *Legionella*'ya özgü olup diğer proteinlerle homoloji göstermezler. Ayrıca bu protein genlerinden birinin yok olması standart deney koşullarında *Legionella*'nın hücre içi büyümesinde kusurlara yol açmaktadır. Efektör proteinler, konak hücrelerde özel replikatif organel oluşumunda, ayrıca konak hücre bağışıklığını tetikleyen haberciler olarak rol oynamaktadırlar (Luo 2012, Simon ve Hilbi 2015).

Legionella en önemli virülans faktörü olan efektör proteinlerinin translokasyonu için salgı sistemlerini kullanarak konak hücrede etkili virülans stratejisi sağlamaktadır. Bakteri efektörlerinin temel özelliği, konak hücre proteinlerini ve protein yollarını hedef almalarıdır. *L. pneumophila* ayrıca diğer efektörlerin fonksiyon ve işlevlerini düzenleyerek virülansa katkıda bulunan meta-effektörleri de kodlamaktadır. Meta-effektörler, *L. pneumophila*'nın virülans stratejisinde hem efektörlerin etkileşimini hem de fonksiyonel düzenlemenin önemini göstermektedir (Joseph ve Shames 2021).

Translokasyona uğramış efektörler çeşitli fonksiyonlara ve aktivitelere sahip olup, türler arasında büyük farklar göstermektedirler. *Legionella* türleri, bugüne kadar tanımlanan bütün hücre içi patojen efektörlerinin en büyük miktarını ve fazla çeşidini kodlamaktadır (Chauhan ve Shames 2021).

58 farklı *Legionella* türünden 80 suşun incelenmesi sonucu, T4BSS efektörlerinin havuzunda 18.000'den fazla protein olabileceği ve efektör proteinlerin son derece yüksek çeşitliliğe sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca efektör genlerin çok sayıda ve çeşitli

ökaryot benzeri proteinleri kodladıkları bulunmuştur. *Legionella*'nın konak hücrede replikasyon ve enfeksiyon yapabilmesinde rol oynayan bu proteinleri, protozodan yatay gen transferi yoluyla sağladığı düşünülmektedir (Chambers vd. 2021). Bu nedenle *L. pneumophila*'nın birçok efektör proteini, ökaryotik protein bölgelerine sahiplerdir. Makrofaj içinde büyümenin üssel fazında işlevleri henüz bilinmeyen çok sayıda efektörün ekspresyonu yapılmaktadır. Bu efektör proteinler, ökaryot hücrelerde sinyal iletimi, hücre iskeleti dinamiği ve membran taşınması gibi temel süreçleri bozmaktadırlar (Swart ve Hilbi 2020).

Endositik taşıma, motor proteinler dahil olmak üzere vezikül olgunlaşması için gerekli olan çok sayıda konak proteininin taşıma olaylarını yönlendirmektedir. Fagozom olgunlaşması, endositik yolu oluşturan organellerle etkileşimleri gerektirir. Dot/Icm sistemi oldukça erken bir aşamada *L. pneumophila* içeren vakuolleri endositik yoldan uzaklaştırır ve lizozomlara taşınmayı önler. *L. pneumophila* yüzeyindeki lipopolisakkarit (LPS) molekülleri de endozomal vakuollerin lizozomlarla füzyonunu geciktirmekte ve *L. pneumophila*'nın lizozomlarla füzyonu önleme kapasitesini arttırmaktadır. T4SS bileşenlerinin konak hücre sitozolüne ulaşırlar ve LCV'nin taşınmasını düzenlemede rol oynarlar (Hubber ve Roy 2010).

Endositik yoldan kaçma *L. pneumophila*'nın konak hücrede yaşamına devam etmesini sağlayan için önemli bir olaydır (Hubber ve Roy 2010). Bakterinin endozomal-lizozomal yoldan kaçması ve LCV biyogenezi, Dot/Icm sistemi ile konak hücreye gönderilen ve *L. pneumophila*'nın intrasellüler replikasyonunda rol oynayan RalF, LidA, SidC, LepA efektör proteinleri tarafından sağlanmaktadır (Abu-Zant vd. 2005). Ankx (LegA8 ve AnkN) protein, ökaryotik konak hücrelerde sentezlenmekte hem endositik veziküllerin hem de salgı veziküllerinin taşınmasını düzenlemede rol oynamaktadır. SNAREs (çözünür NSF bağlanma proteini reseptörleri) olarak bilinen konak hücre proteinleri membran füzyon olaylarına aracılık etmektedir (Hubber ve Roy 2010).

1.16 LCV (*Legionella* Containing Vacuol)

Legionella içeren vakuol olarak bilinen LCV (*Legionella* containing vacuol), mitokondri, ribozom ve küçük veziküller gibi konak hücre organellerinin yüzeyinden oluşan yapılardır (Manske ve Hilbi 2014). Bu yapı, bakterinin hücreye girmesi sırasında oluşmaya başlar ve birkaç dakika içinde tamamlanmaktadır. Poliübikuitinli proteinlerle hızla donatılmasından sonra, fagozomda *L. pneumophila* replikasyonu başlamaktadır. Endoplazmik retikulumdan Golgi kesesine vezikül taşınması, LCV tarafından engellenmektedir (Richards vd. 2013, Oliva vd. 2018). LCV oluşumu ve bakteri replikasyonu sağlayan uygun bir organelle dönüştürüldüğü süreç karmaşık ve bifaziktir, tamamlanması saatler almakta ve Dot/Icm salgı sistemi tarafından yönetilmektedir (Hubber ve Roy 2010, Bärlocher vd. 2017). LCV, *L. pneumophila*'nın konak hücrenin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasına engel olmakta ve bakteri replikasyonu için besin sağlamaktadır (Xu ve Lou 2013).

L. pneumophila'nın konak hücreler tarafından fagositozla alınmasından sonra, kaba endoplazmik retikulumdan (RER) üretilen veziküller, LCV yakınında toplanırlar, bu sırada mitokondri azalmakta ve vakuol çevresinde ribozomlar gözlenmektedir. Pürüzsüz veziküller, kaba endoplazmik retikulum (RER) ve mitokondri, enfeksiyonun başlamasından 2 saat sonra LCV içine alınırlar. Bakteriler vakuol içinde çoğalarak sayılarını 50 kat arttırarak 100 katına çıkarırlar. 24 saat sonra makrofaj parçalanması gerçekleşmekte, *Legionella* sitozole çıkarak ve yeni hücreleri enfekte etmeye başlamaktadır. Dot/Icm tip IV salgılama sistemi, bakteri hücre duvarı ve LCV zarı boyunca uzanan düzenek aracılığıyla, 320 efektörü bakteri sitozolünden konak hücre sitozolüne iletmektedir. Konak GTPazı olan Rab1, pürüzsüz veziküllerin alımı sırasında, LCV' nin sitoplazmik yüzeyinin oluşmasından sorumludur (Swanson ve Isberg 1996, Truchan vd. 2017).

Konak hücrede bakteri replikasyonunu sağlayan LCV, asitlenmeyen yapıda olduğu için bakterinin konak hücrede endozomlar ve lizozomlarla etkileşime girerek bozulmasını önlemektedir. Sitoplazmik yüzeyinde lipidler ve proteinlerden zengin veziküllerin

toplanmasıyla oluşan tek zara sahip olduğu için, patojen olmayan bakterileri içeren vakuolden farklılık göstermektedirler (Oliva vd. 2018, Hubber ve Roy 2010).

Patojen *Legionella* replikasyonunun gerçekleştiği vakuol, asitlenmediği ve lizozomlarla kaynaşmadığı için bozunmaya karşı direnç göstermektedir. Olgunlaşan LCV, endoplazmik retikulum (ER) ile sürekli olarak etkileşim halindedir. *L. pneumophila*, LCV oluşumu ve hücre içi replikasyonu sağlamak amacıyla konak hücrenin PI (Phosphoinositol) lipidlerini kullanmaktadır (Swart ve Hilbi 2020). Hücre içi proliferasyonun ileri evrelerinde konak hücrede besin tükenmesi sonucu *L. pneumophila* LCV' den sitozole çıkmakta, böylece proliferasyon tamamlanmaktadır (Richards vd. 2013, Oliva vd. 2018).

LCV oluşumu, enfeksiyonun erken evresinde ER' dan salgılanan veziküllerin ele geçirilmesini, ayrıca ER ve Golgi arasında vezikül taşınmasında rol oynayan GTP bağlı proteinler olan Rab1 ve SNARE Sec22B' nin görev almasını gerektirmektedir. IFN- γ ile aktive olan makrofajlar içinde bulunan LCV, intrasellüler replikasyonun ileri evrelerinde lizozomla füzyona girmesi sonucunda membranı tahrip olmaktadır. Bakteri bu sırada sitoplazmaya çıkarak burada replikasyon yapmaya başlaması sonucunda, konak hücrenin mitokondri ve vezikülleri dağılmaktadırlar. Sitoplazmada replikasyondan sonra, hücrenin plazma membranı da parçalanmakta, böylece bakterinin konak hücreden çıkışı gerçekleşmektedir (Abu-Zant vd. 2005).

L. pneumophila içeren aerosoller solunduğunda bakteriler makofajlara ya bilinen fagositoz ya da kıvrılma fagositoz (coiling) ile yani LCV içinde girmekte böylece asitleşmeye ve lizozomlarla füzyona uğramamaktadırlar. Buna rağmen, konak hücrede düz veziküller, mitokondri ve ribozomlarla etkileşime girmektedir. *L. pneumophila*' nın hücreye tutunma ve girmesi, bakterinin virölansı ile bağlantılıdır (Samrakandi vd. 2002).

1.17 Fagositoz

L. pneumophila, çeşitli reseptörler kullanarak, fagositoz, sarmal veya kıvrılma (coiling) fagositoz ve pinositoz olmak üzere çeşitli yollarla konak hücreleri istila etmektedir.

L. pneumophila farklı konak hücre türlerini enfekte etmek için farklı yöntemler kullanmakla birlikte, aynı konak hücre üzerinde birden fazla istila yöntemi de kullanabilmektedir (Mraz ve Weir 2018).

L. pneumophila, makrofajlar, fibroblastlar, epitel hücreler ve protozoaya girerek buralarda replikasyon yapmaktadır. Bu hücrelere girmesi kompleman reseptörleri ile veya yeni bulunan bir mekanizma olan kıvrılma (coiling) fagositoz ile olmaktadır. Bakteri özellikle epitel hücrelere girişte bu mekanizmayı kullanmaktadır (Cirillo vd. 1994). Ayrıca monositik hücrelere de coiling fagositoz ile girdiği gösterilmiştir (Cirillo vd. 1999). Asimetrik fagositoz şekli olan kıvrılma (coiling) fagositoz, plazma membranında kıvrımlar oluşması ile, bakterinin çevresinde asimetrik coil veya filopodia yapısı oluşarak bakterinin hücre içine alımı şeklinde gerçekleşmektedir (Cirillo vd. 1994, Cirillo vd. 1999). Bakterinin hücrelere kompleman reseptörleri ile girişi sırasında MOMP (major outer membrane protein), hücre membranına ya direkt olarak ya da kompleman reseptörleri olan C1 ve C3 reseptörleri ile bağlanmaktadır (Cirillo vd. 1999).

L. pneumophila konak hücreye fagositozla girmesinden sonra, bunu yutulma süreci izlemektedir. *L. pneumophila*'nın fagositozu fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) aracılı aktin polimerizasyonuna dayanan aktif bir süreçtir. Koroninler adı verilen aktin bağlayıcı proteinler fagositozda önemli rol oynamaktadır. *L. pneumophila*'nın fagositler tarafından alınmasında en az bir efektör protein gerekmektedir. *L. pneumophila* fagositozu çeşitli konak hücreler arasında moleküler düzeyde korunmaktadır (Chauhan ve Shames 2021). Fagositler, yutulan mikroorganizmaları lizozomal sisteme vererek yok etmektedirler. Hücre içi yaşam döngüsü olmayan bakteriler, çeşitli aktif hidrolitik enzimler içeren ve asidik bir ortama sahip olan fagolizozom içinde etkili bir şekilde sindirilmektedirler. Fagositozla alınan *L. pneumophila*, birkaç dakika sonra, LCV içinde replikasyona başlamaktadır (Hubber ve Roy 2010).

L. pneumophila'nın konak hücrelere bağlanması, çeşitli bakteri faktörleri tarafından sağlanmaktadır. *rtxA*, *pilE*, *ladC* ve *enhC* I salgı sistemi, Tip IV pili, iç zarla ilişkili protein ve periplazmik protein, *L. pneumophila*'nın konak hücre yüzeyine yapışmasını

sağlamakta, böylece hem amiplere hem de memeli hücrelerine girmesini kolaylaştırmaktadır (Zhan vd. 2015, Chauhan ve Shames 2021).

L. pneumophila solunum yolu ile insan vücuduna girerek akciğerlere ulaştıktan sonra, epitel hücre ve makrofajlara saldırmakta ve bu hücrelerde replikasyona uğramaktadır. Bakterinin replikasyon ortamı olan LCV' nin oluşumu Dot/Icm ile düzenlenerek kontrol edilmektedir. Bu benzersiz intrasellüler replikasyon yapısı içinde bakteri, genotipik modülasyona uğramaktadır. Bu olayların hem protozoa hem de insan makrofajlarında benzer özellikler göstermesi, *L. pneumophila*' nın farklı konak hücrelerde aynı mekanizmayı kullandığını ortaya çıkarmaktadır (Zink vd. 2002).

1.18 Konak Hücreler

L. pneumophila' nın farklı konak hücrelerde yaşaması konak hücrelerin fagositik ölüm yollarından başarılı bir şekilde kaçması ile sağlanmaktadır (Mou ve Leung 2018). *Legionella*' nın, farklı protozoonlarda replikasyon yapması, insan alveolar makrofajlarında çoğalma özelliğini arttırmaktadır (Abu Khweek ve Amer 2010). *L. pneumophila*' nın insan ve protozoadaki hücre içi yaşamı benzerdir, ancak fagozomun lizozomla füzyondan kaçma mekanizması farklılık gösterebilmektedir. *L. pneumophila*, insan fagositik hücreleri üzerinde bulunan kompleman reseptörü 1 (CR1)' e ve kompleman reseptörü 3 (CR3)' e bağlanarak, ayrıca plazma membranının psödopod yapısı oluşturması sonucunda bakteriyi sardığı kıvrımlı (coiling) fagositoz ile hücrelere girmektedir (Abu Khweek ve Amer 2010).

L. pneumophila' nın makrofajlara girişini sağlayan FlaA, Mip, DotO ve DotH proteinlerinin ekspresyonu, makrofajları istila etmesi ve hücreden çıkışı sırasında yapılmaktadır (Molofsky ve Swanson 2004). Fagositozla konak hücreye giren bakteri, hücre mitokondrisi ile etkileşime girmekte ve endoplazmik retikulum (ER)' dan çıkan vezikülleri tutarak pürüzlü ER zarı ile çevrili bir vakuol (LCV) oluşturmaktadır. Bu fagozom yapısı içinde bakteri, lizozomların etkisinden kurtulmaktadır. Bakterilerin çoğalarak vakuolü doldurması sonucu konak hücre parçalanmaktadır (Zink vd. 2002, Abu Khweek ve Amer 2010).

L. pneumophila, konak hücre ölümünü başlatmak için konak hücre tipine göre farklı mekanizmalar kullanmaktadır. *L. pneumophila*'nın memeli hücrelerini öldürmesi 2 mekanizma ile olmaktadır. Bunlardan biri, alveoler makrofajlar ve epitel hücrelerde (Tachibana vd. 2013), kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu başlatması, diğer mekanizma ise flagellinin etkisi ve por oluşum aktivitesini kullanarak konak hücrenin parçalanması (Alli vd. 2003, Tachibana vd. 2013) ve kaspaz-1 aktivasyonu ile piroptoz hücre ölümünü başlatmasıdır (Mou ve Leung 2018).

Legionella türleri, yaşamak için memelilerin alveoler makrofaj ve epitel hücrelerini tercih ederler (Zhan vd. 2015, Benitez ve Winchell 2013). Ayrıca insan monosit hücrelerinde doz ve virülans bağımlı olarak apoptozu neden oldukları gösterilmiştir. Apoptoz, bakterinin intrasellüler replikasyonundan çok, bakterinin hücreye adezyonu ile tetiklenmektedir (Neumeister vd. 2002). *L. pneumophila*'nın, makrofaj ve monositler dışında epitel hücrelerde de virülans etkileri olduğu gösterilmiştir (Yan ve Cirillo 2004).

A549 hücreleri Tip 2 alveoler epitel hücreleri özelliği gösteren ve surfaktant apoprotein salgılayan insan akciğer kanseri hücreleridir. *Legionella* türlerinin adezyon, invazyon ve hücre içi büyümesi ile ilgili yapılan çalışmalarda *L. dumoffii* Tex-KL serogrubunun A549 hücrelerine bağlanma ve saldırma özelliğinin oldukça fazla olduğu görülmüştür. Tip 1 ve Tip 2 alveoler epitel hücreler arasında morfolojik farklılıklar bulunmaktadır: Tip 1 hücreler ince ve düz, hücre sitoplazması az olup birkaç organel içermekte ve alveoler yüzeyin çoğunu kaplamaktadır. Tip 2 hücreler ise, alveoler duvar boyunca dizilmişlerdir, hücrelerin yüzeyinde çok sayıda mikrovillus, sitoplazmalarında ince tabakalı yapılar ve geniş veziküller bulunmaktadır. *L. dumoffii*'nin A549 hücrelere adezyon ve invazyon yaptığı, geniş veziküllerde proliferasyona uğradığı gösterilmiştir (Maruta vd. 1998). Sonraki yıllarda *L. dumoffii* ile yapılan çalışmalarda A549 hücrelerine saldırma ve bağlanma özellikleri moleküler düzeyde araştırılmıştır. *L. dumoffii*'de bulunana traC geninin A549 hücrelerinde adezyon, invazyon ve hücre içi büyümede önemli rol oynadığı bulunmuştur (Tian vd. 2016).

Alveoler epitel hücreler *Legionella*'ya karşı doğal immun cevabın oluşturulmasında önemli fonksiyonlara sahiptirler. Akciğerde doğal bağışıklığı düzenleyen ve buna aracılık

eden prostoglandinler, proinflamator maddeler, bakteri enfeksiyonu sonucunda pnömoni sürecini etkileyen sinyal yolları ve NF-KB yolağının aktivasyonu akciğer hücreleri tarafından düzenlenmektedir. Solunum yolu patojenlerine karşı konak hücrenin ilk mekanik ve immünolojik bariyerlerini oluşturmakta böylece patojen ve patojen tarafından salgılanan maddelere maruz kalmaktadırlar. TLR (Toll Like Receptor) reseptörleri ile patojenleri tanıma özelliğine sahip olmakla birlikte kemotaktik maddeler, kemokinler ve sitokinler gibi çeşitli antibakteriyal peptidleri salgılamaktadırlar. *Legionella* ile enfekte A549 hücrelerde IL-6 IL-8 ve TNF- α gibi çeşitli sitokinlerin ekspresyonu gösterilmiştir. Bu nedenle alveoler epitel hücreler Lejyoner hastalığında konak immün cevabın düzenlenmesine oldukça önemli ve potansiyel olarak katkıda bulunmaktadır (Schmeck vd. 2007, N'Guessan vd. 2007).

L. pneumophila protozoa, makrofajlar, fibroblastlar ve epitel hücrelere girerek replikasyon yaptıkları bilinmektedir. Epitel hücrelere girişi kompleman reseptörleri ile olmaktadır. Fagositik hücrelerde ise sarmal (coiling) fagositoz denen kıvrılma şeklinde farklı bir fagositoz gerçekleşmektedir. Epitel hücreler profesyonel olarak fagositik özellikte olmadıkları için bakterinin bu hücrelere alımı daha az olmaktadır. Bu nedenle in vitro çalışmalarda genellikle kullanılmazlar, fakat çeşitli çalışmalar *Legionella*'nın epitel hücrelere girdiğini ve replikasyon yaptığını göstermektedir. Ayrıca bakterinin alveoler epitel hücrelere girmesi ve yaşama yeteneğinin, akciğer enfeksiyonlarına sebep olması bakımından önemli olduğu belirtilmiştir (Cirillo vd. 1994).

1.19 *Legionella* Etkili Hastalıklar

Legionella, doğal tatlı sularda yaşaması ve çoğalmasını sağlayan adaptasyon ve kolonizasyon yeteneği sonucunda, insanlarda hastalığa sebep olmaktadır (Chauhan ve Shames 2021).

L. pneumophila'nın pnömoniye sebep olması makrofajlara, monositlere saldırarak, replikasyon yapma yeteneğine bağlıdır (Tachibana vd. 2013). *Legionella* alveoler fagositik hücrelerde olmakla birlikte, surfaktant apoprotein-A üreten Tip 2 alveoler hücrelerde de bulunmaktadır. Bu durum, *L. dumoffii*'nin in vivo olarak insan akciğer

hücrelerine girebildiği görüşü ile desteklenmektedir (Maruta vd. 1998). *Legionella* türlerinin birçoğu insanların solunum sistemine girdikten sonra alveoler epitel hücrelerde büyüme yeteneğine sahiptirler. *L. dumoffi* 'nin Lejyoner hastalığında 4. veya 5. sırada önemli etken olduğu belirtilmiştir. Bakteriler epitel hücrelere girdikten sonra hücreyi tahrip ederek hızlı ve ciddi derecede pnömoniye sebep olmaktadır (Tian vd. 2016).

Legionella 'nın bulunduğu havanın solunması ile üst solunum yoluna giriş yapan bakterilerin bir kısmı mukoza tarafından tutulmaktadır (Olivia vd. 2018, Benitez ve Winchell 2013). Akciğer alveollerine ulaşan bakterilerin alveollere tutunması sonucunda (Oliva vd. 2018, Mekhour vd. 2013a, Sikora vd. 2015), konağın savunma sistemi olan makrofajlarla karşılaşır. Makrofajların fagositoz yapması sonucu oluşan fagozoma yerleşen *Legionella*, bu şekilde hücrenin lizozim etkisinden korunmakta ve fagozom içinde çoğalmaya başlamaktadır (Richards vd. 2013, Reichardt vd. 2010).

Yaklaşık 6 saatlik duraklama (lag fazı) evresinden sonra fagozom içinde transmisiv formdan, enfeksiyon özelliğine sahip replikatif forma dönüşmektedirler. Birkaç çoğalma periyodundan sonra tekrar virülans özelliğe sahip post-eksponansiyel büyüme fazına girmektedirler (Yan ve Cirillo 2004). Replikasyonun, konak hücrede devam etmesi ile 48 saat sonra çok sayıda fagozom oluşmaktadır. Enfeksiyon evresinde, *Legionella* sayısının artmasıyla hücre nekroza uğrayarak parçalanmakta, böylece yeni oluşan *Legionella* bakterileri serbest kalmaktadır (Prashar vd. 2012, Wang vd. 2015). *Legionella* 'nın hücre dışına çıkan bu formu, yeni konak hücreleri yeniden enfekte etmekte ya da bakterinin uzun süre hayatta kalmasını sağlamak için canlı yapıda olup kültürülenemeyen VBNC (Viable but non culturable) forma farklılaşmaktadır. VBNC formları amip tarafından alındıklarında yeniden canlanabilme özelliğinde olan yapılardır (Appelt ve Heune 2017).

Legionella bakterilerinin bazıları hafif seyreden ve grip benzeri olan Pontiak ateşine sebep olurken bazıları atipik pnömoni şeklinde seyreden ve sıklıkla öldürücü olan Lejyoner hastalığına sebep olmaktadır (Prashar vd. 2012, Wang vd. 2015). Ayrıca *Legionella*, akciğer dışında diğer organları da etkileyerek daha tehlikeli hastalıkların görüldüğü ekstra pulmoner sendroma sebep olmaktadır (Yavuz 2018).

Pontiak ateşi, grip benzeri ve pnömoni etkisi olmayan bir hastalıktır. İnkübasyon ve hastalık süresi genellikle 48 saat olmaktadır. Hastalık akut ilerlemektedir, %95 oranında nöbetler görülmesine rağmen ölüm oranı %0' dır (Prashar vd. 2012, Wang vd. 2015). Bu hastalık, *L. pneumophila*, *L. feeleii*, *L. micdadei*, *L. anisa* ve *L. longbeachae* dahil olmak üzere çeşitli *Legionella* türlerine maruz kalma sonucu ortaya çıkmaktadır. Pontiak ateşi, belirsiz olmaması ve teşhis edilememesi nedeniyle çok ciddiye alınmamaktadır (Chambers vd. 2021). Patojenezi net olmayıp, antimikrobiyal tedavi gerektirmemektedir (Talapko vd. 2022).

Lejyoner hastalığının, inkübasyon süresi 2-14 gündür. Pnömoni ve sistemik enfeksiyonlarla birlikte görülmektedir (Prashar vd. 2012, Wang vd. 2015). Lejyoner hastalarında ateş, öksürük, titreme ve baş ağrısı olmaktadır. *L. pneumophila*'nın akut akciğer hasarına neden olması ile solunum sisteminde alveoler kapiler endotel ve epitelin hasar görmesi, nötrofil inflamasyonu, mikrovasküler ve epitel geçirgenliğin artması sonucunda alveollerde hava yüzeylerinin oluşması nedeniyle hayatı tehdit eden bir pnömoni meydana gelmektedir (Furugen vd. 2008).

Lejyoner hastalığında, alveoler epitel hücreleri nekroza uğrar ve inflamator hücrelerin parçalanmasıyla inflamasyon yayılmaktadır. Ökaryotik alyuvarların parçalanması, *L. pneumophila*'nın por oluşum aktivitesi ile sağlanmaktadır. *L. pneumophila*'nın çeşitli faktörleri (ProA ve PlaB) hemolizi desteklerken, Rtx A proteini por oluşum aktivitesini ve makrofaj adezyonunu sağlayarak makrofaj sitotoksitesisi için gerekli olmaktadır. Bunlarda bir mutasyon olması, sitotoksik etkisinin yetersiz olmasına sebep olmaktadır (Molofsky vd. 2005, Zhan vd. 2015).

L. pneumophila dışındaki türlerin neden olduğu hastalıklar hafif geçmesine rağmen bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda daha şiddetli görüldüğünden toplum üzerinde hastalık yükü olmaya devam etmektedir. *L. longbeachae* toplum kökenli Lejyoner hastalığının önemli bir nedeni olarak bilinmektedir. *L. longbeachae* ve diğer *Legionella* türlerinin epidemiyolojisi, vakalar olmasına rağmen, oldukça az tanımlanmıştır Diğer *Legionella* türleri ayrıca cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu, septik artrit ve bakteriyel

endokardit vakalarında tespit edilmişlerdir. Bu vakalar ciddi olabilirler ancak zor teşhis edilmektedirler (Chambers vd. 2021).

Lejyoner hastalığı (LD) etkeni olan *L. feeleii* serogrubunun hem makrofajlarda hem de alveoler epitel hücrelerde yüksek enfeksiyon yeteneğinin, Pontiak ateşine sebep olan *L. feeleii* serogrubundan daha fazla olduğu gözlenmiştir. LD etkeni *L. feeleii*'nin insan epitel hücrelerinde 40 °C gibi yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiği gösterilmiştir. Ayrıca ısı şoku proteini HSP (heat shock protein)'nin, bakterinin yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmasını sağladığı, böylece bakterinin yüksek ateşli hastalarda yaşaması için avantaj olduğu düşünülmektedir. Lejyoner hastalığına neden olan *L. feeleii*'nin flagella kazandığı, Pontiak ateşine neden olan *L. feeleii*'nin ise flagellalı olmadığı bilinmektedir (Wang vd. 2015).

Legionella türlerinin çoğu kamçılı olmakla birlikte, patojenik *Legionella*'nın hepsinde flagella bulunmamaktadır. Ancak enfeksiyon sırasında alveollerden izole edilen *L. pneumophila*, flagella yapısına sahip olduğu için, hastalığın akciğerlere yayılmasında ve bakterinin virülansında, hareket yeteneğinin önemli olduğu belirtilmektedir (Appelt ve Heune 2017, Prashar vd. 2012).

L. pneumophila genomu, yatay gen transferi (horizontal gene transfer) özelliği ile ökaryot konak hücrelerden ökaryotik benzeri proteinler (eukaryotic-like proteins) kazanmaktadır. Bu nedenle serogruplar arasında virülans yönünden spesifik farklılıklar bulunmaktadır (Steinert vd. 2007, Talapko vd. 2022). *L. pneumophila* SG 2-14'ün etkili olduğu vakalarda, hastalar tipik Lejyoner hastalığı özellikleri göstermelerine rağmen, *Legionella* üriner antigen testleri negatif sonuç vermektedir (Laganà vd. 2019, Talapko vd. 2022).

Hastalığın ilerlemesinde patojen-konak etkileşimi ve konağın immün sistemi önemli rol oynamaktadır. Özellikle 60 yaş üstü ve sigara içen kişiler, ayrıca kronik akciğer, böbrek, bağırsak hastalığı olanlar, diyabetliler, kanser hastaları, organ nakli olanlar, romatoid artrit hastaları, kortikosteroid hormon ve anti-TNF α kullanan hastalar daha çok riskli grupta bulunmaktadır. Lejyoner hastalığında ölüm oranı, kronik kalp ve solunum

sistemi hastalarında, diyabet hastalarında, tıbbi bakım gören kişilerde, yaşlılarda ve sigara içenlerde daha fazla olmaktadır (Sikora vd. 2015).

Legionella'nın insanlara bulaşması bakteri için olumsuz bir durumdur, çünkü insanda enfeksiyona neden olup varlığı tespit edildiğinde, tedavi uygulanması sonucu bakterinin yaşamı son bulmaktadır. Ayrıca enfeksiyonun ilerlemesi ile konak hücre ölümü gerçekleşmekte ve bakteri yaşamı yine sonlanmaktadır. Her iki durum da *Legionella*'nın insanlara bulaşmasının, yaşamını devam ettirmesi bakımından avantajlı bir olay olmadığını ortaya çıkarmaktadır (Chambers vd. 2021).

Solunum yolu enfeksiyonlarında, öldürücü komplikasyonlar artarak akut akciğer hasarı ve solunum sistemi sendromunu ortaya çıkarmaktadır. Bu durumda, alveoler damarlarda endotelin bozulması, epitel geçirgenliğinin artması ile epitel hücrelerin hasar görmesi, nötrofil inflamasyonu sonucu alveollerde hava yüzeylerinin oluştuğu görülmektedir. *L. pneumophila* etkisiyle bu sendromu geçiren hastaların alveoler epitel hücrelerinde apoptotik etkilerin gözlenmesi nedeniyle, bakterinin sitotoksik etkiye sebep olduğu düşünülmektedir (Molofsky vd. 2005, Furugen vd. 2008). *L. pneumophila*'nın makrofajlar ve monositlerde replikasyona uğradığı gibi, Tip I ve Tip II alveoler epitel hücrelerde Lejyoner hastalığına sebep olduğu gösterilmiştir (Gao ve Abu Kwaik 1999a).

Yapılan bir çalışmada insan alveoler epitel hücrelerinde *L. pneumophila*'nın patojen etkisinin olduğu, doz ve zamana bağımlı olarak hasara yol açtığı gösterilmiştir. Alveoler epitel hücreler *Legionella* türlerinin sebep olduğu enfeksiyonlarda önemli olmakla birlikte görevleri tam olarak açıklanmamıştır. Yeni tanımlanan bir sitokin olan HMGB1 (High Mobility Group Box 1) proteininin, hücre ölümü sırasında ortama salındığı ve virulans etkili suşla enfekte olan epitel hücrelerde HMGB1 seviyesindeki artış tespit edildiği belirtilmiştir (Furugen vd. 2008). *L. pneumophila*'nın virülans ve patojenik özelliklerini sağlayan, Lsp Tip II ve Dot/icm Tip IV sekresyon sistemi, por oluşum toksini, Tip IV pili, flagella, stres durumunda salgılanan ısı şoku proteini HSP (Heat shock protein) gibi birçok faktörün apoptozun başlamasında etkili oldukları bilinmektedir (Tachibana vd. 2013).

L. pneumophila‘nın sitotoksik etkisi sonucu A549 hücrelerinde kaspaz 3, 8, 9 ve 1 aktivitesinin meydana geldiği ayrıca *L. pneumophila*‘nın virülans faktörlerini özellikle Dot/Icm salgı sistemi ile sentezlendiği ve bakteri virülansına katkı sağladığı gösterilmiştir (Furugen vd. 2008).

L. dumoffii‘nin sebep olduğu pnömoni sonucu ölen hastanın akciğer biyosisi ile yapılan çalışmada, *L. dumoffii*‘nin akciğerlerin hem makrofaj hücrelerinde hem de Tip 1 ve Tip 2 alveoler epitel hücrelerde bulunduğu gözlenmiştir. İn vitro ortamda *Legionella* türleri ve diğer bakterilerin epitel hücrelere saldırdıkları gösterildiği gibi, bu çalışmada in vivo olarak da *L. dumoffii*‘nin fagositoz yeteneği olmayan insan alveoler epitel hücrelere saldırarak fagositozu uyardığı ve hücreye girebildiği gösterilmiştir. Ayrıca *Legionella*‘nın bazı suşlarının enfeksiyonun erken evrelerinde epitel hücrelere saldırarak hücreye girmesi sonucunda pnömoniye neden olduğu gösterilmiştir. Bakterinin epitel hücrelerde görülmesi olması oldukça önemlidir, çünkü epitel hücreler patojenlere karşı bariyer görevi yaparlar ve sitokin salgılanmasından sorumludurlar. Enfeksiyon, bağışıklığı zayıf hastalarda görülmesine rağmen, *L. dumoffii*‘nin insanlarda diğer *Legionella* türlerinden daha hızlı ve etkili pnömoniye sebep olduğu belirtilmektedir (Maruta vd. 1998).

L. pneumophila‘nın pnömoniye sebep olması, alveoler makrofajlar, monositler ve epitel hücrelere saldırması sonucu bu hücrelere girmesi ve replikasyon yapmasına bağlıdır. Bakterinin konak hücreye tutunması pili, Hsp60 ve MOMP proteinleri ile olmaktadır. Konak hücreye girmesiyle birlikte *L. pneumophila* lizozomlarla füzyona uğramayan fagozom içinde replikasyona başlar. *Legionella*‘nın içinde bulunduğu bu fagozom (LCV), lizozomlarla füzyona uğramamaktadır (Gao ve Abu Kwaik 1999a).

L. pneumophila SG-6, nadiren olmakla birlikte, özellikle *L. micdadei* ve *L. bozemanii* immun sistemi baskılanmış hastalarda Lejyoner hastalığına sebep olmaktadır. *L. micdadei* ve *L. bozemanii* Mono Mac 6 hücrelerinde multiplikasyon yapma yeteneği bu türlerin klinik önemini ortaya çıkarmaktadır. *L. pneumophila* SG-6‘in ise Mono Mac 6 hücrelerinde multiplikasyon yapmadığı belirtilmiştir. Ayrıca *Legionella oakridgensis*‘in Mono Mac 6 hücrelerinde multiplikasyon yaptığı gösterilerek, bu türün klinik öneminin bilinenden fazla olacağı belirtilmektedir (Neumeister vd. 1997).

1.20 Başışıklık Sistemi ve Tedavi

Başışıklık sistemi, iki ana bileşenden oluşmaktadır: Birincisi, fagositoz ve lizozomal sindirim, diğeri ise patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP: Pathogen-associated molecular pattern) tanıyan reseptörlerden oluşan sinyal yollarıdır. Tanıma reseptörleri olan bu reseptörler; hücre yüzeyindeki ligandları tanıyan ve lizozom/endozom ilişkili Toll benzeri reseptörler (TLR: Toll Like Receptor) ve sitoplazmada bakteriyel ve viral molekülleri tespit eden Nod benzeri reseptörler (NLR: Nod Like Receptor) olarak iki gruba ayrılabilir. Alveolar makrofajlar tarafından yutulan *L. pneumophila* hücrede sindirilmek yerine, hücre içinde büyümesi sonucu doku hasarına ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır (Luo 2012).

Memelilerde doğal immün sistemde akciğeryer enfeksiyonun önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Alveoler epitel hücreler ve makrofajlar patojene karşı akciğeryerlerin ön savunmasında rol oynamakta ve sitokin üretimini başlatarak inflamasyona sebep olmaktadır. Patojen, bu sistemden kaçmayı başarsa akciğeryer epitel dokularına zarar verebilir. Bu nedenle bakteri virölansının etkisiyle oluşan pnömoni, konak hücrenin zarar görmesi ve konak hücrede inflamasyonu başlatma yeteneği nedeniyle önemli olmaktadır (Wang vd. 2015).

L. pneumophila, insan alveoler epitel hücrelerinde sitokin ve kemokinlerin salgılanmasına yol ayan transkripsiyon düzenleyici Nükleer faktör Kb (NF-kB)' yi aktive etmektedir. Bu aktivasyon, başışıklık tepkisini tetiklemesi nedeniyle konak hücre için yararlı olmaktadır. *L. pneumophila* enfeksiyonu sırasında, insan hücrelerinde doğal başışıklığın uyarılması ile antimikrobiyal sitokinler olan TNF- α , IL-6, IL-1, IFN- γ ve makrofaj aktivasyonu sağlanmaktadır. TNF- α , makrofajların bakterisidal aktivitesini arttıran güçlü bir sitokindir. TNF- α üretiminin inhibisyonu, bakteri replikasyonunun artması ile bağlantılıdır. IFN- γ ve TNF- α ' nin aksine, İnterlökin-10 (IL-10) ise makrofaj aktivitesini inhibe eden bir sitokindir. Bu nedenle Lejyoner hastaları daha az IFN- γ üretmektedir. Akut Lejyoner hastalığında, IFN- γ ve IL-12, Th1 gibi sitokinlerin seviyesinin yükselmesi, *L. pneumophila* replikasyonunu kısıtlayabilmektedir. Hüморal başışıklığın, Lejyoner hastalığına (LD: Legionnaires' Disease) karşı konak savunmasında

etkisi sınırlı görünmesine rağmen, hücrel bağışıklığın, *L. pneumophila* replikasyonunu kısıtlamada oldukça kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. *L. pneumophila*'nın monositlere girişini destekleyen kompleman ve antikorun, monositlerde *L. pneumophila* çoğalma hızını inhibe etmediği gösterilmiştir. Aktive edilmiş insan monositleri, hem fagositozu hem de bakterinin hücre içi çoğalmasını inhibe etme kapasitesine sahip olurlarsa, *L. pneumophila* virülansının azalmasını sağlamaktadırlar (Abu Khweek ve Amer 2010).

Makrofajlar doğal bağışıklığın kilit hücreleridir ve çeşitli bağışıklık tepkilerini düzenlemektedirler. Bunların en önemlisi, hücre içi patojenlerin öldürülmesini sağlamak amacıyla hücrel intiharı başlatmasıdır. Spesifik mikrobiyal ligandlar ile proinflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-18'in salgılanmasında rol oynayan sistein-aspartik proteaz, kaspaz-1'e bağımlı hücre ölümü olan piroptozu başlatmaktadır. Piroptoz, aktive edilmiş nötrofiller aracılığıyla, hedef alınan bakterilerle birlikte sitozolik içeriğin hızlı bir şekilde hücreden salınması ile meydana gelmektedir. Buna karşılık, klasik mitokondriyal apoptoz, kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu ile sonuçlanan mitokondriyal membran bütünlüğünün kaybından kaynaklanmaktadır (Speir vd. 2014).

Legionella enfeksiyonunun erken evrelerinde, insan monosit hücrelerinden oluşan makrofajlar, TNF- α gibi apoptozu başlatan faktörlere dirençli hale gelmektedirler. *Legionella* transkripsiyon faktörü NF-kB'yi aktive ederek çeşitli konak hücrelerde anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu başlatmaktadır. NF-kB'nin inhibisyonu ise apoptozun başlamasını sağlayarak *Legionella* büyümesini engellemektedir. *Legionella* ayrıca dendritik hücreler dahil olmak üzere diğer bağışıklık hücreleriyle etkileşime girmektedirler (Speir vd. 2014).

Antibiyotik ve oksijen takviyesi dahil olmak üzere destekleyici bakıma rağmen, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda %50'ye ulaşan yüksek ölüm oranları bildirilmiştir. Oksijen takviyesi genellikle Lejyoner hastalığı dahil olmak üzere ciddi pnömoni hastalarına uygulanmakta olup şiddetli hipoksemi gösteren hastalar için oldukça destekleyici ve önemli tedavi yöntemidir. Uzun süreli ve geçici oksijen takviyesi, akciğer hasarının artmasına sebep olabilir. Hiperoksiye bağlı olarak, zarar görme riski taşıyan

hücreler arasında alveolar epitel hücresi ve akciğer mikrovasküler endotel hücreleri bulunmaktadır. Oksijen tedavisinin, aşırı akciğer dokusu hasarına neden olmadığı durumlarda bile, Lejyoner hastalığı dahil olmak üzere spesifik pulmoner enfeksiyonlarda akut akciğer hasarını şiddetlendirebileceği gösterilmiştir (Tateda vd. 2003).

Legionella, β -lactamaz enzimine sahip olması nedeniyle beta-lactam antibiyotikleri Lejyoner hastalığının tedavisinde etkili olmazlar. Levofloxacin ve moxifloxacin içeren Azithromycin ve Fluoroquinolon, *Legionella* etkili pnömoni tedavisinde tavsiye edilmektedir. Semptomları uzun süre devam etmemesine rağmen, Lejyoner hastalığının tedavisi uzun süreli olmaktadır (Talapko vd. 2022).

