HASTANE SU SİSTEMLERİNDEN ALINAN ÖRNEKLERDEN LEGİONELLA PNEUMOPHİLİA TANISINDA KÜLTÜR VE KONVANSİYONEL PZT' NİN KARŞILAŞTIRILMASI

PROJE KOORDİNATÖRÜ: Dr. Öğretim Üyesi Nevcivan GÜLDAŞ

PROJE GRUBU: Prof. Dr. Zeynep GÜLAY

Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM

Dr. Öğretim Üyesi. Sema Alp ÇAVUŞ

M.Sc. Ayşe Nur SARI

Ekim, 2020

İZMİR

COMPARISON OF CULTURE AND CONVENTIONAL PCR METHODS TO DETECTION LEGIONELLA PNEUMOHILIA IN HOSPITAL WATER SAMPLES

PROJECT COORDINATOR: Asst. Prof. Dr. Nevcivan GÜLDAŞ

PROJECT GROUP: Prof. Dr. Zeynep GÜLAY

Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM

Asst. Prof. Dr. Sema Alp ÇAVUŞ

M.Sc. Ayşe Nur SARI

October, 2020

İZMİR

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

PROJE NO: 2017. KB. SAG. 044

HASTANE SU SİSTEMLERİNDEN ALINAN ÖRNEKLERDEN LEGİONELLA PNEUMOPHİLİA TANISINDA KÜLTÜR VE KONVANSİYONEL PZT' NİN KARŞILAŞTIRILMASI

PROJE KOORDİNATÖRÜ: Dr. Öğretim Üyesi Nevcivan GÜLDAŞ

PROJE GRUBU: Prof. Dr. Zeynep GÜLAY

Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM

Dr. Öğretim Üyesi Sema Alp ÇAVUŞ

M.Sc. Ayşe Nur SARI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TIP FAKÜLTESİ, ARAŞTIRMA LABORATUVARI (ARLAB)

Ekim, 2020

İZMİR

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY

PROJECT NUMBER: 2017. KB. SAG. 044

COMPARISON OF CULTURE AND CONVENTIONAL PCR METHODS TO DETECTION LEGIONELLA PNEUMOHILIA IN HOSPITAL WATER SAMPLES

PROJECT COORDINATOR: Asst. Prof. Dr. Nevcivan GÜLDAŞ

PROJECT GROUP: Prof. Dr. Zeynep GÜLAY

Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM

Asst. Prof. Dr. Sema Alp ÇAVUŞ

M.Sc. Ayşe Nur SARI

Dokuz Eylul University, Medical School

Research Laboratory

October, 2020

İZMİR

ÖZET

Doğal su kaynakları ve insan yapımı su sistemlerinde yaygın olarak bulunan Legionella bakterilerinin hastane su sistemlerinde kolonize olmaları nasokomiyal Legionellosis'in başlıca nedenidir. Hastane su sistemlerinin Legionella açısından izlenmesi nasokomiyal Legionellosis'in önlenmesinde ve kontrolünde ilk yaklaşımdır. Legionella sürveyansı için en çok kullanılan yöntem olan kültür altın standarttır. Ancak uzun enkübasyon periyodu ve zayıf duyarlılığı Legionella salgınına müdahale etmede gecikmelere neden olmaktadır. Son yıllarda Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) çevresel örneklerin taranmasında tamamlayıcı bir yöntem olarak bildirilmekte ve PZT'nın kültürdeki kısıtlılıkların üstesinden gelebildiği belirtilmektedir. Bu projede hastanemiz su sistemlerindeki Legionella kontaminasyonunun prevalansını kültür ve konvansiyonel PZT ile araştırarak her iki yöntemin duyarlılıklarını karşılaştırmayı amaçlandı.

Legionella pneumophilia pozitif su örnekleri ve kültür plakları optimizasyon çalışmaları için kullanıldı. Kolonilerden yapılan DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen DNA' lar PZT de pozitif kontrol olarak yer aldı. Sulardan DNA izolasyonu için filtrasyon sonrası kit ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. 16S rRNA ve mip gen bölgesi için PZT gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmaları sonucunda oluşturduğumuz protokol ile *Legionella pneumophilia* pozitif su örneklerinde 16S rRNA gen bölgesini saptayabildik ancak mip gen bölgesini gözlemleyemedik. Hastanemizin farklı bölgelerinden alınan 52 su örneğinde Legionella izlemi için kültür ve PZT' ni eş zamanlı olarak gerçekleştirdik. Örneklerin tümünde kültürde üreme saptanmaz iken PZT'de her iki gen bölgesi gözlenmedi.

