

LEGIONELLA İNFEKSİYONLARI

Tümer VURAL

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANTALYA
stumer@akdeniz.edu.tr

ÖZET

Legionellaceae ailesi fakültatif hücre içi parazitler olup, primer olarak solunum yolu infeksiyonlarına neden olmaktadır. Toplam 34 tür içeren bu ailenin normal habitatı; toprak ve suda yaşayan çevresel protozoa ve amipleri ayrıca soğutma kuleleri ve iklimlendirme sistemlerini içermektedir. Çoğu infeksiyonlar çevresel biofilm ya da amiplerin içeriğinde bulunan aerosol halindeki organizmanın inhalasyonu ile oluşmaktadır. Fakat nadiren bazı infeksiyonlar kontamine sulara yüzme sonucu gibi diğer nedenlerle de oluşabilmektedir. Bu infeksiyonlara bağlı hem sporadik vakalar hem de lokalize salgınlar görülebilmektedir.

Bu organizmalar klora dirençli olup, buna bağlı olarak da su klorlama prosedürlerinden sonra bile canlı kalabilirler. Hastalık yayılımında insandan insana bulaş söz konusu değildir. Çevresel amiplerin içinde çoğalabilmesi bazı virülans faktörlerinin salınımını indükler ve bu durum *Legionella* türlerini insan makrofajlarını infekte etmesi için daha uygun hale getirir.

Organizma, kontamine suların aspirasyonu veya kontamine aerosolların inhalasyonu ile üst solunum yollarına giriş imkanı bulur. İnfeksiyon alanından temizlenmesindeki yetersizliklere bağlı olarak organizmanın akciğerlere kadar ilerlemesi mümkün olmaktadır. Normalde, akciğer dolaşımında bulunan alveolar makrofajlar organizmaların temizlenmesi için savunmada önemli bir rol teşkil etmektedirler. Aynı zamanda bu makrofajlar *Legionella pneumophila*'nın fagositozisini gerçekleştirmektedir. Fakat bu özellik fagozom-lizozom füzyonundaki başarısızlığa bağlı olarak gerçekleşemeyebilir. Bunun yanı sıra organizma fagozomun koruyucu ortamında çoğalır ve hücre rüptürü ile yeni bir grup bakterinin diğer sağlıklı makrofajları infekte etmesine neden olabilir.

Tartışmasız bir şekilde, *Legionella* hastalığının tanısı hastanın klinik belirtileri, muayenesi veya akciğerlerin radyolojik görünümü ile konulamamaktadır. Tanıda kesin yöntem, tamponlanmış (pH 6.9) L-sistein, demir ve alfa-ketoglutarat ile zenginleştirilmiş kömür maya ekstresinin kullanımı ile solunum sekresyonlarından *Legionella*'nın kültürüdür. Enzim "immunoassay" yönteminin kullanılması ile idrarda antijen aranması yöntemi de uygunluk kazanmış ve kültüre göre çeşitli avantajları bulunmuştur. İdrar antijen testi sonuçları saatler içinde elde edilebilirken, kültür sonuçları için 3-5 gün kadar beklenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte unutulmaması gereken önemli bir nokta da idrar antijen testinin sadece *Legionella pneumophila*'nın A serogrubunu saptayabilmesidir. Bu nedenle negatif bir idrar antijen test sonucunun diğer *Legionella* türlerine bağlı infeksiyonları dışlamadığını unutmamak gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: bulaşma yolları ve eradikasyon, ekoloji, *Legionella*, patogenezi, tanı yöntemleri, tarihçe

SUMMARY

Legionella Infections

Legionellaceae family are facultative intracellular parasites that cause primary respiratory tract infections. The family includes 34 species whose normal habitat is within environmental protozoa and amoeba in soil, water and also in cooling towers and air distribution systems. Most infections occur with inhalation of aerosolized organisms within amoebas or environmental biofilm. But occasionally, some infections may occur with other exposures like swimming in contaminated water. Both sporadic cases and localized outbreaks can be seen.

The organism is chlorine-resistant and thus, it can survive even after water treatment procedures. There is no person-to-person spread of the disease. Growth within the environmental amoeba induces the expression of key virulence factors that make the *Legionella* more suitable for infection of human macrophages.

The organism gains entry to the upper respiratory tract by aspiration of water contaminated with the organism or by inhalation of contaminated aerosols. Failure of clearing the organism from infection site permits them to reach through the lungs. Normally, alveolar macrophages in pulmonary circulation constitute an important role in the defence of clearing invading organisms. Although this macrophages perform phagocytosis of *Legionella pneumophila*. But, this feature can not be observed with the fail of phagosome-lysosome fusion. Besides this, the organism can multiply within the protected environment of the phagosome until the cell rupture and releasing of a new crop of bacteria.

Unambiguously, *Legionella* disease cannot be diagnosed on the basis of clinical presentation or radiologic appearance of the lungs. The definitive method of diagnosis involves the culturing of *Legionella* from respiratory secretions by using buffered (pH 6.9) charcoal yeast extract enriched with L-cysteine, iron and alfa-ketoglutarate. Visible colonies can be seen in 3 to 5 days. With the use of an enzyme immunoassay a urinary antigen test is available and has several advantages according to culture. The results of the urinary antigen test can be available within hours, whereas culture results require 3 to 5 days. However, it is important to note that the urinary antigen test only detects infections with serogroup A of *Legionella pneumophila*. Therefore, a negative antigen test does not rule out infections with all *Legionella* species.

Keywords: contamination pathways and eradication, diagnosis methods history, ecology, pathogenesis

1.GENEL BİLGİLER

1.1.Tarihçesi

Lejyoner hastalığı, 1976 yılında, Philadelphia'daki "Amerikan Lejyonerleri" toplantısına katılan üyelerin 182'sinde görülmüş, hızla gelişen bu pnömoni salgınında 29 kişi hayatını kaybetmiştir.

1974 yılında, aynı otelde yapılan 'Oddfellow' toplantısının 11 üyesi de Lejyoner hastalığına yakalanmış, ancak bu salgın *Legionella pneumophila*'nın izolasyonuna kadar dikkati çekmemiştir.

Bilinen ilk Lejyoner hastalığı salgını, 1957 yılında Austin Minnesota'daki bir mezbananın işçileri arasında görülmüştür⁽¹¹⁾.