1.21 Epidemiyoloji

60' dan fazla *Legionella* türü ve 70' den fazla serogrup bulunmaktadır (Graham vd. 2020, Mazzotta vd. 2021). Bunlardan 30 türün insanlarda hastalığa sebep olduğu belirtilmiştir (Erdoğan 2018). Klinik enfeksiyonların çoğuna yaklaşık %90 oranında *L. pneumophila* neden olmaktadır (Chauhan ve Shames 2021, Sikora vd. 2015, Mazzotta vd. 2021). Patojenik olan *Legionella pneumophila* 16 serogrup içermektedir (Laganà vd. 2019).

En fazla hastalık etkeni olan ise *L. pneumophila* serogroup 1' dir. Dünyada %80-90 oranında hastalık etkeni olduğu (Laganà vd. 2019, Talapko vd. 2022, Nisar vd. 2020) ve vakaların %85' inden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada *L. pneumophila* SG-1' in Paris subgrupunun Fransa, İsviçre, İtalya, İsveç, USA, Kanada, Japonya ve Senegal' de en yaygın suş olduğu bildirilmiştir (Mekkour vd. 2013b).

SG 2-14 ise toplum etkili vakalarda %15-20 oranında etkili olup %50' den fazlası su sistemlerinden izole edilmiştir (Laganà vd. 2019, Talapko vd. 2022). *L. pneumophila* SG-1, SG-4 ve SG-6 insanlarda yaklaşık %85 oranında hastalık etkenleridir. *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, and *L. longbeachae* immun sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyona neden olmaktadır (Gruas vd. 2013).

L. pneumophila'nın SG-1, SG-6, SG-7 serogrupları ve diğer türlerden *L. micdadei*, *L. feeleeii*, *L. anisa* ve *Legionella longbeachae*, Pontiac ateşine sebep olmaktadır (Wang vd. 2015, Kirschner 2016). Enfeksiyonda etkili diğer türler, *Legionella feeleeii*, *Legionella micdadei*, *Legionella longbeachae*, *Legionella anisa*, *Legionella dumoffii* ve *Legionella bozemanii*'dir (Talapko vd. 2022).

ABD' de *L. pneumophila* SG-1, vakaların %84.2' sinden, SG 2-14 %7.4' ünden, *L. longbeachae*, % 3.9' undan, *L. bozemanii* ise %2.4' ünden sorumludur. Avustralya ve Yeni Zelanda' da *L. pneumophila* SG-1 vakaların %45.7' sinden ve *L. longbeachae*' in vakaların %30.4' ünden sorumlu olduğu belirtilmektedir (Mraz ve Weir 2018).

1.22 İnsidans

CDC (Center for Disease Control) tarafından açıklanan Lejyoner hastalığı (LD) vakaları, 1976' da 235 iken 1990' da 1370 olduğu açıklanmıştır. USA' da vakalar 1990-2002 yıllarında yavaş artarken 2003' de hızlanmaya başlamıştır. 1992-2002 yıllarında ortalama 1221 iken 2003-2018 arasında ortalama 439 olarak belirtilmiştir (Barskey vd. 2022). USA ve Avrupa' da LD artmaya devam etmektedir. USA' da 2000' den 2015' e kadar 4,5 kat artış olmuştur (Paranjape vd. 2020).

2001-2006 yılları arasında, Amerika' da *L. pneumophila*, %70' den fazla Lejyoner hastalığına sebep olduğu için su kaynaklı patojenlerin en etkinleri arasında 3. sırada yer almaktadır (Buse ve Ashbolt 2011). ABD' de LD vakaları 2005 yılında 2301' den %300 artış gösterirken, 2018' de 7104' e yükselmiş (Nisar vd. 2020), ayrıca 2013-2014 yıllarında, içme suyuna bağlı salgınlarda %88 oranında bulunan *Legionella*, ölümlerin en çok bildirilen nedeni olmuştur (Walker ve McDermott 2021). Lejyoner hastalığındaki artış nedeni ile *Legionella*, US' de halk sağlığı sorunu olarak görülmektedir (Llewellyn vd. 2017).

ECDC (European Center for Disease Control)' nin 2015 kayıtlarına göre Avrupa Birliği ve Norveç' te 2013 yılında Lejyoner hastalığı %1,14 iken, CDC' nin 2011 kayıtlarına göre

2009 yılında ABD' de bu oran %1,15 olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre yeni yüzyılın sonlarına doğru hastalıkta artış olduğu gözlenmiştir. Bu artışın potansiyel nedenleri arasında özellikle soğutma sistemlerinin *Legionella*'nın çoğalmasına uygun şekilde yapılması, enfeksiyonun yayılmasında etkili yaşlı popülasyonun artması, teşhis ve kayıtların düzenli olarak yapılması sayılabilmektedir (Kirschner 2016). ECDC ayrıca, Avrupa' da vakaların yaklaşık %70' inde, spesifik olmayan çevresel risk faktörleri tanımlamıştır. Bu nedenle LD; toplum kaynaklı, seyahat ilişkili ve hastane kaynaklı olarak sınıflandırılmaktadır (Yavuz 2018). UE/EEA (European Union/ European Economic Area) verilerine göre, 2011' den 2018' e %1.2 den %1.8' e yükselmiş, USA' da ise 2000' de %0.038 iken, 2010' da %0.040 daha az artış olduğu belirtilmiştir (Riccò vd. 2021).

Dünyada Lejyoner hastalığı önemli halk sağlığı sorunudur. Vakaların %70 toplum kaynaklı, %20 seyahat ilişkili, %10 hastane kaynaklı olduğu belirlenmiştir (Yavuz 2018). Ölüm oranı %10 olup, hastane kaynaklı olanlarda %25, seyahat bağlantılı olanlarda %6 oranında ölüm gözlenmiştir (Kyritsi vd. 2018). Avrupa' da, rapor edilen LD vakalarının sayısı 2013' den 2017' ye kadar %50 (Paranjape vd. 2020), 2014-2018 yılları arasında %65 oranında artış gösterirken, bu vakaların % 85' inin *L. pneumophila* SG-1 kaynaklı olduğu belirtilmiş olup 8974 vakanın, %8' i ölümle sonuçlanmıştır. Bunların ise %72 toplum kaynaklı, %20 seyahat ilişkili, %6 hastane kaynaklı ve %2 ise diğer etkenler olarak belirlenmiştir (Mazzotta vd. 2021).

L. longbeachae, *L. bozemanii* ve *L. micdadei*, dünyada enfeksiyonların %2-7' sini oluşturmaktadır. *L. longbeachae*, Avustralya ve Yeni Zelanda' da yaklaşık %30 oranında LD' ye neden olmaktadır. *L. pneumophila*' ya kıyasla, diğer *Legionella* türleri genellikle hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Chauhan ve Shames 2021, Scaturro vd. 2020, Chang vd. 2010).

Avustralya ve Yeni Zelanda' da *L. longbeachae*, Lejyoner vakalarının %50' si ile bağlantılı bulunmaktadır (Nisar vd. 2020). *L. longbeachae*' in, ABD' deki vakaların %0.3–3.6' sını, Japonya' da %0.7' sini ve Avrupa' da %1' ini oluşturduğu bildirilmiştir. İskoçya ve Hollanda' da *L. longbeachae* vakalarının arttığı belirtilmektedir. *L. micdadei*

ve *L. bozemanii*' nin bağışıklık sistemi zayıf hastalar arasında pnömoniye neden olduğu açıklanmıştır (Chambers vd. 2021).

Su sistemlerinde bulunan *L. anisa* ve *L. bozemanii* türlerinin sebep olduğu Lejyoner hastalığının, toplam vakaların %1' inden az olduğu bilinmektedir. ABD' de soğutma kulelerinde yapılan çalışmada, pozitif örneklerin %47' sinin diğer *Legionella* türleri olduğu bildirilmiştir. Fransa' da ise, Lejyoner hastalığı vakalarının %98' i *L. pneumophila* ile bağlantılı bulunmuş ancak soğutma kulelerinden kaynaklanan salgınlara *Legionella* türlerinin neden olduğu belirlenmemiştir (Walker ve McDermott 2021).

Yetersiz tanı, tanı yöntemlerinde farklılıklar, farkındalık düzeyi ve ülkeler arasındaki raporlama standartları nedeniyle LD prevalansının ölçülmesi zor olmaktadır. Birçok yerde *L. pneumophila* SG-1 tespiti sadece, üriner antijen testine dayanmaktadır (Chambers vd. 2021). *Legionella pneumophila*' da ölüm oranı %7 ve %25 arasındadır. Diğer *Legionella* türlerinde ölüm oranı ise %5 olarak belirlenmiştir (Talapko vd. 2022). Hastane salgınlarında ölüm oranı %48' e kadar çıkabilmektedir (Nisar vd. 2020). LD, toplum kökenli pnömoninin %2-9' unu oluşturmaktadır (Talapko vd. 2022). Salgınlarda ölüm oranının bağışıklık sistemi zayıf hastalarda %30' a kadar artması nedeniyle Lejyoner hastalığı (LD), yasal olarak Halk Sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir (Zhan vd. 2014).

ELDSNet (European Legionnaires' Disease Surveillance Network) ve WHO (World Health Organisation), su sistemlerinde *Legionella*' nın hastalık riski yönünden potansiyel tehlike olduğunu, bu nedenle su sistemlerinin düzenli olarak *Legionella* açısından kontrol edilmesinin gerekliliğine dikkat çekmişlerdir (Sikora vd. 2015). Otel su sistemlerinde *Legionella* türlerinin kolonize olması seyahat bağlantılı Lejyoner hastalığının (LD) yayılmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle ECDC ve ELDSNet, Avrupa Birliği düzeyinde LD surveyansını önermektedir (Papadakis vd. 2021).

1.23 Salgınlar

1965 yılında Washington DC St. Elizabet's psikiyatr hastanesinde pnömoni salgını sonucu 81 hastanın 14' ü hayatını kaybetmiştir. Salgın sırasında saklanan serum örnekleri salgından 12 yıl sonra incelendiğinde %85' inde *L. pneumophila* antikorları tespit edilmiştir (Vural 2014). Louisiana' da bir markette sebzeleri nemli tutmak amacıyla kullanılan ultrasonic sisleme makinasından kaynaklanan Lejyoner hastalığı salgını bildirilmiştir (Köksal vd. 2002). 1976 yılından sonraki büyük salgın, 2014 yılında Portekiz' de görülmüş; 400 vakadan 14' ünün ölümü ile sonuçlanmıştır. Lejyoner hastalığının, bilinenin aksine kişiden kişiye bulaştığı ve hastalık etkeninin *L. pneumophila* SG-1' in 1905 suşu olduğu bildirilmiştir (Borges vd. 2016).

Hastanelerde görülen Lejyoner hastalığı salgınlarının sıcak sularda bulunan *Legionella* ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir. Sıcak su sistemlerinde ısının yükseltilmesi enfeksiyonları önlemiş ancak bakteriyi tamamen yok etmemiştir. 1982 yılında Amsterdam' da bir üniversite hastanesinde *L. pneumophila* SG-1 enfeksiyonlarının ortaya çıkmasıyla yapılan analizler sonucu, sıcak su örneklerinde *L. pneumophila* SG-1 ve SG-6 izole edilmiştir. 1982 Nisan ayında sıcaklıkların yükselmesiyle, *L. pneumophila* SG-1' in sebep olduğu 4 hastane enfeksiyonu meydana gelmiştir. 1985 Kasım ayında hasta balgamından ilk kez serogrup 6 izole edildiğinde, bunun hastane enfeksiyonu olduğu düşünülmüştür (Zanen-Lim ve Zanen 1988).

1988-1989 yılları arasında Güney Avustralya' da özellikle bahçıvanlar arasında görülen salgın üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, *L. longbeachae* saksı topraklarından izole edilmiştir. Lejyoner hastalığı için risk faktörü olan *L. longbeachae*' in Yeni Zelanda, Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada' da, saksı ve bahçe topraklarının kullanımıyla ilişkili olduğu açıklanmıştır (Chambers vd. 2021).

Soğutma kulelerinde *Legionella*' nın kolay üremeleri ve yüksek konsantrasyonlara ulaşmaları sonucunda, kulelerin fan sistemlerinde oluşan aerosoller ile ortama yayılmakta ve böylece insanlara bulaşabilmektedirler. Bu nedenle soğutma kulelerinin

mikroorganizmanın yayılmasında etkili önemli kaynaklar oldukları belirtilmektedir (Akbaş vd. 1999).

2011-2014' de USA' da görülen salgında 74 içme suyu kaynaklı salgın görülmüştür. Bunların %61' inden *Legionella* etkili olduğu bildirilmiştir. Bunlardan %17'si hastalıkla sonuçlanmış, %88'i hastane tedavisi görmüş olup, 27 ölümün *Legionella* kaynaklı olduğu belirlenmiştir (Buse vd. 2020).

2014 ve 2015' de Michigan eyaletinin Flint bölgesinde salgın meydana gelmiştir. Evlerin su tesisatının %12' sinde, *Legionella* bulunmuş ve en yaygın serogrubun *L. pneumophila* SG-6 olduğu açıklanmıştır (Byrne vd. 2018).

New York' da 2015 yılında görülen salgında, 138 vakanın 18' i ölümle sonuçlanmıştır. 2017 Disneyland salgınında ise, 12 kayıtlı vaka belirlenmiştir. Soğutma kulelerinin salgında etkili oldukları belirtilmiştir. *L. pneumophila*' nın 12 km kadar uzağa gidebildiği, hava ile yayıldığı ve bu nedenle aerosol yoluyla bulaşmanın enfeksiyon riski taşıdığı ifade edilmiştir (Paranjape vd. 2020).

Polonya' da, 2002' den beri ulusal olarak bildirimi zorunlu bir hastalık olmasına rağmen, *Legionella* tanısında düşük maliyetli teknikler tercih edilmesi nedeniyle, hastalık genellikle ileri aşamada fark edilmekte, bu durum ise verilerin yetersizliğine neden olmaktadır (Pancer 2013).

Türkiye' de 1996 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan genelge ile Lejyoner hastalığı ulusal olarak bildirilmesi zorunlu hastalık olarak kabul edilmiş ve Türkiye 2001 yılında Avrupa *Legionella* Enfeksiyonları Çalışma Grubu' na (EWGLI-European Working Group *Legionella* Infection) dahil edilmiştir (Akbaş 2013).

Japonya' da hamamların neden olduğu dört büyük salgın nedeniyle (Amemura-Maekawa vd. 2010), Japonya Ulusal Epidemiyolojik Sürveyans ve Enfeksiyon Hastalıkları Merkezi

tarafından, özellikle kaplıcalar ve hamamların, *L. pneumophila* bulaşmasında soğutma kulelerinden daha etkili kaynaklar olduğu belirtilmiştir (Amemura-Maekawa vd. 2012).

1.24 Su Sistemlerinde Dezenfeksiyon

Su dağıtım sistemleri ve arıtma tesisleri, *Legionella* bulaşmasında önemli rol oynamaktadır. Su kaynaklı salgınların %66' sı ve hastalıkların %26' sında *Legionella*' nın etkili olduğunu gösteren Haftalık Morbidite ve Mortalite Raporu, uygulanan içme suyu arıtma standartlarının yeterli olmadığını düşündürmektedir (Schwake vd. 2021).

Sıcaklık, su sistemlerinde *L. pneumophila*' yı kontrol etmenin en etkili yoludur. Su sistemlerinde 12 °C ile 50 °C arasındaki sıcaklıklar *Legionella*' nın çoğalmasını etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Cervero-Aragóa vd. 2019). Sıcak suyun sistemde 50 °C' de kalması önerilmektedir. Özellikle su sıcaklığını anlama yeteneği olmayan demans hastalarının olduğu sağlık merkezlerinde, suyun yüksek sıcaklıklarda olması tehlikeli olabilmektedir. Bu nedenle aralıklı olarak süper ısı kullanma yani sistemdeki suyun 70 °C' de tutulması ve muslukların 30 dakika boyunca akıtılması *Legionella* salgınlarının kontrolünde etkili olmaktadır (Mraz ve Weir 2018).

70 °C ve 80 °C gibi daha yüksek sıcaklıklarda termal şoklar dezenfeksiyonda kullanılmaktadır. Yine de *Legionella* hayatta kalmakta, termal işlemde haftalar sonra su sistemini yeniden kolonize edebilmektedir. Bu önlemler, kültürlenebilir *Legionella* konsantrasyonlarını azaltmada etkili olmasına rağmen, su sistemlerinde bakterinin yok edilmesinde başarılı olamamaktadırlar (Cervero-Aragóa vd. 2019).

Protozoa varlığının *L. pneumophila* salgınları için risk faktörü olduğu belirtilmektedir (Abdel-Nour vd. 2013). Protozoa, *L. pneumophila*' nın dezenfektanlara karşı direnç göstermesini sağlamaktadır. Bu nedenle dezenfeksiyonda, protozoa direncinin ve *L. pneumophila* ile protozoa etkileşimlerinin bilinmesi gerekli olmaktadır (Nisar vd. 2020). *Acanthamoebae* içinde yaşayan *L. erythra* ve *L. pneumophila*, planktonik olarak serbest *Legionella*' ya göre ısıtma işlemine dirençlidir. Amip kistleri termal dezenfeksiyon boyunca *Legionella* yaşamasına imkân sağlamaktadırlar. Bu nedenle termal dezenfeksiyonun

Legionella taşıyan *Acanthamoebae*' nin kontrolünde yetersiz olacağı bildirilmiştir. Ayrıca, soğuk ve sıcak suda yaşayan *Legionella* türleri de farklı özelliklere sahiptirler. *L. pneumophila*' nin termal toleransı ısı şokuna tepki göstermesinden kaynaklanmaktadır (Whiley vd. 2016). Isıl işlem hastaneleri dezenfekte etmede kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. ABD, Almanya ve Slovakya'da nozokomiyal Lejyoner hastalığı salgınlığının önlenmesi için termal dezenfeksiyonun uygulanması kabul edilmiştir (Nisar vd. 2020).

UV ışınlanması genotoksik özellikteki dezenfeksiyon yöntemidir. UV uygulaması, *L. pneumophila*' da azalma sağlamakta ancak tüm kültürlenebilir *L. pneumophila*' yı ortadan kaldıramamaktadır. Polivinil klorür ve polietilen yüzeyler üzerindeki *Legionella* biyofilmlerinin ve amip ilişkili *L. pneumophila*' nin yüksek dozlarda UV ışınlarını tolere edebildiği bildirilmiştir (Nisar vd. 2020).

Dezenfeksiyonda ozon uygulanması, *L. pneumophila*' nin azalmasını sağlamaktadır. Ozonun sudaki yarı ömrü çok kısa olduğundan konsantrasyonu korumak zordur. Klorlama ve ozonlama kombinasyon halinde kullanılırsa, hem *L. pneumophila*' yı hem de protozoonları önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (Nisar vd. 2020). Ozonun gaz ve çözünmüş şekli, DNA'ya zarar vermesi nedeniyle *L. pneumophila*' ya klordan daha etkili olmaktadır (Mraz ve Weir 2018).

WHO (Word Health Organisation) tarafından, içme sularının dezenfeksiyonunda klor önerilmektedir. Klor uygulaması, *L. pneumophila*' nin azalması ile sonuçlanmaktadır. Klorun *Legionella*' ya karşı etkinliğinin 43 °C' de arttığı gözlenmiştir. Bakteriler *Acanthamoeba* kistleriyle etkileştiğinde, serbest klora yüksek düzeyde tolerans göstermiştir. İn vitro çalışmalarda, klor dioksit *L. pneumophila*' nin azalmasına sebep olurken, amiple birlikte bulunan *L. pneumophila*' da etkili olmamıştır. Polivinil klorür, polietilen ve paslanmaz çelik malzemeler üzerindeki *Legionella* biyofilmleri klor dioksiti tolere edebilmektedirler (Abdel-Nour vd. 2013).

Serbest yaşayan *L. pneumophila*, klor çözeltisine maruz kaldıktan sonra 3 dakika içinde ölürken, biyofilmlerde yaşayan *L. pneumophila*'nın klorla yok edilmesi çok daha zordur. Düşük klorda bakterinin VBNC haline geldiği belirtilmektedir. Klor, *Legionella*'da yeterince etkili olmamıştır, çünkü *L. pneumophila*'yı yok etmek için biyofilmin içine nüfuz etmesi gerekmektedir. Bu nedenle, şok hiperklorizasyon kullanılması önerilmektedir. Ancak sularda yüksek düzeyde klor hem insan sağlığına zararlıdır hem de boruların aşınmasına sebep olabilmektedir (Mraz ve Weir 2018).

Klor dioksitin, bakır borularda biyofilmlere nüfuz ederek *L. pneumophila*'yı azalttığı ve klor, monokloramin, elektro klorlama, ozon ve bakır-gümüş iyonizasyonuna kıyasla en etkili yöntem olduğu belirtilmektedir (Mraz ve Weir 2018). Klor dioksit, klorun aksine biyofilm yapısının içine nüfuz edebilir, ayrıca *L. pneumophila*'nın yaşadığı serbest yaşayan amipleri etkisiz hale getirebilmektedir. Bu nedenle hastane sistemlerinde Lejyoner hastalığı riskini azaltmak için klor dioksit kullanılmaktadır (Talapko vd. 2022).

2004-2009 yıllarında yapılan bir çalışmada, 2 hastanenin 11 farklı yerindeki sıcak su sistemlerinden alınan 271 örneğin analiz sonuçlarına göre, *L. pneumophila* %37, SG 2-14 %68.3 oranında, SG-1 %18.8 olarak bulunmuştur. 2004' den 2006' ya kadar 5 kez klorlama yapılmış. Su sıcaklığı 50 °C' den 60 °C' ye dereceye çıkarılmış ancak *L. pneumophila* kolonizasyonunda azalma beklenirken artış gözlenmiştir. 2005' den 2006' ya kadar yapılan araştırmada, hastanenin *L. pneumophila* değerinin önceki yıllara göre, %48 iken %87 olduğu görülmüştür. Klorin miktarı azaltıldığında her iki hastanede *L. pneumophila* artmış, %27 iken %73 olduğu görülmüştür. Olumsuz sonuçlardan dolayı dezenfeksiyon yöntemleri yeniden düzenlenmiş, su sistemleri sürekli klorin dioksit maruz bırakılmıştır. Bir hastanede *L. pneumophila* kolonizasyonu %68'den %8, diğerinde ise %77' den %12 olduğu, *L. pneumophila* konsantrasyonunun kabul edilebilir sınırlara ulaştığı bildirilmiştir. Sonraki araştırmalarda, 2007-2008' de %10 ve %5, 2008-2009' da ise %8 ve %0 bulunmuştur. Ayrıca 2004-2009' da *Legionella* etkili olduğu klinik bulgular görülmemiştir. Bu durum klorin dioksit uygulamasının, *L. pneumophila* konsantrasyonunu kabul edilebilir sınırlar arasında tutmada etkili olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Tesauro vd. 2010).

Klor türevi olan kloramin, *L. pneumophila*' yı su ortamlarında biyofilmlerden tamamen yok etmemektedir (Abdel-Nour vd. 2013). Sadece planktonik olarak yaşayan *Legionella*' ya etki gösterirler. Poliheksametilen ve benzizotiazolon biyositleri, *A. polyphaga*' da yaşayan *L. pneumophila*' ya karşı etkili olmamıştır, bu durum amiplerde bulunan proteinlerin *Legionella*' da biyositlere direnç sağladığını göstermektedir (Lau ve Ashbolt 2009).

Amonyak türevi olan monokloramin (NH_2Cl), dezenfeksiyonda serbest klordan daha etkili olmaktadır. Monokloraminin biyofilmlere daha etkili nüfuz edebildiği belirtilmiş, ancak bakteri monokloramine direnç gösterdiği için sulardan yok edilememiştir (Mraz ve Weir 2018). Ayrıca hastanelerde monokloraminin *L. pneumophila*' nın VBNC (Viable but non culturable) formuna dönüşmesine neden olduğu bildirilmektedir. Bazı *L. pneumophila* suşlarının yüksek seviyelerde monokloramini tolere edebildiği gösterilmiştir (Abdel-Nour vd. 2013).

Brom ve iyot hem yüzme havuzları hem de soğutma sularının dezenfekte edilmesinde etkili olurken, içme sularında brom önerilmemektedir. İyot özellikle *L. pneumophila*' yı biyofilm içinde öldürmekte etkisiz kalmıştır. Demir, organik karbon, azot ve fosfor gibi yüksek besin içeriği *L. pneumophila*' nın büyümesini ve kalıcılığını desteklemesi nedeniyle dökme demir borular *L. pneumophila* için en üretken, plastik borular orta düzeyde, bakır borular ise en az üretken malzemelerdir (Mraz ve Weir 2018).

Su sistemlerinde yüzey malzemesinin bileşimi *L. pneumophila*' nın yapışmasında önemli rol oynamaktadır. Su tesisatlarında kullanılan plastik *L. pneumophila*' nın yapışmasını sağlarken, bakır ise engellemektedir (Abdel-Nour vd. 2013). Bu nedenle bakır kullanımı Lejyoner hastalığı riskini azaltırken, plastik artırmaktadır (Talapko vd. 2022).

Kalsiyum ve magnezyum katyonları *L. pneumophila*' nın abiyotik yüzeylere bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Yüksek çinko, magnezyum ve mangan, *L. pneumophila* kontaminasyonunu arttırmaktadır. Çinko, *L. pneumophila*' nın insan akciğer epitel hücrelerine bağlanmasını sağlamaktadır. Karbon, besin sağladığı için,

biyofilmlerde *L. pneumophila* kolonizasyonunu desteklemekte, ayrıca 20 °C sıcaklıklarda biyofilm yapısında artışa neden olmaktadır (Abdel-Nour vd. 2013).

Kimyasal dezenfeksiyon yöntemleri olan ozonlama, klorlama, monokloramin, klor dioksit ve Cu+/Ag + iyonları, su kaynaklarında *Legionella* içeren amip kistlerini tamamen ortadan kaldıramaz (Nisar vd. 2020). Bu nedenle *L. pneumophila'* nın biyofilmlerde büyümesini önlemek için spesifik fajlar kullanılabilir. Faj kullanımı polisakkaritleri parçalayarak biyofilm yapısını dengesizleştirmektedir. Gümüşün antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle biyofilm hacminde azalma olduğunda, gümüş nanopartikülleri olumlu sonuçlar göstermektedir (Talapko vd. 2022).

Legionella türleri üzerinde antimikrobiyal etki gösteren antimikrobiyal peptitler, biyosümfaktanlar ve uçucu yağlar gibi doğal bileşikler bulunmaktadır. Ayrıca filtrasyon yöntemleri kullanılabilir, ancak hastane sisteminde filtrelerin kullanımı ve bakımının, maliyeti önemli ölçüde artırabileceği belirtilmektedir (Talapko vd. 2022).

Nanopartiküller, *L. pneumophila*-amip etkileşimini ve biyofilm yapısını bozmaları nedeniyle, *L. pneumophila'* yı insan yapımı su sistemlerinde bulunan biyofilmlerden etkili şekilde temizlemek amacıyla, son zamanlarda uygun bir dezenfeksiyon yöntemi olarak görülmektedir (Abdel-Nour vd. 2013).

Kimyasal yöntemler, suyun aşırı ısınması ve UV ışınması gibi yöntemler kısa süreler için başarılı olsa da bakteriler daha sonra tekrar tespit edilmektedir. Bu nedenle *L. pneumophila'* yı sulardan yok etmek için hem bakterilere hem de protozoa konaklara karşı etkili ve sürekli uygulamalar kullanılması gerekmektedir (Nisar vd. 2020).

1.25 Halk Sağlığı ve Önlem

Legionella türlerinden özellikle *L. longbeachae* bahçe faaliyetleri ile uğraşan kişilerde görülmektedir. Bahçıvanlarda fazla görüldüğü için, eldiven ve maske kullanmaları ayrıca aerosol oluşumunu en aza indirmek için saksı toprağını nemlendirmeleri önerilmektedir. Avrupa'da *L. longbeachae* daha az görülmektedir. Saksı topraklarının pastörize edilmesi

ve am ürünlerinin saksı topraklarından azaltılması veya elimine edilmesi ve *L. longbeachae* için uygun yeşil atıkların kullanılması bu enfeksiyonları azaltabilmektedir (Chambers vd. 2021).

Hastanelerde Lejyoner hastalığının önlenmesi geniş çapta tartışılmış, Dünya Sağlık rgt (WHO) ve birçok ulusal kurum tarafından su standartları belirlenmiştir. Bunlar zellikle *L. pneumophila'* nın olduğu sıcak su sistemleri dahil olmak üzere, bütün su sistemlerinin bakımını içermektedir. Bitişik soğuk su borularının ısınmasını önlemek için sıcak su borularının uygun şekilde yalıtılması, su tutma tankları gibi suyun durgunlaştığı alanların ortadan kaldırılması ve *Legionella* büyümesini destekleyen malzemenin en aza indirilmesi gerekmektedir. 55-59 C sıcaklıklar ve 20 C' nin altındaki soğuk suda *Legionella* türlerinin tespit edilme ihtimalinin oldukça düşük olduğu belirtilmektedir. *Legionella* türleri tespit edildiğinde ise hastalık riskini azaltmak amacıyla monokloramin, ısı, ultraviyole ışık, bakır-gümüş iyonizasyonu ve klorlama gibi yöntemler kullanılmaktadır (Chambers vd. 2021).

Hastaneler Lejyoner hastalığı yönünden riskli kişilerin bulunduğu ortamlar olmaları nedeniyle, LD bakımından etkin kontrol programlarının uygulanması zorunlu hale gelmektedir. Kontrol programında iki önemli etkenden biri, hastane su sistemlerinin *Legionella* kolonizasyonu yönünden değerlendirilmesi ve su tesisatında koruyucu önlemlerin alınmasıdır. Diğer etken ise, hastalarda görülen aktif vaka sürveyansının izlenmesi ve şüpheli belirtiler görüldüğünde hastalara *Legionella* yönünden tanı testlerinin yapılmasıdır (Solmaz ve Solmaz 2020).

WHO, su sistemlerinde *Legionella'* nın önlenmesi için çeşitli belgeler yayınlamıştır. *Legionella* konsantrasyonundaki değişimleri değerlendirmek için, *Legionella* seviyesinin düzenli olarak kontrol edilmesi WHO tarafından tavsiye edilmektedir (Diaz-Flores vd. 2015).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Legionella bakterileri sularda ve doğal çevrede yaşamaları ve çok gelişmiş bir yaşama ve çoğalma mekanizmasına sahip olmalarından dolayı insanlarda ölümle sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara sebep olmaları nedeniyle bakterilerin sularda izolasyonu, identifikasyonu ve tiplendirilmeleri epidemiyolojik yönden önem taşımaktadır. Bu amaçla dünyanın çeşitli ülkelerinde ve Türkiye’ de serolojik yönden araştırılan surveyans çalışmaları yapılmış olup bu çalışmalar, *Legionella* bakterilerinin serogrup ve subgrupların dağılımında ülkelere göre çok fazla çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Legionella enfeksiyonunu diğer pnömonilerden ayırtetmek oldukça zordur. *Legionella* enfeksiyonunun tanımlanmasında kullanılan kültür, üriner antijen, serolojik yöntemler, doku ve kan sıvısından bakteri bulunması ayrıca PCR gibi moleküler yöntemler bulunmaktadır. Populasyonda seroprevalans düzeyini belirlemek amacıyla serolojik testlerin oldukça önemli olduğu kabul edilmektedir (Graham vd. 2020).

Yapılan bir çalışmada, birbirleri ile bağlantıları olmayan, klinik ve çevresel örneklerin serogrup ve subtipleri karşılaştırılmıştır. Hastadan ve içme suyundan izole edilen örnekler çalışmaya alınmıştır. Monoklonal antikorlar kullanılarak serotipleri ve subgrupları belirlenmiştir (Luck vd. 1998).

2003-2007 yılları arasında İsrail'in farklı şehirlerindeki otel, hastane, yaşlı bakım evi ve sağlık kurumundan alınan su örneklerinin serogrup ve subgrupları belirlenmiştir. İsrail’de *L. pneumophila* SG-3’ün SG-1’e göre daha baskın serogrup olduğu belirtilmiştir. En fazla otellerde, sonra sırasıyla hastane, yaşlı bakım evleri, sağlık kurumları ve diğer farklı yerlerden alınan su örneklerinde *Legionella* bulunmuştur. Bunların hepsi sıcak-soğuk, merkezi içme suyu sistemlerine sahip olan ve düzenli dezenfeksiyon yapılmadığı için *Legionella* bakterilerinin yaşaması ve çoğalmasına uygun yerlerdir. Bu durum toplu halde insanların yaşadığı kalabalık yerlerin ve su sistemlerinin yapısının *Legionella* bakımından daha riskli olduğunu göstermektedir (Yarom vd. 2010).

Yapılan başka bir çalışmada, Tayvan ve diğer ülkelerde SPA sularının sebep olduğu enfeksiyonlardan dolayı su örnekleri incelenmiş ve SG-1 olmayan *L. pneumophila* bulunmuştur. Ancak hastaların üriner antijen testlerinde sadece SG-1 antijeni tespit edilmiştir. Üriner antijen testleri sadece SG1 tespit edilmesine uygun olduğundan, diğer serogrupların kayba uğramış olduğu düşünülmüştür (Chang vd.2010).

Japonya’da yapılan bir çalışmada banyo, soğutma kuleleri ve topraktan alınan çevresel örnekler MAb ve SBT tiplendirme ile tanımlanmıştır. Banyo suları ve topraktan alınan örneklerde SG-1 baskın düzeylerde bulunmuştur. *L.pneumophila* SG-1’in 9 subgrubu: Allentown/France, Bellingham, Benidorm, Camperdown, Heysham, Knoxville, OLDA, Oxford ve Philadelphia olarak tespit edilmiştir. Klinik ve çevresel örneklerde farklı serogrupların olduğu gözlenmiş, ayrıca *Legionella*’nın toprakta önemli risk faktörü olduğu belirtilmiştir. Çeşitli ülkelerde buna benzer yapılan çalışmalarda saksı toprağı ve gübrelenmiş toprakta *L. pneumophila* SG-1 bulunmuştur. Bu durumun aydınlatılması için toprak ile daha fazla örnek çalışılmasının önemi vurgulanmıştır (Amemura-Maekawa vd. 2012).

Serotipleme yapılan başka bir çalışmada, İsveç’in Lidköping şehrinde soğutma kulesinden ve salgın sırasında hastanede yatan hastadan alınan klinik örnekler çalışılmıştır. Çalışmalarda hem klinik hem de soğutma kulesi örneklerinde *L. pneumophila* SG-1 in Benidorm, Bellingham, Portland ve OLDA subgrupları bulunmuştur. Soğutma kulelerinin bu salgında etkili olduğu ve aerosol yoluyla *Legionella* yayılmasında rol oynadığı belirtilmiştir (Ulleryd vd. 2012).

İspanya’da Lejyoner hastalığının yüksek oranlarda olması nedeniyle Catalan ve Valenciana bölgelerinde klinik ve çevresel örneklerde *L. pneumophila* araştırması yapılmıştır. MAb (monoklonal antibody) ve SBT (sequence based typing) yöntemleri kullanılarak serolojik tiplendirme yapılmıştır. Hastane kaynaklı klinik örnekler ve hastaneye ait su sistemlerinden alınan örnekler arasında yüksek oranda benzerlik olmasının, bakterinin virölans kapasitesinden çok, su örneklerde bakterinin daha fazla miktarda bulunması ve bunlara hastaların duyarlılığından kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir (Quero vd. 2018).

2000-2019 yılları arasında 132 otele ait oda, yüzme havuzu, banyoların sıcak ve soğuk su sistemlerinden alınan örneklerde *Legionella* analizi yapılarak, lateks aglütinasyon testi ile serogrupları tanımlanmıştır. Çalışmada ECDC' nin yıllık kayıtlarına göre belirlenen vakaların sadece %10'unun kültürle doğrulanmakta olup, muhtemelen diğer *Legionella* türlerinin göz ardı edildiği ayrıca Lejyoner hastalığının, %80'den fazlasının *L. pneumophila* serotiplerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Papadakis vd. 2021).

Türkiye' de ise, su sistemlerinde bulunan *Legionella* oranları ile ilgili istatistiksel veriler olmamasına rağmen, çeşitli şehirlerde bulunan otel, hastane gibi su sistemlerinde *Legionella* analizi ve serolojik tiplendirmesi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Yavuz 2018).

1998 yılında İstanbul' da 3 eğitim hastanesine ait depo ve musluk sularında *Legionella* analizi yapılmıştır. 61 örneğin dahil edildiği çalışmada su örneklerine membran filtrasyon ve kültür yöntemi uygulanmıştır. 13 depo suyunda *Legionella* tespit edilmemiştir. 48 musluk suyunun 4' ünde *Legionella* bulunmuştur. Bunların 3' ü *L. pneumophila* SG-1 ve diğer 1 örnekte ise *Legionella* species olduğu saptanmıştır (Köksal vd. 2002).

1995-1997 yılları arasında Ege ve Akdeniz Bölgeleri' nde otel ve tatil köylerinden alınan su örnekleri ile *Legionella* analizi yapılmıştır. Bu çalışmaya dahil edilen oteller, Türkiye' ye tatil amacıyla gelip ülkelerine dönen ve çeşitli Avrupa ülkelerinde Lejyoner hastalığı tanısı konan hastaların konakladığı ve oteller olup, hastalığa sebep olabileceğinin bildirilmesi üzerine araştırılan oteller olması bakımından önemlidir. Bu bildirimler, WHO ve Avrupa çalışma grubu olan EWGLI (European Working Group of *Legionella* Infection) tarafından seyahat ilişkili Lejyoner hastalığı surveyans araştırmalarının yürütülmesi sırasında, PHLS (Public Health laboratory Service) Communicable Disease Surveillance Centre-London tarafından yapılmıştır. Serolojik tiplendirme çalışmaları ile otellerde farklı *L. pneumophila* serogruplarının olduğu görülmüştür. Bu çalışma ile oteller ve vakalar arasında epidemiyolojik bağlantı saptanmamasına rağmen, Lejyoner hastalığı görülen kişilerin konakladığı otellerin araştırılması yönüyle önemli olduğu belirtilmiştir (Akbaş vd. 1999).

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin değişik servislerinden alınan su örneklerinde *Legionella* analizi yapılmıştır. Özellikle çocuk sağlığı ve hastalıkları anabilim dalı servislerine ait su örneklerinde 1 örnekte *L. pneumophila* SG-1 ve 1 örnekte ise *Legionella* species, ayrıca anesteziyoloji ve reanimasyon birimlerindeki musluk sularında ise *Legionella* species bulunmuştur. Üreme görülen su deposundan dağılan klinik birimlerin su sistemlerinde *Legionella* üremesi gözlenmediği belirtilmiştir (İğnak ve Gürler 2012).

Ege bölgesinde İzmir, Aydın, Muğla illeri ve Bodrum'da bulunan turistik otellerin musluk, soğutma kulesi, jakuzi gibi su sistemlerinden alınan örneklerde *Legionella* analizi yapılmıştır. Lateks aglütinasyon ile *L. pneumophila* SG 2-14 oldukları bulunan örneklerin serogrupları DFA yöntemi ile belirlenmiştir. Serogruplarda oldukça çeşitlilik olduğu gözlenmiştir. *L. pneumophila* SG-1, Lejyoner hastalığının en önemli etkeni olmasına rağmen, turizm bölgelerinde diğer serogrupların da yaygın olduğu ve hastalığın araştırılması bakımından serogrupları belirlemenin önem taşıdığı vurgulanmıştır (Afacan vd. 2006).

Alanya' da yeni açılan otelde görülen *Legionella* salgını nedeniyle, otelin su sistemlerine ait sular ve klinik örnekler birlikte araştırılmıştır. Gerekli veriler yeterli toplanamaması ve ayrıntılı testler yapılamamasına rağmen, salgının oteldeki su sistemlerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu nedenle yeni açılan otellerde su sistemlerinin Lejyoner hastalığı bakımından risk taşıdığı belirtilmiştir (Erdoğan ve Arslan 2013).

L. pneumophila' nın pnömoniye yol açma yeteneğinin makrofajlara ve monositlere saldırarak bu hücreler içinde replikasyon yapma yeteneğine bağlı olduğu belirtilmektedir (Tachibana vd. 2013). *L. pneumophila'* nın makrofaj ve monositler dışında epitel hücrelerde virülans etkileri olduğu gösterilmiştir (Yan ve Cirillo 2004). *L. micdadei'* nin insan monositleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır ve çoğalmak için özellikle monositleri tercih ettikleri gözlenmiştir (Weinbaum vd. 1984). İnsan makrofaj hücre benzeri olan U937 hücrelerinde *L. pneumophila'* nın büyümesi araştırılmış, bu hücrelerin *L. pneumophila'* nın virulent ve virulent olmayan suşlarında intrasellüler hücre büyümesine imkan sağladıkları bildirilmiştir (Pearlman vd. 1988).

L. pneumophila'nın farklı hücre hatlarında, invazyon ve intrasellüler replikasyonu sırasında morfolojik özelliklerinde değişiklikler gözlenmiştir. Çalışmalar, adezyon ve invazyon arasında pozitif ilişki olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Makrofaj benzeri ve fagositik olmayan hücrelerde bakterinin hücreye girişinde farklı mekanizmaların rol oynadığı ve *L. pneumophila*'nın makrofaj benzeri hücrelere, fagositik olmayan hücrelere göre daha kolay girebildiği gösterilmektedir. Makrofajların bakterinin yapışması bakımından daha avantajlı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca fagositoz yapmayan hücrelerde *L. pneumophila*'nın invazyonunda farklılıklar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar mikrofilament ve aktin polimerizasyonu gibi hücrenin yapısal bütünlüğünü sağlayan faktörlerin, non-fagositik hücrelere *L. pneumophila* alımında önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Hücrelere bakteri girişindeki farklılıkların hücre iskeleti ve membran yapısındaki karakteristik farklardan kaynaklandığı ve bunlarla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Xiong vd. 2017).

1996 yılında yapılan bir çalışmada *L. pneumophila*'nın virülans etkili proteinleri olan Mip ve Msp proteinlerinin apoptoza etkileri HL-60 hücrelerinde araştırılmıştır. Bu çalışma ile *L. pneumophila*'nın HL-60 hücrelerinde apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Müller vd. 1996).

1998 yılında yapılan bir çalışmada *L. dumoffii*'nin alveoler epitel hücrelere girişi in vitro olarak A549 hücrelerinde çalışılmıştır. *L. dumoffii*'nin insan akciğer hücrelerine girebildiği, alveoler makrofajlar dışında tip I ve II alveoler epitel hücrelerde yaşadıkları ve çoğaldıkları gösterilmiştir. *L. dumoffii*'nin alveoler epitel hücrelerini istila ederek insanda pnömoniye yol açtıkları belirtilmiştir. *Legionella*'nın hem fagositik tip I hem de fagositik olmayan tip 2 alveoler epitel hücrelerde bulundukları açıklanmıştır. Bu sonuç, *L. dumoffii*'nin in vivo ortamda insan akciğer hücrelerine girebildiği görüşünü desteklemektedir (Maruta vd. 1998).

Büyüme fazının sitotoksositeye etkisini belirlemek amacıyla makrofajlar *L. pneumophila* ile enfekte edilerek, makrofaj canlılığı kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir. *L. pneumophila* etkili sitotoksitenin, büyüme fazıyla bağlantılı olduğu açıklanmıştır. *L. pneumophila*'nın, post-eksponansiyel fazda iken, eksponansiyel faza göre daha hareketli,

bulaşıcı ve makrofajları öldürücü etkisinin olduğu belirtilmiştir. *L. pneumophila*'nın virülansını nasıl düzenlediğinin bilinmesinin, patojenin sulardan ve enfekte olmuş akciğerden yok edilmesi amacıyla önlemlerin alınmasında gerekli olacağı düşünülmektedir (Byrne ve Swanson 1998).

1999 yılında yapılan bir çalışmada *L. micdadei* ve *L. pneumophila*'nın amip ve makrofaj hücrelerindeki virülans özellikleri ve replikasyon yapabilme özellikleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre *L. micdadei* ve *L. pneumophila* türlerinin birbirlerinden farklı özelliklere sahip olmaları nedeniyle taksonomik olarak ayrı oldukları belirtilmektedir. *L. micdadei* ve *L. pneumophila* virulansla ilgili ortak özelliklere sahip oldukları gibi farklılıklarda bulunmaktadır. *L. micdadei*, *L. pneumophila* gibi flagella, asit fosfataz ve mip kodlamakta ancak fosfolipaz C ve zinc metalloproteinaz enzimleri bulunmamaktadır. Bu enzimlerin *L. pneumophila* virulansında önemli olduğu düşünülmektedir. Aralarında diğer fark ise *L. micdadei*'nin kıvrımlı fagositoz (coiling) ile makrofajlara girmesidir. Bu nedenle konak hücrede ER ile etkileşim yaptıkları gözlenmemektedir. Bu türlerin amip ve makrofajlarda replikasyon yapabilmeleri için farklı özelliklere sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır. Böylece *Legionella* türlerinin konak hücreleri enfekte etmek için farklı yollar izledikleri açıklanmıştır. *L. micdadei* ve *L. pneumophila* benzer virulans faktörler kodlamalarına rağmen *L. micdadei*'de bunlardan bazılarının eksik olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle de konak hücreleri enfekte etme ve sitotoksitede *L. micdadei*'nin alternatif bir strateji kullanmış olabileceği düşünülmektedir (Joshi ve Swanson 1999).

L. pneumophila'nın, makrofajlar ve alveoler epitel hücrelerde replikasyon ve sitopatojeniteye etkileri farklı enfeksiyon süreleri uygulanarak araştırılmıştır. Bu durum bakteri sayısının artması ve bakteriyel ürünlerin birikmesinin sitopatojenite için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Sitopatojenitenin WI-26 tip I alveoler epitel hücrelere etkilerinin, makrofajlar ile benzer sonuçlar gösterdiği açıklanmıştır. Mutant bakterilerin intrasellüler replikasyon yapmalarına rağmen, apoptoz ve sitopatojenite yeteneklerinin olmadığı gösterilmiştir. Makrofaj ve alveoler epitel hücrelerde, sitopatojenitenin doz bağımlı olduğu belirtilmiştir. Apoptozla birlikte bakterinin sitotoksik etkiye yol açtığı, alveoler epitel hücreler ve makrofajlarda hızlı nekroza sebep olduğu gösterilmiştir (Gao ve Abu Kwaik 1999a).

L. pneumophila'nın U937 makrofaj benzeri monosit hücre hattı, alveoler epitel hücreler ve periferik kan monositlerinde doz bağımlı apoptozu indüklediği başka bir çalışmada gösterilmiştir. Apoptozun başlaması ile *L. pneumophila* sitotoksik etkiye neden olmakta, eksponansiyel fazdan çıkarak hızlı şekilde nekrozu başlatarak post-eksponansiyel büyüme fazına girmektedir. Farklı büyüme evrelerinde *L. pneumophila*'nın apoptozu indüklediği, bakteri büyümesine bağlı olarak apoptozun artmasının, post-eksponansiyel faza ulaşan bakterilerin hücrelere saldırmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Replikasyonun bitmesinden 24 saat sonra, durağan faza geçen bakterilerin canlılığının üç kat azalmasıyla apoptozun uyarılması da azalmaktadır. Isıyla öldürülen bakterilerin ise apoptoza neden olmadıkları gözlenmiştir. Hücre dışındaki *L. pneumophila*'nın, U937 hücresinde apoptozu indüklediği ve ekstrasellüler bakteri istilasının apoptoz sürecinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Gao ve Abu Kwaik 1999b).

Yapılan diğer çalışmada, *L. pneumophila*'nın sıçan alveoler makrofaj hücreleri olan MH-S hücrelerine etkileri incelenmiştir. *L. pneumophila* enfeksiyonu sonucu, makrofajlarda sitokin cevabının düzenlenmesi araştırılmıştır. Virülent etkiye sahip *L. pneumophila*'nın alveoler makrofajlarda IL-12 üretimini, diğer sitokinlere göre daha az uyardığı gösterilmiştir (Matsunaga vd. 2001).

Başka bir çalışmada, gine domuzu *L. Longbeachae* SG-1' in klinik izolatu ile aerosola maruz bırakıldıktan sonra, *L. pneumophila*'nın hastalık ve ölüme neden olduğu açıklanmıştır. *L. longbeachae* SG-1' in, U937 makrofaj hücrelerinde replikasyon yapabildiği, Mono Mac-6 (MM6) makrofaj hücrelerinde ve amip türü olan *Acanthamoebae castellanii*' de ise replikasyon yapamadıkları belirlenmiştir (Doyle vd. 2001).

L. longbeachae' in HL-60 hücrelerinde büyüme ve sitotoksik etkileri, klinik izolat A5H5 ve mip mutant suşu olan B8 kullanılarak ve MTT yöntemi ile araştırılmıştır. *L. longbeachae*' in hücreyi enfekte etmesi sonucunda hücrenin apoptoza uğradığı, böylece doza bağımlı sitotoksik etkinin HL-60 hücrelerinde ölüme neden olduğu açıklanmıştır (Arakaki vd. 2002). *Legionella* bakterilerinin insan monosit hücrelerinde apoptoza neden olduğu Mono Mac 6 (MM6) hücre hattında gösterilmiştir. Apoptoz düzeyinin doz ve

virülansa bağlı olduğu, apoptozun, bakterinin hücre içi replikasyonundan çok hücreye adezyonu ile artış gösterdiği belirtilmiştir (Neumeister vd. 2002).

L. pneumophila SG-1, *L. micdadei* Rivera, *L. dumoffii*' yi içeren grup-1 ve *L. longbeachae* suşlarından oluşan grup II arasında apoptoz indüksiyonu, gözenek oluşturma aktivitesi ve hücre içi büyüme gibi virulans özelliklerin hücre ölümüne etkileri, U937 makrofajlarında karşılaştırılmıştır. Sitopatojenitede önemli rol oynayan gözenek oluşturma aktivite ve hücre içi büyümenin, patojenik bakterilerde meydana geldiği gözlenmiştir. *L. dumoffii* ve *L. micdadei* Rivera' nın patojen olmalarına rağmen gözenek oluşturmaları gözlenmiştir. Bu nedenle por oluşturma sitopatojeniteden sorumlu tek faktör olmadığı, *L. pneumophila*' nın tanımlanması ve teşhisine yardımcı olabileceği belirtilmiştir. *L. longbeachae* serogrup-1, U937 makrofajlarında replikasyon yaparken, Mono Mac-6 makrofajları ve *Acanthamoebae castellanii*' de replikasyon olmamıştır. Sonuçlara göre patojenik özelliklerin, türler arasında heterojenlik gösterdikleri açıklanmıştır. Apoptoz indüksiyonu, gözenek oluşturma ve hücre içi büyümede varyasyon olmasının, *Legionella* türlerinin insidansındaki değişkenliği belirleyen etken olabileceği belirtilmiştir (Alli vd. 2003).

2004 yılında sıçan alveoler makrofaj hücrelerinde (MH-S) yapılan çalışmada, *L. pneumophila*' nın monosit ve alveoler makrofajlarda replikasyona uğradıkları, özellikle enfeksiyon sırasında alveolar makrofajlarda yerleştikleri gösterilmiştir (Yan ve Cirillo 2004).

2008 yılında yapılan çalışmada A549 alveoler epitel hücrelerde *L. pneumophila*' nın intrasellüler büyümesi ve enfeksiyonu gösterilmiştir. Virulent suşlarda intrasellüler büyüme gözlenmiş, virulent olmayan dotO mutantlarının çoğalmadıkları gözlenmiştir. *L. pneumophila* ' nın doz ve zamana bağlı olarak sitotoksitedeki artışının, alveoler epitel hücrelerde hasara neden olduğu açıklanmıştır (Furugen vd. 2008).

Büyüme fazının sitotoksitedeki etkisini anlamak amacıyla, bakteri farklı besiyerlerinde bekletildikten sonra makrofajlara enfekte edilmiş ve hücre canlılığı araştırılmıştır. Ekspansiyel büyüme fazında iken bakterinin daha az yayılma özelliği gösterdiği

ve makrofajları öldürmediği, post-eksponansiyel fazda ise makrofajları öldürücü etkisinin olduğu gözlenmiştir. *L. pneumophila*'nın filament yapısının bakterinin virülans özelliğini etkilediği, bu durumun alveoler epitel hücrelere yayılmasını sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle flagellanın, bakterinin patojenik özelliğini arttırdığı düşünülmektedir (Prashar vd. 2012).

Japonya' da farklı ortamlardan (8 ayak spa merkezi, 7 kaynak suyu, 4 koy suyu, 3 gölet suyu) alınan 22 su örneğinin analizinde Hepsi *L. pneumophila* pozitif olan 5 örnekten 3' ü ayak spa merkezindeki su örneğinde saptanmıştır. Bakterilerin serotiplendirmeleri yapılmış ve PCR ile virulans etkileyen gen bölgeleri (lvhB3, rtxA, hsp60, dotaA) belirlenmiştir. HeLa hücreleri ve THP-1 hücrelerinde intrasellüler büyüme ve sitotoksik etkileri LDH (Lactate dehydrogenase) yöntemi ile araştırılmıştır. 1 saat enfeksiyondan sonra, 2 ayak spa merkezi suyu ve 1 kaynak suyundan izole edilen 3 suşun HeLa hücresine invazyonun, virulans etkili referans Lp02 suşuna göre 10 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. 24 ve 48 saat sonra intrasellüler bakterilerin hücre içi büyüme sayısı belirlenmiştir. 24 saat enfeksiyondan sonra, 2 ayak spa merkezi suyu ve 1 gölet suyundan izole edilen 3 suş, oldukça büyüme göstermiş ve intrasellüler sayısı Lp02 referans suşa göre 10 kat artmıştır. 24 ve 48 saat enfeksiyonda 3 suş yüksek sitotoksik etkiye neden olmuş, 24 saat enfeksiyonda hücrelerin zarar gördüğü tespit edilmiştir. 48 saat enfeksiyonda ise bütün suşların sayısı azalmıştır. Bütün suşlar THP-1 hücrelerinde yüksek sitotoksik etkiye neden olmuştur. Özellikle ayak spa merkezinden izole bir suşun hem HeLa hem de THP-1 hücrelerinde intrasellüler büyüme meydana gelmiş ayrıca yüksek sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir. lvhB3, rtxA, hsp60, dotaA virulans faktörler bütün suşlarda tanımlanmasına rağmen, intrasellüler büyüme ve sitotoksik etki ile aralarındaki bağlantı bilinmemektedir. Bu virulans faktörlerin insanlarda patojenik etkiye neden olacağı belirtilmektedir. Sitotoksik etkisi yüksek olan suşun, sularda ilk izolasyonda konsantrasyonunun standart seviyenin üstünde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile ayak spa mekezinin *Legionella* enfeksiyonuna sebep olabileceği belirtilmiştir (Tachibana vd. 2013).

L. dumoffii'nin makrofajlar dışında A549 alveoler epitel hücrelere saldırdığı ve hücrelere girerek çoğaldığı gösterilmesi üzerine, aynı bakterilerin A549 hücrelerine saldırma ve

hücrede çoğalma yeteneklerinin mekanizmalarını moleküler düzeyde araştırmak amacıyla çalışma yapılmıştır. TraC geninin HeLa ve A549 hücrelerine tutunma, saldırma ve hücre içinde büyümede rolü olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar *L. dumoffii* Tex-KL suşunda TraC ve TraD operonlarının epitel hücrelere invazyonda önemli olduklarını belirtmişlerdir. *L. dumoffii* ilk olarak 1977 yılında hem soğutma kulesinde alınan su örneğinde hem de pnömoni nedeniyle ölen kişinin akciğer dokusundan izole edilmiştir. İlk olarak tipik olmayan *Legionella* benzeri organizma olarak tanımlanmış daha sonra yeni bir tür olarak sınıflandırılarak *L. dumoffii* şeklinde adlandırılmıştır. *L. dumoffii* insanlarda Lejyoner hastalığının önemli etkeni olarak 4. veya 5. sırada yer almaktadır. Flagella, katalaz, jelatinaz gibi enzimleri bulunmakta ancak virülans faktörlerden olan lipaz, oksidaz, zinc metalloproteaz enzimleri bulunmamaktadır. *L. dumoffii*'nin A549 ve Vero hücrelerine saldırması ve hücre içi replikasyonu *L. pneumophila*'dan daha etkin olmaktadır. Ayrıca makrofajların ise, *L. pneumophila* büyümesinde epitel hücrelerden daha etkili oldukları belirtilmektedir (Tian vd. 2016).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Su Örnekleri

Analizi yapılacak su örnekleri, 1000 ml' lik steril kahverengi kaplara alındıktan sonra 48 saat içinde laboratuvara gönderilmişlerdir (Akbaş vd. 1999). 24-48 saat içinde gönderilen örnekler için soğuk zincir gerekli olmamaktadır. Örnekler uygun bir taşıma kabına düzgünce yerleştirilmeli, şişe veya cam tüplerin kırılmaması ve dökülmemesi için gerekli önlem alınmalıdır. Laboratuvara gelen su örnekleri hemen çalışılmalı, bekletilmesi gereken durumlarda ise mutlaka buzdolabında saklanmalıdırlar (Anonim 2014).

3.1.2 Besiyerleri

BCYE (Buffered charcoal yeast extract) ve DGVP (Dye-glycine-vancomycin-polymyxin B) besiyerleri, kimyasal maddeler gerekli miktarlarda tartılarak erlen içerisinde hazırlandı (Şekil 1 ve 2). *Legionella* analizinde kullanılan BCYE ve DGVP besiyerleri çevresel su örneklerinde bulunan çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkenler içerir. BCYE antifungal maddeler içerir, bu nedenle özellikle soğutma kuleleri ve içilemeyen su örneklerine uygulanan kültür yönteminde kullanılır (Pierre vd. 2017). BCYE, *Legionella* türlerinin izolasyonu için ideal ortam sağlamaktadır. Suda yaşayan diğer mikroorganizmaların üremesini engellemek amacıyla ise, glisin ve antibiyotik içeren DGVP kullanılmaktadır (Akbaş vd. 1999, Anonim 2014). DGVP agar, Dye-glycine-vancomycin-polymyxin B içermesinden dolayı, su florasında bulunan diğer organizmaları inhibe etmede oldukça etkilidir. Ayrıca düşük konsantrasyonlu antibiyotik içerdiği için kullanımı avantajlıdır (Zhan vd. 2014).



Şekil 3.1 Besiyeri için kimyasal maddelerin tartılması



Şekil 3.2 Besiyerinin erlen içinde hazırlanması

3.2 Yöntem

3.2.1 Suların filtrasyonu ve ön işlemler

Su örneklerinin alınma yerlerine göre uygulanan farklı yöntemler Çizelge 3.1' de görülmektedir (Zhan vd. 2014, Anonim 2014).

Su örneklerinin filtrasyonu ve ekim öncesi işlemlerde; direkt ekim, asit uygulama ve filtrasyon sonrası asit uygulama şeklinde 3 farklı yöntem uygulandı.

3.2.1.1 Soğutma kulesinden alınan su örneklerinde ekim

Direkt Ekim: 0.1 ml su örneği BCYE ve DGVP besiyerleri üzerine direkt olarak pipetlendi. Steril L-öze kullanılarak yayma ekimi yapıldı.

Asit Uygulama: Cam kapaklı tüp içinde hazırlanan 2 ml. HCl-KCl (pH 2.2) asit çözeltisi içine, 2 ml su örneği ilave edildi; tüp vortekslendi. 3 dakika bekletildi, tekrar vortekslendi. Pipetle tüpten 0.1' er ml alınarak BCYE ve DGVP besiyerleri üzerine damlatıldı. Steril L-öze ile yayma ekimi yapıldı.

3.2.1.2 Sıcak ve soğuk su tanklarından alınan su örneklerinde ekim

Direkt Ekim: 0.1 ml su örneği BCYE ve DGVP besiyerleri üzerine direkt olarak pipetlendi. Steril L-öze ile yayma ekimi yapıldı.

Filtrasyon ve Asit Uygulama: Su örneğinin 50 ml' si 0,45 µm filtre kağıdı kullanılarak, filtrasyon cihazında filtre edildi (Şekil-3). Filtre kağıdı, steril pens yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak, 5 ml steril distile su içeren kapaklı tüpün içine bırakıldı. Tüp 30 sn vortekslendi. Bu tüpten 2 ml örnek alınarak, 2 ml HCl-KCl (pH 2.2) asit çözeltisi içeren tüpe aktarıldı (Zhan vd. 2014). Tüp vortekslendi, 3 dakika bekletildi, tekrar vortekslendi.

Tüpten 0.1' er ml örnek alınarak, BCYE ve DGVP besiyerlerine pipetlendi. Steril L-öze ile yayma ekimi yapıldı.

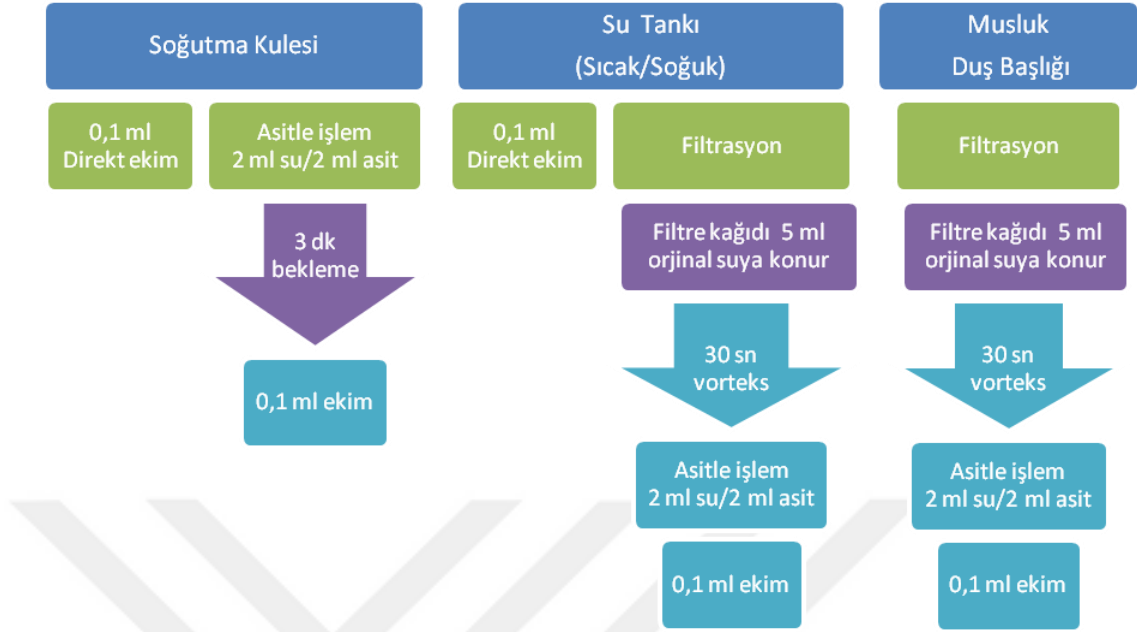


Şekil 3.3 Suların filtre edildiği filtrasyon cihazı

3.2.1.3 Musluk ve duşlardan alınan su örneklerinde ekim

Filtrasyon ve asit uygulama: Su örneğinin 50 ml.si 0.45 μ m por çaplı selüloz asetat filtre kağıdı kullanılarak, filtrasyon cihazında filtre edildi. Filtre kağıdı steril pens yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak, 5 ml steril distile su içeren kapaklı tüpün içine bırakıldı. Tüp 30 sn vortekslendi. Bu tüpten 2 ml örnek alınarak, 2 ml HCl-KCl (pH 2.2) asit çözeltisi içeren tüpe aktarıldı (Akbaş vd. 1999). Tüp vortekslendi, 3 dakika bekletildi, tekrar vortekslendi. Tüpten 0.1' er ml örnek BCYE ve DGVP besiyerlerine pipetlendi. Steril L-öze ile yayma ekim yapıldı.

Çizelge 3.1 Suların filtrasyonu ve kültür öncesi ön işlemler



3.2.2 İnkübasyon

BCYE ve DGVP besiyerlerine ekimleri yapılan petrilere, 37 °C ve nemli ortam içeren etüvde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.4- 3.5).



Şekil 3.4 *Legionella* kültüründe kullanılan etüv



Şekil 3.5 Etüvde besiyerine ekimi yapılan petriler

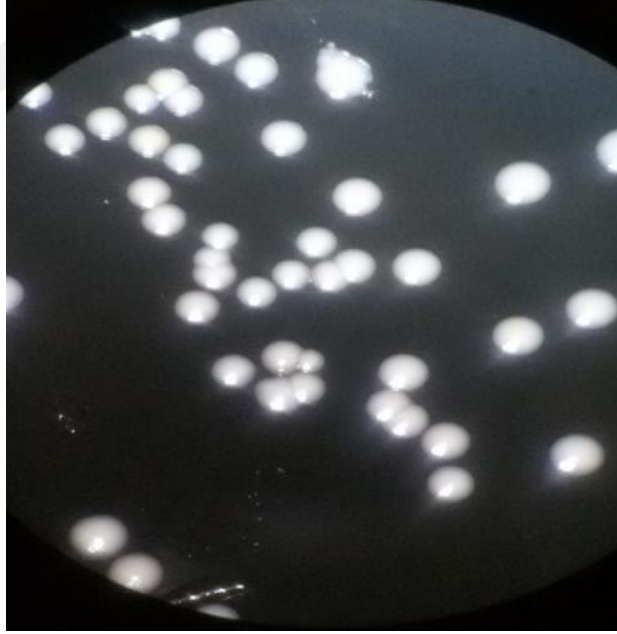
3.2.3 Mikroskopik identifikasyon

Legionella kolonilerinin birçoğu 5 gün inkübasyon sonunda koloniler görülmektedir. *Legionella* suşlarının yaklaşık %90' ı ise, 3. günden sonra besiyeri plaklarında görülmeye başlamaktadırlar (Zhan vd. 2014).

Legionella bakterileri morfolojik olarak; yüzeyleri düzgün, hafif bombeli, merkezleri gri-beyaz, kenarları yeşil, mavi, mor veya pembe, buzlu cam gibi parlak yapıdadırlar (Vural ve Er 1999, Zhan vd. 2014). Dış görünüşleri bakımından benzeyen *Legionella* şüpheli bakteriler, koloni mikroskopunda (Olympus SZ-40) incelendiler (Şekil 3.6). Koloni mikroskopunda *Legionella* bakterileri, Şekil 3.7' de görüldüğü gibi mat olmayan, parlak, canlı ve ısıltılı yapılar şeklinde görülmektedir. Şüpheli *Legionella* kolonilerini doğrulamak için, aynı anda hem BCYE hem de TSA (Tryptic Soy Agar) veya kanlı besiyerine ekimleri yapıldı. Bu amaçla aynı koloniden steril öze ile alınarak bir kısmı BCYE ve bir kısmı sistein içermeyen besiyerine ekim yapıldı. *Legionella*, kanlı agar ve TSA' da sistein olmadığından üremeyeceği için (McDade vd. 1977), sadece BCYE' de üreyen kolonilerin *Legionella* olduğuna karar verildi (Akbaş vd. 1999, Anonim 2014).



Şekil 3.6 Koloni mikroskobu



Şekil 3.7 *Legionella*'nın koloni mikroskop görüntüsü

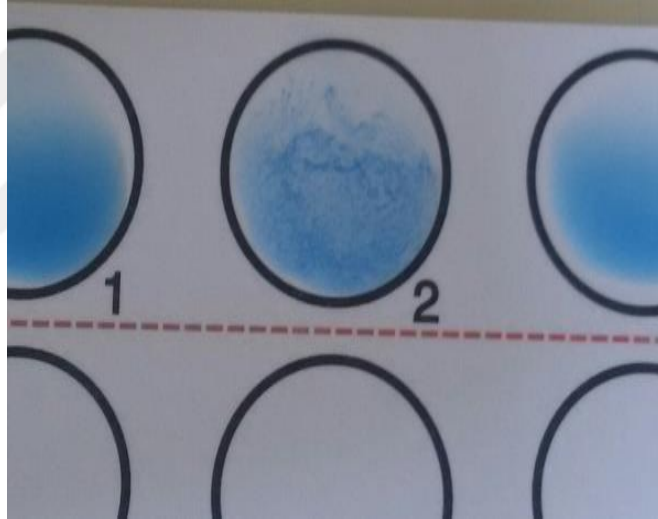
3.2.4 Lateks aglütinasyon testi

Koloni mikroskobunda morfolojik tanımlaması yapılan ve BCYE' de üreyen kolonilerin karakteristik *Legionella* bakterileri oldukları doğrulandıktan sonra, ileri tanımlama amacıyla aglütinasyon testi uygulandı. Ticari olarak hazırlanan *Legionella* Lateks aglütinasyon kitinde (Oxoid, Latex; Oxoid Limited, UK), *L. pneumophila* serogrup-1, *L. pneumophila* serogrup 2-14, diğer *Legionella* türlerini (*Legionella longbeachae* 1 ve 2, *Legionella bozemanii* 1 ve 2, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legionella jordanis*, *Legionella micdadei* ve *Legionella anisa*) saptamaya yönelik reaktifler, pozitif ve negatif kontrol, tampon sıvısı ve reaksiyon kartları bulunmaktadır (Şekil 3.8). Lateks aglütinasyon kiti, *Legionella*'nın belirli türlerine ve *L. pneumophila* serogrup 2-14 serotiplerine duyarlı olup, mavi lateks parçacıklar içerir. Bu parçacıklar, antikor aglütinat ile hassaslaştırılmış ve spesifik *Legionella* hücre duvarında bulunan antijenlerin varlığında görünür kümeler halinde aglütinasyon oluşturmaktadırlar. Böylece, patojenik *Legionella* türleri ve *L. pneumophila* serogrup 2-14 serotiplerinin hızlı ve kolay bir şekilde tanımlanması sağlanmaktadır. Pozitif reaksiyon, örnekte *Legionella*'ya karşı antijenlerin varlığını gösterir. Böylece bakterinin hangi serogruba veya türe ait olduğu belirlenmektedir.

Testin uygulanması şu şekilde yapılmaktadır: Tanımlanması yapılacak olan *Legionella*'nın BCYE' de üreyen kolonisinden plastik öze ile bir miktar alındı. Kit içindeki tampon sıvısı ile homojenize edilerek reaksiyon kartı üzerinde bulunan üç ayrı daire şeklinin içine gelecek şekilde dağıtıldı. *L. pneumophila* serogrup-1, *L. pneumophila* serogrup 2-14, diğer *Legionella* türlerini içeren 3 ayrı plazma sıvısı, her bir daire içinde bulunan örnek üzerine damlatıldı. 3-5 dakika yavaş şekilde ve dairesel hareketlerle çevrilerek aglütinasyon sıvısı ile bakterinin etkileşimi sağlandı. Aglutinasyon meydana gelen daire içine damlatılan plazma sıvısına göre *Legionella*'nın tür ve serogrubu belirlendi. Aglütinasyon, siyah kapaklı tüp damlatılan örnekte ise *L. pneumophila* serogrup-1, sarı kapaklı tüp damlatılan örnekte ise *L. pneumophila* serogrup 2-14, beyaz kapaklı tüp damlatılan örnekte ise *Legionella* species oldukları belirlendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.8 *Legionella* Lateks aglütinasyon kiti



Şekil 3.9 *Legionella* pozitif aglütinasyon görüntüsü

3.2.5 Direkt Floresan Antikor (DFA) testi

DFA, kültürden izolasyonu yapılan ve şüpheli *Legionella* kolonilerinin tanımlanması için kullanılmaktadır (Pierre vd. 2017). Ayrıca *L. pneumophila* SG-1' in subgruplarının belirlenmesinde monoklonal antikorların kullanılmasının önemli bir epidemiyolojik yöntem olduğu, çeşitli serogrup ve subgrupların prevalans çalışmalarında kullanıldıkları belirtilmiştir (Brindle vd. 1987).

Bu nedenle çalışmamızda *Legionella* izolasyonu için kültür yöntemi, serolojik tiplendirme ve subgrupların belirlenmesi için ise DFA yöntemi uygulanmıştır. Serotiplendirme yöntemi, *L. pneumophila*'nın lipopolisakkarit yapısına bağlı olup DFA'da kullanılan monoklonal antikorlar (MAb), serogruba spesifik olmalıdır. Ayrıca serogrupların birçoğu ortak antijene sahip olduklarından, çapraz reaksiyona sebep olan poliklonal antikorlar serumdan çıkarılmalıdır (Helbig vd. 1997).

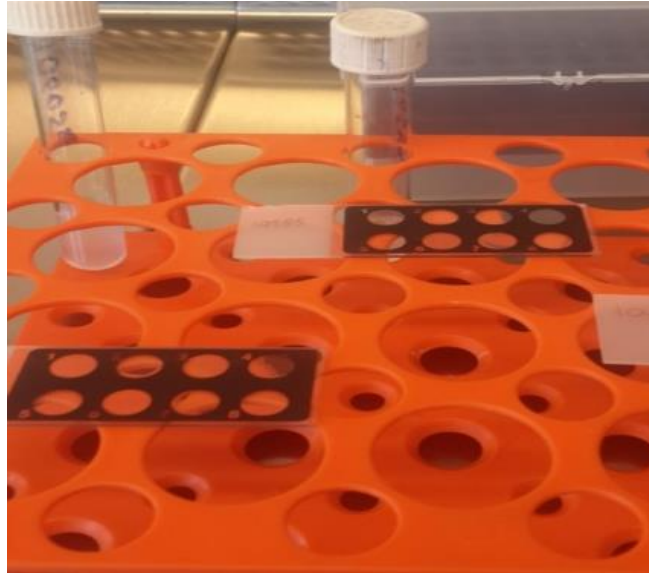
Lateks aglütinasyon testi sonucuna göre, *L. pneumophila* SG 2-14 olan örneklerin serotiplerini, *L. pneumophila* SG-1 olanların subtiplerini ve *Legionella* türlerini belirlemek amacıyla Direkt Floresan Antikor (DFA) yöntemi uygulandı. Bu test için m-TECH ticari kiti (Monoclonal Technologies Inc. Milton, GA) kullanılmıştır (Anonymus 2014).

Legionella tespit edilmesinde kültürün altın standart olduğu (Fricke vd. 2020), bütün *Legionella* tür ve serogruplarının kültür yöntemi ile tanımlanabileceği belirtilmiştir. DFA, deneyim gerektiren ve özellikle hızlı mikroskopik tanıda kullanılan bir test olup, *L. pneumophila* serogroup 1 tespitinde duyarlılığı %70 ve spesifikliğı yaklaşık %99'dır. DFA yöntemi hızlı sonuç vermesine rağmen, kültür yöntemine göre duyarlılığı düşüktür. Bunun nedeni mikroorganizmayı tespit etmek için alınan su örneğinin her ml sinde 10^4 ve 10^5 bakterinin olmasının gerekliliğinden kaynaklanmaktadır. Yöntemin özgüllüğü %98-99 olarak belirtilmesine rağmen poliklonal DFA konjugatları bazı pseudomonas suşları arasında çapraz reaksiyon vermekte ayrıca kontamine musluk suyu ile hazırlanmış DFA re ajanlerine bağlı olarak ortaya çıkan yalancı pozitif reaksiyonlar olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, monoklonal antikorlar kullanarak çapraz reaksiyon oluşumu önlenmektedir (Vural ve Er 1999).

DFA testinde, *Legionella* türleri ve serogruplarına karşı tavşanlardan elde edilen FITC (Fluorescein IsoThio Cyanate) ile işaretlenmiş antikorlar kullanılmaktadır. *Legionella*'nın hedef antijenine bağlanan floresan işaretli antikorlar ile spesifik bakteri antijenlerinin varlığı tespit edilmektedir. Test protokolüne göre, floresan işaretli monoklonal antikorlar, bakteri hücre duvarındaki antijene bağlandıktan sonra, floresan mikroskopunda yeşil renkte ışıma görülmektedir.

İlk olarak -70 °C derin dondurucuda saklanan bakteriler hızla çözündürülerek besiyerine ekimleri yapıldı. Besiyerinde üreyen saf *Legionella* kolonileri steril öze ile toplanarak, PBS (Phosphate Buffered Saline) içinde homojenize edildi (Feeley vd. 1979) ve berrak bir süspansiyon (McFarland No.1) hazırlandı. Testin yapılması için, saf *Legionella* kültürleri PBS içinde homojenize olacak şekilde, berrak bir süspansiyon (McFarland No.1) hazırlandı (Cherry vd. 1978).

Teflon kaplı lam üzerinde bulunan her bölmeye 20 µl pipetlendi. Alevde fıkse edildi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı (Şekil 3.10). DFA ticari kitinde bulunan antiserumlar vortekslendi, lam üzerinde kuruyan örneğe 20 µl damlatıldı. Lamlar 37 °C etüvde, nemli ortamda 30 dakika bekletildi. Etüvden çıktıktan sonra lamlar, PBS (phosphate buffered saline) dolu kapların içinde ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek yıkamaları sağlandı (Şekil 3.11). Sonra aynı şekilde distile su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldılar (Şekil 3.12). Tamamen kuruyan örnek üzerine Mounting Medium damlatıldı. Lamel kapatılarak floresan mikroskopta (Leica DM1000) incelendi (Palmer vd. 1993). Test sonucunu doğrulamak amacıyla deneyde örneklerle birlikte aynı zamanda pozitif ve negatif kontrol örnekleri de çalışıldı.



Şekil 3.10 Lamların kurutulması



Şekil 3.11 Lamaları PBS içinde yıkama

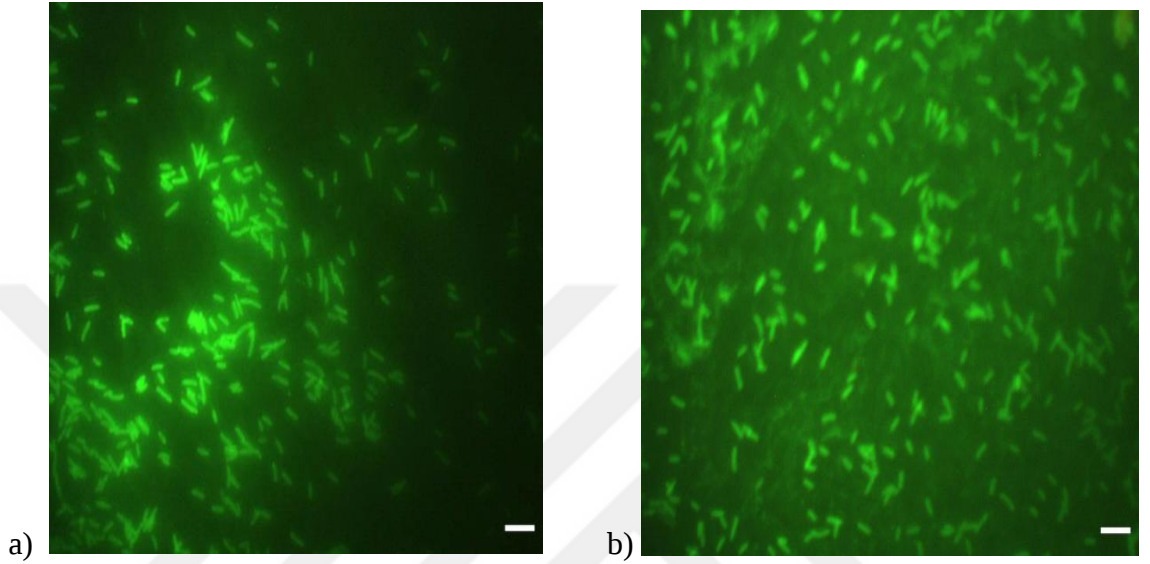


Şekil 3.12 Lamaların yıkama sonrası kurutulması

3.2.6 Floresan mikroskopta inceleme

Teflon kaplı lamalar, lamel kapatılarak floresan mikroskopta (Leica DM1000) incelendi. FITC işaretli antikor, örnekte bulunan *Legionella* antijenine spesifik olarak bağlanmaktadır. *Legionella* da uygun antijen yoksa, antikor reaktifi bağlanmaz ve yıkama sırasında temizlenir. FITC işaretli antikoru, incelenen *Legionella* da uygun antijene bağlanması sonucu, floresan ışığa ortaya çıkmaktadır. Şekil 3.13. a, b' de olduğu gibi, mikroskopta çubuk şeklinde ve parlak yeşil renkte görülen *Legionella* bakterilerinin, serogrup ve subgrubu, DFA kitinde kullanılan antikora göre belirlenmektedir.

Legionella nın hangi serogrup ve subgrupuna özel olarak hazırlanan hangi reajen, test edilen *Legionella* üzerine damlatıldıktan sonra ışıma ortaya çıkarsa, bu reajen belirlemek istediğimiz *Legionella* bakterisinin serogrubu ve subgrupunu tanımlamamızı sağlamaktadır.



Şekil 3.13. a, b *Legionella* nın floresan mikroskop görüntüsü (Scale Bar: 20 µm)

3.2.7 *Legionella* bakterilerinin saklanması

Legionella olduğu belirlenen koloni, BCYE agara ekilerek bakterinin çoğalması sağlandı. 37 °C ve nemli etüvde, birkaç gün içinde besiyeri yüzeyini kaplayacak şekilde çoğalan bakteri kolonisi, öze ile toplandı. Daha önce hazırlanan ve 2 ml' lik kapaklı tüplere konan %16 glycerol buyyonlu besiyeri içinde iyice homojenize edildi. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C derin dondurucuda saklamaya bırakıldı (Anonim 2014).

3.2.8 A549 hücresinin kültür ekimi

A549 ATCC hücrelerini kültüründe RPMI 1640 besiyeri kullanıldı (Steiner vd. 2019). Ticari olarak alınan ve 2 mM L-glutamine içeren RPMI 1640 sıvı besiyerine, %10 FCS (Fetal Calf Serum) ve %0,1 penicilline-streptomisin antibiyotiği eklendi (Steiner vd.

2019). Ayrıca, FCS yerine FBS (Fetal Bovine Serum)' de kullanılabilmektedir (Furugen vd. 2008, Tian vd. 2016). Hücre ekimi yapılmadan önce besiyerinin su banyosunda 36 °C' ye kadar ısınması sağlandı.

Sıvı azot tankında 2 ml vial içinde donmuş halde bulunan A549 hücresi, su banyosunda buzlu tam çözünmeyecek şekilde kısa süre bekletildi. Tüp içindeki hücre sıvısı, RPMI 1640 besiyeri ile karıştırıldı, hücre süspansiyonu 75 cm' lik flaska aktarıldı.

Flask, 37 °C ve %5 CO₂' li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin gelişimi izlendi (Şekil 3.14), hücreler flask yüzeyinde gelişmeye başlayıp besiyerini kullandıklarında yeni besiyeri eklenerek hücrelerin büyümeleri sağlandı. Hücreler flask yüzeyini yeterince kapladıklarında bir kısmı yapılacak deneyde kullanılmak, bir kısmı ise dondurucuda saklamak amacıyla pasajlama işlemleri yapıldı.