1965 yılında, Washington DC St. Elizabeth's Psikiyatri Hastanesi'ndeki pnömoni salgını sonucu 81 hastanın 14'ü hayatını kaybetmiştir. Salgından 12 yıl sonra, saklanan serum örnekleri, retrospektif olarak araştırıldığında, hastaların % 85'inde *L.pneumophila* antikor serokonversiyonu saptanmıştır⁽¹⁵⁾.

L.pneumophila'nın ilk izolasyonu 1947'de olmuştur. Sebebi bilinmeyen, ateşli bir hastanın kanı, kobaya inoküle edilmiş, 'riketsiya benzeri' bir mikroorganizma izole edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu, 30 yıl sonra, bu mikroorganizmanın *L.pneumophila* olduğu anlaşılmıştır.

1977 yılında Centers for Disease Control and Prevention'dan (CDC, Hastalık Kontrol Merkezi) Dr. Joseph Mc Dade, atipik pnömoni nedeniyle ölen bir hastanın akciğer otopsi materyalinden, gram negatif bir bakteri izole etmiştir. Yeni izole edilen bu bakteri, hiçbir taksonomik gruba uymadığından yeni bir familya: *Legionellaceae* familyası; yeni bir cins: *Legionella* cinsi; yeni bir tür: *pneumophila* türü olarak sınıflandırılmıştır. Bakteri, hem salgından etkilenen gruba ithafen, hem de akciğerde infeksiyon oluşturduğu için, *Legionella pneumophila* olarak adlandırılmıştır^(3,5,10,14).

1.2.Etkenin Tanımlanması

Legionellaceae familyası, *Proteobacteria* sınıfının gamma-2 subgrubunun bir bölümüdür.

Yapılan çeşitli çalışmalarla, günümüze dek *Legionellaceae* familyasında 44 tür saptanmış olup, 21 türü insanlarda infeksiyon oluşturabilmektedir. Bu familyada yer alan, Lejyoner hasta-

lığının en sık gözlenen etyolojik ajanı olan *L.pneumophila* 16 serogrup içerirken, infeksiyonların çoğundan *L.pneumophila* serogrup 1, 4 ve 6 sorumludur.

L.pneumophila'nın, familyanın diğer türlerinden ayrımı için; Direkt Floresan Antikor (DFA) yöntemi, DNA hibridizasyonu, multilokus enzim elektroforezi ve çapraz immünoelektroforez gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca, *Legionellaceae* familyası üyelerinin, hücre duvarında büyük miktarda "ubiquinon" içeren dallı zincirli yağ asitleri içermesi nedeni ile, gaz- likit kromatografisi ve hücresel "ubiquinon" analizi ile ön tanıları yapılabilmektedir^(1,2,6).

1.3.Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Legionellaceae familyası üyeleri gram negatif, aerobik, sporsuz, genellikle kapsülsüz ve hareketli, pleomorfik görünümde çomaklardır. Gram negatif olarak tanımlanmalarına karşın, Gram boyama yöntemiyle zor boyanan *Legionella* türleri; 0.3-0.9 µm eninde, 2-20 µm boyundadırlar. Doku ve klinik örneklerde bulunan mikroorganizmalar, 1-2 µm'lik kokobasil görünümünde olmalarına karşın, besiyerinde üremiş *Legionella* türleri uzun, filamentöz formlarda görülebilirler.

Legionella türleri, hücresel yağ asitlerinin % 80'den fazlasının dallı zincirli olması nedeni ile, gram negatif bakteriler arasında ayrıcalıklıdır. Bu özellikleri ile *Corynebacterium* cinsi gibi gram pozitif bakterilere ve mikolik asit gibi uzun karbon zinciri içeren *Mycobacterium* cinsine yakın benzerlik göstermektedirler.

Primer izolasyonda *Legionella* oakridgensis haricinde diğer türlerde tek polar flagella ve çok sayıda fimbria bulunmasına karşın, flagellanın varlığı sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. *Legionellaceae* familyasındaki türler, içte ve dışta trilaminer membran, peptidoglikan tabaka ve bazı türlerde polisakkarit yapıda bir kapsül içermektedirler.

Organizmada lipopolisakkarit yapıya karşı oluşan antikorlar IFA yöntemi ile saptanabilmektedir.

Familya üyeleri enerjilerini Krebs siklusu yoluyla katabolize edilen aminoasitler aracılığı ile, şekerleri ise pentoz siklusu ve Embden-Meyerhof yolundaki glikoneojenik enzimler ile elde ederler⁽²²⁾.

Tablo 1.1. *Legionella* türlerinin içerdiği serogrup sayısı ve insanlarda infeksiyon oluşturma özelliği.

Legionella türleri	Serogrup sayısı	İnfeksiyon oluşturma özelliği	Kaynaklar
1. <i>L.adelaidensis</i>	1	Yok	Benson et al., 1991
2. <i>L.anisa</i>	1	Var	Gorman et al., 1985; Harrison and Saunders, 1994
3. <i>L.birminghamensis</i>	1	Var	Wilkinson et al., 1987
4. <i>L.bozemanii</i>	2	Var	Brenner et al., 1980; Harrison and Saunders, 1994
5. <i>L.brunensis</i>	1	Yok	Wilkinson et al., 1988
6. <i>L.cherrii*</i>	1	Vara	Brenner et al., 1985; Fang et al., 1989
7. <i>L.cincinnatiensis</i>	1	Var	Thacker et al., 1988
8. <i>L.dumoffii</i>	1	Var	Brenner et al., 1980
9. <i>L.erythra</i>	2	Yok	Brenner et al., 1985; Harrison and Saunders, 1994
10. <i>L.fairfieldensis</i>	1	Yok	Thacker et al., 1991
11. <i>L.feeleii</i>	2	Var	Herwaldt et al., 1984; Harrison and Saunders, 1994
12. <i>L.geestiana</i>	1	Yok	Dennis et al., 1993

Tablo 1.1. (Devam) *Legionella* türlerinin içerdiği serogrup sayısı ve insanlarda infeksiyon oluşturma özelliği.

13. <i>L.gormanii</i>	1	Var	Morris et al., 1980; Harrison and Saunders, 1994
14. <i>L.gratiana</i>	1	Yok	Bornstein et al., 1989
15. <i>L.hackeliae</i>	2	Var	Brenner et al., 1985; Harrison and Saunders, 1994
16. <i>L.israelensis</i>	1	Yok	Bercovier et al., 1986
17. <i>L.jamestowniensis</i>	1	Yok	Brenner et al., 1985
18. <i>L.jordanis</i>	1	Var	Cherry et al., 1982; Harrison and Saunders, 1994
19. <i>L.lansingensis</i>	1	Var	Thacker et al., 1992
20. <i>L.londiniensis</i>	2	Yok	Dennis et al., 1993; Lo Presti et al., 1996
21. <i>L.longbeachae</i>	2	Var	McKinney et al., 1981; Harrison and Saunders, 1994
22. <i>L.lytica*</i>	1	Varb	Drozanski, 1991; Rowbotham, 1993; Hookey et al., 1996
23. <i>L.maceachernii</i>	1	Var	Brenner et al., 1985; Harrison and Saunders, 1994
24. <i>L.micdadei</i>	1	Var	Hebert et al., 1980
25. <i>L.moravica</i>	1	Yok	Wilkinson et al., 1988
26. <i>L.nautarum</i>	1	Yok	Dennis et al., 1993
27. <i>L.oakridgensis*</i>	1	Varc	Orrison et al., 1983; Fang et al., 1989
28. <i>L.parisiensis</i>	1	Var	Brenner et al., 1985; Lo Presti et al., 1996
29. <i>L.pneumophila</i>	16	Var	Brenner et al., 1979, 1988; Lück et al., 1995
30. <i>L.quateirensis</i>	1	Yok	Dennis et al., 1993
31. <i>L.quinlivanii</i>	2	Yok	Benson et al., 1989; Harrison and Saunders, 1994
32. <i>L.rubrilucens</i>	1	Yok	Brenner et al., 1985
33. <i>L.sainthelensi</i>	2	Var	Campbell et al., 1984; Harrison and Saunders, 1994
34. <i>L.santicrucis</i>	1	Yok	Brenner et al., 1985
35. <i>L.shakespearei</i>	1	Yok	Verma et al., 1992
36. <i>L.spiritensis</i>	2	Yok	Brenner et al., 1985; Harrison and Saunders, 1994
37. <i>L.steigerwaltii</i>	1	Yok	Brenner et al., 1985
38. <i>L.tucsonensis</i>	1	Var	Thacker et al., 1989
39. <i>L.wadsworthii</i>	1	Var	Edelstein et al., 1982
40. <i>L.waltersii</i>	1	Yok	Benson et al., 1996
41. <i>L.worsleiensis</i>	1	Yok	Dennis et al., 1993
42. sp. nov. :strain Montbeliard	1	Yok	Lo Presti et al., 1996
43. sp. nov.: strain Greoux	1	Yok	Lo Presti et al., 1996
44.sp.nov.:strain IB V	1	Yok	Lo Presti et al., 1996

*İnsanlarda infeksiyon oluşturma özelliği; izolasyon olmaksızın, serolojik yöntemler (a, b, c), amib içerisinde zenginleştirme ve genetik yöntemler (b) ve boyama yöntemi ile (c) tanımlanmıştır.

1.4.Ekstrasellüler Ürünler

Legionella türleri; hemolizinler, proteazlar, esterazlar, fosfotazlar, aminopeptidazlar ve endonükleazlar gibi enzimler ve potansiyel toksinler üretirler. Majör sekretuar bir protein olan 38 kDa metalloproteaz, hemolitik ve sitotoksik özellikler içermektedir.

1.5.Legionellaceae Ekolojisi

Legionellaceae familyasındaki türlerin ekolojilerinin bilinmesi, potansiyel salgınların önlenmesi amacıyla gereklidir. Türlerin doğal kaynakları; nehirler, göller, termal sular ve nemli kazı toprağıdır. *L.pneumophila*, sıcaklığı 0-63°C, pH'sı 5.0-8.5 ve çözünmüş oksijen içeriği 0.2-

15.0 mg/l arasında değişebilen, geniş bir fiziksel spektrum içerisinde yıllarca canlı kalabilir.

Legionella türlerinin, doğada yaşamını sürdürebilmeleri ve çoğalabilmeleri için, ortamda bazı mikroorganizmaların bulunması önemlidir. Siyanobakteriler ve diğer *Legionella* dışı bakteriler, *Legionella* türlerinin in vitro koşullarda üremesini stimüle ederler. Sularda serbest olarak yaşayan amipler ve kirpikli protozoalar, enfeksiyon kaynağı olarak şüphelenilen ortamlardan, *Legionella* türleri ile birlikte izole edilmişlerdir. Mavi-yeşil algler, amip ve kirpikli protozoaları enfekte ederek çoğalabilen mikroorganizma, uygun olmayan çevre koşullarında yaşamını sürdürebilir.

Legionella türleri, doğal su ortamlarında az sayıda bulunması nedeni ile, düşük oranlarda su dağıtım sistemlerine geçerler. Ancak, su dağıtım sistemlerinde suyun durgun olduğu alanlar gibi uygun üreme ortamları bulunması ve klora yüksek oranda dirençli olmaları nedeni ile canlılıklarını sürdürmeye ve çoğalmaya devam ederler. Soğutma kuleleri, su dağıtım sistemleri, su depoları gibi fiziksel korunma ve besin sağlayan ve su sıcaklığı uygun olan insan yapımı sistemlerde hızla çoğalırlar.

Legionella türlerinin su sistemlerindeki kolonizasyonu su sıcaklığı, sediment birikimi ve kommensal mikroflora gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir.

Dip sedimentinin yüzeyinde bulunan *Legionella*'lar için sıcaklık, özellikle önemli bir parametredir. Su tanklarının dip sedimentinde bulunan ortam bakterileri, *Legionella* türleri için gerekli temel besinleri sağlayarak yaşamalarını destekler.

Yapılan çalışmalarda; *Legionella* türleri ile kolonize olmuş sıcak su depolarının daha çok vertikal tipte ve eski olduğu, suyun yüksek konsantrasyonda Ca^{+2} ve Mg^{+2} içerdiği saptanmıştır. Aynı zamanda, vertikal tipte olan su depolarının dip kısmında kolonizasyonu kolaylaştıran ve farklı sıcaklık katmanlarında olan daha kalın bir dip sedimentinin oluştuğu görülmüştür^(4,7).