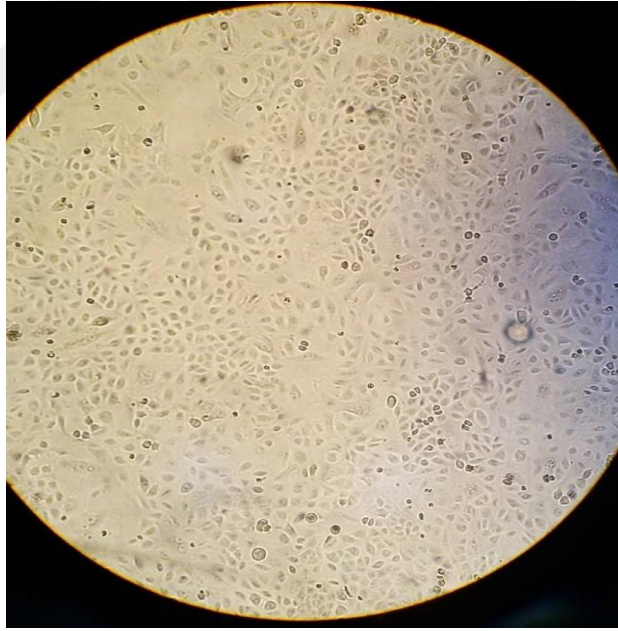
3.2.9 A549 hücresini pasajlama

Hücreler büyümeye başlayıp ortamdaki besiyerini tüketmeye başladıkları zaman flask içindeki besiyeri alınarak yeni RPMI 1640 besiyeri eklendi. Birkaç gün sonra ise hücreler flask yüzeyini kapladıkları zaman, pasajlama işlemi uygulandı. Bu işlem için 25 cm' lik 3 küçük flask hazırlandı (Şekil 3.15). 75 cm' lik flask içindeki besiyeri, steril pipetle alınarak atık kabına atıldı. Flaskın içine önce 5 ml. PBS eklenerek yavaşça çalkalandı, tekrar steril pipetle alındı.

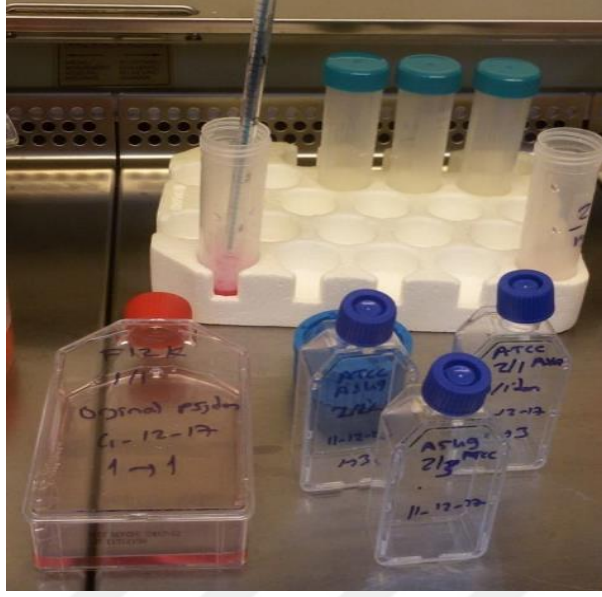
Flask yüzeyine yapışmış halde bulunan hücrelerin yüzeyden kalkmasını sağlamak amacıyla, 3 ml Tripsin-EDTA eklendi (Day vd. 2013). Tripsin, serin proteaz enzimi olup sıcak ortamda etkilidir. Bu nedenle aktivite göstermesi için flask, 37 °C ve %5 CO₂ içeren etüvde 5 dakika bekletildi. Tripsin tek başına kullanıldığında hücrelere zarar verebilir, bu nedenle EDTA ile birlikte kullanılmaktadır. EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ise besiyeri içinde bulunan Ca⁺² iyonlarının etkisini bloke ederek hücrelerin yüzeyden kalkmasını kolaylaştırmaktadır.

Süre sonunda etüvden alınan flask içine %10 FBS ve %0,01 penisilline-streptomycin ile yeni hazırlanan RPMI 1640 besiyerinden 3 ml eklendi. Flask içinde yavaşça pipetaj yapılarak yüzeye yapışmış kalan hücrelerin de kalkması sağlandı (Şekil 3.16). İnvert mikroskopta (Olympus) incelendi, hücrelerin yüzeyden kalkarak sıvı içinde hareket ettikleri gözlendi (Şekil 3.17). 25 cm' lik 3 ayrı flask içine yeni hazırlanan besiyerinden 12 ml ilave edildi. Hücrelerin bulunduğu büyük flask içindeki sıvıdan ise 3 ml alındı ve 25' lik 3 ayrı flask içine aktarıldı.

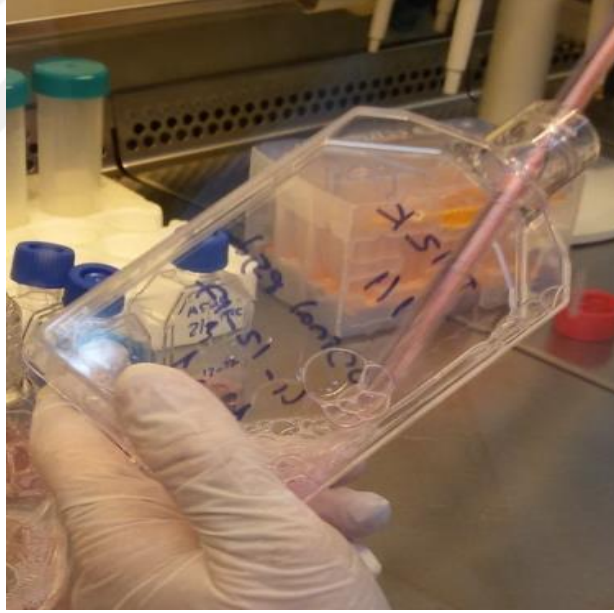
Flaskların içinde bulunan hücreler invert mikroskopta incelendi. Gelişmeleri için 37 °C ve %5 CO₂ içeren etüve kaldırıldı. Böylece, büyük flask içinde gelişen hücreler, deneyde kullanmak ve bir kısmı saklanmak üzere, çoğalmaları amacıyla yeni flasklara aktarılmış oldular ve pasajlama işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3.14 A549 hücrelerinin mikroskop görüntüsü



Şekil 3.15 A549 hücrelerinin pasajının yapılması



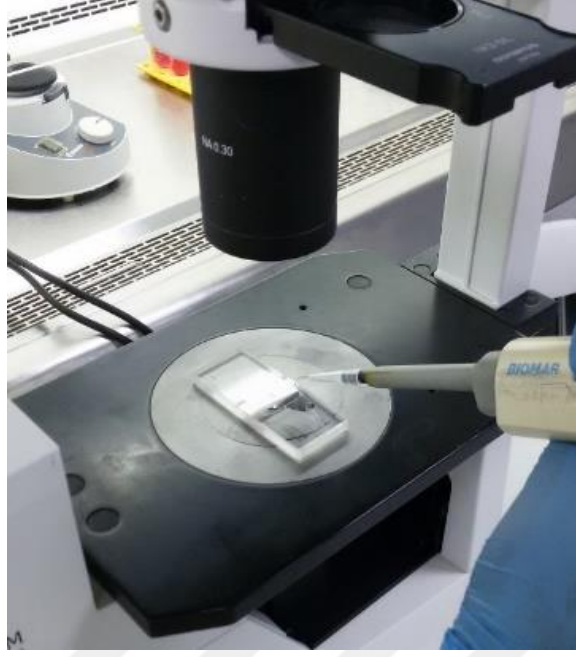
Şekil 3.16 A549 hücrelerinin flask yüzeyinden kaldırılması



Şekil 3.17 A549 hücrelerinin mikroskopta hareketli görüntüsü

3.2.10 Thoma lamında hücre sayımı

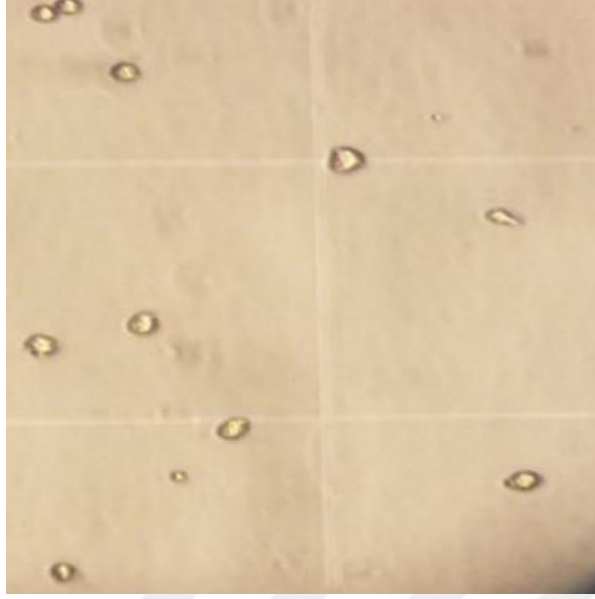
Hücrelerin bakteri ile enfeksiyonu sırasında bakterilerin hücrelere olan etkisini görmek amacıyla hücre sayısının bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla deneyde kullanılacak hücrelerin, sayım işlemi yapılmalıdır. Pasajlama işleminde sırasında 3 ml Tripsin-EDTA eklendikten sonra hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandıktan sonra, hücre süspansiyonunun bir kısmı pasaj için kullanıldı, bir kısmı ise santrifüj tüpüne aktarıldı. 1500 Rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki supernatant sıvısı dikkatlice alındı. Hücrelerin bulunduğu pelletin dağılmamasına dikkat edildi. Pellet üzerine 2 ml antibiyotiksiz hazırlanan RPMI 1640 besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonundan 20 µl alındı. Thoma lamına pipetlenerek, mikroskopta hücrelerin sayımı yapıldı (Şekil 3.18- 3.19- 3.20).



Şekil 3.18 A549 hücrelerinin Thoma lamına pipetlenmesi



Şekil 3.19 Thoma lamında A549 hücre sayımı yapılması



Şekil 3.20 A549 hücrelerinin Thoma lamında mikroskop görüntüsü

3.2.11 A59 hücrelerinin saklanması

Hücrelerin bir kısmı daha sonra tekrar kullanılmak üzere dondurularak saklandı. Dondurma işleminde DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanıldı (Day vd. 2013). DMSO donma aşamasında hücrelerin içine geçerek su moleküllerini bağlamaktadır. Böylece kristalleşmeyi önlemekte ve ani ozmotik basınca karşı hücrelerin korunması sağlanmaktadır.

Saklama işlemi için önce besiyeri hazırlandı. Besiyerine 1/10 oranında DMSO eklendi. Kalan besiyeri içinde hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması sağlandı. Flask içeriği santrifüj tüpüne boşaltıldı. 1500 Rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatant yavaşça pipetle alındı. Hücrenin bulunduğu pellet üzerine 1 ml DMSO içeren RPMI 1640 besiyeri eklendi. Pipetajla hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. 2 mm' lik kapaklı tüplere aktarıldı. Kademeli olarak önce +4 °C' de 30 dakika, sonra -20 °C' de 30 dakika bekletildikten sonra, -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.12 *Legionella* bakterilerinin kültürlenmesi

Derin dondurucuda -80 °C' de ve %16 gliserollü buyyon besiyeri içinde dondurularak saklanan bakterileri canlandırmak amacıyla BCYE besiyerine ekimleri yapıldı. Bunun için gliserollü buyyonun tamamı çözünmeden buzlu şekilde bir miktar steril öze ile alarak BCYE besiyerine ekimleri yapıldı. 3 gün 37 °C nemli etüvde bakterilerin üremeleri gözlemlendi.

Daha sonra BCYE besiyerinde üreyen bakteri kolonisinden bir öze dolusu alınarak BYE sıvı besiyerinde süspanse edildi. *Legionella*'nın sıvı besiyerinde kültürlenmesinin; temas bağımlı sitotoksinite, etkili enfeksiyon başlaması, fagozom-lizozom füzyonundan kaçış gibi (Joshi ve Swanson 1999) bakteri infektivitesi ve büyüme fazı ile ilgili olarak hücre içi yaşam döngüsünü gösteren bir model oldukları kabul edilmektedir (Joshi ve Swanson 1999, Reichardt vd. 2010). *Legionella pneumophila*, post-eksponansiyel fazda iken, eksponansiyel fazdan daha çok virulent özellikler kazanmaktadır. Bakterinin hücresel çift fazlı yaşam döngüsü sıvı kültürde gösterilmektedir. Replikasyondan sonra bakteri eksponansiyel büyüme fazından transmisiv formdaki post-eksponansiyel ve değişmeyen (stationary) faza geçmektedir. BYE sıvı besiyeri, *Legionella pneumophila*'nın sabit faza geçmesi için büyümesini sağlamaktadır. BCYE besiyerine benzer ancak kömür tozu (charcoal) ve agar içermemektedir (Reichardt vd. 2010, Abdelhady ve Garduno 2013).

Bu amaçla deneylerde, *Legionella* bakterilerinin BYE sıvı besiyerinde kültürleri yapıldı. Spektrofotometrede (BOECO) 620 nm' de optik dansite (OD) değerleri belirlendi. 24-56 saat içinde, 12 saat aralıklarla ölçümleri yapılarak bakterilerin post-eksponansiyel faza ulaşmaları sağlandı (Abdelhady ve Garduno 2013).

3.2.13 *Legionella* bakterilerinin ekstrasellüler ekimleri

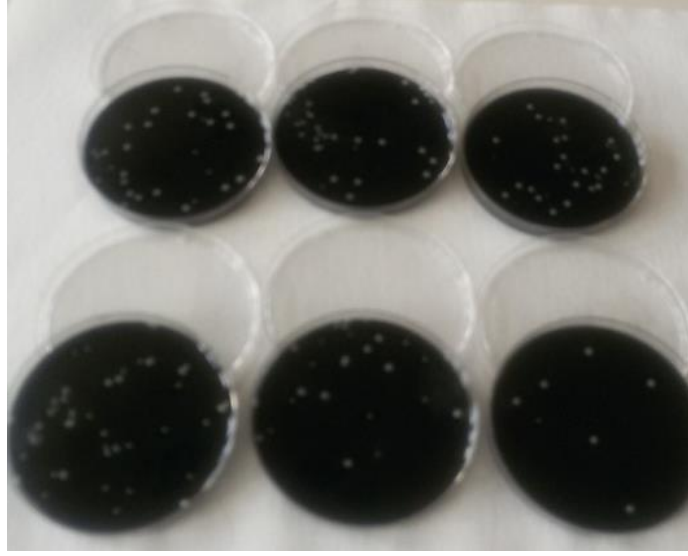
Hücreleri enfekte etmeden önce bakterilerin ekstrasellüler ortamda büyümeleri sağlandı. Bakterilerin daha etkin ve virulent oldukları bilinen post-eksponansiyel faza ulaşmaları amacıyla, bir miktar bakteri kolonisi BYE (Buffered yeast extract) sıvı besiyeri içinde süspanse edildikten ve 37 °C nemli etüvde bekletildikten sonra bakterilerin 12 saat

aralıklarla, 620 nm spektrofotometrede optik dansite (OD) deęerleri belirlendi. OD deęerleri 1.5-2.0 arasında olacak řekilde belirlenen ve post-eksponansiyel faza geldikleri dūřunūlen *Legionella* bakterileri 1. Deneyde 100, 200 ve 500 MOI ve 2. deneyde 100, 500 ve 1000 MOI olacak řekilde A549 hūcrelerine enfekte edildi. Hazırlanan sūspansiyonda bulunan bakteri kolonilerinin sayılarını ifade eden CFU (Colony Forming Unit) deęeri, standart plate hesabına dayalı olarak hesaplandı (Matsunaga vd. 2001).

CFU deęerini hesaplamak için önce bakteri sūspansiyonunun 1/10 dilūsyonları yapıldı. Bu amaçla kapaklı tūplere 1' den 10' a kadar numara verilerek, tūplere 4.5 ml PBS konuldu. Bakteri sūspansiyonu iyice vortekslenerek iyice karıřması saęlandı. 500 μl 1. tūpe eklendi, bu tūpten 2. tūpe 500 μl (0.5 ml) aktarıldı; 10. tūpe kadar aynı iřlemler uygulandı.

Yūksək konsantrasyondaki sūspansiyonlarda bakteri oranının çok yoęun olmasından dolayı petrilere yoęun ūreme olacaęı tahmin edilerek ve 6., 7. ve 8. tūplerde, saymaya uygun koloni ūremesi olacaęı dūřunūlerek, sadece bu tūplerdeki sūspansiyon ekimden önce vortekslendi. 0.1 ml BCYE besiyerine pipetlendi, steril L ze ile yayma ekimleri yapıldı. 37 C ve nemli ortam içeren etūve kaldırıldı. 2-3 gūn sonra bakterilerin ūremesi gözlendi, ūreyen kolonilerin sayımları yapıldı (řekil 3.21).

Deney sonuçlarının etkinlięini belirlemek ve bakterinin intrasellūler çoęalmasını hesaplamak için hūcreye enfekte edilen bakteri sayısının bilinmesi gerekmektedir. Böylece hazırlanan sūspansiyondaki bakteri miktarı CFU olarak belirlenmiřtir.



Şekil 3.21 Ekstrasellüler *Legionella* üremeleri

3.2.14 A549 hücrelerinin *Legionella* ile enfekte edilmesi

Hücreler farklı MOI oranlarında hazırlanan bakteri süspansiyonu ile enfekte edildi. MOI (Multiplication of Infection), bir hücreyi enfekte eden bakteri sayısıdır. Diğer bir ifadeyle MOI, Bakteri/Hücre oranıdır. 1 MOI denince; 1 hücrenin 1 bakteri ile, 100 MOI' de; 1 hücrenin 100 bakteri ile enfekte edildiği anlaşılmaktadır.

Bu amaçla, tüpe antibiyotik içermeyen ancak %10'luk Fetal Bovin Serum (FBS) içeren 4.5 ml RPMI 1640 konuldu. CFU değeri hesaplanan ve koloni miktarı bilinen bakteri süspansiyonu, deneyde kullanılacak MOI oranlarına uygun olacak miktarda eklendi. Böylece, BYE içinde büyüme fazına ulaşan bakteriler, öncelikle kültür besiyeri ortamı olarak kullandığımız RPMI 1640 besiyeri içinde süspanse edildi ve hücreleri enfekte etmek için hazırlandı (Gao vd. 1997).

Deneylerde 96 kuyucuk içeren plate kullanıldı. Öncelikle flaskta büyümesi sağlanan ve tüpe aktarılan A549 alveoler epitel hücresi, Thoma lamında sayımı yapıldıktan sonra plate kuyucuklarına 0.2 ml olarak pipetlendi. Hücrelerin kuyucuk yüzeyine yapışmalarını sağlamak amacıyla, 37 °C ve %5 CO₂' li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda, hücreler bakteri ile enfekte edilmeden önce kuyucukların içinde bulunan ve A549 hücrelerini ekimde kullandığımız RPMI 1640 besiyeri yavaşça pipetle alınarak uzaklaştırıldı. Uygun konsantrasyonlarda hazırlanan bakteri süspansiyonu, A549 hücrelerinin bulunduğu kuyucuklara 0.2 ml olarak pipetlendi. 37 °C ve %5 CO₂' li etüvde 2 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.15 Hücreye bakteri enfeksiyonu ve invazyon

İnkübasyon sonunda kuyucuk içindeki sıvı, ependorf tüpe alındı. 10 kat dilüsyonları hazırlandı. BCYE besiyerine ekimleri yapıldı. Böylece enfeksiyondan sonra kuyucuklarda kalan ve hücrelere giremeyen bakteri miktarı belirlendi. Yıkama ile uzaklaşmayan hücre dışı bakterilerini ortamdan yok etmek amacıyla Gentamisin antibiyotiği kullanıldı (Gao ve Abu Kwaik 1999a).

Her kuyucuğa ml' sinde 100 µg Gentamisin içeren %5' lik RPMI 1640 besiyerinden 0.2 ml eklendi. Plate 37 °C ve %5 CO₂' li etüvde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Gentamicin kalıntılarını yıkamak amacıyla kuyucuğa, 0.1 ml antibiyotik içermeyen RPMI 1640 besiyeri pipetlendi ve tekrar pipetle yavaş bir şekilde alındı. 2-3 kez yıkama işlemi uygulandı. Kuyucuklara tekrar %10 FBS ve %0,1 oranında penicilline-streptomycin antibiyotikleri ile hazırlanan RPMI 1640 besiyeri eklendi. 37 °C ve %5 CO₂' li etüvde, uygun enfeksiyon sürelerinde (48, 96 ve 120 saat) inkübasyona bırakıldı.

Her süre sonunda kuyucuklar, antibiyotik içermeyen RPMI 1640 besiyeri ile 2 kez yıkandı. Hücrelerin patlaması ve hücre içine girdikleri düşünülen bakterilerin hücre dışına çıkmalarını sağlamak amacıyla, 0.5 ml steril distile su eklendi. 37 °C ve %5 CO₂' li etüvde 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

Süre sonunda kuyucuklara pipetaj işlemi uygulanarak hücrelerin patlaması sağlandı. Kuyucukta hücrelerin patlaması ile açığa çıkan lizat sıvısı, ependorf tüplere alındı. 10 kat dilüsyonları hazırlandı (Maruta vd. 1998). Hücreden çıktıkları düşünülen bakterilerin koloni sayımlarını belirlemek için CFU değerlerini hesaplamak amacıyla, BCYE

besiyerine ekimleri yapıldı. Üremeler sonunda koloni sayıları hesaplandı. Bu şekilde bakterilerin, hücre içi çoğalmalarının miktarı belirlendi.

3.2.16 Sitotoksikite testi

A549 hücrelerinin, *Legionella* bakterileri ile etkileşimleri sonucunda oluşan sitotoksik etkiyi gözlemek amacıyla, kolorimetrik yöntem olan MTT testi uygulandı. Sadece canlı hücrelerin varlığını tespit etmeye yönelik olan MTT yönteminin, çoğalma ve sitotoksikite testlerinde uygulanan çok yönlü ve kantitatif bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Mossman 1983).

Bu yöntemde canlı hücrelerde bulunan mitokondrinin süksinat dehidrojenaz enzimi etkisiyle, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solüsyonu içinde bulunan tetrazolium halkası parçalanmaktadır. Canlı hücre mitokondrisinin reaksiyonu sonucunda, açık sarı renkte olan MTT, formazon oluşumu ile koyu-mavi ve mor renge dönüşmektedir. Ölü hücrelerde mitokondri aktivitesi olmayacağı için, MTT sarı renkte kalacak ve renk değişimi olmayacaktır. MTT kolorimetrik yöntemi, makrofajlarda bulunan canlı *Legionella* bakterilerini belirlemek amacıyla da çalışmalarda kullanılmıştır (Gebran vd. 1994). Canlı *Legionella*'nın mitokondriyal aktivitesi ile MTT' de bulunan ve sarı renk veren tetrazolium halkası ayrılmakta ve koyu renkli formazon oluşumu gözlenmektedir.

Bu nedenle deney sırasında canlı *Legionella* bakterilerinin etkisiyle MTT' de renk değişiminin oluşmasını önlemek amacıyla, 1. deneyde; 48, 96 ve 120 saat; 2. deneyde ise 72, 96, 108 saat uygulanan inkübasyon süreleri sonucunda, her kuyucukta bulunan supernatant alındı. Böylece hücreler tarafından ekstrasellüler ortama salınan bakterilerin uzaklaştırılması sağlandı.

Daha sonra intrasellüler bakterilerin hücreden dışarı çıkmalarını için, hücrelerin patlaması sağlandı. Bu amaçla, kuyucuklara 100 µl steril distile su eklendi, 10 dakika bekletildi. Hücrelerin patlaması sonucu ortama salınan lizat sıvısı tekrar uzaklaştırıldı. Böylece

hücre içinde bulunan canlı bakterilerin etkisiyle MTT' de renk değişiminin olması önlenmeye çalışıldı (Higa vd. 1998).

Her kuyucuğa 10 µl MTT/100 µl besiyeri olacak şekilde, 20 µl MTT stok (5 mg/ml) solusyonu içeren 0.2 ml RPMI 1640 eklendi. 37 °C ve %5 CO₂' li etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı. Deneyde kullanılan canlı hücrelerin mitokondri aktivitesi sonucu, MTT' de bulunan ve suda çözünür özellikteki tetrazolium tuzu, suda çözünmeyen formazon kristallerine dönüşmektedirler.

Oluşan kristal yapıların çözünmesi için Dimetil Sülfosit (DMSO)'in en iyi çözücü olduğu belirtilmiştir (Twentyman vd. 1987). Bu nedenle inkübasyon sonunda MTT içeren supernatant sıvısı kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Formazon kristallerini çözmek amacıyla kuyucuklara 0.1 ml DMSO (Dimethyl Sulfoxide) eklendi. 15 dakika oda ısısında ve karanlıkta bekletildi. Bir saat geçmeden ELISA okuyucu cihazında spektrofotometrik ölçümleri yapıldı (Mossman 1983).

3.2.17 Besiyerleri ve kimyasalların hazırlanması

BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) besiyeri hazırlama

ACES	:	10 g
Yeast extract	:	10 g
Bacto agar	:	17 g
α-ketoglutarik asit	:	1 g
Charcoal	:	2 g
KOH	:	2,4 g
Distile su	:	985 ml

Kimyasal maddeler erlen içinde karıştırıldı.

pH : 6.90-6.97 olacak şekilde ayarlandı.

Otoklavda 121 °C'da 15 dakika bekletildi.

Isısı ayarlanmış benmaride 55 °C'a soğutuldu.

Manyetik karıştırıcının üstüne alındı.

L-cysteine ve Ferric fosfat ayrı olarak hazırlandı (Anonim 2014).

L-cysteine (0.4 g/4 ml)

400 mg L-cysteine tartıldı
3.5 ml steril distile su içinde çözünmesi için vortekslendi.
pH 6.6-6.7 ayarlandı.
Hacim 4 ml olana dek su eklendi
Filtreden geçirilerek sterilize edildi (Day vd. 2013).

Ferric fosfat (0.25 g/10 ml)

2.5 g Ferric fosfat tartıldı
5 ml steril distile H₂O içinde çözünmesi için vortekslendi
Hacim 10 ml olana kadar distile H₂O eklendi
Filtreden geçirilerek steril 15 ml konikal tüpe aktarıldı (Day vd. 2013).
L-cysteine ve Ferric fosfat hazırlandıktan sonra, 55 °C'a soğutulmuş olan besiyerine eklendi. Manyetik karıştırıcıda karışması sağlandı. pH 6.9'a ayarlandı.
90 mm çapında steril petrilere döküldü.

DGVP (Dye-Glycine-Vancomycine-Polymixine B) besiyeri hazırlama

ACES	:	10 g
Yeast extract	:	10 g
Bacto agar	:	17 g
α -ketoglutarik asit	:	1 g
Charcoal	:	1,5 g
KOH	:	2,4 g
Glycine	:	3,4 g
Distile su	:	975 ml

Erlen içine eklenen kimyasal maddeler manyetik karıştırıcıda karıştırıldı
pH : 6.90-6.97 olacak şekilde ayarlandı
Otoklavda 121 °C'de 15 dakika bekletildi
Isısı ayarlanmış benmaride 55 °C' a soğutuldu.

Boya ve antibiyotikler ayrı olarak hazırlandı

Besiyerine eklendi.

Manyetik karıştırıcıda karışması sağlandı.

pH 6.9'a ayarlandı.

90 mm çapında, steril petrilere döküldü (Anonim 2014).

Boyalardan hazırlanması

BTB (Bromothymol Blue) : 10 mg (1 ml)

BCP (Brom Cresol Purple) : 10 mg (1 ml)

Antibiyotik hazırlanması

Vancomycin HCl : 1 mg (1 ml)

Polymyxin B : 50.000U (1 ml)

HCl-KCl (pH 2.2) asit çalışma solusyonu hazırlama

Stok 0.2N HCl hazırlama

1N HCl : 20 ml

Distile su : 80ml

Stok 0.2N KCl hazırlama

KCl : 1.5 g

Distile su : 100 ml

HCl-KCl (Çalışma Solusyonu) Hazırlama amacıyla stok HCl ve KCl gereken miktarlarda mezurda ölçüldü.

HCl (0.2N stok) : 5.3 ml

KCl (0.2N stok) : 25 ml

100 ml Distile suya eklendi

pH 2.2' ye ayarlandı.

Filtrasyonla veya otoklavlanarak sterilize edildi (Anonim 2014).

Glycerol (%16) Buyyon hazırlama

Nutrient Broth (Difco) :	1 g
Glycerol :	20.1 g
Distile su :	100 ml

Kimyasal maddeler manyetik karıştırıcıda karıştırılarak erimesi sağlandı

pH: 7.2±0.5' e ayarlandı

Kapaklı tüplere bölünerek 115 °C' da 10 dakika otoklavlandı (Anonim 2014).

Ringer çözeltisi (1/40) hazırlama

Sodium chloride :	225 mg
Potassium chloride :	11 mg
Calcium chloride anhydrous :	12 mg
Sodium bicarbonate :	5 mg
Su :	1 L

Uygun oranlarda hazırlandıktan sonra otoklavlanarak sterilize edildi (Anonim 2014).

PBS (Phosphate Buffered Saline) hazırlama

NaCl (137 mM) :	8 g
Na ₂ HPO ₄ (10mM) :	1,44 g
KCl (2,7 mM) :	0,2 g
KH ₂ PO ₄ (2 mM) :	0,24 g
Distile su :	800 ml

Kimyasalların steril distile suda çözünmesi sağlandı

pH 7,4 olacak şekilde ayarlandı

1 ml olana kadar steril distile su eklendi

Ağzı kapaklı 500 ml cam şişelere dağıtıldı

30 dakika otoklavlandı (Day vd. 2013).

BYE (Buffered Yeast Extract) sıvı besiyeri

ACES : 10 g
Yeast Extract : 10 g
L-cysteine : 0,4 g
Ferric pyrophosphate : 10 ml
KOH : 2.2 g
a-ketoglutarate : 1 g

Kimyasal maddeler tartıldı.

Otoklavlandı. Soğumaya bırakıldı.

L-cysteine (0.4 g/4 ml) ve Ferric pyrophosphate (0.25 g/10 ml) ayrı olarak hazırlandı.

Her biri ayrı şekilde filtreden geçirilerek besiyerine eklendi (Day vd. 2013).

Gentamisin hazırlama (10 mg/ml stok)

100 mg Gentamicin sülfat tartıldı, 15 ml' lik tüpe aktarıldı

10 ml olana kadar steril distile su eklendi

Vortekslendi

0,2 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi

Ependorf tüplerde alıquotlandı

-20 °C derin dondurucuda saklandı (Day vd. 2013).

RPMI 1640 besiyeri hazırlama (%10 FBS ve %0.1 penicillin-streptomycin)

Ticari olarak satılan steril 20 mM L-glutaminli, sodyum bikarbonat içermeyen RPMI 1640 (Sigma) kullanıldı.

RPMI 1640 içerisine %10 FCS ve %0,1 penicillin-streptomycin antibiyotikleri eklendi.

+4 °C'de saklandı (Tiaden vd. 2013).

MTT hazırlama

5 mg MTT tartıldı. 1 ml PBS içinde çözünerek filtreden geçirildi (Mossman 1983).

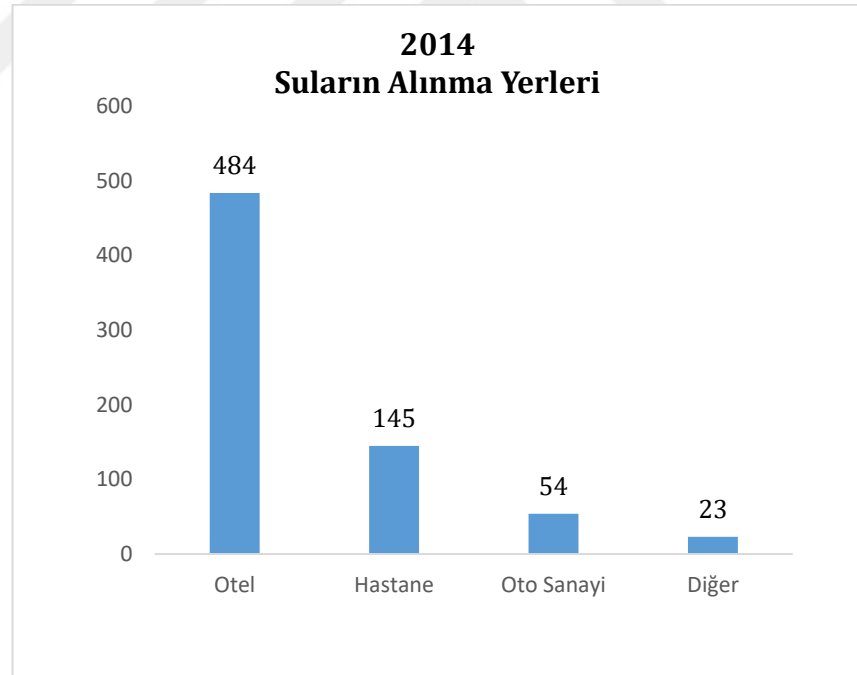
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

2014 yılında 484 otel, 145 hastane, 54 oto sanayii ve 23 diğer binaların su sistemlerinin farklı noktalarından alınan 706 su örneğinde *Legionella* analizi yapılmıştır.

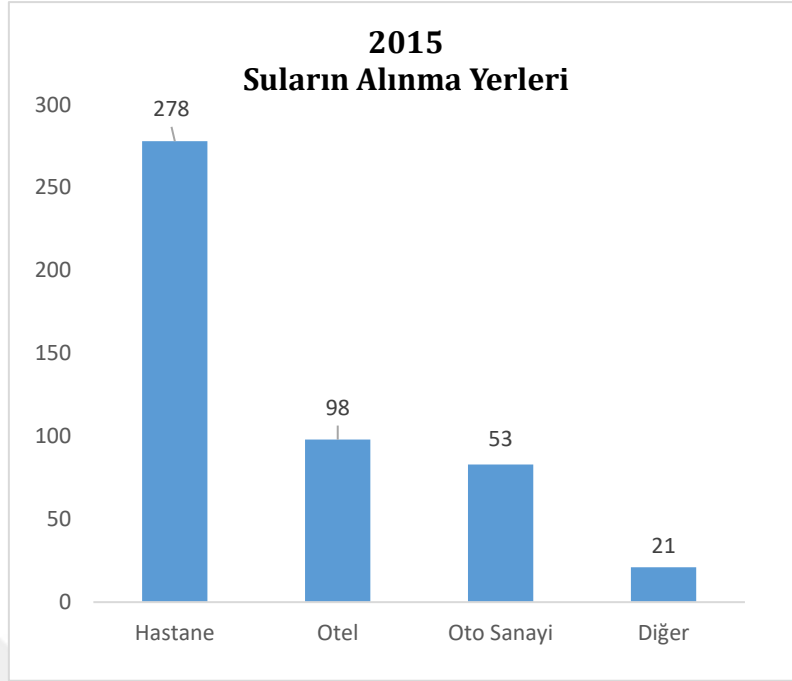
2015 yılında 98 otel, 278 hastane, 53 oto sanayii ve 21 diğer binaların su sistemlerinin farklı noktalarından alınan 450 su örneğinde *Legionella* analizi yapılmıştır.

2016 yılında 143 hastane, 41 oto sanayii ve 17 diğer binaların farklı noktalarındaki su sistemlerine alınan 201 su örneğinde *Legionella* analizi yapılmıştır.

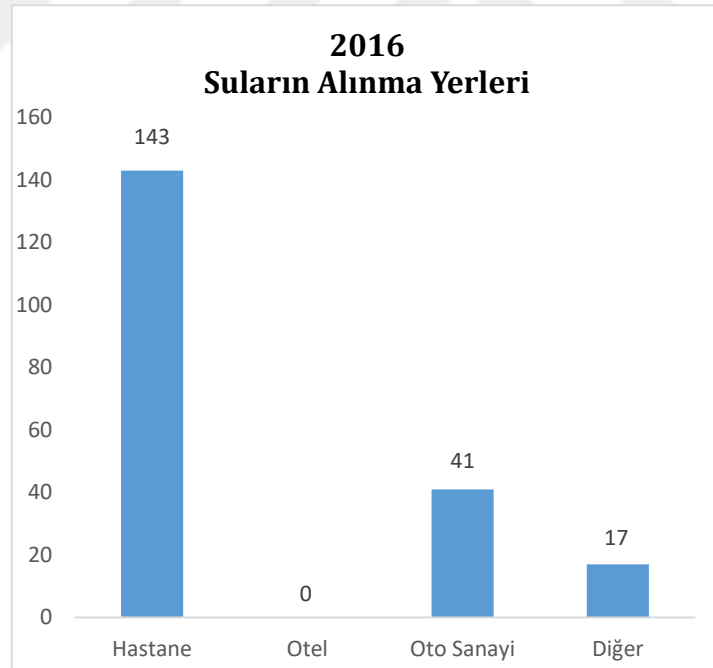
2014, 2015 ve 2016 yıllarında analizi yapılan suların nerelerden alındıkları Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’ de görülmektedir.



Şekil 4.1 2014 yılında suların alınma yerleri



Şekil 4.2 2015 yılında suların alınma yerleri



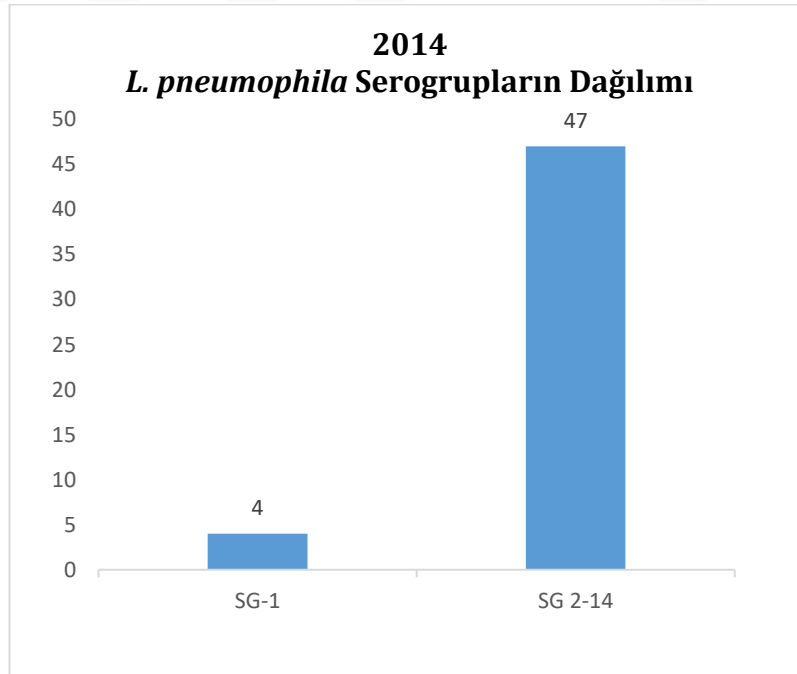
Şekil 4.3 2016 yılında suların alınma yerleri

4.1 Lateks Aglutinasyon Testine göre Serotiplendirme

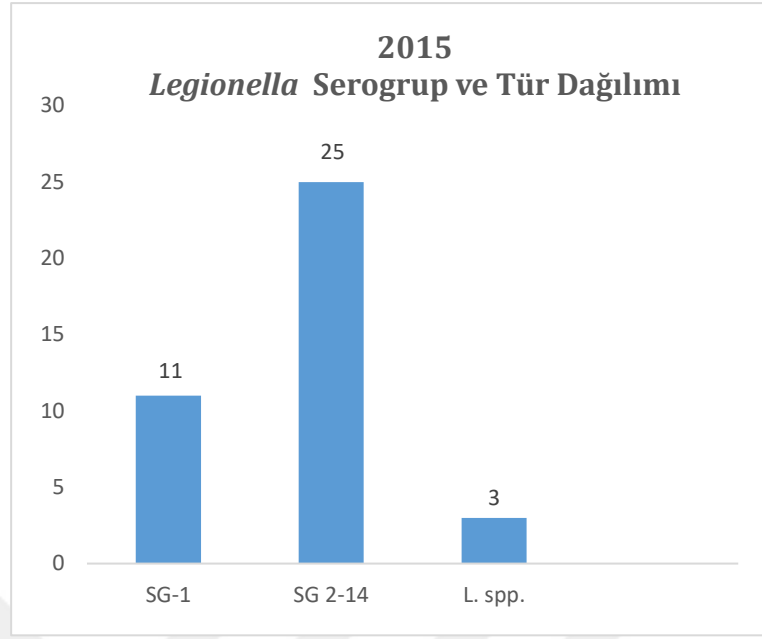
2014 yılında çalışmaya alınan 706 su örneğinin lateks aglutinasyon testi sonucuna göre, 51 (%7.2) örnek *Legionella* yönünden pozitif olup, bunların serogrup dağılımları; 4'ü (%7.8) *L. pneumophila* SG-1, 47'si (%92.1) *L. pneumophila* SG-2-14 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).

2015 yılında çalışmaya alınan 450 su örneğinin lateks aglutinasyon testi sonucuna göre, 39 örnek (%8.6) *Legionella* yönünden pozitif olup, bunların serogrup dağılımları; 11'i (%28.2) *L. pneumophila* SG-1, 25'i (%64.1) *L. pneumophila* SG-2-14 ve 3'ü (%7.7) *Legionella* spp. olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).