1.6.İnfeksiyon Kaynakları

Su dağıtım sistemleri, *Legionella* türlerinin yayılımı açısından primer kaynaklardır. Yapılan çeşitli çalışmalarda nozokomiyal olguların has-

tane su dağıtım sistemlerinin kontaminasyonu ile, toplumsal kaynaklı olguların ise endüstriyel bölgeler ve yerleşim bölgelerindeki su kaynaklarının kontaminasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Legionella türlerinin en çok çok bulunduğu ve amplifiye olduğu alanlar şunlardır;

- soğutma kuleleri,
- sıcak ve soğuk su sistemleri,
- su tankları,
- evaporatör ve nebulizörler,
- duş başlıkları ve sıcak su muslukları,
- hastanelerde bulunan solunum terapi ekipmanları,
- termal banyolar, çamurlar ve kaplıcalar.

Ayrıca oda nemlendiricilerinin de, *L. pneumophila* içeren aerosoller yaydığı saptanmıştır.

İnfeksiyon kaynağının saptanması ve doğrulanması amacıyla moleküler "fingerprinting" metotları, elektroforetik alloenzim tipleme, ribotipleme, DNA'nın "pulse" alan elektroforezi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve monoklonal antikor panelleri kullanılmaktadır^(13,17).

1.7.Bulaş Yolları

L.pneumophila' nın yayılımı modu olarak, hava yolu ile yayılma üstün gelen tezdır, ancak aspirasyon veya solunum yolları manipülasyonları sırasında, kontamine suyun direkt alımı ile de geçebilmektedir.

Aerosolizasyonun en kuvvetli kanıtı, 1968 Pontiac ateşi salgınında gözlenmiştir. Bakterinin, soğutma kulesi kaynaklı aerosoller içerisinde hava akımları ile 1.6 km'den fazla taşınabildiği bildirilmiştir.

Kontamine musluk suyu ile doldurulmuş veya yıkanmış nebulizör gibi solunum sistemi ekipmanları, aerosolizasyon ile bulaşa yol açabilmektedir. Yapılan bir araştırmada, *L.pneumophila* içeren duş başlıkları ve sıcak su musluklarının, az sayıda mikroorganizmayı aerosolleştirebildiği, aerosol partiküllerinin alt solunum yollarına penetre olabilecek kadar küçük (1-5 µm) oldukları bildirilmiştir.

Kontamine sular veya kolonize orofaringeal sekresyonların aspirasyonu da olası bulaş yollarından biridir. Özellikle baş-boyun kanseri nedeni ile opere olmuş hastalarda aspirasyona

eğiliminin artması, nozokomiyal Lejyoner hastalığı insidansını yükseltmektedir.

Kontamine sularla temasa bağlı yara infeksiyonları, hemodiyaliz fistül infeksiyonları ve gastrointestinal sistem infeksiyonları da bildirilmiştir⁽¹⁸⁾.

1.8.İnsidans

Lejyoner hastalığının insidansı; su rezervuarlarının mikroorganizma ile kontaminasyon derecesine, kontamine su ile temas eden kişinin duyarlılığına ve etkenin organizmaya giriş konsantrasyonuna bağlıdır. Ancak infeksiyonun saptanabilmesinde, özel laboratuvar testlerinin varlığı da önemlidir. Laboratuvar tanı yöntemlerinin yetersizliği nedeni ile, *Legionella* infeksiyonlarının bilinenden çok daha fazla olabileceği belirtilmektedir.

Yapılan çalışmalar ile toplumsal kaynaklı pnömonilerde *Legionella* türlerinin en sık gözlenen üç etken arasında olduğu saptanmıştır.

Nozokomiyal pnömoni insidansı mikroorganizmanın kolonizasyon derecesine, immünsuprese hasta sayısına ve infeksiyonu saptayacak tanı yöntemlerinin yeterliliğine bağlıdır.

Sigara kullanımı, kronik akciğer hastalığı, ilerlemiş yaş ve immün supresyon başlıca risk faktörleridir. Bazı çalışmalarda aşırı alkol alımı ve böbrek yetmezliği de risk faktörü olarak bildirilmiştir. İmmünsuprese ve altta yatan akciğer hastalığı olan çocuklar ile yenidoğanlarda, nozokomiyal infeksiyon olguları bildirilmiştir. AIDS hastalarında da, *Legionella* türleri ile oluşan infeksiyon olgu sayısının arttığı gözlenmektedir. Bu hastalar ekstrapulmoner infeksiyonlar, bakteremi ve akciğer absesine eğilimlidirler^(16,20,21).

1.9.Virülans ve Patogenezi

L.pneumophila, toplumdan kazanılmış diğer pnömoni etkenlerine göre, daha ciddi bir hastalığa neden olmaktadır. Bazı *Legionella* türleri ve serotiplerinin insan infeksiyonlarında daha sık gözlenmesi, henüz açıkça tanımlanamamış olan virülans faktörlerinin varlığını düşündürmektedir. Örneğin, *L.pneumophila* serogruplarının çoğu, su dağıtım sistemlerinde kolonize olabilmelerine karşın, genellikle sadece birkaç serogrubu hastalık oluşturabilmektedir.

Legionella türlerinin insan infeksiyonların-

daki patojenitesi, konak hücreleri invaze edebilme yeteneğine bağlıdır. Solunum yoluyla alınan mikroorganizma, solunum yolları epitel hücrelerine adhere olarak mukosiliyer temizleme işleminden kurtulur. Bu nedenle, sigara kullanan, alkolik veya kronik akciğer hastalığı olan kişilerde infeksiyon riski yüksektir.

Mikroorganizma alveollere ulaştıktan sonraki tablo, hem bakterinin virülansına hem de konağın savunma yeteneğine bağlıdır. Konak defansındaki primer komponent, alveoler makrofajlardır. Alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen *L.pneumophila*, ribozom ile ilişkili, özelleşmiş bir fagozom ile kuşatılır. Ancak mikroorganizmayı kuşatan fagozom, lizozom ile füzyon yapamadığından, mikroorganizma lizozomların mikrobisidal etkisinden kurtulur ve makrofaj rüptüre olana dek çoğalır. Hücre rüptüre olduktan sonra ortamdaki bakteriler, yeni hücreler tarafından fagosite edilir ve siklus yeniden başlar.

L.pneumophila'nın in vitro koşullarda oksijene bağımlı mikrobisidal sistemlere duyarlı olmasına karşın, polimorfonükleer lökositler mikroorganizmanın öldürülmesinde yeterince etkili değildir. *L.pneumophila* nötrofiller tarafından sadece spesifik antikor veya kompleman varlığında fagosite edilebilir. Mikroorganizma, monositlerin aksine polimorfonükleer lökositlerde yeterince replike olamaz.

İn vitro çalışmalar, konak savunmasında, humoral bağışıklığın, sekonder bir rol oynadığını göstermiştir. Örneğin, oluşan antikorlar mikroorganizmanın:

- Kompleman aracılığı ile öldürülmesini arttıramaz.
- Monositler ve alveoler makrofajlardaki çoğalmasını inhibe edemez.
- Sadece fagositler tarafından öldürülmesini ılımlı bir şekilde arttırabilir.

Türe özgü olan bu antikorlar, infeksiyondan sonraki ilk birkaç hafta içerisinde saptanabilmektedir.

Diğer intrasellüler patojenler gibi, *L.pneumophila*'ya karşı primer konak defansı, hücresel bağışıklık aracılığı ile gerçekleştirilir. Lejyoner hastalığı AIDS hastaları, kortikosteroid alan hastalar, transplant hastaları ve "hairy cell" lösemi hastalar gibi hücresel bağışıklığı deprese has-

talar için daha yaygın ve ciddi bir enfeksiyondur.

Mononükleer hücreler, *L.pneumophila* antijenlerine karşı hem proliferasyon hem de IFN- γ , IL-1, TNF gibi, monositleri aktive eden sitokinlerin üretimiyle yanıt verir. Monositler tarafından aktive edilen IFN- γ , mikroorganizma için gerekli olan Fe'i sınırlayarak, *L.pneumophila*'nın intrasellüler çoğalmasını inhibe eder. Yine, IL-2 tarafından aktive edilen "Naturel Killer" hücrelerin *L.pneumophila* ile enfekte mononükleer hücreleri öldürdüğü gösterilmiştir.

İn vitro çalışmalarda, *L.pneumophila*'nın fagositik hücrelerce üretilen süperoksit ve hidroksit radikalleri gibi çeşitli reaktif oksijen ürünlerine ve hidrojen peroksit duyarlı olduğu bulunmuştur.

L.pneumophila, komplemanı hem klasik hem de alternatif yoldan aktive edebilmektedir. Ancak alternatif yoldan aktivasyonda C₃b, bakterinin lipopolisakkarit yapısı yerine dış membran porin proteinine bağlanmaktadır. Bu porin proteini, hem virülen hem de avirülen suşlarda bulunabildiği için virülenstaki rolü tartışmalıdır. Ancak pasajlarla avirülen hale getirilmiş virülen suşlarda porin düzeylerinde belirgin azalma olduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, *Legionella* türlerinin ürettiği toksin ile proteazlar ve hemolizinler gibi ekstrasellüler maddelerin, mikroorganizmanın intrasellüler devamlılığından ve bazı klinik tablolardan sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Toksinin etki mekanizması tam olarak bilinmemesine karşın, nötrofil aktivasyonunun erken basamaklarında sinyal iletiminde görevli olduğu, O₂- ve diğer oksijen radikallerinin üretimini inhibe ettiği saptanmıştır.

Çalışmalar; *Legionella micdadei* dışında, özellikle *L.pneumophila* olmak üzere çoğu *Legionella* türünün, üremeleri sırasında ortama, fosfolipaz C sekrete ettiklerini göstermiştir⁽²²⁾.

1.10.Laboratuvar Tanısı

Lejyoner hastalığının klinik ve radyolojik bulguları spesifik olmadığı için, tanı koyabilmek amacıyla özel tanı yöntemlerine gereksinim vardır. Bunlar arasında güncel olanlar özel selektif besiyerlerinde kültür yöntemi, monoklonal antikor işaretli DFA, solid faz "radioimmunoassay"

(SPRIA), PCR, üriner antijen, DNA hibridizasyonu, IFA, enzim "immunoassay" (ELISA) ve hızlı mikroaglutinasyon gibi yöntemler; gerek çevresel gerekse klinik örneklerde *Legionella* türlerine ait antijen veya türlere karşı oluşan antikorları saptayabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda kültür, direkt immün floresan ve üriner antijen arama gibi yöntemler daha sıklıkla kullanılmaktadır⁽²²⁾.

1.10.1.Boyanma özellikleri:

Klinik örneklerdeki mikroorganizma standart Gram boyama yöntemi ile iyi boyanamadığı için, zıt boya olan safranini daha uzun süre uygulamak (örneğin 2 dakika) gibi modifiye yöntemler kullanılabilir. Gimenez boyası, Gram boyama yöntemine göre mikroorganizmayı daha etkin olarak boyamaktadır. Parafin ile fikse dokulardaki mikroorganizmanın gözlenebilmesi için, Warthin-Starry ve Dieterle gibi gümüş boyaları kullanılmaktadır.

Besiyerine pasajı yapılan bakteriler, hem klinik örneklerde bulunanlardan daha kolay boyanır, hem de filamentöz ve basil formlarının bir arada gözlemlendiği pleomorfik bir yapı gösterir. Türlerin çoğunda, Sudan Black B ile boyandığında siyah renkte görünen, lipid içeren vakuoller bulunur.

L.micdadei, *Legionella bozemanii* ve *Legionella dumoffi*'nin doku örneklerinde zayıf asit-fast olarak boyandığı, renksizleştirme işleminde % 1'lik sülfürik asit kullanılan aside dirençli boyamada gözlenebilmektedir. Bu özellik, *L.micdadei* enfeksiyonlarının yanlışlıkla mikobakteriyel enfeksiyon olarak yorumlanmasına ve tedavide antitüberküloz ajanların kullanımına neden olabilmektedir.

1.10.2.Kültür:

Legionella türleri ile oluşan enfeksiyonların tanısı için doğrulayıcı yöntem, örneklerden, mikroorganizmanın izolasyonudur.