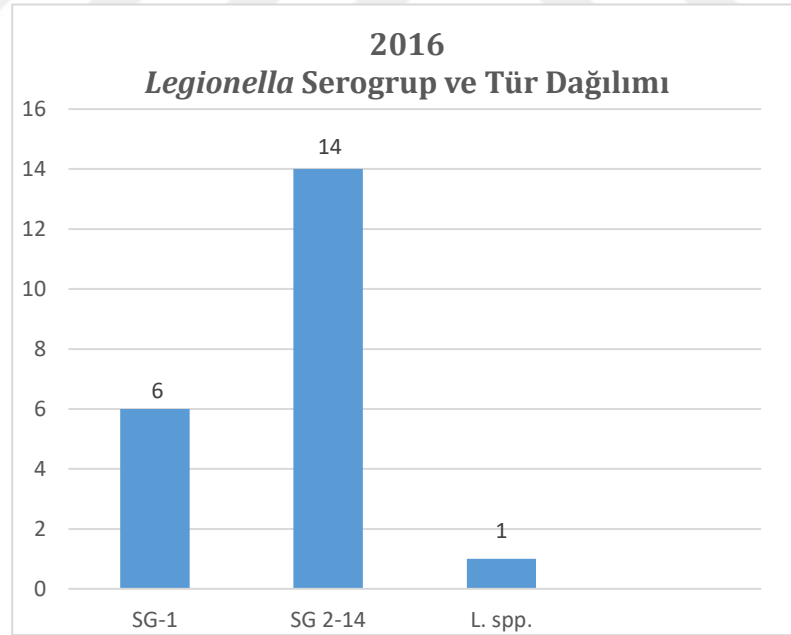
2016 yılında çalışmaya alınan 201 su örneğinin lateks aglutinasyon testi sonucuna göre, 21 örnek (%10.4), *Legionella* yönünden pozitif olup, bunların serogrup dağılımları; 6'sı (%28.6) *L. pneumophila* SG-1, 14'ü (%66.6) *L. pneumophila* SG-2-14 ve 1'i (%4.7) *Legionella* spp. olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).



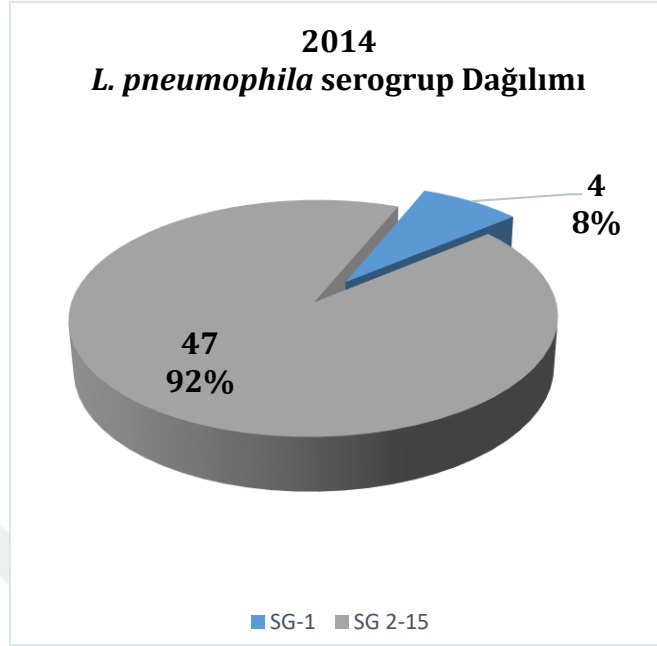
Şekil 4.4 2014 yılı *L. pneumophila* serogrupların dağılımı



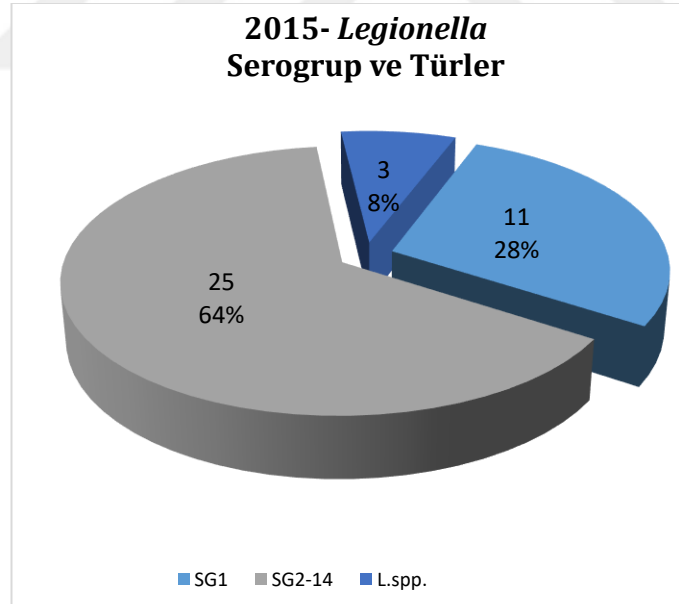
Şekil 4.5 2015 yılı *Legionella* serogrup ve tür dağılımı



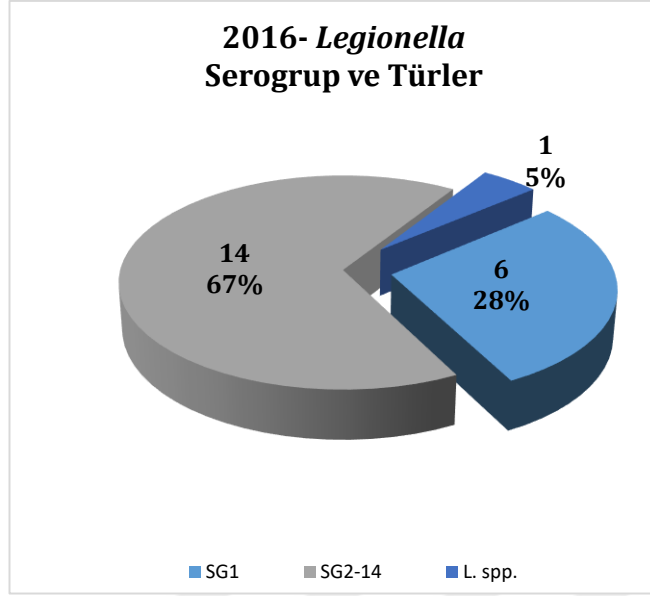
Şekil 4.6 2016 yılı *Legionella* Serogrup ve Türlerin Dağılımı



Şekil 4.7 2014 yılı *L. pneumophila* serogrup yüzde oranları



Şekil 4.8 2015 yılı *Legionella* serogrup ve türlerin yüzde oranları



Şekil 4.9 2016 yılı *Legionella* serogrup ve türlerin yüzde oranları

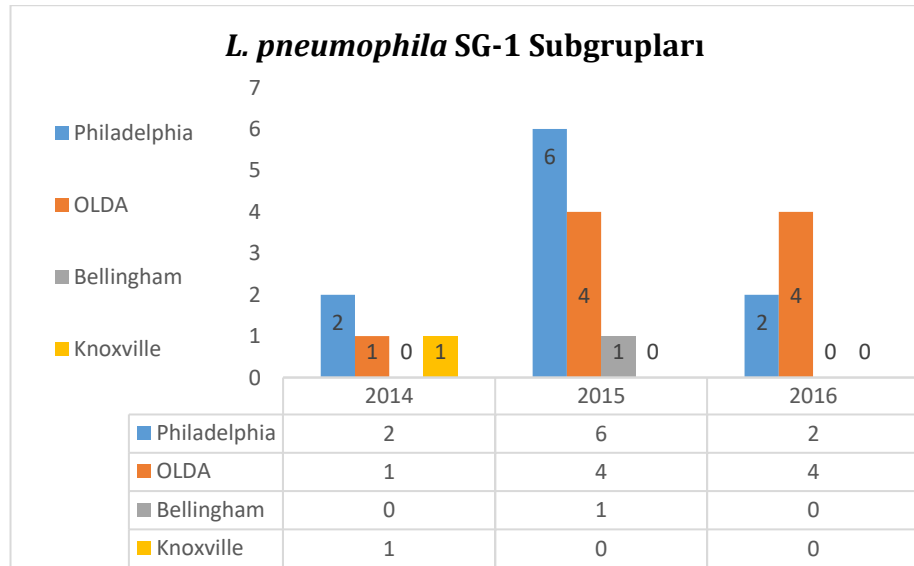
4.2 DFA ile *Legionella* Serogrup ve Subgrupların Belirlenmesi

2014 yılında, 706 su örneğinin *Legionella* yönünden analizi yapılmış, bunlardan 51'i (%7.2) pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerden 4'ü (%7.8) *L. pneumophila* serogroup-1 bulunmuştur. Bunlar otellere ait su sistemlerinde bulunmuş olup; 2' si Philadelphia subgrubu, 1'i OLDA subgrubu, diğer 1 örnek ise Knoxville subgrubu olarak tanımlanmıştır. Pozitif örneklerden 47 si (%92) *L. pneumophila* serogroup 2-14 bulunmuştur. Bunlardan 41'i *L. pneumophila* SG-2 ve 3'ü SG-3 olup otellere ait su sistemlerinde, diğer örneklerden 2' si SG-6 ve 1 örnek ise SG-10 olarak tanımlanmış olup hastanelere ait su sistemlerinde tespit edilmişlerdir. Suların alınma noktalarının verileri bulunmamaktadır.

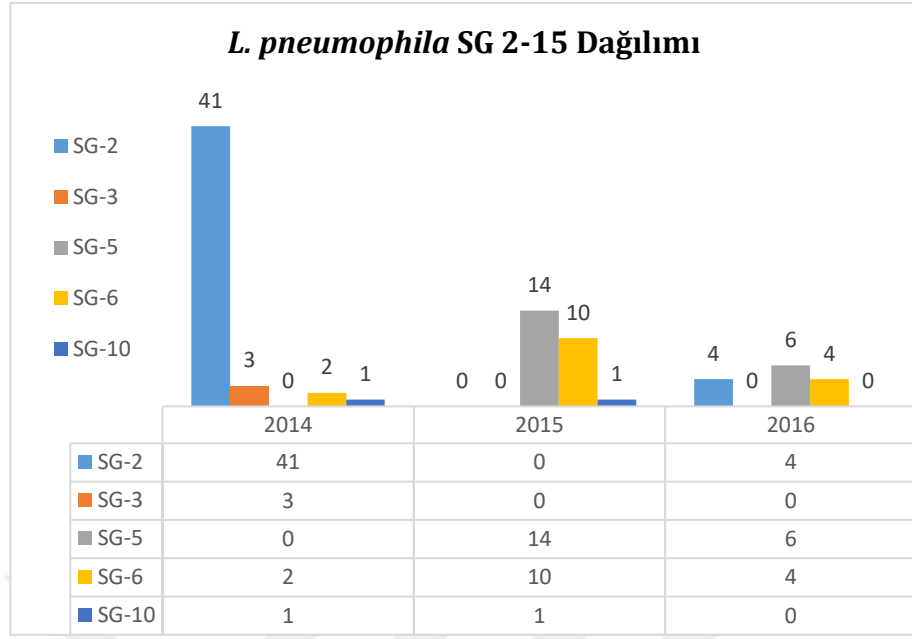
2015 yılında, 450 su örneğinin *Legionella* yönünden analizi yapılmış, bunlardan 39' u (%8.6) pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerden 11'i (%28) *L. pneumophila* serogroup-1 bulunmuştur. Bunlardan 6' sı Philadelphia subgrubu olup; otele ait musluk suyu, oto sanayi binasının duş suyu, hastanede oda suyundan alınan örneklerde tespit edilmiştir. 4' ü OLDA subgrubu olup; hastane kondansatör, oto sanayi binasının sıcak duş suyunda bulunmuştur. Diğer 1 örnek ise Bellingham subgrubu olup; hastane yoğun bakımında musluk suyunda bulunmuştur.

25 (%64) su örneği *L. pneumophila* serogroup 2-14 bulunmuştur. Bunlardan 14'ü *L. pneumophila* SG-5 olup; hastane odası, tuvalet, duş başlıkları, su kazanına ait sularda tespit edilmiştir. 10'u *L. pneumophila* SG-6 olup; hastane oda suyu ve tuvaletinde, hastane su kazanına ait sularda bulunmuştur. Diğer 1 örnek ise *L. pneumophila* SG-10 olup; hastane odası musluk suyunda saptanmıştır. Oto sanayiye ait soğutma kulelerinden alınan 3 (%7) su örneğinde ise *Legionella* spp. bulunmuştur. Bunlardan 1 örnekte *L. micdadei* ve 2 örnekte ise *L. longbeachae* tespit edilmiştir (Şekil 4.7- 4.8- 4.9).

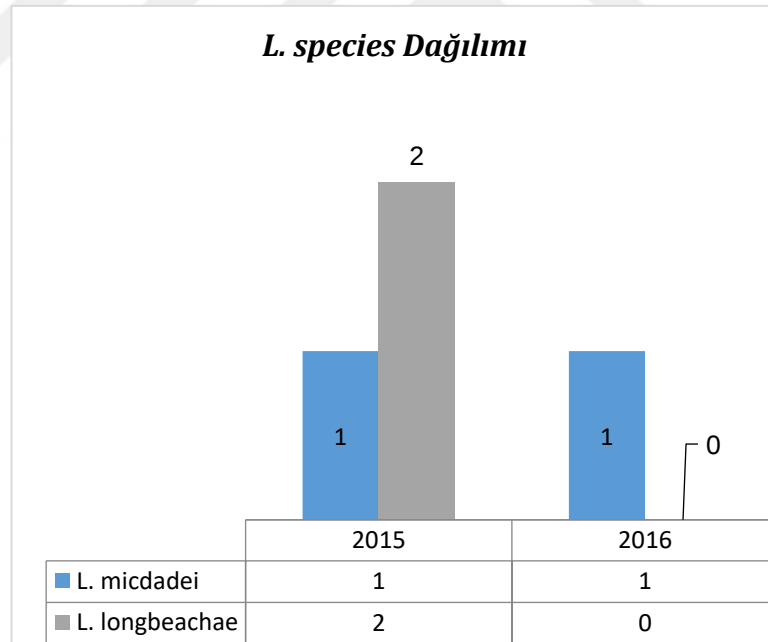
2016 yılında, 201 su örneğinden 21'i (%10.4) *Legionella* yönünden pozitif bulunmuştur. Bunlardan 6'sı *L. pneumophila* SG-1 olup; 2'si Philadelphia subgrubu ve 4'ü OLDA subgrubu olarak ve oto sanayi duş başlığından alınan su örneklerinde tespit edilmiştir. 14 (%67) su örneği *L. pneumophila* serogroup 2-14 bulunmuştur. Bunlardan 6'sı *L. pneumophila* SG-5 olup; hastanenin sıcak su tankı, arıtma kulesi ve kimya sanayi havuzuna ait sulardan tespit edilmiştir. 4'ü *L. pneumophila* SG-6 olup; hastanenin banyo musluğu, hastane odasındaki duş başlığı, hastanenin sıcak su kazanına ait sulardan tespit edilmiştir. 4'ü *L. pneumophila* SG-2 olup; hastane odasının musluk suyu ve musluk başlığı, hastane odasının duş başlığına ait sularda, diğer 1 örnek ise *L. micdadei* olarak belirlenmiş ve oto sanayi soğutma kulesinden alınan su örneğinde bulunmuştur (Şekil 4.8- 4.9- 4.10).



Şekil 4.10 *L. pneumophila* SG-1 subgruplarının dağılımı



Şekil 4.11 *L. pneumophila* SG 2-14 serogrupların dağılımı



Şekil 4.12 2015-2016 yıllarında *Legionella* species dağılımı

2015 ve 2016 yıllarında çalışılan su örneklerinde tespit edilen serogrup ve subgrupların dağılımı Çizelge 4.1, 4.2, 4.3' de görülmektedir.

Çizelge 4.1 2015 yılı *Legionella pneumophila* serogrup ve subgrupların bulunduğu sular

<i>Legionella</i> SG 2-14	Sayılar	Yerler	<i>Legionella</i> SG-1	Sayılar	Yerler
SG-5	1	Hastane tuvalet	<i>Philadelphia</i>	1	Oto sanayii duş
	2	Hastane oda musluk suyu		1	Hastane oda musluk suyu
	6	Hastane sıcak su kazanı		4	Otel lavabo
	5	Hastane oda duş başlığı	<i>Olda</i>	1	Oto sanayii sıcak duş
SG-6	1	Hastane tuvalet		1	Bina sıcak su kollektör
	1	Hastane oda duş başlığı		2	Hastane sıcak su kondansatör
	4	Hastane sıcak su kazanı	<i>Bellingham</i>	1	Hastane yoğun bakım lavabo
	4	Hastane oda musluk suyu			
SG-10	1	Hastane oda musluk suyu			

Çizelge 4.2 2016 yılı *Legionella pneumophila* serogrup ve subgrupların bulunduğu sular

<i>Legionella</i> SG 2-14	Sayılar	Alınma Yerleri	<i>Legionella</i> SG-1	Sayılar	Yerler
SG-5	1	Hastane sıcak su kazanı	<i>Philadelphia</i>	2	Oto sanayii duş başlığı
	1	Kimya sanayii arıtma kulesi-soğuk			
	2	Kimya sanayii arıtma kulesi			
	2	Kimya sanayii arıtma havuzu			
SG-6	1	Hastane banyo musluk suyu	<i>Olda</i>	4	Oto sanayii duş başlığı
	2	Hastane oda duş başlığı			
	1	Hastane sıcak su kazanı			
SG-2	2	Hastane oda musluk suyu			
	1	Hastane oda musluk başlığı			
	1	Hastane oda duş başlığı			

Çizelge 4.3 2015-2016 yıllarında *Legionella* spp' lerin bulunduğu sular

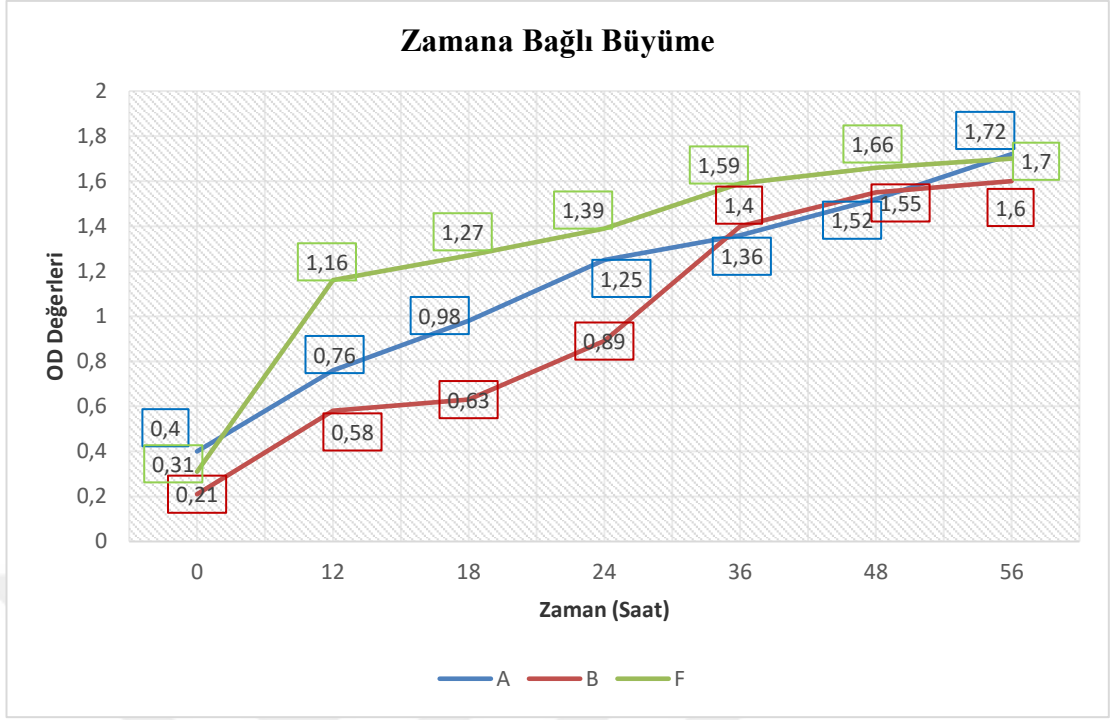
Yıllar	<i>Legionella</i> spp	Sayılar	Yerler
2015	<i>L. micdadei</i>	1	Oto sanayii soğutma kulesi
	<i>L. longbeachae</i>	2	Oto sanayii soğutma kulesi
2016	<i>L. micdadei</i>	1	Oto sanayii soğutma kulesi

4.3 *Legionella* Bakterilerinin Ekstrasellüler Büyümesi

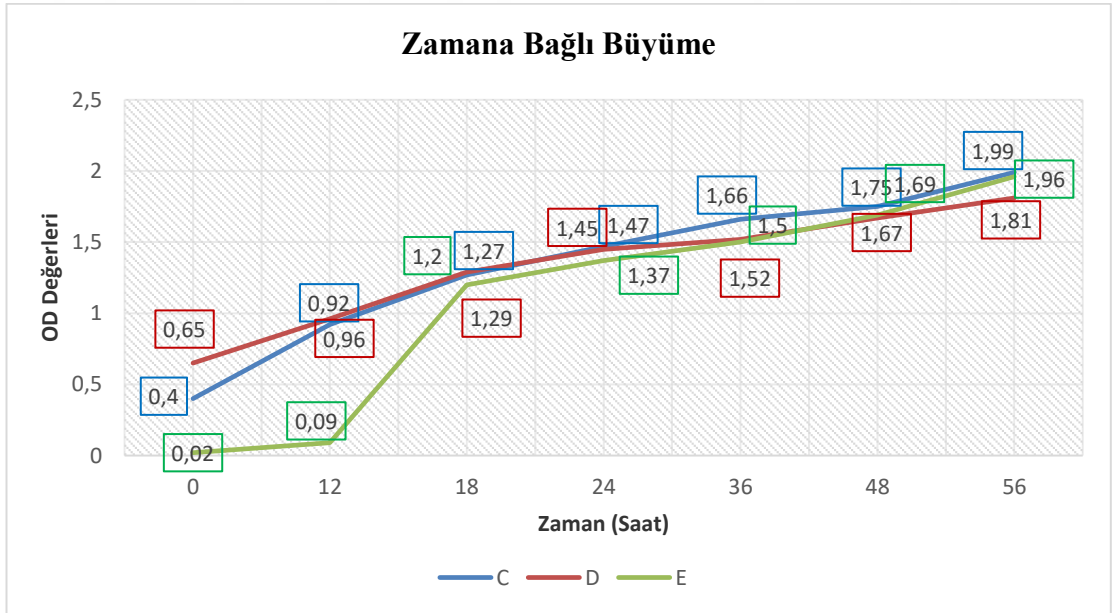
Çalışma sonuçlarımıza göre sularda *Legionella* bakterilerinin çok farklı serotip ve subgrupları bulunduğu görülmektedir. Deneylerimizde ayrıca çevresel *Legionella* bakterilerinin, A549 alveoler epitel hücrelerine sitotoksik etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *L. pneumophila* SG-1, *L. pneumophila* SG 2-14 ve *Legionella* species bakterilerin farklı MOI oranları kullanılarak A549 hücreleri farklı sürelerde enfekte edilmiş, sitotoksik etkileri MTT kolorimetrik yöntemi ile gösterilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarımızda sulardan izole edilen farklı *Legionella* bakterileri eksponansiyel fazda iken A549 hücrelerine enfekte edilmişler, bu çalışmalarda bakterilerin sitotoksik etkileri gözlenmemiştir. Büyüme fazının sitotoksik etkisinin bilinmesi nedeniyle, yaptığımız bu çalışmada sulardan farklı zamanlarda izole edilen *Legionella* bakterileri kullanılmıştır. Post-eksponansiyel faza ulaşmaları sağlandıktan sonra A549 hücrelerine enfekte edilmişlerdir.

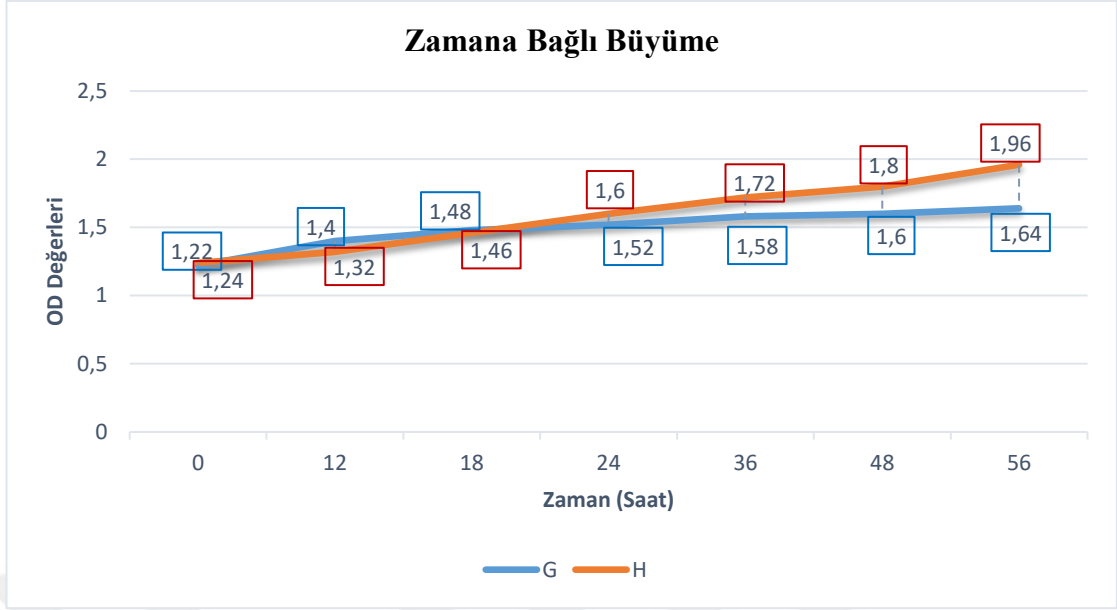
Çalışmada kullandığımız *L. pneumophila* SG 2-14 bakterilerin (A-B) ve *L. pneumophila* SG-1 bakterilerin (C-D) BYE agarda gelişimleri sağlanarak 620 nm spektrofotometre cihazında optik dansite (OD) değerleri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11' de görülmektedir.



Şekil 4.13 *L. pneumophila* SG 2-14 olan bakterilerin zamana bağlı büyüme grafiği (620 nm OD)



Şekil 4.14 *L. pneumophila* SG-1 olan bakterilerin zamana bağlı büyüme grafiği (620 nm OD)



Şekil 4.15 *Legionella* species olan bakterilerin zamana bağlı büyüme grafiği (620 nm OD)

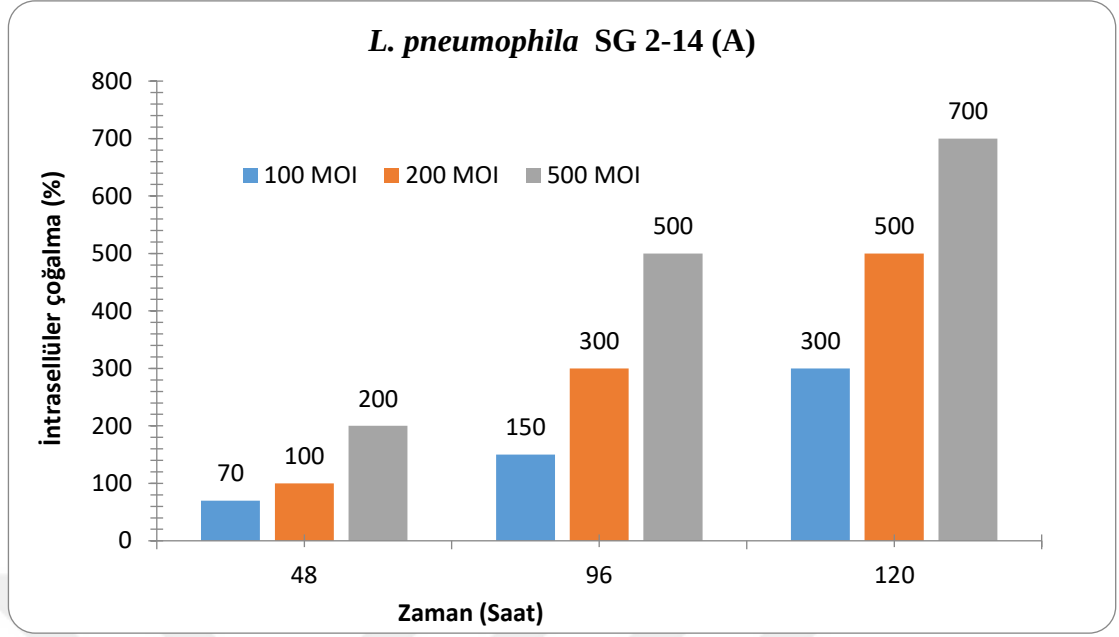
4.4 MTT ile Sitotoksosite Belirlenmesi

Sitotoksosite deneylerinin ilk çalışmasında, hastanelerin oda musluk suyu ve duş başlığından alınan su örneklerinden izole edilen *L. pneumophila* örnekleri kullanılmıştır.

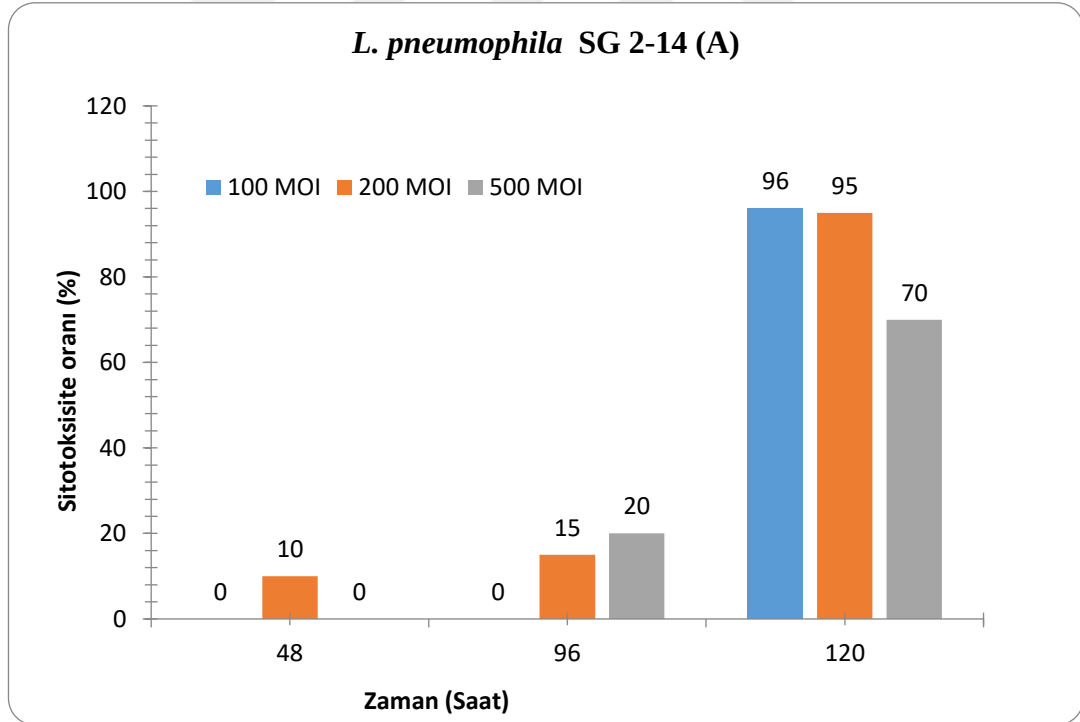
L. pneumophila SG 2-14 olan A örneğinde, 48 saat enfeksiyonda, 100 MOI de %70 200 MOI' de %100 ve 500 MOI' de %200 intrasellüler çoğalma meydana gelmiştir. 100 ve 500 MOI de sitotoksik etki olmamış, sadece 200 MOI de bir kuyucukta %10 sitotoksik etki gözlenmiştir.

96 saat enfeksiyonda, 100 MOI' de %150, 200 MOI' de ise %300, 500 MOI' de ise %500 oranında intrasellüler çoğalma meydana gelmiştir. 200 MOI' de 1 kuyucukta %15, 500 MOI' de 2 kuyucukta %20 ve %15 oranında sitotoksik etkiye neden olmuştur.

120 saat enfeksiyonda, 100 MOI' de %300, 200 MOI' de %500, 500 MOI' de ise %700 intrasellüler çoğalma görülmüştür. 100 MOI de triplicate olarak çalışılan kuyucuklardan birinde %96, 200 MOI de bir kuyucukta %95, 500 MOI de ise üç kuyucukta %50, %34 ve %73 oranlarında hücre ölümü gözlenmiştir.



Şekil 4.16 A bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma

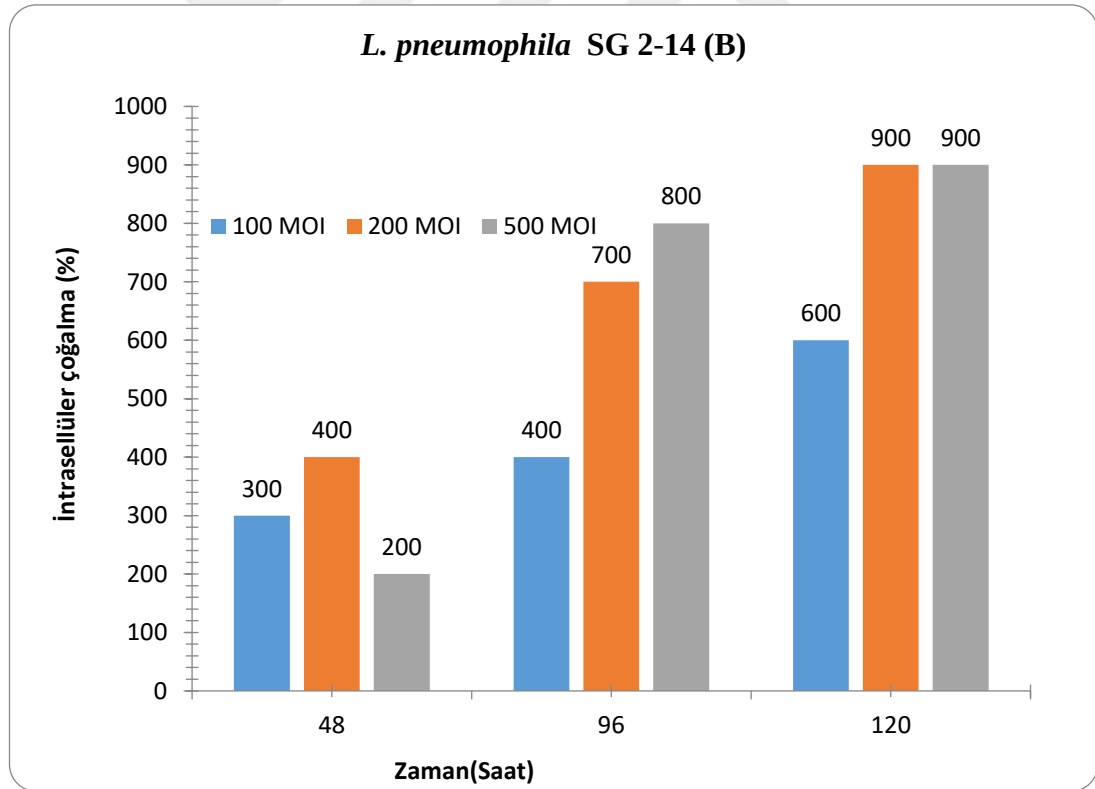


Şekil 4.17 A bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı sitotoksosite

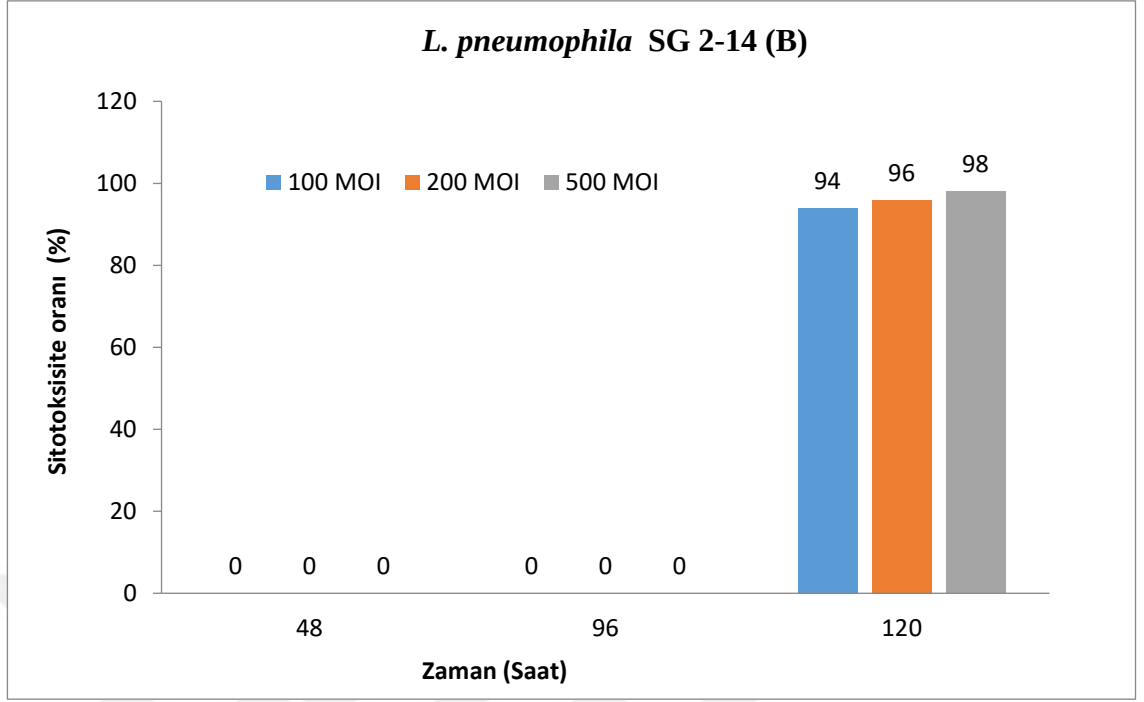
L. pneumophila SG 2-14 olan B örneğinde, 48 saat enfeksiyonda 100 MOI' de %300, 200 MOI' de %400 ve 500 MOI' de %200 intrasellüler çoğalma olurken, her MOI de hücre ölümü gözlenmemiştir.

96 saat enfeksiyonda, 100 MOI' de %400, 200 MOI de %700, 500 MOI' de %800 oranında intrasellüler çoğalma olurken, her MOI de hücre ölümü gözlenmemiştir.

120 saat enfeksiyonda, 100 MOI' de %600, 200 MOI' de %900, 500 MOI' de %900 intrasellüler çoğalma meydana gelmiştir. 100 MOI' de triplicate (3 kuyucuk) olarak çalışılan kuyucukların 2' sinde %93 ve %94, 200 MOI de 2 kuyucukta %95 ve %96, 500 MOI de 3 kuyucukta %91, %97 ve %98 oranlarında sitotoksik etki gözlenmiştir.



Şekil 4.18 B bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma

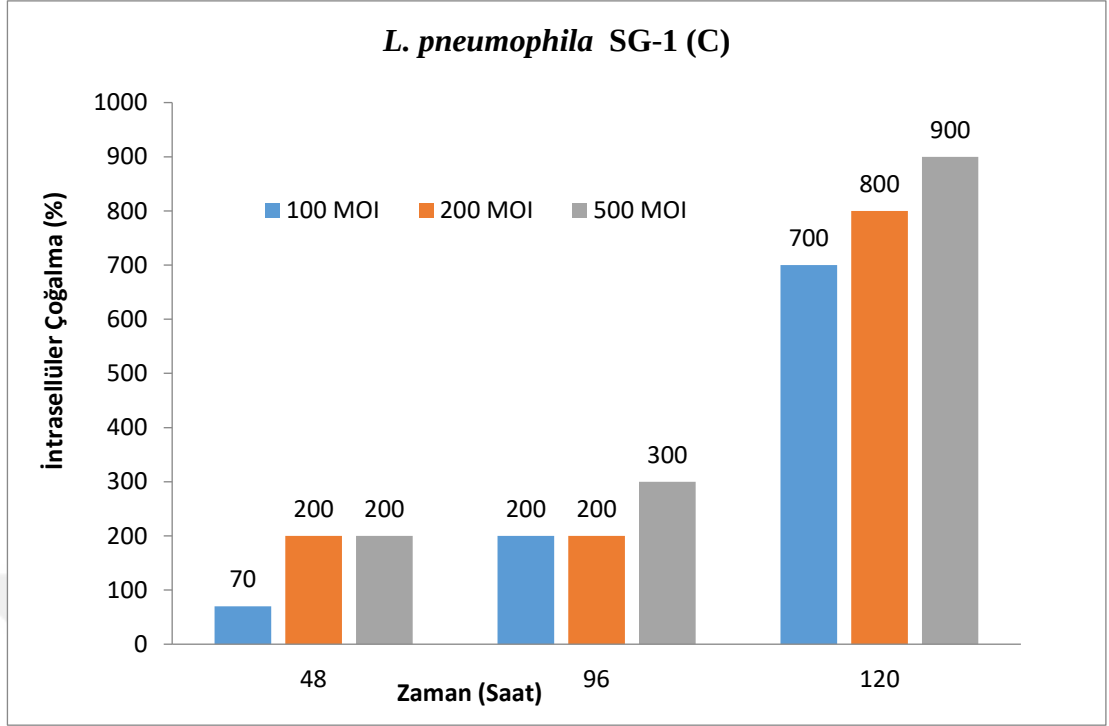


Şekil 4.19 B bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı sitotoksosite

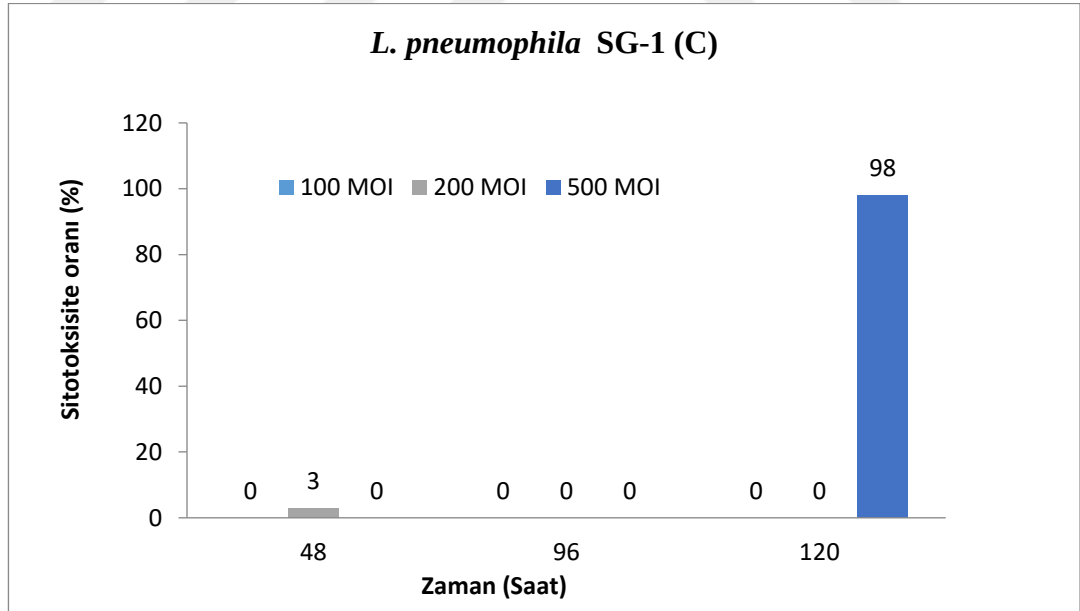
L. pneumophila SG-1 olan C örneğinde, 48 saat enfeksiyonda 100 MOI de %70, 200 MOI de %200 ve 500 MOI' de %200 intrasellüler çoğalma meydana gelmiştir. 100 ve 500 MOI de sitotoksosite gözlenmemiştir. 200 MOI' de %13 sitotoksik etki gözlenmiştir.