Legionella türleri standart besiyerlerinde üretilmediğinden; üreme faktörleri, boyalar ve değişik antibiyotik kombinasyonları içeren selektif besiyerleri kullanılır (Tablo 1, 2).

Legionella türleri ile oluşan nadir enfeksiyonlar dışında; genellikle hastanın, balgam, endotrakeal veya transtrakeal aspirasyon mayii,

bronkoalveoler lavaj sıvısı ve akciğer biopsi materyali gibi solunum sistemine ait klinik örneklerin, özel işlemlerden sonra kültürleri yapılmaktadır.

İzolasyon için kullanılan primer besiyeri, pH'ı 6.9'a tamponlanmış "charcoal yeast extract" (BCYE- α) agardır. Besiyerindeki ketoasitler ve Fe iyonları ile birlikte büyümeyi stimüle eden L-sistein, önemli bir maddedir ve mikroorganizmanın üremesini kolaylaştırır. Besiyerindeki α -ketoglutarat da mikroorganizmanın üremesine katkıda bulunur.

Balgam gibi normal flora içeren diğer örneklerin kültürü için, BCYE- α agar'a sefamandol, polimiksin B ve anizomisin veya sikloheksimid, glisin, polimiksin B ve vankomisin ilavesiyle geliştirilen selektif BCYE- α besiyeri kullanılır.

Ekim yapılan besiyerleri 35-37°C'de, nemli ve % 5-10 CO₂'li ortamda enkübe edilir. *Legionella* türlerine ait koloniler, 3-4 gün içerisinde makroskopik olarak gözlenebilmelerine karşın, üreme gözlenmeyen besiyerleri onuncu güne dek enkübe edilir. Oluşan koloniler, S tipinde, 3-4 mm çapında, buzlu cam görünümünde, gri-beyazdan mavi-yeşile değişebilen renklerde gözlenirler⁽¹⁹⁾.

Tablo 1.2. *Legionella* türleri için selektif izolasyon besiyerleri.

Besiyerleri	İlave edilen antibiyotikler	Kaynaklar
CYE	polimiksin B (40000 IU/l), vankomisin (0.5 mg/l),	Edelstein and Finegold, 1979
Kanlı agar + L-sistein, Fe ₄ (P ₂ O ₇) ₃	amfoterisin B (2.5 mg/l), kolistin (15000 IU/l), trimetoprim (2.5 mg/l), vankomisin (5 mg/l),	Greaves, 1980
BCYE α	anizomisin (80 mg/l), sefamandol (4 mg/l),	Edelstein, 1981
CYE	polimiksin B (80000 IU/l), sefalotin (4 mg/l), kolistin (16 mg/l), sikloheksimid (80 mg/l), vankomisin (0.5 mg/l),	Bopp et al., 1981
BCYE	glisin (3 g/l), polimiksin B (100000 IU/l), vankomisin (5 mg/l),	Wadowsky and Yee, 1981
BCYE α + bromkresol moru, bromtimol mavisi	anizomisin (80 mg/l), glisin (3 g/l), polimiksin B (50000 IU/l), vankomisin (1 mg/l),	Edelstein, 1982
GVP	amfoterisin (80 mg/l), glisin (3 g/l), polymixin B (100000 IU/l), vankomisin (5 mg/l),	Okuda et al., 1984
BCYE α	sikloheksimid (80 mg/l), glisin (3 g/l), polimiksin B (100000 IU/l), vancomycin (5 mg/l),	Dennis et al., 1984a

1.10.3. İmmuno-Floresan Yöntemler:

İmmuno-floresan yöntemlerde "Rhodamine B isothiocyanate", "Lissamine rhodamine B" veya "fluorescein isothiocyanate" benzeri floresan boyalar ile tavşan immünglobulini gibi antikorlar özel bir yöntem ile birleştirilmiştir.

Legionella infeksiyonlarının tanısında; immüno-floresan yöntemlerden antijen aramaya yönelik DFA yöntemi ile, antikor aramaya yönelik IFA yöntemi kullanılmaktadır⁽¹⁹⁾.

1.10.3.1. Direkt Floresan Antikor (DFA) Yöntemi:

Hızlı sonuç verebilmesine karşın, DFA yönteminin duyarlılığı, kültür yönteminin duyarlılığından daha düşüktür. Bunun nedeni, mikroorganizmayı saptayabilmek için, alınan örneğin her ml'sinde 104-105 bakteri bulunması gerekliliğidir.

Yöntemin duyarlılığı balgam incelendiğinde yaklaşık % 50 iken; bronkoalveoler lavaj, akciğer dokusu biopsi örneği gibi daha spesifik örneklerde % 70'e ulaşmaktadır. Yöntemin özgüllüğü % 98-99 olarak bildirilmesine karşın, poliklonal DFA konjugatları hazırlanmış DFA reagenlerine bağlı yalancı pozitif reaksiyonlar bildirilmiştir. Ancak, monoklonal antikorlar kullanılarak çapraz reaksiyon olasılığı elimine edilebilmektedir.

1.10.3.2. İndirekt Floresan Antikor (IFA) Yöntemi:

IFA yöntemi *Legionella* infeksiyonlarında geç tanı alınması nedeni ile, daha çok epidemiyolojik çalışmalarda ve potansiyel salgınları önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Tek bir serum örneğinde, 1/256 ve üzerindeki antikor titresinin varlığı geçirilmiş infeksiyonu, akut ve konvelesan faz serum örnekleri arasında, en az 1/128 olacak şekilde dört katlık titre artışı akut infeksiyonu düşündürmektedir.

1.10.4. DNA probe ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

DNA probe ve PCR yöntemi, ilk olarak su örneklerindeki *Legionella* türlerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. *Legionella* genusu için 55 rRNA gen dizisinin; *L.pneumophila* türleri için ise mip gen dizisinin kullanımı, *L.pneumophila*'nın

diğer *Legionella* türlerinden ayırımını sağlamıştır.

Yapılan son çalışmalar, su örneklerindeki *Legionella* türlerinin PCR ile saptanmasının, kültür ve immunofluoresan yöntemlerden daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir. Buna karşın, suyun kirliliği gibi bazı faktörler, PCR sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir.

Çeşitli çalışmalarda, respiratuar örneklerdeki mikroorganizmanın saptanması amacıyla da PCR kullanılmış; duyarlılığı % 85, özgüllüğü % 99 bulunmuştur. Ayrıca PCR yöntemi, bakterinin idrar örneklerinde saptanması amacıyla da kullanılabilir⁽²²⁾.