96 saat enfeksiyonda, 100 MOI' de %200, 200 MOI de %600, 500 MOI de %300 intrasellüler çoğalma meydana gelmiştir, hiçbirinde sitotoksosite gözlenmemiştir.

120 saat enfeksiyonda, 100 MOI de %700 ve 200 MOI de %800 intrasellüler çoğalma meydana gelmiş, ancak sitotoksik etki gözlenmemiştir. 500 MOI de ise, %900 hücre intrasellüler çoğalma meydana gelmiş, triplicate (3 kuyucuk) olarak çalışılan 3 kuyucuktan birinde %98 maksimum sitotoksik etki gözlenmiştir.



Şekil 4.20 C bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma

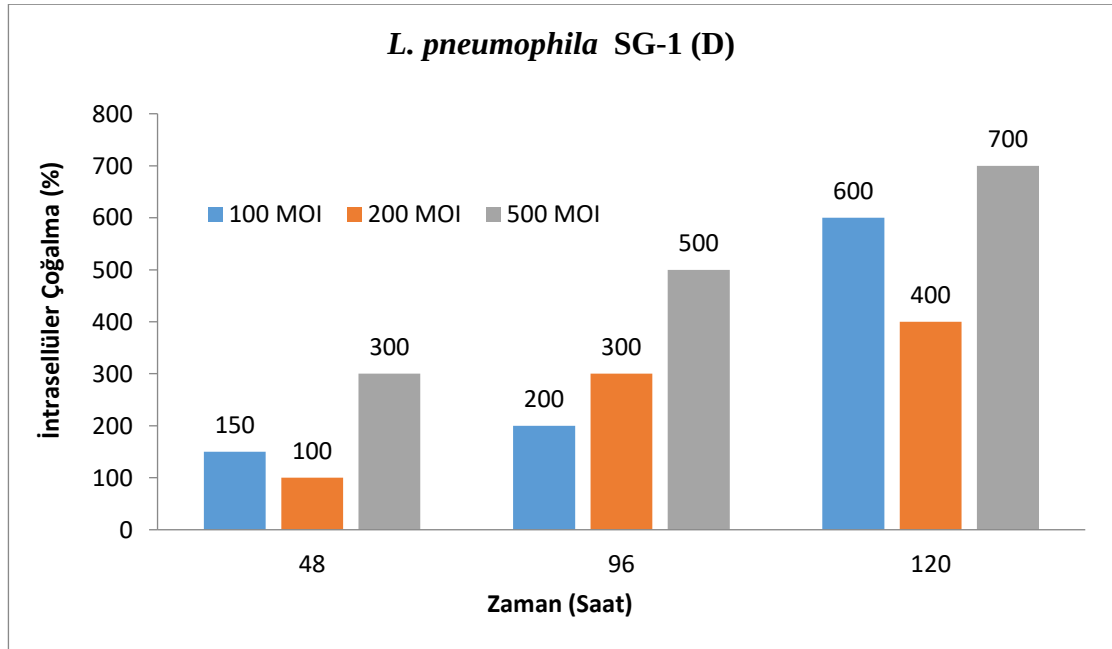


Şekil 4.21 C bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı sitotoksosite

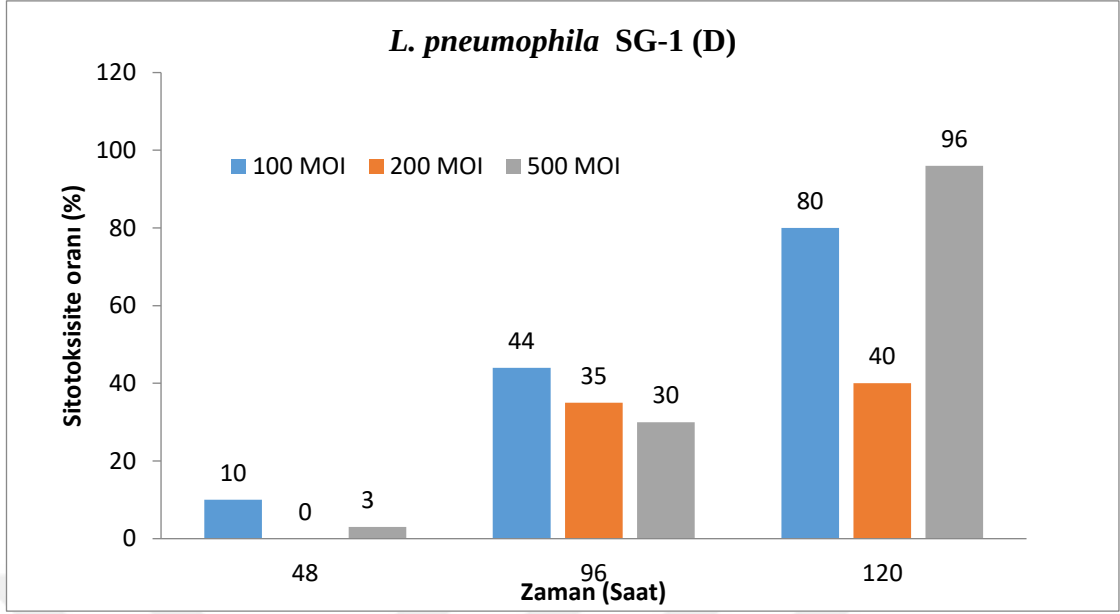
L. pneumophila SG-1 olan D örneğinde, 48 saat enfeksiyonda, 100 MOI' de %150 intrasellüler çoğalma meydana gelmiş, bir kuyucukta %11 sitotoksik etkiye neden olmuştur. 200 MOI' de bakteriler hücre içinde %100 intrasellüler çoğalma meydana gelmiş, ancak sitotoksik etki gözlenmemiştir. 500 MOI' de %300 intrasellüler çoğalma olurken, bir kuyucukta %3 oranında sitotoksik etki gözlenmiştir.

96 saat enfeksiyonda, 100 MOI' de %200 intrasellüler çoğalma meydana gelmiş, %44 sitotoksik etki gözlenmiştir. 200 MOI' de %300 intrasellüler çoğalma meydana gelmiş, 3 kuyucukta %42, %35 ve %28 oranlarında sitotoksik etki gözlenmiştir. 500 MOI' de %500 intrasellüler çoğalma olurken, 2 kuyucukta %29 ve %18 oranlarında sitotoksik etki gözlenmiştir.

120 saat enfeksiyonda, 100 MOI' de %600 intrasellüler çoğalma meydana gelmiş, 2 kuyucukta %63 ve %99 maksimum sitotoksosite gözlenmiştir. 200 MOI de %400 intrasellüler çoğalma olurken, 1 kuyucukta %40 sitotoksik etki gözlenmiştir. 500 MOI' de, %700 intrasellüler çoğalma meydana gelmiş olup, üç kuyucukta %90, %98 ve %99 oranlarında maksimum sitotoksosite gözlenmiştir.

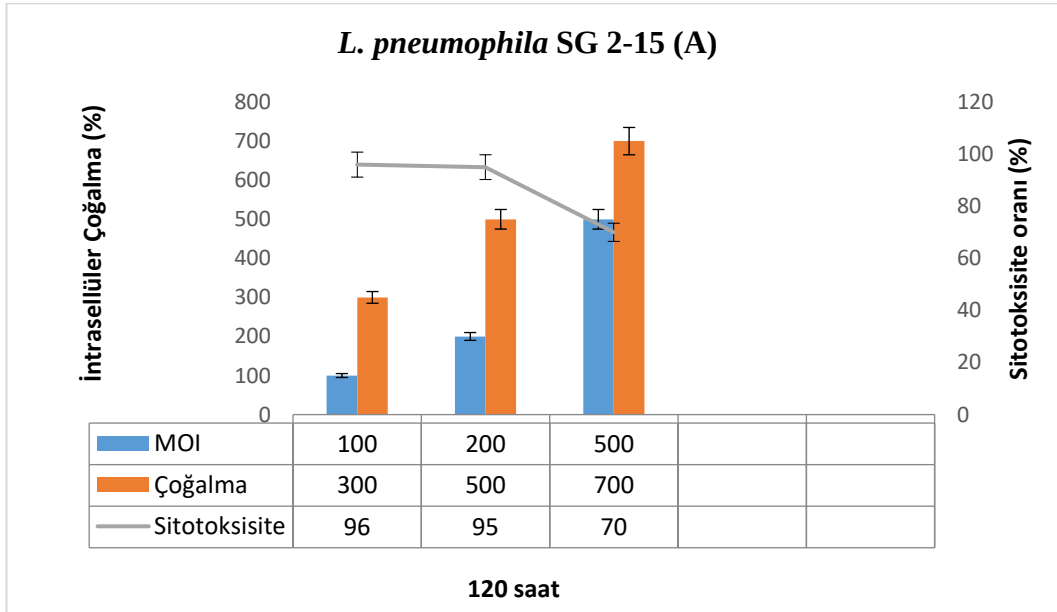


Şekil 4.22 D bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma

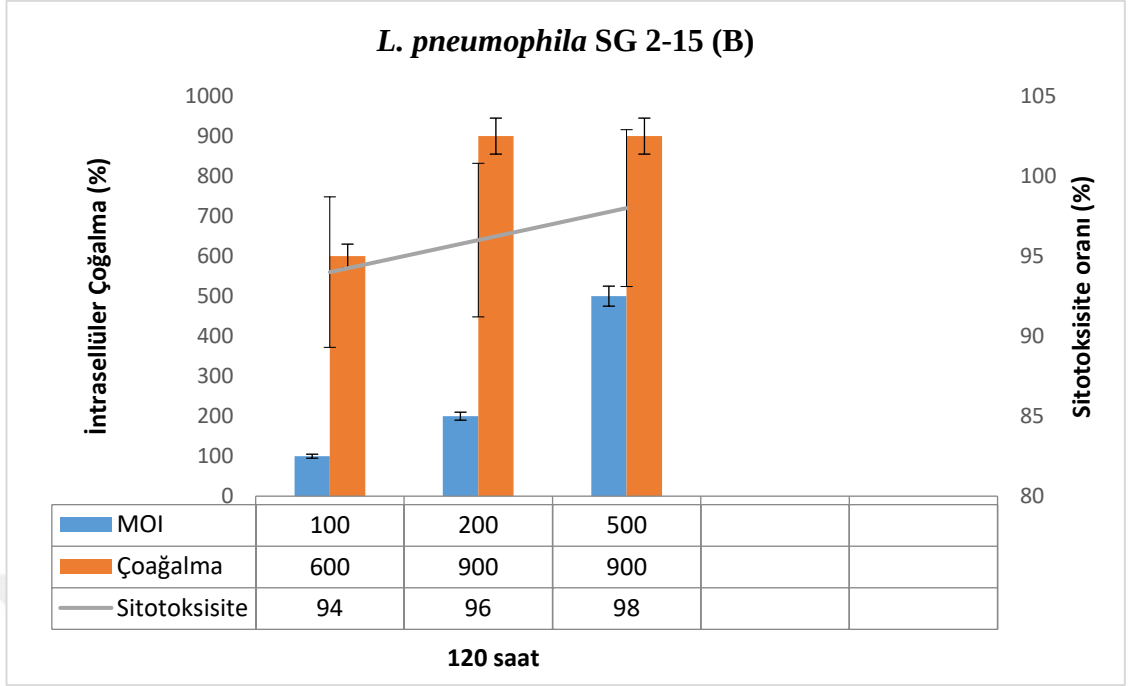


Şekil 4.23 D bakterisinde zaman ve MOI' ye bağlı sitotoksiste

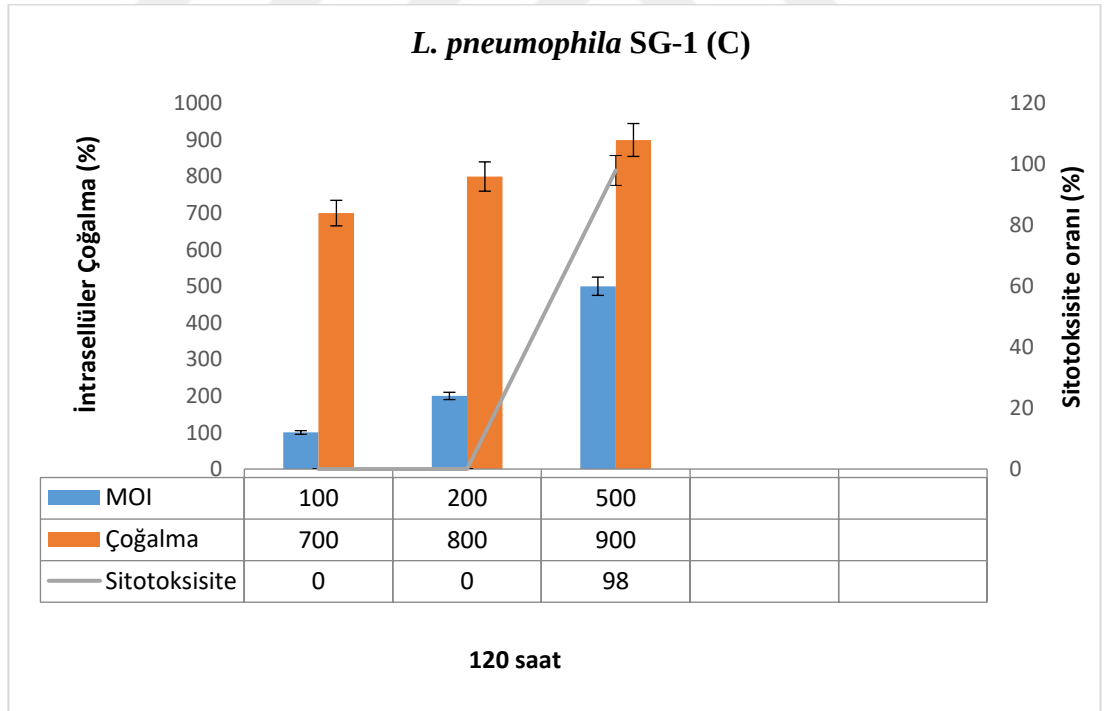
A, B, C, D olarak isimlendirilen *L. pneumophila* SG-1 ve *L. pneumophila* SG 2-15 olan örneklerin, özellikle 120 saat enfeksiyonda etkili oldukları görülmektedir. Bu nedenle 100, 200 ve 500 MOI oranlarındaki bakterilerin intrasellüler çoğalmaları ve sitotoksik etkileri aşağıdaki grafiklerde gösterilmektedir.



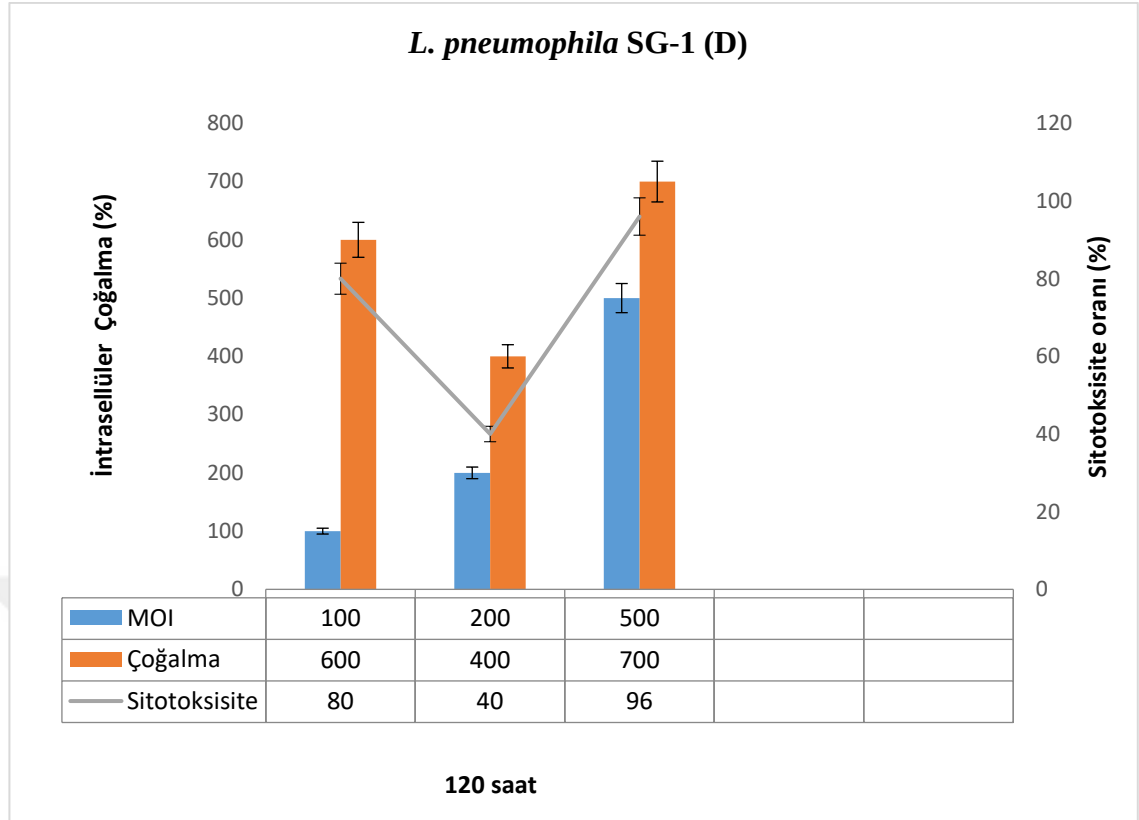
Şekil 4.24 A bakterisinde 120 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki



Şekil 4.25 B bakterisinde 120 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki



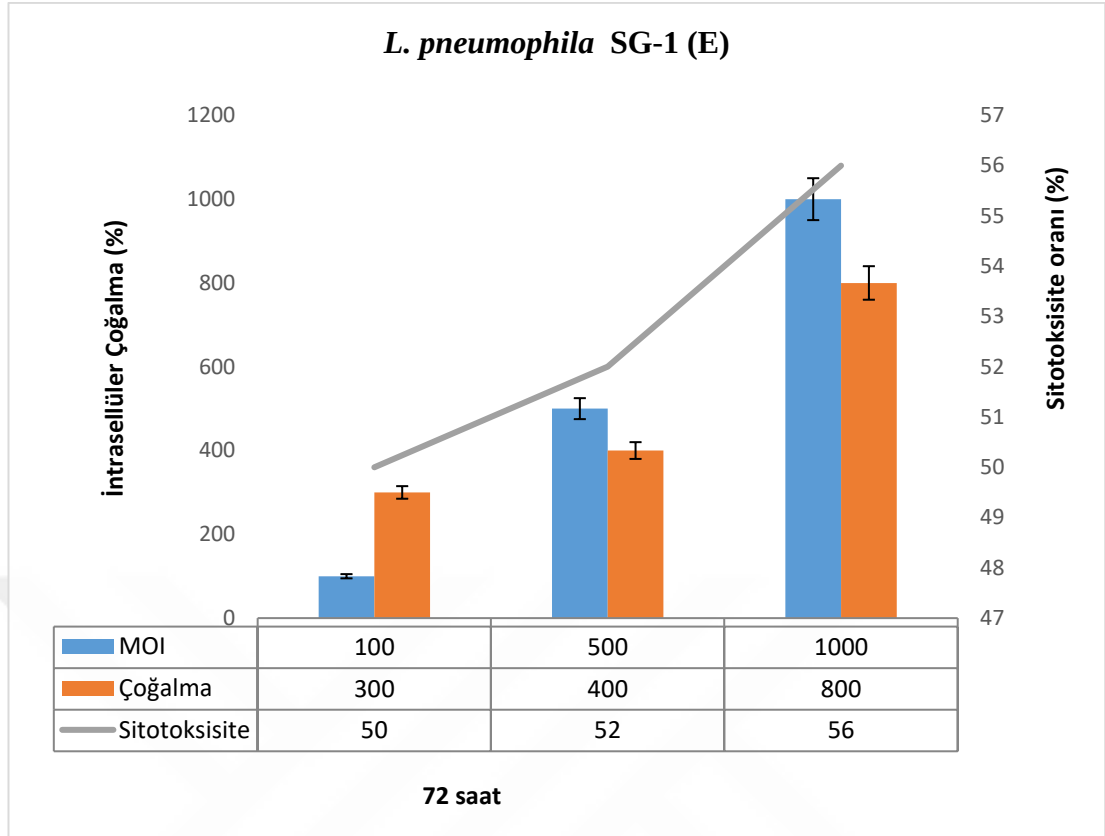
Şekil 4.26 C bakterisinde 120 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki



Şekil 4.27 D bakterisinde 120 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki

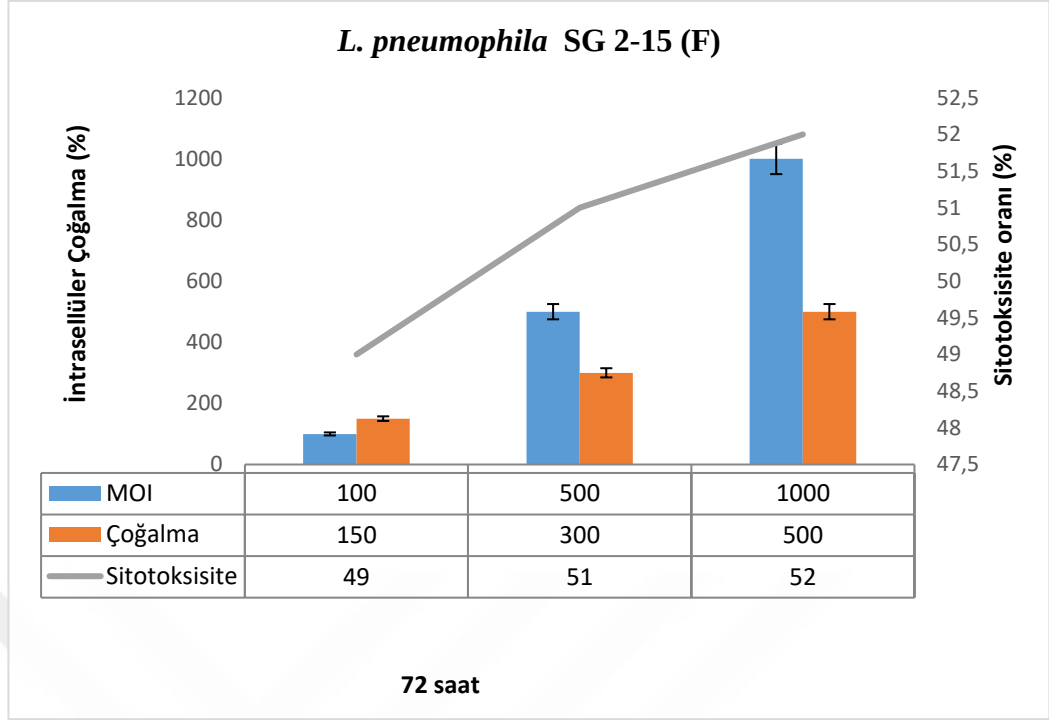
A549 hücrelerine *Legionella* bakterilerinin sitotoksik etkisini göstermek amacıyla yapılan ikinci deneyde, *L. pneumophila* SG-1, *L. pneumophila* SG 2-15 ve *L. species* olan bakteriler E, F, G, H şeklinde isimlendirilerek kullanılmıştır. Bu çalışmada 100, 500 ve 1000 MOI oranları ile 72, 96 ve 108 saat enfeksiyon süreleri uygulanmıştır.

L. pneumophila SG-1 olan E bakterisi, 72 saat enfeksiyonda 100 MOI' de %300 intrasellüler çoğalma ve bir kuyucukta %50 sitotoksosite, 500 MOI' de %400 intrasellüler çoğalma ve bir kuyucukta %52 sitotoksosite, 1000 MOI' de %800 intrasellüler çoğalma ve bir kuyucukta %56 sitotoksosite meydana gelmiştir. 96 ve 108 saat enfeksiyonlarda çok az intrasellüler çoğalma meydana gelirken, sitotoksik etki gözlenmemiştir.



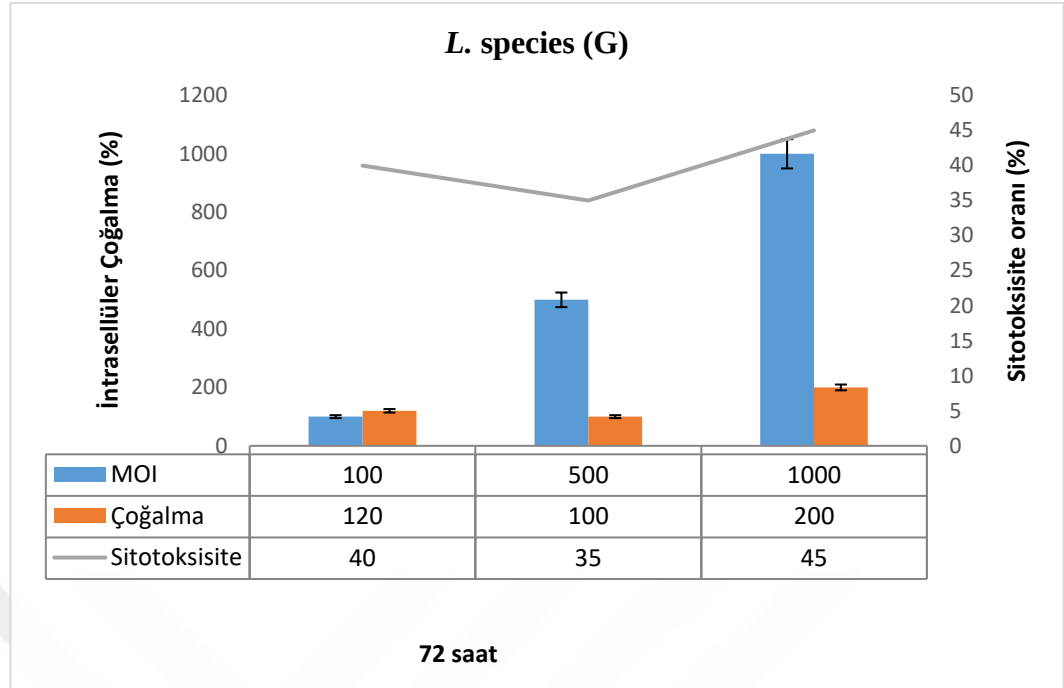
Şekil 4.28 E bakterisinde 72 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki

L. pneumophila SG 2-14 olan F örneğinde, 72 saat enfeksiyonda 100 MOI' de %150 intrasellüler çoğalma olurken, bir kuyucukta %49 sitotoksik etki olmuştur. 500 MOI' de %300 intrasellüler çoğalma olurken, bir kuyucukta %51 sitotoksik etki olmuştur. 1000 MOI' de %500 intrasellüler çoğalma olmuş ve bir kuyucukta %52 sitotoksik etki gözlenmiştir. 96 ve 108 saat enfeksiyonlarda çok az intrasellüler çoğalma meydana gelmiş olup, sitotoksik etki gözlenmemiştir.



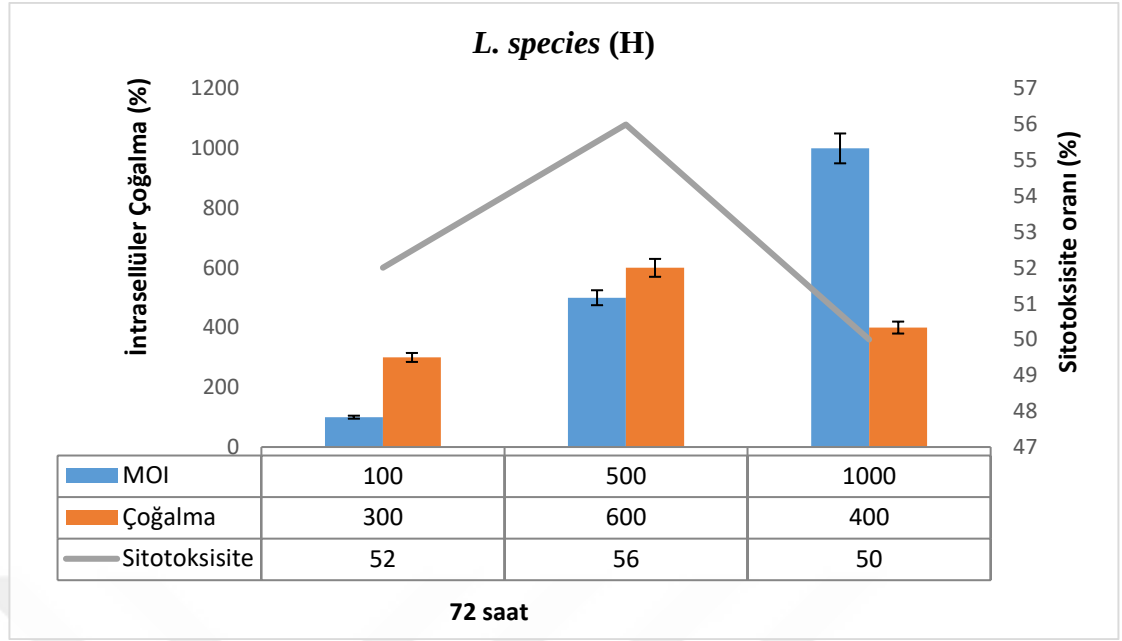
Şekil 4.29 F bakterisinde 72 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki

Legionella species olan G örneğinde, 72 saat enfeksiyonda 100 MOI' de %120 intrasellüler çoğalma olmuş ve bir kuyucukta %40 sitotoksik etki gözlenmiştir. 500 MOI de %100 intrasellüler çoğalma olmuş ve bir kuyucukta %35 sitotoksiste görülmüştür. 1000 MOI' de %200 intrasellüler çoğalma olmuş ve bir kuyucukta %45 sitotoksik etki gözlenmiştir. 96 ve 108 saat enfeksiyonlarda çok az intrasellüler çoğalma olmuş ve sitotoksik etki gözlenmemiştir.



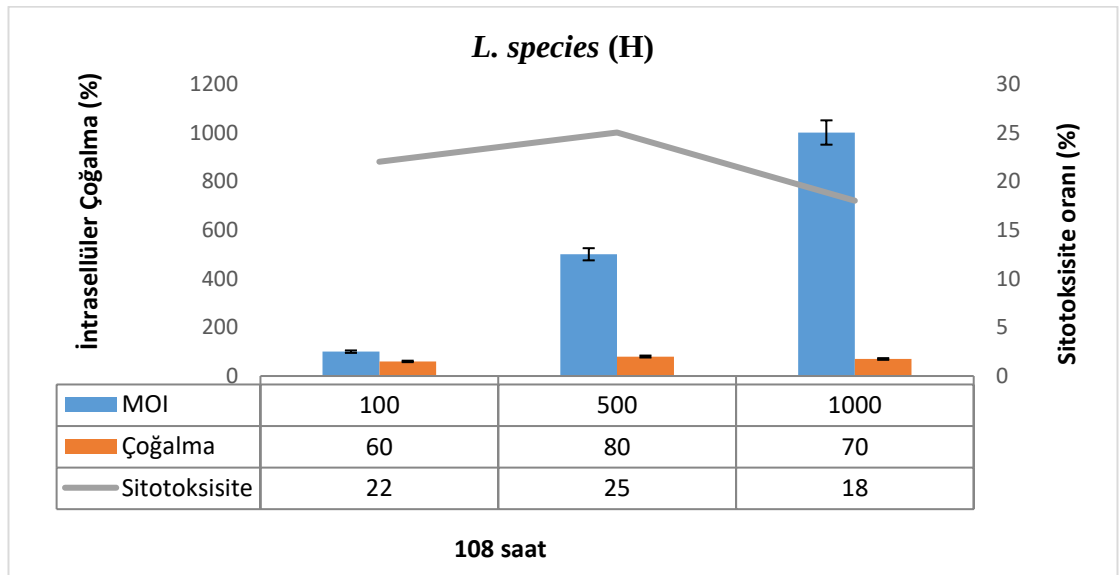
Şekil 4.30 G bakterisinde 72 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki

Legionella species olan H örneğinde, 72 saat enfeksiyonda 100 MOI' de %300 intrasellüler çoğalma olmuş ve %52 sitotoksik etki görülmüştür. 500 MOI' de %600 intrasellüler çoğalma olmuş ve %56 sitotoksik etki görülmüştür. 1000 MOI' de %400 intrasellüler çoğalma olmuş ve %50 sitotoksik etki görülmüştür. 96 saat enfeksiyonda çok az intrasellüler çoğalma olmuş ve sitotoksik etki gözlenmemiştir.



Şekil 4.31 H bakterisinde 72 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki

108 saat enfeksiyonda 100 MOI' de %60 intrasellüler çoğalma olmuş ve iki kuyucukta %22 ve %13 sitotoksosite gözlenmiştir. 500 MOI' de %80 intrasellüler çoğalma olmuş ve 1 kuyucukta %25 sitotoksik etki gözlenmiştir. 1000 MOI' de %70 intrasellüler çoğalma olmuş ve 1 kuyucukta %18 sitotoksik etki gözlenmiştir.



Şekil 4.32 H bakterisinde 108 saat enfeksiyon süresinde MOI' ye bağlı intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki

Çizelge 4.4 Post-Hoc Tukey testine göre MTT sonucunun istatistiksel analizi

Veri	Değişken	S.D	K.T	K.O	F	p	Post Hoc (Tukey)
Plate	a1	2	,268	,536	1,092	,367	
	a2	2	1,140	2,279	3,375	,069	
	a3	2	1,379	2,758	3,307	,072	
Değer	a1	2	,147	,293	,597	,566	
	a2	2	,160	,319	,472	,635	
	a3	2	1,187	2,375	2,847	,097	
Grup	a1	3	1,502	4,505	6,116	,009	
	a2	3	1,799	5,396	5,327	,014	
	a3	3	,394	1,183	,946	,449	
Plate*Değer	a1	4	,713	2,853	2,905	,068	
	a2	4	,323	1,294	,958	,465	
	a3	4	,709	2,835	1,700	,214	
Plate*Grup	a1	6	,601	3,606	2,447	,088	
	a2	6	1,475	8,851	4,369	,014	
	a3	6	,379	2,274	,909	,520	
Değer*Grup	a1	6	,430	2,578	1,749	,193	
	a2	6	,248	1,487	,734	,632	
	a3	6	,648	3,887	1,553	,243	

Plate (Zaman) = 48 saat, 96 saat, 120 saat

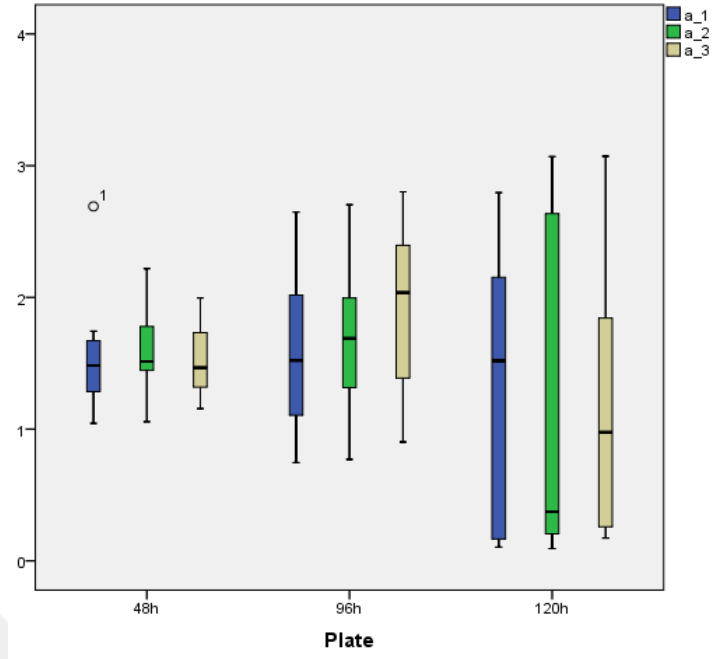
Değer (MOI) = 100, 200, 500

Grup (*Legionella pneumophila*) A bakterisi (2-14)

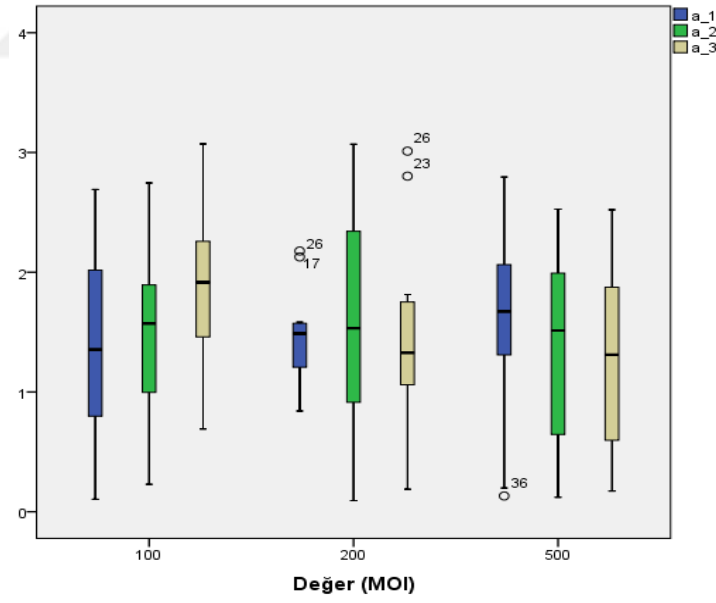
B bakterisi (2-14)

C bakterisi (SG-1)

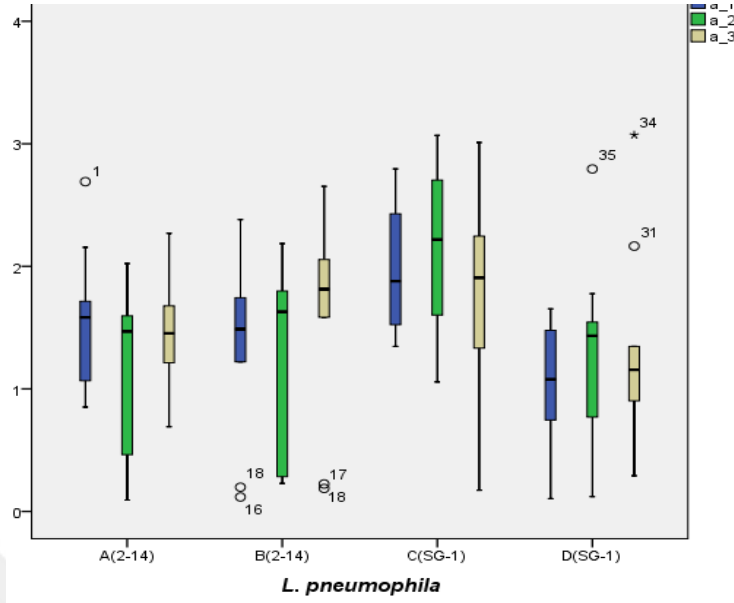
D bakterisi (SG-1)



Şekil 4.33 Gözlenen değerler ile zaman grafiği



Şekil 4.34 Gözlenen değerler ile MOI grafiği



Şekil 4.35 Gözlenen değerler ile *Legionella* grafiği

4.5 İstatiksel Analiz

Tüm deneyler üç tekrarlı olması amacıyla, aynı zamanda ve aynı plate içinde üç kuyucukta olacak şekilde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçların standart hataları hesaplanmıştır.

Deneylerde kullanılan tüm *Legionella* türlerinin, hem farklı enfeksiyon süreleri hem de farklı MOI oranları uygulandığında, incelenen alveoler epitel hücrelerde oluşan sitotoksik etkileri ve bu etkiler arasında anlamlı bir fark olup olmadığı, Post-hoc Tukey testi ile incelenmiştir.

Gözlenen değerler dikkate alındığında grup değişkenine ait a1 ve a2 kuyucukları ile plate ve grup karşılaştırmasında, a2 kuyucuğunda anlamlı bir farklılaşma olduğu görülmektedir. Farklılığın kaynağını bulmak için yapılan Post-hoc Tukey testine göre a1 kuyucuğunda bulunan *L. pneumophila* SG 2-14 (A) örneğinin, *L. pneumophila* SG-1 (D) örneğinden yüksek olması nedeniyle kaynaklandığı gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Su örneklerinde *Legionella*'nın tespit edilmesi ve serolojik tiplendirilmesi ile ilgili çok fazla çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda özellikle kültür ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda otel, hastane, çeşitli sanayi tesisleri, hamamlar, kaplıcalar, SPA merkezi ve meskenler gibi farklı binaların su sistemlerinde ayrıca toprak ve yüzme havuzunda kolonize olan *Legionella* bakterilerinin izolasyonu ve identifikasyonu yapılmış, su sistemlerinde *Legionella* bakterilerinin oldukça farklı tür, serotip ve serogruplarının olduğu ortaya çıkarılmıştır.