1.10.5. Üriner Antijen:

Legionella antijenleri idrarda solubl halde bulunabildiği için, klinik semptomların başlangıcından yaklaşık üç gün sonra, hastanın idrarında *L.pneumophila* serogrup 1'e ait antijen, "radioimmunoassay" (RIA) veya ELISA yöntemiyle saptanabilir. Yöntemin duyarlılığı % 80, özgüllüğü % 100'dür.

1.11. Rezervuar Dezenfeksiyonu

1.11.1. Su sıcaklığı:

Su dağıtım sistemlerinden *Legionella* türlerinin eradikasyonu için genellikle kullanılan yöntem, sistemdeki suyun belirli bir süre, 60-85°C'lerde ısıtılmasıdır. Bu yöntem geçici olup, mikroorganizmanın sistemleri tekrar kontamine etmesini önleyemez. Bakterinin su sistemlerinde çoğalmasını önlemek için su sıcaklığı soğuk su sistemlerinde 20°C'nin altında, sıcak su sistemlerinde ise depoda 60°C'nin üzerinde, çıkış yerlerinde 50°C'nin üzerinde sabit olarak tutulmalıdır.

1.11.2. "Biocid"ler:

Su dağıtım ve soğutma sistemlerinde, serbest klor düzeyi belirli aralıklarla 1000 ppm ve günlük doz 1-5 ppm olacak şekilde suyun klorlanması, sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasına karşın, bazı dezavantajları vardır. Klor toksik ve koroziv bir maddedir ve sıcak suyun dezenfeksiyonu amacıyla kullanımı güçtür.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, *Legionella* türlerine karşı klorlu fenolik tiyoeter etkili bulunurken, gluteraldehit ve kuaterner amonyum bileşikler etkisiz bulunmuştur. "Bromo-

nitropropone-diol", "bromo-chloro-dimethylhydantoin" ve "isothiazolinon"lar ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise çelişkilidir.

Ozonun çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği araştırılmış, *Legionella* türleri, ozona karşı *Escherichia coli*, poliovirus ve HAV'dan daha dirençli, *Bacillus subtilis* sporlarından daha duyarlı bulunmuştur.

Bakır-gümüş iyonizasyon üniteleri (LiquiTech, Burr Ridge, Tarn-Pure gibi) ürettikleri iyonlar aracılığı ile bakteri hücre duvarını parçalayarak hücre lizisine yol açarlar. Bu üniteler su dağıtım sistemleri boyunca mikroorganizmanın tekrar kolonizasyon olasılığını azaltırlar. Yapılan kontrollü çalışmalarda yöntemin *L. pneumophila*'nın eradikasyonunda yüksek derecede etkili olmasına karşın, sistemin maliyetinin yüksek oluşu ve atık gümüşün tekrar değerlendirilememesi nedeni ile kullanımı kısıtlıdır⁽⁸⁾.

1.11.3. Ultraviyole ışınları:

Bakterinin DNA'sını parçalayarak ölümüne neden olur. Transplantasyon veya yoğun bakım üniteleri gibi lokalize bir alanın dezenfeksiyonunda etkinliği kanıtlanmıştır. Rezidüel koruma sağlamadığı için, düzenlemeden sonra distal alanlar, aşırı ısıtma veya "flushing" yöntemi ile dezenfekte edilmelidir.

Gerektiğinde UV ışınları, klorizasyon veya bakır-gümüş iyonizasyon yöntemleri birarada kullanılabilir^(8,9).

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı *Legionella* Tanı Laboratuvarı 1992 yılında kurulmuştur. Alt yapı çalışmaları tamamlandıktan sonra çevresel ve klinik örneklerin kültürü ve etkenin identifikasyonları yapılmaya başlanmıştır.

•Anabilim Dalımız *Legionella* Laboratuvarı'nın kalite kontrolü için, Surrey Üniversitesi Robens Enstitüsü/İngiltere'den temin edilen kontrollü standart su örneklerinde *Legionella* spp. araştırılması yapılmıştır. Santrifüj edilen (3000g x 15 dk) su örneklerinin dip sedimenti asit (0.2 M HCl-KCl, pH=2.2) ile 15 dakika muamele edilerek selektif besiyerlerine (BCYE-α agar +GVPC selective supplement) ekimleri yapılmıştır. Nemli ortam ve 37°C'de bekletilen kültürlerin ikisinde, dört veya beş gün sonra,

buzlu cam görünümünde, grimsi-beyaz renkli küçük kolonilerin olduğu belirlenmiştir. Üreyen kolonilerin *L.pneumophila* serogrup 1 antiserumu (Micro-screen *Legionella*, *L.pneumophila* antiserum serogroup 1, serogroups 2-14, Mercia Diagnostics) ile aglütinasyon vermesi ve ayrıca Monofluo direkt floresan antikor (Sanofi Diagnostic Pasteur, 61730) yöntemi ile, 365-546 nm dalga boyutundaki floresan mikroskopunda parlak refle veren çomak şeklinde objelerin görülmesi sonucu, *L.pneumophila* serogrup 1 olduğu anlaşılmıştır. Üreme saptanan su örneklerinin protokol numaraları Robens Enstitüsü'ne bildirilmiş ve sonuçlar enstitü tarafından doğrulanmıştır.

Kültürün, *Legionella* infeksiyonlarının tanısında önemli bir yeri olmasına karşın, üreme için gereken zamanın uzun olması ve kuşkulu üremelerde ileri tanı veya doğrulama yöntemlerine ihtiyaç duyulması, dezavantaj teşkil etmektedir⁽¹⁷⁾.