1998 yılında yapılan çalışmada, hastadan izole edilen 1 örnek ve içme suyundan izole edilen 2 örnekte *Legionella* araştırması yapılarak bunların, serogrup ve subtipleri belirlenmiştir. Klinik örneklerin 4'ünde *L. pneumophila* SG-1' in subgrubu Bellingham, 4' ü ise *L. pneumophila* SG-12 bulunmuştur. Çevresel örneklerde, 47 *Legionella* pozitif örnek bulunmuş, 5 'inde *Legionella* species, 42' si *L. pneumophila* bulunmuştur. SG-1' e ait subgruplar, 19' u Camperdown, 3' ü Bellingham olup, SG 2-14 olanlar ise, 6' sı SG-6 ve 14' ü SG-12 olarak tanımlanmıştır (Luck vd. 1998). Çalışmamızda klinik örnekler kullanılmamış ancak, SG-1' in Bellingham subgrubu ve SG-6 bulunması ile benzerlik görülmüştür.

2004 yılında apartman, otel ve hastaneden alınan 137 sıcak su örneğinde *Legionella* araştırması yapılarak, serogrup ve subtipleri belirlenmiştir. 59 apartmanın sıcak su sistemlerinde %30.5 *Legionella* pozitif bulunmuş, bunlardan %22 *L. pneumophila* ve %8.5 diğer *Legionella* türleri bulunmuştur. *L. pneumophila* pozitif olan 13 örnekte; 4'ü SG-3 ve 4'ü SG-9, 3'ü SG-6, 2'si SG-8; 1 örnekte *L. micdadei*, 1 örnekte ise *L. bozemanii* bulunmuştur. 11 otelin 4'ünde *Legionella* tespit edilmemiş, diğer 3'ünde SG-1, 3'ünde SG-6, 1'inde SG-3 ve SG-6 birlikte bulunmuştur. 5 hastaneden alınan 32 sıcak su örneğinin 5'inde %93.7 oranında *L. pneumophila* SG-3, diğer 2'sinde az oranlarda *L. anisa* ve *L. bozamanii* bulunmuştur (Leoni vd. 2005). Bizim sonuçlarımızda ise, %96.4 *L. pneumophila*, %3.6' sı *Legionella* spp. olarak bulunmuş ve *L. pneumophila* yüksekliği ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca *L. pneumophila* SG-3, SG-6 ile *Legionella* türlerinden *L. micdadei* bulunması yönünden benzerlik görülmektedir.

1980-2008 yılları arasında 86 klinik örnekten *L. pneumophila* suşları izole edilmiştir. %80.2 oranında *L. pneumophila* SG-1, diğerleri ise *L. pneumophila* SG-2, SG-3, SG-4, SG-5, SG-6 ve SG-9 olarak belirlenmiştir. SG-5, SG-3 ve SG-2, diğer serogruplara göre yüksek olduğu belirtilmiştir. SG-1' in monoklonal tiplendirilmesi sonucunda, %44.9 Benidorm, %17.4 Allentown/France, %14.5 OLDA, %1.5 Bellingham, %10.1 Philadelphia, %7.2 Knoxville, %4.4 Oxford subgrupları tespit edilmiştir. En çok baskın grubun Benidorm olduğu belirtilmiştir. SG-1 olan örneklerin erkek hastalarda (%87.5), kadın hastalara göre (%40) fazla olduğu belirtilmiştir. *L. pneumophila* SG-1, çalışma sonuçlarımızda elde edilen orandan fazla olmasına rağmen Bellingham, OLDA, Philadelphia ve Knoxville subgruplarının bulunması yönünden benzerlik olduğu görülmektedir. Sonuçlarımıza göre OLDA ve Philadelphia bu çalışma sonuçlarından yüksek bulunmuştur. Ayrıca *L. pneumophila*'nın SG-2, SG-3, SG-5 ve SG-6 serogruplarının bulunması yönünden sonuçlarımızla uyumlu olduğu görülmektedir.. Araştırmamızda klinik örnekler çalışılmamış olup cinsiyet arasında bir oran yapılmamakla birlikte, erkek ve kadınlar arasındaki oranın fazla olması (12/4), bu konuda daha ayrıntılı araştırma yapılmasının gerekliliğine dikkat çekmektedir (Amemura-Maekawa vd. 2010).

2003-2007 yılları arasında İsrail' in farklı şehirlerindeki otel, hastane, yaşlı bakım evi ve sağlık kurumundan alınan su örneklerinin serolojik tiplendirmesi yapılmıştır (Yarom vd. 2010). SG-3, sonuçlarımızda elde edildiği gibi bulunmuş olmasına rağmen, farklı olarak *L. pneumophila* SG-3' ün SG-1' e göre daha baskın serogrup olduğu görülmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada, SPA merkezinden alınan su örneklerinin tanımlanması amacıyla, DFA yönteminde mTech antikoru kullanılmıştır. %40' dan fazla *L. pneumophila* SG 2-14 ve %57.6 oranında *L. pneumophila* SG-1 bulunmuştur. *L. pneumophila* SG 2-14 dağılımı; %36.4 oranında SG-5 ve en az %6.1 oranında SG-10 olarak tespit edilmiştir (Chang vd. 2010). Sonuçlarımızda *L. pneumophila* SG 2-14 oranı daha yüksek bulunmasına rağmen, SG-5 ve SG-10 serogruplarının saptanması yönünden benzerlik bulunmaktadır.

Japonya’ da yapılan bir çalışmada banyo, soğutma kuleleri ve topraktan alınan çevresel ve salgın kaynaklı olan klinik örnekler karşılaştırılmıştır. Soğutma kulelerinde *L. pneumophila* %67 oranında SG-1, %23 oranında SG-7 bulunmuştur. Banyo sularında %42 Bellingham, %14 Oxford ve %12 OLDA, %12 Benidorm, %8 Philadelphia, %2 Knoxville; soğutma kulelerinde %72 Oxford, %24 OLDA, %2 Philadelphia, %2 Benidorm; toprakta %51 OLDA, %31 Bellingham, %3 Oxford, %3 Philadelphia, %3 Benidorm; klinik örneklerde %45 Benidorm, %17 Allentown/France, %15 OLDA, %10 Philadelphia, %7 Knoxville bulunmuştur (Amemura-Maekawa vd. 2012). Sonuçlarımızdan farklı olarak *L. pneumophila* SG-1 yüksek oranlarda bulunmasına rağmen *L. pneumophila* SG-1 subgrupları olan Bellingham, OLDA ve Philadelphia ve Knoxville bulunması yönüyle bulduğumuz verilerle uyumlu olduğu görülmektedir.

İsveç’ in Lidköping şehrinde görülen salgında, 15 farklı soğutma kulesinden alınan 61 su örneği ve salgın nedeniyle hastanede yatan 84 kişiden alınan örneklerde serotipleme çalışması yapılmıştır. Hastalardan izole edilen örnekte, *L. pneumophila* SG-1’ in Benidorm ve Bellingham subgrupları bulunmuştur. Soğutma kulelerinin 3’ ünde, *L. pneumophila* SG-1’ in Benidorm, Bellingham, Portland ve OLDA subgrupları bulunmuştur (Ulleryd vd. 2012). Bu sonuçlar, çalışma sonuçlarımızda elde edilen *L. pneumophila* SG-1’ in Bellingham ve OLDA subgrupları ile benzerlik göstermektedir. Çalışma sonuçlarımızda soğutma kulesine ait sulara *L. micdadei* ve *L. longbeachae* bulunması yönüyle farklılık olduğu gözlenmektedir.

1989-2016 arasında İspanya’ da yapılan çalışmada, 109 klinik, 157 çevresel olan toplam 266 örneğin serotipleri arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. %13.5 oranında SG-1 olmayan *L. pneumophila* bulunmuştur. *L. pneumophila* SG-1 subgruplarının dağılımı; %26.61 oranında Philadelphia, %19.27 oranında Knoxville, %14.68 oranında OLDA, %14.68 oranında Benidorm bulunmuştur. Klinik örneklerde %31.9 oranında Philadelphia, %27.8 oranında Knoxville, %24.24 oranında OLDA, %27.27 oranında SG-1 olmayan *L. pneumophila* bulunmuştur. Çevresel örneklerde, %33.1 oranında OLDA, %17.2 oranında SG-1 olmayan *L. pneumophila* tespit edilmiştir. Soğutma kulelerinde; %26.7 oranında OLDA, %17.4 oranında Oxford, %12.8 oranında SG-1 olmayan *L. pneumophila* bulunmuştur. Hastane sularında %51.6 oranında OLDA, %35.5 oranında

SG-1 olmayan *L. pneumophila* bulunmuştur (Quero vd. 2018). Farklı oranlarda olmalarına rağmen OLDA, Knoxville ve Philadelphia subgruplarının bulunması yönüyle sonuçlarımıza benzer olduğu görülmüştür. SG-1 olmayan *L. pneumophila*'nın oldukça yüksek değerlerde olduğu ancak bu serogrupların ayrı olarak belirtilmediği görülmüştür. Ayrıca çevresel örnek dışında klinik örnekler çalışılması yönüyle de çalışmamızdan farklılık göstermektedir.

2000-2019 yılları arasında yapılan çalışmada, Yunanistan'ın Girit adasında bulunan 132 otelin oda, yüzme havuzu, banyo sularının sıcak ve soğuk su sistemlerinden alınan 3311 su örneğinde *Legionella* analizi yapılmıştır. 83 otelin 685 su örneğinde *L. pneumophila* bulunmuş, %30.96 oranında SG-1, %18.27 oranında SG-3 oldukları belirlenmiştir. Sıcak su dağıtım sistemlerinde %36.81 oranında, soğuk sularda %12.4 ve tortu örneklerinde %24.43 oranında *L. pneumophila* bulunmuş olup, sıcak sularda *L. pneumophila* yönünden yüksek pozitiflik olduğu görülmüştür (Papadakis vd. 2021). Sonuçlarımızda sıcak ve soğuk sistemler arasında karşılaştırma yapılmamasına rağmen, pozitif çıkan su örneklerinin sıcak sulara ait oldukları görülmektedir. Ayrıca *L. pneumophila* SG-1 değerinin yüksekliği bakımından sonuçlarımızdan farklılık göstermektedir. SG-3'ün sonuçlarımız bulunan %3.5 oranına göre oldukça yüksek bulunduğu görülmektedir.

Ocak 2009 ve Aralık 2010 arasında Morocco (Fas)'nın farklı bölgelerindeki 9 farklı şehirde bulunan 26 otel, 6 fabrika ve 2 spor merkezinden alınan toplam 156 sıcak su örneğinde *Legionella* analizi yapılmıştır. Otellerde 118, fabrikada 33 ve spor merkezinden 5 su örneği çalışmaya alınmıştır. Analiz sonuçlarında %38.2 oranında *L. pneumophila* bulunmuştur. %36.5 oranında otellerde, %40 oranında spor merkezinde ve %12.2 oranında fabrikada *L. pneumophila* pozitifliği gözlenmiştir. *L. pneumophila*'nın serogrup dağılımları ise, %37 SG-1, %4 SG-3, %14 SG-4, %37 SG-6 olduğu belirlenmiştir. En yaygın olarak, SG-1 ve SG-6'nın olduğu belirtilmiştir (Mekkour vd. 2012). SG-1 pozitifliğinin sonuçlarımıza göre oldukça yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca SG-3 ve SG-6 bulunması yönüyle benzerlik olmasına rağmen, SG-3 değerlerinin birbirine yakın olduğu, ancak SG-6'nın sonuçlarımızdan oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Çevresel örneklerle yapılan araştırmalar sularda *Legionella* pozitif oranının yaz aylarında daha yüksek olduğunu göstermiştir. Lejyoner hastalığının surveyans ve epidemiyolojik araştırmalarının, salgınların saptanması ve diğer epidemiyolojik özellikleri ortaya çıkarmakla birlikte ayrıca, hastalığı önleme ve kontrol stratejilerinin oluşturulmasına katkı sağlayacağı belirtilmektedir (Leung vd. 2020). Çalışmamızda mevsimsel değerlendirme yapılmamıştır. Yıl içinde farklı zamanlarda su sistemlerinden alınan su örneklerinin analizleri yapılmıştır. Ancak mevsimsel farklılıklara göre epidemiyolojik araştırma yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Türkiye’de farklı şehirlerde bulunan çeşitli su sistemlerinden alınan su örneklerinde *Legionella* analizi yapılmış ayrıca serogrup ve subgrupları tespit edilmiştir.

Ege bölgesinde İzmir, Aydın, Muğla ve Bodrum' da bulunan turistik otellerin musluk, soğutma kulesi, jakuzi gibi su sistemlerinden alınan örneklerde *Legionella* analizi yapılmış, DFA yöntemi ile serogrupları belirlenmiştir. Sonuçlara göre *L. pneumophila* serogruplarının dağılımları; İzmir' de SG-3, SG-6, SG-8, SG-10, SG-11, SG-13; Aydın' da SG-11 ve SG-3; Muğla' da SG-6 ve SG-8; Bodrum' da sadece SG-6 olarak bulunmuştur (Afacan vd. 2006). Sonuçlarımıza göre, otellerde *L. pneumophila* SG-3, SG-6 ve SG-10 bulunması yönünden uyumlu olduğu görülmüştür.

2009 yılında İstanbul' da yapılan bir çalışmada 61 meskene ait toplam 122 sıcak su örneği *L. pneumophila* ve serbest yaşayan amipler yönünden araştırılmıştır. Ev sularında, %21.3 *L. pneumophila* ve %31 oranında serbest yaşayan amipler bulunmuştur. Su örneklerinin 19.6% oranında ve swap örneklerinin %6.5 oranında *L. pneumophila* pozitifliği bulunmuştur. Bunların %87.5 oranında *L. pneumophila* SG 2-14, %12.5 oranında *L. pneumophila* SG-1 oldukları belirlenmiştir (Burak ve Zeybek 2010). Çalışma sonuçlarımızda olduğu gibi *L. pneumophila* SG 2-14 oranında yüksek pozitiflik olması nedeniyle benzerlik gözlenmektedir.

2010 yılı Ocak-Aralık aylarında yapılan çalışmada Antalya' da 56 farklı otelden alınan 1403 su örneğinde, otellerin %37.5' inde ve toplam su örneklerinin %10.1' inde *L. pneumophila* pozitifliği belirlenmiştir. Pozitif örneklerin %85' i *L. pneumophila* SG

2–14, %15' i ise *L. pneumophila* SG-1 yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir (Özen vd. 2012). Bu sonuçlar, *L. pneumophila* SG-1 ve yüksek oranda pozitif *L. pneumophila* SG 2-14 olması nedeniyle, çalışma sonuçlarımızla uyumlu bulunmaktadır.

Kayseri' de hastane, okul, otel ve meskenlerin alınan 120 su örneğinde *Legionella*’ nın lateks aglütinasyon ile serogrupları belirlenmiştir. 8 örnekte *Legionella* pozitif olup, 6 örnekte *L. pneumophila* SG-1 ve 2 örnekte *Legionella* species bulunmuştur. *Legionella* species olanlar otellerin musluk-duş başlığı, *L. pneumophila* SG-1 olanlar ise hastanelerin depo, musluk ve duş sistemlerinden alınan su örnekleri olduğu belirlenmiştir (Akkaya ve Özbal 2011). Bu çalışmada otellerde *Legionella* species, hastanelerde *L. pneumophila* SG-1 yüksek pozitif olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre hastane ve otellerin depo, musluk ve duş sularında *Legionella* pozitifliğinin tespit edilmesi yönünden sonuçlarda benzer oldukları görülmektedir.

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin değişik servislerinde duş başlığı, musluk ve depo sularından alınan toplam 100 su örneğinde *Legionella* analizi yapılmıştır. Duş başlığı ve musluklara ait 6 su örneğinin 3' ünde *L. pneumophila* SG-1 ve 3 örnekte *Legionella* species, 8 depo suyunun 1' inde ise *Legionella* species bulunmuştur. Çocuk sağlığı ve hastalıkları anabilim dalı servislerinden alınan su örneklerinin 1' inde *L. pneumophila* SG-1, diğer 1' inde ise *Legionella* species, anesteziyoloji ve reanimasyon birimlerinde musluk sularında *Legionella* species bulunmuştur (İğnak ve Gürler 2012). Burada sadece serotipleme çalışması yapılmış olup, su sistemlerinde SG-1 ve *Legionella* species bulunması yönünden çalışma sonuçlarımızla uyumlu olduğu görülmektedir.

Alanya' da yeni açılan bir otelin su sistemlerinin 10 farklı yerinden alınan su örnekleri ve otelde görülen salgın nedeniyle 6 hasta ve 26 hastalık şüphesi olan kişilerden alınan klinik örnekler çalışılmıştır. 13 farklı su örneğinin 11' inde *L. pneumophila* SG-1 bulunmuştur. 6 hastanın idrar örneğinde *L. pneumophila* SG-1 pozitif bulunmuş, ayrıca bir hastanın serumunda, *L. pneumophila* SG-1 antikor pozitifliği tespit edilmiştir. Hastalık şikayeti olan 26 kişinin idrarında *L. pneumophila* SG-1 pozitifliği bulunmamıştır (Erdoğan ve Aslan 2013). SG-1 pozitifliği, çalışma sonuçlarımızın verilerinden daha yüksek olmakla birlikte, otel sularında *L. pneumophila*’ nın farklı serogruplarının bulunması özellikle

toplum kaynaklı salgınlarda *L. pneumophila*'nın önemli bir etken olduğunu göstermektedir.

Erzurum ve çevre illerdeki otel, hamam ve alış-veriş merkezlerine ait 2025 su örneğinin, 65' inde *L. pneumophila* tespit edilmiştir. Serolojik tiplendirme ile %70.8 oranında *L. pneumophila* SG 2–14, %27.7 oranında *L. pneumophila* SG-1 bulunmuştur. Ayrıca bir su örneğinde *L. pneumophila* SG 2–14 ve *L. pneumophila* SG-1 birlikte bulunmuştur. Sıcak su musluklarında %11.6 oranında, sıcak su tanklarında %6.1 oranında, duş sularında %4.8 oranında pozitiflik olduğu belirtilmiştir (Yılmaz ve Orhan 2021). Bu çalışma, yüksek oranda *L. pneumophila* SG 2–14 pozitifliği olması yönüyle çalışma sonuçlarımızla uyumlu bulunmaktadır. Ayrıca sıcak su musluklarında, sıcak su tanklarında ve duş sularında *Legionella*'nın pozitif bulunması yönüyle sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca, su örneklerinden izole edilen farklı *Legionella* bakterileri A549 alveoler epitel hücrelerine enfekte edilmiştir. *Legionella* bakterilerinin A549 hücrelerine girerek hücre içinde yaşadıkları ve çoğaldıkları ayrıca zaman ve doza bağlı olarak sitotoksik etkiye neden oldukları gösterilmiştir. Bu konu üzerinde yapılan birçok araştırma sonuçları *Legionella* bakterilerinin A549 hücrelerine olduğu gibi diğer solunum yolu hücrelerine de sitotoksik etkilerinin olduğunu göstermektedir.

L. pneumophila'nın HL-60 makrofajlarında sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile gösterilmiştir. MOI:50' de 48 saat enfeksiyon sonunda *Legionella corby* etkisi ile hücre canlılığı %82' den 4. günde %53 azalma meydana gelmiştir. MOI:500 de ise, %57 oranında maksimum sitotoksikite gözlenmiştir. *L. pneumophila*'nın mip ve msp yönünden mutant suşları MOI:10' da enfekte edilince, canlılık %62.8 ve %43.2 olarak bulunmuştur. *L. corby*'nin farklı MOI ve farklı inkübasyon süreleri uygulanınca HL-60 hücrelerini %18-%56 arasında öldürebildiği gözlenmiştir (Müller vd. 1996). Çalışma sonuçlarımızda olduğu gibi 48 saat enfeksiyon süresinin hücre canlılığını çok fazla etkilemediği görülmektedir. Hücre canlılığının 4. günde azalma göstermesi, farklı MOI ve inkübasyon süreleri uygulandığında hücreleri farklı oranlarda etkilemesi yönünden çalışma sonuçlarımız ile uyumlu bulunmaktadır.

L. dumoffii Tex-KL ve *L. pneumophila* Philadelphia-1 (ATCC 33152) suşlarının, A549 hücrelerine enfeksiyondan 1-2 gün sonra hücre içinde büyüdükleri gözlenmiştir. *L. dumoffii* Tex-KL suşu, *L. pneumophila* Philadelphia-1 suşuna göre A549 hücreleri ile 10 kat fazla etkileşim göstermiştir. *L. dumoffii*'nin A549 hücrelerine adezyon ve invazyon özelliğinin, *L. pneumophila* Philadelphia-1' den fazla olduğu, yaklaşık 3 saatte ikiye katlanarak hızla çoğaldığı gözlenmiştir (Maruta vd. 1998). Çalışma sonuçlarımıza göre SG-1 olan C, D ve E örneklerinde intrasellüler replikasyonları farklı oranlarda olmasına rağmen, yapılan çalışma sonuçları ile uyumlu olarak, A549 hücreleri ile etkileşimlerinin fazla olduğu görülmektedir.

L. pneumophila'nın büyüme fazının sitotoksositeye etkisini belirlemek amacıyla makrofajlar, farklı büyüme evresindeki bakterilerle 1 saat enfekte edildikten sonra, makrofaj canlılığı kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir. Post-eksponansiyel fazdaki *L. pneumophila* makrofajları öldürürken, eksponansiyel fazdaki *L. pneumophila*'nın makrofajları öldüremediği gözlenmiştir. MOI:8 ile 1 saat enfeksiyonda, makrofajlar %9 canlı kalmışlardır. MOI:15 ile 1 saat enfeksiyonda %80 canlı kalmışlardır. Sitotoksik etkinin alveoler epitel hücrelerde de büyüme fazıyla bağlantılı olduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Bakterinin post-eksponansiyel fazda iken, eksponansiyel faza göre daha hareketli, bulaşıcı ve öldürücü etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Byrne ve Swanson 1998). Çalışmamızda A549 hücreleri kullanılmış olup bakterilerin post-eksponansiyel fazda enfekte edilmeleri sağlanmış, özellikle yüksek MOI oranları ve uzun süreli enfeksiyonda sitotoksik etkiye neden oldukları gözlenmiştir. Verilerimiz yapılan araştırma sonuçları ile uyumlu bulunmaktadır.

1999 yılında yapılan çalışmada, 4 farklı *L. micdadei* suşu (Rivera, Camilleri, 31B, D2676) ile, iyi tanımlanan bir *L. pneumophila* suşunun virülans özellikleri, fare makrofajları ve U937 makrofajlarında karşılaştırılmıştır. Makrofajlarda *L. micdadei*'nin %1-%3 oranında, *L. pneumophila*'ya göre daha az bağlanma ve yaşama özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir. U937 hücrelerinde ise *L. micdadei* ve *L. pneumophila* suşlarının 48 saat enfeksiyondan sonra daha fazla büyüdükleri gözlenmiştir. 72 saat enfeksiyonda ise *L. micdadei*'nin 31B suşu ile *L. pneumophila*'nın CFU oranları 100 kat artış göstermiştir. 24 saatte *L. micdadei*'nin Rivera ve Camilleri suşları 10 kat artarken sonra tekrar azalma

göstermiştir. Camilli, Rivera ve D2676 suşları, makrofajlarda az büyüme oranına sahip iken 31 B suşu, *L. pneumophila*'nın Lp02 suşu kadar virulans etki göstermiştir. MOI:5' ten fazla uygulanınca *L. pneumophila* makrofajların %95' ini öldürebilmiştir. *L. micdadei* hem eksponansiyel hem de post-eksponansiyel fazda iken MOI:50 oranında enfekte edilmiş, ancak makrofaj canlılığını etkilememiştir. *L. micdadei* 31B ise, replikasyona uğramasına rağmen temas bağımlı sitotoksiste meydana gelmemiştir (Joshi ve Swanson 1999). Çalışma sonuçlarımızda da görüldüğü gibi aynı türün farklı serogrupları, farklı MOI ve enfeksiyon süreleri kullanılarak hücreye uygulandığında, serogruplar arasında intrasellüler çoğalma ve sitotoksik etki yönünden değişiklikler olduğu gözlenmektedir.

U937 makrofajları MOI:50 oranında *L. pneumophila*'nın virulans etkili suşu ile 1 saat enfekte edildiğinde %31 oranında, 3 saat enfeksiyonda ise %56 oranında sitopatojenite gözlenmiştir. Enfeksiyondan 12 saat sonra ise %100 artış görülmüştür. MOI:0.5 ve MOI:5' de, yani daha az MOI uygulanınca sitopatojenik etkinin daha geç sürede meydana geldiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar makrofaj ve alveoler epitel hücrelerde sitopatojenitenin doz bağımlı olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Gao ve Abu Kwaik 1999a). *L. pneumophila*'nın U937 makrofaj benzeri monosit hücre hattı, alveoler epitel hücreleri ve periferik kan monositlerinde doz bağımlı apoptozu uyardığı gösterilmiştir. MOI:0.5' de, enfeksiyondan 2-3 saat sonra apoptoz meydana gelmiş, apoptozun sitopatojenite ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir. MOI:5 ve MOI:50 ile U937 makrofajları 1 saat enfekte edildikten sonra 2-3 saatte apoptotik hücreler gözlenmiştir (Gao ve Abu Kwaik 1999b).

Farklı büyüme evrelerinde *L. pneumophila*'nın apoptoza sebep olduğu, bakteri büyümesine bağlı olarak apoptozun artmasının, post-eksponansiyel faza ulaşan bakterilerin hücrelere saldırmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Gao ve Abu Kwaik 1999a). Deney sonuçlarımız bu çalışmalarla uyumlu olarak sitopatojenik etkinin meydana gelmesinde doz ve enfeksiyon süresinin etkili olduğunu göstermektedir. MOI az uygulandığında ve uzun süreli enfeksiyonda sitotoksik etkiye neden olmadığı ancak yüksek MOI' de sitotoksiste meydana geldiği gözlenmektedir. Deneylerimizde apoptoz araştırması yapılmamıştır, ancak intrasellüler çoğalma ve sitotoksistenin hücrede apoptozu uyarması nedeniyle bu konunun araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

L. longbeachae' in klinik izolatu A5H5 ve mip mutanıtı B8 suşları, MOI:10 ve MOI:100 ile HL-60 makrofajlarına enfekte edildikten 12 saat sonra, intrasellüler replikasyon meydana gelmiştir. 6 saat sonra, A5H5 suşunda %15.5 oranında, B8' de %7.8 oranında sitotoksik etki gözlenmiştir. 100 MOI' de ve 48 saat enfeksiyon süresinde ise %74,3 oranında maksimum toksisite gözlenmiştir (Arakaki vd. 2002). Çalışmalarımızda MOI:100 ile enfeksiyonda 48 saat sonunda maksimum sitotoksik etki görülmemiştir. D örneğinde MOI:100' de 96 saatte %44 oranında, MOI:200' de 96 saat enfeksiyonda 3 ayrı kuyucukta yaklaşık %40 oranlarında sitotoksik etki gözlenmiştir. MOI:100' de maksimum sitotoksisite 2. grupta yapılan deneylerde ve 72 saat enfeksiyonlarda gözlenmiştir. E, F, G ve H olarak isimlendirilen örnekler MOI:100 oranlarında ve 72 saat enfeksiyon süresinde maksimum düzeyde sitotoksik etki görülmüştür.

L. pneumophila SG-1, *L. micdadei* Rivera, *L. dumoffii*' yi içeren grup-1 ve *L. longbeachae* suşlarını içeren grup II arasında, U937 makrofajlarında hücre içi büyümenin hücre ölümüne etkileri karşılaştırılmıştır. Bakterilerin hücre içi büyümesinin meydana geldiği hücrelerde sitopatojenik etkinin olduğu gözlenmiştir. *L. pneumophila*' nın U937 makrofajlarının %50' den fazlasını öldürebildiği gözlenmiştir. Grup II' de bulunan bakteriler ise, 72 saatlik enfeksiyondan sonra U937 makrofajlarının %49' dan azını öldürebilmiştir (Alli vd. 2003). Çalışmalarımızda bu sonuçlara benzer olarak 2. grupta çalışılan deneylerde kullandığımız E, F, G, H bakterilerinde 72 saat enfeksiyon süresi ve her 3 MOI (100, 500 ve 1000)' de yüksek sitotoksik etki meydana gelmiştir. 96 ve 108 saat enfeksiyonda sitotoksik etki gözlenmemiş, ayrıca bu sürelerde bakterilerin intrasellüler replikasyonunun çok az olduğu görülmüştür. Bu araştırma sonuçlarına göre hücre içi çoğalma ve sitotoksik etki arasında bağlantı olduğu düşünülmektedir.

Alveoler makrofajlar istilacı bakterileri hücresel süreçlerle yok edemezlerse, bakterilerin hücre içi replikasyonu sonucu pnömoni meydana gelmektedir (Bärlocher vd. 2017). *L. pneumophila*' nın HL-60 makrofajlarında, 48 saatte sitotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir. MOI:50' de *Legionella corby*' nin etkisi ile hücre canlılığında 2. günde %82' den 4. günde %53' e kadar azalma olmuştur. MOI:500 olduğunda %57 maksimum sitotoksisite gözlenmiştir. *L. corby*' nin HL-60 hücrelerini %18' den %56' ya kadar öldürdüğü belirtilmiştir (Abu Khweek ve Amer 2010). Bu çalışmadan farklı olarak

deneylerimizde A549 alveoler epitel hücreleri kullanılmakla birlikte, MOI:500 oranında bakteri ile enfekte edildikten sonra hücrede yüksek sitotoksik etkinin meydana gelmesi bakımından çalışma sonuçlarımızla uyumlu bulunmaktadır.

15 çevresel ve 7 klinik örnek kullanılarak *L. pneumophila* suşlarının makrofajlarda sitotoksik etkileri karşılaştırılmıştır. Çevresel suşlar MOI:25' de enfekte edildiğinde, makrofaj canlılığında ortalama %41.3 ile %3.6 azalma, MOI:75' de ise %73.7 ile % 2.9 azalma gözlenmiştir. dotA mutant suşu ile MOI:25' de enfekte edilince, makrofaj canlılığında azalma % 3.1 ile % 1.9 arasında, MOI:75' de ise, makrofaj canlılığında azalma % 4.4 ile % 2.6 arasında meydana gelmiştir. dotA mutant suşun sitotoksik etkisinin az olduğu gözlenmiştir. Çevresel suşların klinik suşlara göre THP-1 makrofajlarına karşı daha sitotoksik oldukları belirtilmiştir (Sharaby vd. 2018). Deneylerimizde klinik örnekler olmamasına rağmen, çevresel örneklerde gözlenen sitotoksik etkiler bakımından, sonuçlarımızla uyumlu bulunmaktadır. Bakterilerin bazılarında MOI oranlarındaki artışla birlikte hücrede sitotoksik etkilerinin arttığı gözlenmektedir.

Legionella pneumophila'nın insanların solunum sistemine girerek akciğer dokusunda makrofaj ve monositler dışında alveoler Tip I ve Tip II epitel hücrelerine zarar vererek pnömoniye ve Lejyoner hastalığına yol açan en önemli patojenlerden biri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle alveoler epitel hücreler Lejyoner hastalığının patojenezinde oldukça önemli yer almaktadır (N'Guessan vd. 2007, Gao ve Abu Kwaik 1999a). Alveoler epitel hücrelerde apoptotik etkilerin gözlenmesi nedeniyle, bakterinin bu hücrelerde sitotoksik etkiye sebep olduğu düşünülmektedir (Molofsky vd. 2005, Furugen vd. 2008).

A549 epitel hücrelerinde *L. pneumophila* enfeksiyonu ve intrasellüler büyümesini gösteren bir çalışmada, *L. pneumophila*'nın virülans etkili suşu A549 alveoler epitel hücrelerine enfekte edildikten 1 gün sonra, hücrelerde intrasellüler büyüme gözlenmiş, enfeksiyonun 3. gününde ise bakterinin hücrede 100 kat arttığı görülmüştür. Virülans etkisi olmayan dotO mutantlarının ise A549 hücrelerinde çoğalmadıkları gözlenmiştir. *L. pneumophila*'nın, doz ve zaman bağlı olarak sitotoksikite artışının, alveoler epitel

hücrelerde hasara neden olduğu açıklanmıştır (Furugen vd. 2008). Çalışmamızda kullanılan suşların virülans özellikleri bilinmemesine rağmen, bakterilerin hepsinde farklı oranlarda intrasellüler çoğalma olduğu görülmüş ve sitotoksik etkinin farklı oranlarda meydana geldiği gözlenmiştir.

L. feeleii' nin Pontiak ateşine (PF) sebep olan SG-1 ve Lejyoner hastalığına (LD) sebep olan SG-2, makrofajlar ve A549 hücrelerine enfekte edilmişlerdir. 12, 24 ve 48 saat sonra SG-2' nin, SG-1' den daha fazla enfeksiyon yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir. Enfeksiyondan 4 saat sonra her iki serogrup makrofajlarda çoğalırken, 24-48 saat sonra CFU miktarının 10-100 kat arttığı tespit edilmiştir. LD etkeni olan *L. feeleii* SG-2' nin, 0. saatte hücre içine girme özelliği, PF etkeni olan *L. feeleii* SG-1' den 100 kat fazla olmakla birlikte, 24 saat enfeksiyonda J774' de %93 ve U937' de %70 oranında sitotoksik etki nedeniyle hücre ölümü gözlenmiştir (Wang vd. 2015). Burada hücre içine girme yeteneğinin enfeksiyonu etkilemesi bakımından önemli olduğu anlaşılmaktadır. Deneylerimizde 2 saat enfeksiyondan sonra hücre dışında kalan bakterilerin CFU değerleri hesaplanarak hücre içine giren bakteri miktarları bulunmuştur. İntrasellüler çoğalmanın, hücre içine giren bakteri sayıları ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Ayrıca, SG 2-15 ve SG-1 bakterilerin büyüme ve sitotoksik etkilerinde farklılıklar gözlenmiştir.

İntrasellüler replikasyon *L. pneumophila*' nın ekolojisini ve patojenezinin merkezini oluşturmaktadır, bu nedenle intrasellüler replikasyonun anlaşılması ile bakterinin moleküler mekanizmasının bilinmesi ile mümkün olacaktır. Bakterinin memeli hücrelerinde intrasellüler enfeksiyonunda etkili olan moleküller ayrıca bakterinin çevreden yok edilmesi amacıyla da kullanılabilir. İntrasellüler replikasyon için gerekli olan demir, bakterinin yok edilmesinde terapötik molekül olarak kullanılabilir, diğer bir ifadeyle demirin ortamdan yok edilmesi sonucu bakteri replikasyon yapamamaktadır (Abu Kwaik 1998).

Yapılan araştırmalar metalloproteaz enziminin sıçanların yumurtalık hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olurken, HL-60 hücrelerinde intrasellüler yaşama ve sitotoksitede etkisinin olmadığını, metalloproteaz yönünden mutant suşun ise J774 fare makrofajlarında oldukça sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. *L. pneumophila*

sıçanların yumurtalık hücrelerinde protein sentezini inhibe ettiği gösterilmiş ancak buna sebep olan toksin tanımlanmamıştır. *L. pneumophila*'nın legiolizin toksini Vero hücreleri ve sıçanların yumurtalık hücrelerinde ekstrasellüler sıvıda tespit edilmiş, fakat sitotoksik etkiye neden olmamıştır (Husmann ve Johnson 1994). Deneylerimizde sitotoksik etkiye neden olan toksin araştırılması yapılmamıştır. Ayrıca sitotoksik etkinin meydana gelmesini sağlayan virulans faktörler belirlenmemiştir. Bu nedenle sitotoksik etkiye yol açan faktörlerin belirlenmesinin Lejyoner hastalığının patojenezinin aydınlatılması bakımından önemli olacağı düşünülmektedir.

Çeşitli faktörlerin etkisiyle hücrede sitotoksik etkinin meydana gelmesi için, hücrenin büyüme hızı ve bölünme zamanının da önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu amaçla, çeşitli bitki ekstraktları, farklı hücre hatlarına enfekte edilerek hücrelere sitotoksik etkileri karşılaştırılmıştır. Her hücre için büyüme hızı ve bölünme zamanının karakteristik olduğu görülmüştür. İlaç ve kimyasal madde gibi çeşitli etkenlerle hücre büyümesi uyarılmakta veya inhibe olmaktadır. Ortamda yoğunluğunun artması ve substratları metabolize etmesi sonucu hücre, büyümenin neredeyse sıfır olduğu durgun faza girmektedir. Bitki ekstraktları ile yapılan çalışmada A549 hücresinin bölünme zamanı (DT: doubling time) düşük olduğunda, tümör kökenli olmayan hücrelere göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Hücrenin besin ihtiyacı ve kökeni, kültür ortamı gibi faktörler hücrenin büyümesinde etkili olmaktadır (Iloki Assanga vd. 2013). Bakteri ile enfekte olduğunda hücrenin büyüme hızı ve bölünme zamanı değişiklik gösterecektir. Deneylerimizde farklı *Legionella* bakterilerinin etkisi ile A549 hücrelerinin büyüme özelliği ve bölünme zamanı bilinmemektedir. Bu durum elbette deney sonuçlarının yorumlanması bakımından farklılığa sebep olabilmektedir.

Legionella türlerinin serogrup ve subgrupları arasında farklı virulans özellikler olmakta ve *L. pneumophila* suşları arasında genetik farklılıklar görülebilmektedir. Bakterinin patojenik etkisi konak hücrelerle etkileşim, hücre savunmasında kaçma, konak hücrede yaşama ve replikasyon yeteneğiyle mümkün olmaktadır. *Legionella* bakterilerinin insanlarda patojenik etkilerinin tanımlanabilmesi için bu mekanizmaların ayrıntılarını bilmek gerekmektedir. Bu nedenle *Legionella*'nın serogrup ve subgruplarının iyi tanımlanması önemli olmaktadır (Sopena vd. 2007). Bakterinin LPS, flagella, hidroliz

enzimleri gibi farklı patojenik faktörlerinin aktivasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmaların daha ayrıntılı araştırılması gerekmektedir (Samrakandi vd. 2002, Schmeck vd. 2007). *L. pneumophila*'nın farklı suşlarını karşılaştırmak gen regülasyonu ve patojenezine daha incelikte yaklaşım sağlamak bakımından önem kazanmaktadır (Samrakandi vd. 2002). Suşların genomik analizlerinin yapılarak aralarındaki farklılıkların moleküler temelini belirlemek, hastalığın patojenezini anlamamıza, böylece hastalıktan korunma ve hastalığı önleme için gereken potansiyel yolların belirlenmesine yardımcı olacaktır.

Bakterinin konak hücreye girmesi, enfeksiyonda önemli bir aşama olup *Legionella* türleri arasında farklılık göstermektedir. *L. pneumophila*'nın monositlere adezyon, invazyon ve replikasyon yetenekleri ile ilgili yapılan bir araştırma sonucunda enfeksiyon sürecinin her adımının bakteri suşları arasında farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir (Samrakandi vd. 2002). *L. dumoffii*'nin alveoler epitel hücrelere girmesi efektör aracılı endositoz ile olurken, *L. pneumophila* mikrofilyament bağımlı fagozitoz ile hücreye girmektedir. *L. dumoffii* enfeksiyonun erken evrelerinde endozomal vakuollerden konak hücrenin sitoplazmasına kaçabilme ve RER ile çevrili sitoplazmada proliferasyon yapabilme yeteneğindedir. *L. pneumophila* ise sadece ribozomla çevrili endozom içinde proliferasyon yapmaktadır (Atlas 1999).

Lejyoner hastalığının insanda etkilerini araştırmak için gine domuzları model organizma olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada gine domuzuna 10^9 CFU (colony forming unit) *L. dumoffii* enjekte edilmiş, 3 saat sonra alveoler yüzeydeki hücrelerin birçoğunda bakteri tespit edilmiştir. *L. dumoffii* Tex-KL suşu enjekte edildikten 24 saat sonra hayvanın akciğerinde birçok alveoler hücreyi tahrip etmiştir. 10^4 CFU bakteri enjekte edildiğinde ise 48 saat sonra hayvanın hastalandığı gözlenmiştir (Maruta vd. 1998). Yapılan bir çalışmada *L. pneumophila* SG-1' in Corby subgrubunun farelerde enfeksiyon etkisinin, *L. pneumophila* SG-1' in Philadelphia subgrubundan daha fazla olduğu gösterilmiştir (Vinzing vd. 2008).

Başka bir çalışmada ise *L. pneumophila* suşu gine domuzuna enjekte edildiğinde bakterinin hücrede intrasellüler replikasyon yapmadığı ancak hastalığa neden olduğu

gösterilmiş ve ekstrasellüler bakterilerin aktivitesi sonucu bu etkinin meydana geldiği belirtilmiştir (Husmann ve Johnson 1994). Deneylerimizde ekstrasellüler bakterilerin etkisi araştırılmamıştır. İntrasellüler replikasyon olmamasına rağmen sitotoksitenin meydana geldiğini gösteren araştırmalar, deneylerde ekstrasellüler bakterilerin sitotoksik etkilerinin dikkate alınması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca hücre kültürü ile yapılan çalışmalara ek olarak deneylerin canlı organizmada in vivo ortamda gerçekleştirilmesinin bakteri patojenezini anlamamız bakımından önemli olacağı düşünülmektedir.

Lejyoner hastalığının ortaya çıkmasında bakterinin dozu etkili olmakla birlikte kişinin yaşı, sigara kullanımı, kronik akciğer hastalığı, kanser, bağışıklığın baskılanması gibi risk faktörleri, ayrıca doğal bağışıklığı düzenleyen genlerde ortaya çıkan polimorfizm gibi genetik faktörler de önemli rol oynamaktadır (Vinzing vd. 2008).

Lejyoner hastalığı, bağışıklığı az kişilerde daha riskli olması nedeniyle özellikle hastanelerin su sistemleri denetim altında tutulmalıdır. *Legionella* bakterileri su kaynaklı olmaları nedeniyle insanlara aerosol yoluyla bulaştığı gibi ayrıca seyahat bağlantılı ve toplum kökenli bulaşma nedeniyle ülkeler arasında farklı serogrup ve subgruplar görülebilmektedir. Araştırmalar, toplu halde insanların yaşadığı kalabalık yerlerin ve su sistemlerinin *Legionella* bakımından daha riskli ortamlar olduğunu göstermektedir (Yarom vd. 2010). Bu nedenle *L. pneumophila* enfeksiyonlarının araştırılması, halk sağlığının korunması bakımından önem kazanmaktadır (Leoni vd. 2005).

Legionella bakterilerinin makrofaj, monosit ve epitel hücrelere sitotoksik etkisinin insanlarda ölümle sonuçlanabilen enfeksiyonlara neden olmasından dolayı, *Legionella* bakterileri ve canlılara olan etkileri uzun yıllardan beri araştırılmaktadır. Dünyanın birçok ülkesinde çevresel ve klinik örneklerde *Legionella*'nın farklı serogrup ve subgrupları tespit edilmesine rağmen, *L. pneumophila* dışında kalan *Legionella* bakterilerinin insanlarda enfeksiyona etkileri ve dünya üzerindeki hastalık yükü tam olarak bilinmemektedir.

Lejyoner hastalığının, %80' den fazla *L. pneumophila*' nın farklı serogruplarından kaynaklandığı belirtilmektedir (Papadakis vd. 2021). *Legionella* enfeksiyonunun tanımlanmasında kültür, üriner antijen, serolojik yöntemler, doku ve kan sıvısında bakteri tespiti ve PCR gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Yine de *Legionella* enfeksiyonunu diğer pnömonilerden ayırdetmek zor olmaktadır. Bu nedenle bakterinin popülasyonda seroprevalans düzeyini belirlemek amacıyla yapılan serolojik testlerin oldukça önemli olduğu kabul edilmektedir (Graham vd. 2020).

Çok farklı çevresel ortamlara adapte olması ve çok çeşitli konak hücrelerde yaşama yeteneğine sahip olması, sulardan aerosol yoluyla insanların solunum sistemine yerleşerek akut ve ölümcül hastalığa neden olmasından dolayı özellikle su sistemlerinin çok fazla kullanıldığı ortamlar *Legionella*' nın hastalık potansiyelinin artmasına sebep olmaktadır.

Legionella' nın fizyolojisi, patojenik özellikleri, konak hücrelerle etkileşiminin anlaşılması ve aydınlatılması Lejyoner hastalığının daha kolay tanımlanmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca *Legionella*' nın ekolojisini daha iyi anlamak çevresel patojen olması nedeniyle yayılımına, su sistemlerine kolonizasyonuna ve insanlara bulaşmasına engel olmak amacıyla gereken önlemlerin belirlenmesine ve bu önlemlerin uygulanmasına yardımcı olacaktır.

Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda *Legionella*' nın teşhis ve tanımlanmasının oldukça önemli olması nedeniyle çevresel ve klinik kökenli *Legionella* bakterilerinin özelliklerinin, ayrıca insanlara patojenik etkilerinin bilinmesi Lejyoner hastalığının daha hızlı tespit edilmesine, daha iyi tanımlanmasına ve uygulanacak tedavinin etkili olmasına katkı sağlayacaktır.

Çalışmalarımızda, Türkiye' nin İç Anadolu Bölgesi' nde yer alan farklı şehirlerindeki otel, hastane ve sanayi merkezlerine ait su sistemlerinden alınan su örnekleri kullanılmıştır. Sularda bulunan *Legionella* bakterilerinin izolasyonu sağlanmış ve serolojik tiplendirilmeleri belirlenmiş, A549 hücrelerine sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Elde edilen verilerimiz çeşitli araştırma sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Bu doğrultuda bulgularımız, otel, hastane ve sanayi merkezlerinin su sistemlerinde SG-1'in subgruplarının ve SG 2-14 dağılımının oldukça çeşitlilik gösterdiğini, sıcak ve soğuk su sistemlerinde *L. pneumophila*'nın serogrup ve subgruplarının değişik oranlarda kolonize olduğunu, diğer *Legionella* türlerinin ise çok fazla bulunmadığını göstermektedir.

Sitotoksiste deneylerimizin sonucunda, bu konuyla ilgili yapılan araştırmalara benzer veriler elde edilmiştir. Bu doğrultuda verilerimiz, farklı *Legionella* türlerinin A549 alveoler epitel hücrelerde sitotoksik etkisinin doz ve zamana bağlı olarak farklı olabileceğini, intrasellüler replikasyonun sitotoksistede etkili rol oynayabileceğini göstermektedir.

Bu konuda yapılan araştırmaların Türkiye' de henüz başlangıç aşamasında olduğu tahmin edilmektedir. Lejyoner hastalığının epidemiyolojik olarak araştırılmasıyla birlikte *Legionella* bakterilerinin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla, daha çeşitli serogrup ve subgrupların farklı hücrelerde etkileri kapsamlı ve ayrıntılı olarak incelenmelidir. Çalışma sonuçlarımız bu konuların araştırılmasına dikkat çekmesi ve gerekliliğini belirtmesi bakımından önem taşımaktadır.

Araştırma sonuçlarımızın, öncelikle halk sağlığını ilgilendiren patojen olması nedeniyle *Legionella* bakterileri hakkında detaylı ve kapsamlı çalışmalar yapılması konusunda farkındalık sağlayacağı düşünülmektedir.

Deneylerden elde edilen sonuçların, *Legionella* bakterilerinin izolasyonu, serolojik olarak tanımlanması, serogrup ve subgruplarının dağılımı, virulans özellikleri ve insanlara patojenik etkileri hakkında ileride yapılacak daha ayrıntılı araştırmalar için bilgi ve ön veri sağlaması yönüyle katkısının olacağı beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D.E. and Guyard, C. 2013. Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*. International Journal of Molecular Sciences, 14(11); 21660-21675.
- Abdelhady, H., Rafael, A. and Garduno, R.G. 2013. The progeny of *Legionella pneumophila* in human macrophages shows unique developmental traits. FEMS Microbiology Letters, 349(2); 99–107.
- Abu Khweek, A. and Amer, A. 2010. Replication of *Legionella pneumophila* in Human cells Why are We Susceptible. Frontiers in Microbiology, 1(133); 1-8.
- Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C. and Harb, O.S. 1998. Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and Its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis. Applied and Environmental Microbiology, 64(9); 3127–3133.
- Abu Kwaik, Y.A. 1998. Fatal attraction of mammalian cells to *Legionella pneumophila*. Molecular Microbiology, 30(4), 689–695.
- Abu-Zant, A., Santic, M., Molmeret, M., Jones, S., Helbig, J. and Abu Kwaik, Y. 2005. Incomplete Activation of Macrophage Apoptosis during Intracellular Replication of *Legionella pneumophila*. ASM Journals Infection and Immunity, 73(9); 5339–5349.
- Afacan, G., Yumuk, Z., Baskın, Y. ve Balıkçı, E. 2006. Turistik bölgelerde Su Sistemlerinden İzole Edilen *Legionella pneumophila* serogrup 2-14 Sıklığı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 36(4); 214-218.
- Akbaş, E., Dalkılınç, I., Gözalan, A. ve Güvener, E. 1999. Otel Su Sistemlerinde *Legionella* spp. Ege ve Akdeniz Bölgelerinde Bir Çalışma. Flora Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi, 4(4); 258-266.
- Akbaş, E. Hastane su Sistemlerinde *Legionella* Araştırılmasında Temel Prensipler. 2013. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 43(1); 1-13.
- Akkaya, Z. ve Özbal, Y. 2011. Kayseri'deki Farklı Binaların Su Depolarında *Legionella* Araştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi, 20(1); 9-17.
- Alli, T.O.A., Zink, S., Lackum, N.K. and Abu Kwaik, Y. 2003. Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp. Microbiology, 149(3); 631-641.
- Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig J.H, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe, J., Nukina, M., Nakajima, H., Kawano, K., Tada, Y., Watanabe, H. and the Working Group for *Legionella* in Japan. 2010. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. Journal of Medical Microbiology, 59(6), 653–659.
- Amemura-Maekawa J., Kikukawa, K., Helbig, J.H, Kaneko, S., Hashimoto, A.S., Furuhashi, K., Chang, B., Murai, M., Ichinose, M., Ohnishi, M., Kura, F. and the Working Group for *Legionella* in Japan. 2012. Distribution of Monoclonal Antibody Subgroups and Sequence-Based Types among *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates Derived from Cooling Tower Water,

- Bathwater, and Soil in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12); 4263-4270.
- Anonim. 2014. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı Rehberi. Suda *Legionella* Türlerinin Tanımlanması. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 965, Ankara, 2014.
- Anonymous 2014. Web Sitesi: <http://www.4m-tech.com>. Erişim Tarihi: 03.07.2015. mTECH Monoclonal Inc. *Legionella* Product Catalog.
- Appelt, S. and Heune, K. 2017. Flagellar Regulon of *Legionella*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(454); 1-13.
- Arakaki, N., Higa, F., Koide, M., Tateyama, M. and Saito, A. 2002. Induction of apoptosis human macrophages in vitro by *Legionella longbeachae* through activation of the caspase pathway. *Journal Medical Microbiology*, 51(2); 159-168.
- Atlas, R.M. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology*, 1(4); 283-293.
- Bärlocher, K., Amanda, W.A. and Hilbi, H. 2017. Formation of *Legionella* Replicative Compartment at retrograde Trafficking. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(482); 1-8.
- Barskey, A.E., Derado, G. and Edens, C. 2022. Rising Incidence of Legionnaires' Disease and Associated Epidemiologic Patterns, United States, 1992–2018. *Emerging Infectious Diseases*, 28(3); 527-538.
- Benitez, A.J. and Winchell, J.M. 2013. Clinical Application of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Legionella* Species, *Legionella pneumophila* and *Legionella pneumophila* Serogroup 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1); 348–351.
- Boamah, D.K., Zhou, G., Ensminger, A.W. and O'Connor, T.J. 2017. From Many Hosts:Protozoa Host of *Legionella*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(477); 1-17.
- Borges, V., Nunes, A., Sampaio, D.A., Vieira, L., Machado, J., Simões, M.J., Gonçalves, P. and Gomes, J.P. 2016. *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Scientific Reports*, 6(1); 26261-26272.
- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G. and McDade, J.E. 1979. Classification of the Legionnaires' Disease Bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the Family *Legionellaceae*, familia nova. *Etiology*, 90(4); 656-658.
- Brindle, R.J., Stannet, P.J. and Tobin, O'H.J. 1987. *Legionella pneumophila*: Monoclonal Antibody Typing of Clinical and Environmental isolates. *Epidemiology Infection*, 99(2); 235-239.
- Burak, D. M. and Zeybek, Z. 2011. Investigation of *Legionella pneumophila* and free living amoebas in the domestic hot water systems in Istanbul. *Turkish Journal of Biology*, 35(6); 679-685.

- Buse, H.Y. and Ashbolt, N.J. 2011. Differential growth of *Legionella pneumophila* strains within a range of amoebae at various temperatures associated with in-premise plumbing. *Letters in Applied Microbiology*, 53(2); 217-224.
- Buse, H.Y., Morris, B.J., Gomez-Alvarez, V., Szabo, J.G. and Hall, J.S. 2020. *Legionella* diversity and Spatiotemporal Variation in the Occurrence of Opportunistic Pathogens within a Large Building Water System. *Pathogens*, 9(7); 567-594.
- Byrne, B. and Swanson, M.S. 1998. Expression of *Legionella pneumophila* Virulence Traits in Response to Growth Conditions. *Infection and Immunity*, 66(7); 3029–3034.
- Byrne, B.G., McColm, S., McElmurry, S.P., Kilgore, P.E., Sobeck, J., Sadler, R., Love, N.G. and Swanson, M. 2018. Prevalence of Infection-Competent Serogroup 6 *Legionella pneumophila* within Premise Plumbing in Southeast Michigan. *American Society Microbiology*, 9(1); 16-18.
- Cervero-Aragóa, S., Schrammela, B., Dietersdorfer, E., Sommera, R., Lück, C., Walochnik, J. and Kirschner, A. 2019. Viability and infectivity of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* strains induced at high temperatures. *Water Research*, 158; 268–279.
- Chambers, S.T., Slow, S., Scott-Thomas, A. and Murdoch, D.R. 2021. Legionellosis Caused by Non-*Legionella pneumophila* Species, with a Focus on *Legionella longbeachae*. *Microorganisms*, 9(2); 291- 307.
- Chang, B., Sugiyama, K., Taguri, T., Maekawa, J.A., Kura, F. and Watanabe, H. 2009. Specific Detection of Viable *Legionella* Cells by Combined use of Photoactivated Ethidium Monoazide and PCR/Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(1); 147-153.
- Chang, J.H., Tseng, L.R., Tan, J.K., Chen, Y.J., Mu, J.J., Chuen- Chiang, S. and Wu, H.S. 2010. The Molecular typing of *Legionella* Infection from a Spa. Taiwan. *Epidemiology Bulletin*, 26(19); 331-338.
- Chauhan, D. and Shames, S.R. 2021. Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. *Virulence*, 12(1); 1122–1144.
- Cherry, W.B., Pittman, B., Harris, P.P., Hebert, G.A., Thomason, B.M., Thacker, L. and Weaver, R.E. 1978. Detection of Legionnaires Disease Bacteria by Direct Immunofluorescent Staining. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(3); 329-338.
- Cirillo, J.D., Falkow, S. and 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.G., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S. and 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.
- Day, S.R., Sifri, C.D. and Hoffman, P.S. 2013. Infection of Nonphagocytic Host Cells by *Legionella*. In: *Legionella: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Buchrieser, C. and Hilbi, H. (eds.), Springer Media, 463-477, New York.

- De Buck, E., Anne' J. and Lammertyn, E. 2007. The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology*, 153(12); 3948–3953.
- Díaz-Flores, A., Montero, J.C., Castro, F.J., Alejandres, E.M., Bayón, C., Solís, I., Fernández-Lafuente, R. and Rodríguez, G. 2015. Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. *BMC Microbiology*, 15(91); 423-427.
- Doyle, R.M., Cianciotto, N.P., Banvi, S., Manning, P.A. and Heuzenroeder, M.W. 2001. Comparison of Virulence of *Legionella longbeachae* Strains in Guinea Pigs and U937 Macrophage-Like Cells. *Infection and Immunity*, 69(9); 5335–5344.
- Erdoğan, H. ve Arslan, H. 2013. Yeni Açılan Bir Otelde Ortaya Çıkan *Legionella* Salgınının İrdelenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47(2); 240-249.
- Erdoğan, H. 2018. Lejyoner Hastalığı. *Mediterranean Journal Infection of Microbe and Antimicrobe*, 7; 2.
- Eisenreich, W. and Heuner K. 2016. The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS Letters*, 590(21); 3868-86.
- Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, K.J., Mackel, D.C. and Baine, W.B. 1979. Charcoal-Yeast Extract Agar: Primary Isolation Medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(4); 437-441.
- Felice A, Franchi M., DeMartin S., Vitacolonna N., Iacumin L. and Civilini M. 2019. Environmental Surveillance and spatiotemporal analysis of *Legionella* spp. in a region of Northeastern Italy (2002–2017). *PLOS ONE*, 14(7), 1-23.
- Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E. 2002. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3); 506–526.
- Fricke, C., Xu, J., Jiang, F.L., Liu Y., Harms, H. and Maskow, T. 2020. Rapid Culture-based Detection of *Legionella pneumophila* using Isothermal Microcalorimetry with an improved Evaluation Method. *Microbial Biotechnology*, 13(4); 1262–1272.
- Furugen, M., Higa, F., Hibiya, K., Teruya, H., Akamine, M., Haranaga, S., Yara, S., Koide, M., Tateyama, M., Mori, N. and Fujita, J. 2008. *Legionella pneumophila* infection induces programmed cell death, caspase activation, and release of high-mobility group box 1 protein in A549 alveolar epithelial cells: inhibition by methyl prednisolone. *Respiratory Research*, 9(1); 39-48.
- Gao, L.Y., Harb, O.S. and Abu Kwaik, Y. 1997. Utilization of Similar Mechanisms by *Legionella pneumophila* To Parasitize Two Evolutionarily Distant Host Cells, Mammalian Macrophages and Protozoa. *Infection and Immunity*, 5(11); 4738–4746.
- Gao, L.Y., Harb, O.S. and Abu Kwaik, Y. 1998. Identification of Macrophage-Specific Infectivity Loci (*mil*) of *Legionella pneumophila* That Are Not Required for Infectivity of Protozoa. *Infection and Immunity*, 66(3); 883–892.
- Gao, L.Y. and Abu Kwaik, Y. 1999a. Apoptosis in Macrophages and Alveolar Epithelial Cells during Early Stages of Infection by *Legionella pneumophila* and Its Role in Cytopathogenicity. *Infection and Immunity*, 67(2); 862-870.

- Gao, L.Y. and Abu Kwaik, Y. 1999b. Activation of Caspase 3 during *Legionella pneumophila*-Induced Apoptosis. *Infection and Immunity*, 67(9); 4886-4894.
- Garduño, R.A., Garduño, E., Hiltz, M. and Hoffman, P.S. 2002. Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* Gives Rise to a Differentiated Form Dissimilar to Stationary-Phase Forms. *ASM Journals Infection and Immunity*, 70(11); 6273-6283.
- Gebran, S. J., Newton, C.A., Yamamoto, Y., Klein, T.W. and Friedman, H. 1994. A Rapid Colorimetric Assay for Evaluating *Legionella pneumophila* Growth in Macrophages In Vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(1); 127-130.
- Graham, F.F, Hales, S., White, P.S. and Baker, M.G. 2020. Review Global seroprevalence of Legionellosis -a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1); 7337-7348.
- Gruas, C., A'lvarez, I., Lara, C., Garcí'a, C.B., Savva, D. and Arruga, M.V. 2013. Identification of *Legionella* spp. in Environmental Water Samples by ScanVIT-*Legionella* TM Method in Spain. *Indian Journal Microbiology*, 53(2); 142–48.
- Hebert, A.G., Moss, W.C., McDougal, K.L., Bozeman, M.F, McKinney, M.R. and 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.
- Helbig, J.H., Kurtz, J.B., Pastoris, M.C., Pelaz, C. and Lück, P.C. 1997. Antigenic Lipopolysaccharide Components of *Legionella pneumophila* Recognized by Monoclonal Antibodies: Possibilities and Limitations for Division of the Species into Serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11); 2841–2845.
- Higa, F., Kusano, N., Tateyama, M., Shinzato, T., Arakaki, N., Kawakami, K. and Saito, A. 1998. Simplified Quantitative Assay System for Measuring Activities of Drugs against Intracellular *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(5); 1392–1398.
- Hubber, A. and Roy, C.R. 2010. Modulation of host cells function by *Legionella pneumophila* Type IV Effectors. *Annual Review Cell and Developmental Biology*, 26(1); 261–283.
- Husmann, L.K. and Johnson, W. 1994. Cytotoxicity of Extracellular *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 62(5); 2111-2114.
- Iloki Assanga, S.B., Gil-Salido, A. A., Lewis Luján, L. M., Rosas-Durazo, A., Acosta-Silva, A. L., Rivera-Castañeda, E. G. and Rubio-Pino, J. L. 2013. Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, 4(4); 60-70.
- Isaac, D.T. and Isberg, R. 2014. Master manipulators: an update on *Legionella pneumophila* Icm/Dot translocated substrates and their host targets. *Future microbiology*, 9(3); 343-359.

- İğnak, Ş. ve Gürler, B. 2012. Bir Üniversite Hastanesi Su Sistemlerinde *Legionella* Türlerinin Araştırılması. 2012. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 42(3); 110-114.
- Joseph, A.M. and Shames, S.R. 2021. Affecting the Effectors: Regulation of *Legionella pneumophila* Effector Function by Metaeffectors. Pathogens, 10(2), 108-114.
- Joshi, A.D. and Swanson, M.S. 1999. Comparative Analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* Virulence Traits. Infection and Immunity, 67(8); 4134-4142.
- Jung, A.L., Stoiber, C., Herkt, C.E., Schulz, C., Bertrams, W. and Schmeck, B. 2016. *Legionella pneumophila* Derived Outer Membrane Vesicles Promote Bacterial Replication in Macrophages. PLOS Pathogens, 12(4); 1-26.
- Kirschner, A.K.T. 2016. Determination of Viable *Legionellae* in Engineered Water systems: Do we find what we are looking for? Water Research, 93(2016); 276–88.
- Kowalczyk, B., Chmiel, E. and Palusinska-Szys, M. 2021. The Role of Lipids in *Legionella*-Host Interaction. International Journal of Molecular Sciences, 22(3); 1487-1503.
- Köksal, F., Oğuzkurt, N. and Samastı, M. 2002. İstanbul’da Üç Eğitim Hastanesinin Depo ve Musluk Sularında *Legionella* Bakterilerinin Araştırılması. Klimik Dergisi, 15(1); 16-18.
- Kyritsi, M.A., Mouchtouri, V.A., Katsioulis, A., Kostara, E., Nakoulas, V., Hatzinikou, M. and Hadjichristodoulou, C. 2018. *Legionella* colonization of hotel waters of Greece. International Journal Environmental Research Public Health, 15(12); 2707-2718.
- Laganà, P., Facciola, A., Palermo, R. and Delia, S. 2019. Environmental Surveillance of Legionellosis within an Italian University Hospital-Results of 15 Years of Analysis. Journal Environmental Research Public Health, 16(7); 1103-1112.
- Lau, H.Y. and Ashbolt, N.J. 2009. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. Journal of Applied Microbiology, 107(2); 368–378.
- Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P.P., Sacchetti, R., Stampi, S. and Zanetti, F. 2005. *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. Journal of Applied Microbiology, 98(2); 373–379.
- Leung, Y.H., Lam, C.K., Cheung, Y.Y., Chan, C.W., Chuang, S.K. 2020. Epidemiology of Legionnaires’ Disease, Hong Kong, China, 2005-2015. Emerging Infectious Diseases, 26(8); 1695-1702.
- Llewellyn, A.C, Lucas, C.E., Roberts, S.E., Brown, E.W., Nayak, B.S., Raphael, B.H. and Winchel, J.M. 2017. Distribution of *Legionella* and bacterial community composition among regionally diverse US cooling towers. PLOS ONE, 12(12); e0189937.
- Luck, C.P., Wenchel, H.M. and Helbig, J.H. 1998. Nosocomial Pneumonia Caused by Three Genetically Different Strains of *Legionella pneumophila* and Detection of

- These Strains in the Hospital Water Supply. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4); 1160–1163.
- Luo, Z.Q. 2012. *Legionella* secreted effectors and innate immune responses. *Cellular Microbiology*, 14(1); 19–27.
- Mallama, C.A., McCoy-Simandle, K. and Cianciotto, N.P. 2017. Type II Dampens MyD88 and Toll-Like Receptor 2 Signaling Pathway in Infected Human Macrophages. *Infection and Immunity*, 84(4), e00897-16.
- Manske, C. and Hilbi, H. 2014. Metabolism of Vacuolar Pathogen *Legionella* and Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4;125.
- Maruta, K., Miyamoto, H., Hamada, T., Ogawa, M., Taniguchi, H. and Yoshida, S.I. 1998. Entry and Intracellular Growth of *Legionella dumoffii* in Alveolar Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(6); 1967-1974.
- Matsunaga, K., Klein, T.W., Friedman, H. and Yamamoto, Y. 2001. Alveolar Macrophages Cell Lines MH-S Is Valuable as an In Vitro Model for *Legionella pneumophila* infection. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24(3); 326-331.
- Mazzotta, M., Salaris, S., Pascale, M.R, Girolamini, L. and Cristino, S. 2021. Occurrence of *Legionella* spp. in Man-Made Water Sources: Isolates Distribution and Phylogenetic Characterization in the Emilia-Romagna Region. *Pathogens*, 10(5); 552-566.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, W.D., Tsai, R.T., Redus, M.A. and 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.
- Mekkour, M., Driss, K.B, Tai, J. and Cohen, N. 2012. Prevalence of *Legionella pneumophila* in Production Networks and Distribution of Domestic Hot Water in Morocco. *World Environment*, 2(2); 11-15.
- Mekkour, M., Driss, K.B, Tai, J. and Cohen, N. 2013a. *Legionella pneumophila*: An Environmental Organism and Accidental Pathogen. *International Journal of Science and Technology*, 2(2); 187-196.
- Mekkour, M., El Khalil, B.D., Tai, J. and Cohen, N. 2013b. Sequenced Based typing of the first endemic *Legionella pneumophila* Paris isolated environment in Morocco. *Sky Journal of Microbiology Research*, 1(4); 32-34.
- Molofsky, A.B. and Swanson, M.S. 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology*, 53 (1); 29–40.
- Molofsky, A.B., Shetron-Rama, L.M. and 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.
- Mou, Q. and Leung, P.H.M. 2018. Differential expression of virulence genes in *Legionella pneumophila* growing in *Acanthamoeba* and human monocytes. *Virulence*, 9(1); 185-196.

- Mossman, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2); 55-63.
- Mraz, A.L. and Weir, M.H. 2018. Knowledge to Predict Pathogens: *Legionella pneumophila* Lifecycle Critical Review Part I Uptake into Host Cells. *Water*, 10(2); 132-150.
- Müller, A., Hacker, J. and Brand, B.C. 1996. Evidence for Apoptosis of Human Macrophage-Like HL-60 Cells by *Legionella pneumophila* Infection. *Infection and Immunity*, 64(12); 4900-4906.
- Nagai, H. and Kubori, T. 2011. Type IV secretion system of *Legionella* and other Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2(136); 1-12.
- Neumeister, B., Schoniger, S., Faigle, M., Eichner, M. and Dietz, K. 1997. Multiplication of Different *Legionella* Species in Mono Mac 6 Cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4); 1219-1224.
- Neumeister, B., Faigle, M., Lauber, K., Northoff, H. and Wesselborg, S. 2002. *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. *Microbiology*, 148(11); 3639–3650.
- N'Guessan, P.D., Etouem, M.O., Schmeck, B., Hocke, A.C., Scharf, S., Vardarova, K., Opitz, B., Flieger, A., Suttorp, N., Hippenstie, S. 2007. *Legionella pneumophila*-induced PKC α -, MAPK-, and NF-KB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *American Journal Physiological Lung Cell Molecular Physiology*, 292; 267-277.
- Nisar, M.A., Ross, K.E., Brown, M.H., Bentham B. and Whiley, H. 2020. *Legionella pneumophila* and Protozoan Hosts: Implications for the Control of Hospital and Potable Water Systems. *Pathogens*, 9(4); 286-308.
- Oliva, G, Sahr, T. and Buchrieser C. 2018. Life cycle of *Legionella pneumophila* Cellular Differentiation virulence and methabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8;3.
- Özen, S.N., Ataman, T.Ş. and Emek, M. 2017. Exploring the *Legionella pneumophila* positivity rate in hotel water samples from Antalya, Turkey. *Environmental Sciences Pollution Research*, 24(13); 12238-12242.
- Palmer, C.J., Tsai, Y.L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C. and Sangermano, L.R. 1993. Detection of *Legionella* Species in Sewage and Ocean Water by Polymerase Chain Reaction, Direct Fluorescent-Antibody and Plate Culture Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11); 3618-3624.
- Pancer, K. 2013. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water distribution systems as a complementary element of risk assessment of Legionellosis in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(3); 436–440.
- Papadakis, A., Keramarou, M., Chochlakis, D., Sandalakis, V., Mouchtouri, V.A. and Psaroulaki, A. 2021. *Legionella* spp. Colonization in Water Systems of Hotels Linked with Travel-Associated Legionnaires' Disease. *Water*, 13(16); 2243-2251.

- Paranjape, K., Bédard, E., Shetty, D., Hu, M., Pak Choon, F.C., Prévost, M. and Faucher, S.P. 2020. Unravelling the importance of the eukaryotic and bacterial communities and their relationship with *Legionella* spp. ecology in cooling towers: a complex network. *Microbiome*, 8(1); 157.
- Pearlman, E., Jiwa, A.H., Engleberg, N.C. and Eisenstein, B.I. 1988. Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage-like (U937) cell line. *Microbial Pathogenesis*, 5(2); 87-95.
- Pierre, D.M., Baron, J., Yu, V.L. and Stout, J.E. 2017. Diagnostic testing for Legionnaires' Disease. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1); 59-62.
- Prashar, A., Bhatia, S., Tabatabaeiyazdi, Z., Duncan, C., Garduño, R.A., Tang, P., Low, D.E., Guyard, C., Mauricio, R. and Terebiznik, M.R. 2012. Mechanism of invasion of lung epithelial cells by filamentous *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, 14(10); 1632-1655.
- Quero, S., Párraga-Niño, N., Barrabeig, I., Sala, M.R., Pedro-Botet, M.L., Monsó, E., Jané, M., Sabrià, M. and García-Núñez, M. 2018. Population structure of Environmental and Clinical *Legionella pneumophila* isolates in Catalonia. *Scientific Reports*, 8(1); 6241-6249.
- Reichardt, K., Jacobs, E., Röske, I. and Helbig, J.H. 2010. *Legionella pneumophila* carrying the virulence associated lipopolysaccharide epitope possesses two functionally different LPS components. *Microbiology*, 156(10); 2953–2961.
- Riccò, M., Peruzzi, S., Ranzieri, S. and Giuri, P.G. 2021. Epidemiology of Legionnaires' Disease in Italy, 2004–2019: A Summary of Available Evidence. *Microorganisms*, 9(11); 2180-2200.
- Richards, A.M., Von Dwingelo, J.E., Price, C.T. and Abu Kwaik, Y. 2013. Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*–amoeba interaction. *Virulence*, 4(4); 307–314.
- Samrakandi, M.M., Cirillo, S.L.G., Ridenour, D.A., Bermudez, L.E. and Cirillo, J.D. 2002. Genetic and Phenotypic differences between *L. pneumophila* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4); 1352–1362.
- Santic, M., Asare, R., Doric, M. and Abu Kwaik, Y. 2007. Host-Dependent Trigger of Caspase-1 and Apoptosis by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 75(6); 2903–2913.
- Scaturro, M., Poznanski, E., Mupo, M., Blasior, P., Seeber, M., Prast, A.M, Romanin, E., Girolamo, A., Rota, M.C., Bella, A., Ricci, M.L. and Stenico, A. 2020. Evaluation of GVPC and BCYE Media for *Legionella* Detection and Enumeration in Water Samples by ISO 11731: Does Plating on BCYE Medium Really Improve Yield? *Pathogens*, 9(9); 757-762.
- Schmeck, B., N'Guessan, P.D., Ollomang, M., Lorenz, M., Zahlten, J., Opitz, B., Flieger, A., Suttorp, N. and Hippenstiel, S. 2007. *Legionella pneumophila*-induced NF-KB- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells. *European Respiratory Journal*, 29; 25-33.

- Schmeck, B., Lorenz, J., N' Guessan, P.D., Opitz, B., Laak, V., Zahlten, J., Slevogt, H., Witzenth, M., Flieger, A., Sutorpand, N. and Hippenstiel, S. 2008. Histone Acetylation and Flagellin Are Essential for *Legionella pneumophila*-Induced Cytokine Expression. *Journal of Immunology*, 181(2); 940-947.
- Schwake, D.O., Alum, A. and Abbaszadegan, M. 2021. *Legionella* Occurrence beyond Cooling Towers and Premise Plumbing. *Microorganisms*, 9(12); 2543-2561.
- Sharaby, Y., Rodríguez-Martínez, S., Pecellin, M., Sela, R., Peretz, A., Höfle, M.G., Halpern, M. and Brettar, I. 2018. Virulence Traits of Environmental and Clinical *Legionella pneumophila* (MLVA) Genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(10), e00429-18.
- Shevchuk, O., Jäger, J. and Steinert, M. 2011. Virulence properties of *Legionella pneumophila* cell envelope. *Frontiers in Microbiology*, 2(74); 1-12.
- Sikora, A., Bobin, M.W., Montewka, M.K., Magryś, A. and Gładysz, I. 2015. Prevalence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(2); 195–201.
- Simon, S. and Hilbi, H. 2015. Subversion of cell-autonomous immunity and cell migration by *Legionella pneumophila* effectors. *Frontiers in Microbiology*, 6(447); 1-17.
- Solmaz, M. ve Solmaz, T. 2020. Hastane Su Sistemlerinde Lejyonella Risk Yönetimi ve Korunma. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 29(1); 51-55.
- Sopena, N., Pedro-Botet, L., Mateu, L., Tolschinsky, G., Rey-Joly, C. and Sabrià, M. 2007. Community-acquired legionella pneumonia in elderly patients: characteristics and outcome. *Journal of American Geriatrics Society*, 55(1); 114-119.
- Speir, M., Vince, J.E. and Naderer, T. 2014. Programmed cell death in *Legionella* infection. *Future Microbiology*, 9(1); 107-118.
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C. and Glöckner, G. 2007. *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(7-8); 577–587.
- Steiner, B., Leoni S.A. and Hilbi, H. 2019. Perturbation of *Legionella* Cell Infection by RNA Interference. In: *Legionella: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Buchrieser, C. and Hilbi, H. (eds.), Springer Media, 221-238, New York.
- Swanson, M.S. and Isberg, R.R. 1996. Identification of *L. pneumophila* Mutants that have aberrant intracellular Fates. *Infection and Immunity*, 64(7); 2585–2594.
- Swart, L. A., Harrison, C.F., Eichinger, L., Steinert, M. and Hilbi, H. 2018. *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as Cellular Model for *Legionella* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(61); 1-17.
- Swart, A.L. and Hilbi, H. 2020. PI and Fate of *Legionella* in Phagocytes. *Frontiers in Immunology*, 11(25); 1-13.

- Tachibana, M., Nakamoto, M., Kimura, Y., Shimizu, T. And Watarai, M. 2013. Characterization of *Legionella pneumophila* Isolated from Environmental Water and Ashiyu Foot Spa. *BioMed Research International*, 2013(514395); 1-7.
- Talapko, J., Frauenheim, E., Juzbaši, M., Tomas, M., Mati, S., Juki, M., Samardžić, M. and Škrlec, I. 2022. *Legionella pneumophila* Virulence Factors and the Possibility of Infection in Dental Practice. *Microorganisms*, 10(2); 255-269.
- Tao, L., Zhu, W., Bi-Jie Hu, B.J., Qu, J.M. and Luo, Z.Q. 2013. Induction of rapid cell death by environmental isolate of *Legionella pneumophila* in Mouse macrophages. *Infection and Immunity*, 81(9); 3077–3088.
- Tateda, K., Deng, J.C. Moore, T.A., Newstead, M.W., Paine, R., Kobayashi, N., Keizo Yamaguchi, K. And Standiford, J.T. 2003. Hyperoxia Mediates Acute Lung Injury and Increased Lethality in Murine *Legionella* pneumonia: The Role of Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 170(8); 4209-4216.
- Tesauro, M., Bianchi, A., Consonni, M., Pregliasco, F. And Galli, M.G. 2010. Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in two Italian hospitals. *Annual Ist Super Sanita*, 46(3); 274-278.
- Thomas, R.J. and Brooks, T.J. 2004. Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to respiratory epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 36(2); 83-92.
- Tiaden, A., Kessler, A. and Hilbi, H. 2013. Analyses of *Legionella* infection by Flow Cytometry. In: *Legionella: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Buchrieser, C. and Hilbi, H. (eds.), Springer Media, 233-249, New York.
- Tian, Q., Ken-ichiro, I., Yu, H.R., Jian, Z.H. and Yoshida, S.I. 2016. *Legionella dumoffii* Tex- KL Mutated in an Operon Homologous to traC-traD is Defective in Epithelial Cell Invasion. *Biomedical and Environmental Sciences*, 29(6); 424-434.
- Truchan, H. K., Christman, H.D., White, R.C., Rutledge, N.S., Cianciotto, N.P. 2017. Type II substrate of *Legionella* translocate out of the Pathogen-Occupied Vacuole via a Semipermeable Membrane. *American Society for Microbiology*, 8(3); 870-887.
- Twentyman, P.R. and Luscombe, M. 1987- A Study of some Variables in Tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal Cancer Research*, 56(3); 279-285.
- Ulleryd, P., Hugosson, A., Allestam, G., Bernander, S., Claesson, E.B., Eilertz I, Hagaeus, A.C., Hjorth, M., Johansson, A., De Jong, B., Lindqvist, A., Peter Nolskog, P. and Svensson, N. 2012. Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden epidemiological, environmental and microbiological investigation supported by meteorological modelling. *BMC Infectious Diseases*, 12(1); 313-321.
- Vinzing, M., Eitel, J., Lippmann, J., Hocke, A.C., Zahlten, J., Slevogt, H., N'Guessan, P.D., Günther, S., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Flieger, A., Suttorp, N. and

- Opitz, B. 2008. NAIP and Ipaf Control *Legionella pneumophila* Replication in Human Cells. The Journal of Immunology, 180; 6808-6815.
- Vural, T ve Er, D. 1999. *Legionella* Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri ve Laboratuvar Tanısı. Flora, 4(1); 9-25.
- Vural, T. 2014. *Legionella* Enfeksiyonları. ANKEM Dergisi, 28 (Ek-2); 167-176.
- Walker, J.T. and McDermott, P.J. 2021. Confirming the Presence of *Legionella pneumophila* in Your Water System. Journal of AOAC International, 104(4); 1135–1147.
- Wang, C., Saito, M., Tanaka, T., Amako, K. And Yoshida, S.I. 2015. Comparative analysis of virulence traits between a *Legionella feeleii* strain implicated in Pontiac fever and a strain that caused Legionnaires' disease. Microbial Pathogenesis, 89; 79-86.
- Weinbaum, D.L., Benner, R.R., Dowling, J.N., Alpern, A., Pasculle, A.W. and Donowitz, G.R. 1984. Interaction of *Legionella micdadei* with Human Monocytes. Infection and Immunity, 46(1); 68-73.
- Whiley, H., Bentham, R. and Brown, M.H. 2016. *Legionella* Persistence in manufactured water systems pasteurization and thermal tolerance. Frontiers in Microbiology, 8(1330); 1-6.
- Winn, W.C. 1988. Legionnaires Disease: Historical Perspective. Clinical Microbiology Reviews, 1(1); 60-81.
- Xiong, L., Yamasaki, S., Chen, H., Shi, L. and Mo, Z. 2017. Intracellular Growth and Morphological Characteristics of *Legionella pneumophila* during Invasion and Proliferation in Different Cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 40(7); 1035–1042.
- Xu, L. and Luo, Z.Q. 2013. Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. Microbes Infection, 15(2); 157–167.
- Yan, L. and Cirillo, J.D. 2004. Infection of murine macrophage cell lines by *Legionella pneumophila*. FEMS Microbiology Letters, 230(1); 147-152.
- Yarom, R., Sheinman, R. and Armon, R. 2010. *Legionella pneumophila* serogroup3 prevalence in drinkig water survey in Israel (2003-2007). Water Science & Technology Water Supply, 10(5); 746-752.
- Yavuz, C.I. 2018. Su Kaynaklı Bir Hastalık Olarak Lejyoner Hastalığı ve Çevresel Sürveyans. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 48(4); 211-227.
- Yılmaz, A. and Orhan, F. 2021. Investigation of the presence of *Legionella pneumophila* in water samples from Erzurum and surrounding provinces in Turkey. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 28(2); 255-259.
- Zanen-Lim, O.G. and Zanen, H.C. 1988. Differences in Lypopolysaccharid profiles of serological identical *Legionella pneumophila* SG-6. Journal of Clinical Pathology, 41(8); 826-829.
- Zayed, R.A., Pecellin, M., Jaber, L., Butmeh, S., Bahader, A.S., Steinert, M., Höfle, M.G., Brettar, I. and Bitar, D.M. 2021. Cytotoxicity, Intracellular Replication, and Contact-Dependent Pore Formation of Genotyped Environmental *Legionella*

pneumophila Isolates from Hospital Water Systems in the West Bank, Palestine. Pathogens, 10(4); 417-430.

Zeybek, Z., ve Türkmen, A. 2020. İstanbul daki Yüzme Havuzu Suları ve Biyofilm Örneklerinde *Legionella* ve Serbest Yaşayan Amiplerin Görülme Sıklığının Farklı Yöntemlerle Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 54(1); 50-65.

Zhan, X.Y., Hu, C.H. and Zhu, Q.Y. 2014. Comparative study on sampling methods for monitoring *Legionella* species in environmental water. African Journal of Microbiology Research, 8(10); 974-985.

Zhan, X.Y., Hu, C.H. and Zhu, Q.Y. 2015. *Legionella* Pathogenesis and Virulence Factors. Annals of Clinical and Laboratory Research, 3(2); 15-30.

Zhu, W., Hammad, L.A., Hsu, F.S., Mao, Y. and Luo, Z.Q. 2013. Induction of caspase 3 activation by multiple *L. pneumophila* Dot/Icm substrates. Cell Microbiology, 15(11); 1783–1795.

Zink, S.D., Pedersen, L., Cianciotto, N.P. and Abu Kwaik, Y. 2002. The Dot/Icm Type IV Secretion System of *Legionella pneumophila* Is Essential for the Induction of Apoptosis in Human Macrophages. Infection and Immunity, 70(7); 1657-1663.