•1993 yılında ilk Lejyoner hastalığı olgumuz; böbrek transplantasyonu yapılmış, immün supresyon altında kombine antibiyotik uygulanmasına karşın tedaviye yanıt alınamayan bir erkek hasta idi. Hastaya, atipik pnömoni nedeni ile terminal dönemde, konsey kararı ile açık akciğer biyopsisi uygulanmış ve materyal, tanı amacıyla laboratuvarımıza gönderilmiştir. Monofluo DFA yöntemi uygulanan örnekte, floresan mikroskobu ile *L.pneumophila* antijeni saptanmıştır. Ülkemizde ilk kez DFA yöntemi ile Lejyoner hastalığı tanısı konan olgumuzda makrolid +rifampin kombinasyon tedavisine olumlu sonuç alınmıştır. Aynı hasta, 1997 yılında, tekrar atipik pnömoni nedeni ile hastanemize yatırılmış, incelenen balgam örneğinde DFA yöntemi ile *Legionella* antijeni saptanmıştır. Yapılan tetkikler sonucunda, hastada HIV pozitifliği saptanmıştır. Uygulanan makrolid tedavisine olumlu yanıt alınıp, hasta taburcu edilmiştir^(12,21).

Sonuç

Legionella türleri ile oluşan nozokomiyal infeksiyonlarda, mortalite yaklaşık % 40-50 oranındadır. Erken tanı ve tedavi sonucu mortalite oranı azaltılabilir ve uygun tedaviye cevap 3-5 günde alınabilir.

Lejyoner hastalığı, genellikle 50 yaş üstü,

immün supresyon, sigara ve alkol bağımlılığı gibi predispozan faktörlerin bulunması halinde, nadiren salgın ile ortaya çıkabilen, hayatı tehdit edici ve tanı yetersizliği nedeni ile sıklıkla tanımlanamayan bir infeksiyondur.

KAYNAKLAR

1. Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova, *Ann Intern Med* 1979;90(4):656-8. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-90-4-656>
2. Collins MT, Bangsberg J, Hoiby N. Antigenic heterogeneity among *Legionella*, *Fluoribacter* and *Tatlockia* species analyzed by crossed immunoelectrophoresis, *Inc J Syst* 1987;37(4):351-6.
3. Colville A, Crowley J, Dearden D, Slack RC, Lee JV. Outbreak of legionnaires' disease at a university hospital, Nottingham, *Epidemiology, Microbiology and Control, Epidemiol Infect* 1993;110(1): 105-16. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268800050731>
4. Fliermans CB, Harvey RS. Effectiveness of 1-bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin against *Legionella pneumophila* in a cooling tower, *Appl Environ Microbiol* 1984;47(6):1307-10.
5. Fraser DW, Tsai T, Orenstein W et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia, *N Engl J Med* 1977;297(22):1189-97. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197712012972201>
6. Fry NK, Warwick S, Saunders NA, Embley TM. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae, *J Gen Microbiol* 1991;137(5):1215-22. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-137-5-1215>
7. Jantzen E, Sonesson A, Tangen T, Eng J. Hydroxyfatty acid profiles of *Legionella* species: diagnostic usefulness assessed by principal component analysis, *J Clin Microbiol* 1993;31(6):1413-9.
8. Liu Z, Stout JE, Tedesco L et al. Controlled evaluation of copper/silver ionization in eradication of *Legionella* from a hospital water distribution system, *J Infect Dis* 1994;169(4):919-22. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/169.4.919>
9. Liu Z, Stout JE, Tedesco L et al. Ultraviolet light irradiation of potable water for *Legionella* colonization in hospital water distribution system, *ASHRAE Transactions* 1994;100:375.
10. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR,

- Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease, *N Engl J Med* 1977;297(22):1197-203.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197712012972202>
11. Osterholm MT, Chin TD, Osborne DO et al. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant, *Am J Epidemiol* 1983;117(1): 60-7.
 12. Ögünç G, Özdemir T, Vural T, Süleymanlar G, Akaydın M, Karpuzoğlu T. Böbrek transplantasyonu sonrası gelişen lejyoner hastalığı, *Mikrobiyol Bült* 1993;27(2):137-42.
 13. Reinthaler FF, Sattler J, Schaffler- Dulling K, Weinmayer B, Marth E. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of Legionella pneumophila from tap water in hospital, *J Clin Microbiol* 1993;31(5):1213-6.
 14. Terranova W, Cohen ML, Fraser DW. 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features, *Lancet* 1978;2(8081):122-4.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)91507-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(78)91507-6)
 15. Thacker SB, Bennett JV, Tsai TF et al. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium, *J Infect Dis* 1978;138(4):512-9.
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/138.4.512>
 16. Vural T, Çolak D, Ögünç D, Ergin Ç, Öngüt G, Tuncer D, Er D. Legionellosis in immunosuppressed patients. In book of abstracts of the 12th meeting of the European Working Group on Legionella Infections, (EWGLI 1997), 34, Lisbon (1997).
 17. Vural T, Ergin Ç, Öngüt G, Demirgiller D, Er D. Isolation of Legionella spp. From portable water samples around Antalya by low-pH treatment and use of selective medium (preliminary research). In proceedings of the 10th meeting of the European Working Group on Legionella Infections (EWGLI 1995), 41-2, İstanbul (1995).
 18. Vural T, Ergin Ç, Öngüt G, Mamikoğlu L, Özçelik FT. Isolation of Legionella pneumophila from hospital humidifiers. In Legionella infections and atypical pneumonias, Proceedings of the 11th meeting of the European Working Group on Legionella Infections, ed. Berdal BP (EWGLI 1996), 73, Oslo (1996).
 19. Vural T, Süleymanlar G, Demircan A, Ergin Ç, Öngüt G, Kargı AB, Günay G. Four patients with Legionnaires' disease: Detected by direct fluorescence antibody and culture methods. In Legionella infections and atypical pneumonias, Proceedings of the 11th meeting of the European Working Group on Legionella Infections, ed. Berdal BP (EWGLI 1996), 123, Oslo (1996).
 20. Vural T, Süleymanlar G, Ergin Ç, Öngüt G. Legionella pneumophila antibodies in haemodialysis patients. In Legionella infections and atypical pneumonias, Proceedings of the 11th meeting of the European Working Group on Legionella Infections, ed. Berdal BP (EWGLI 1996), 121-2, Oslo, (1996).
 21. Vural T, Ögünç D, Özdemir T, Çolak D, Ergin Ç, Öngüt G, Süleymanlar G. Tekrarlayan bir Lejyoner Hastalığı olgusu, XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (özet kitabı, Poster no: 01-11) Antalya (1998).
 22. Yu. VL. Legionella pneumophila (Legionnaires' Disease), "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Disease, 4 th ed." 2087-97, New York, Churchill Livingstone Inc. (1995).