Nasokomiyal Legionellosisin önlenmesi için hastane su sistemlerinin düzenli aralıklarla izlenmesi önem taşımaktadır. Hastanemiz su örneklerinde gerek kültür, gerekse PZT ile Legionella saptanmaması bu konuda yapılan çalışmaların etkinliğini göstermektedir. Su örneklerinde Legionella'nın taranmasında 16S rRNA temelli PZT, kültür ile birlikte kullanılabilir. Kültür sonucu oluşan kolonilerden DNA izolasyonu, PZT ve DNA dizi analizi ile virulan Legionella türleri belirlenebilir. PZT'nin konvansiyonel kültürün yerini almadan önce duyarlılık ve özgüllüğü hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır.

ABSTRACT

The main reason for nasocomial Legionellosis is the colonization of Legionella bacteria, which are common in natural water resources and man-made water systems, in hospital water systems. Monitoring hospital water systems in terms of Legionella is the first approach in the prevention and control of nasocomial Legionellosis. Culture, the most widely used method for Legionella surveillance, is the gold standard. However, the long incubation period and poor sensitivity causes delays in intervening in the Legionella outbreak. In recent years, Polymerase Chain Reaction (PCR) has been reported as a complementary method in screening environmental samples and it is stated that PCR can overcome the limitations in culture. In this project, it was aimed to investigate the prevalence of Legionella contamination in the water systems of our hospital with culture and conventional PCR and to compare the sensitivity of both methods.

Legionella pneumophilia positive water samples and culture plates were used for optimization studies. DNAs obtained as a result of DNA extraction from colonies took place as positive control in PCR. For DNA isolation from water, DNA extraction was performed with the kit after filtration. PCR was performed for the 16S rRNA and the mip gene region. With the protocol we created as a result of optimization studies, we were able to detect the 16S rRNA gene region in Legionella pneumophilia positive water samples, but we could not observe the mip gene region. We performed culture and PCR simultaneously for Legionella monitoring in 52 water samples taken from different parts of our hospital. While no reproduction was detected in culture in all samples, both gene regions were not observed in PCR.

In order to prevent nasocomial legionellosis, regular monitoring of hospital water systems is important.The fact that Legionella was not detected in the water samples of our hospital with either culture or PCR demonstrates the effectiveness of the studies conducted on this subject. 16S rRNA-based PCR can be used with culture to screen Legionella in water samples. Virulent Legionella species can be determined by DNA isolation, PCR and DNA sequence analysis from colonies formed as a result of culture. More information is needed about the sensitivity and specificity of PCR before replacing conventional culture.

İÇİNDEKİLER

1. AMAÇ ve KAPSAM...……1

2. MATERYAL VE YÖNTEM……..…….4

2.1.1. Birinci Çalışma……...….4
2.1.2. İkinci Çalışma……..6
2.1.3. Üçüncü Çalışma…….….6
2.1.4. Dördüncü Çalışma……...7
2.1.5. Beşinci Çalışma……...9
2.1.6. Altıncı Çalışma……....9
2.1.7. Yedinci Çalışma……....10
2.1.8. Sekizinci Çalışma……..…11
2.1.9. Dokuzuncu Çalışma…….….11
2.1.10. Onuncu Çalışma……11
2.1.11. On Birinci Çalışma……...11
2.1.12. On İkinci Çalışma……..11
2.1.13. On Üçüncü Çalışma……...12
2.1.14. On Dördüncü Çalışma……..….12
2.1.15. On Beşinci Çalışma……...12
3. ANALİZ VE BULGULAR……...14
3.1. Birinci Çalışma……..14
3.2. İkinci Çalışma……...….14
3.3. Üçüncü Çalışma…….15
3.4. Dördüncü Çalışma…….…16
3.5. Beşinci Çalışma……16
3.6. Altıncı Çalışma……..16
3.7. Yedinci Çalışma……17
3.8. Sekizinci Çalışma……..17
3.9. Dokuzuncu Çalışma……...18
3.10. Onuncu Çalışma……....18
3.11. On Birinci Çalışma……...….18
3.12. On İkinci Çalışma……..19
3.13. On Üçüncü Çalışma……...19
3.14. On Dördüncü Çalışma……...20

3.15. On Beşinci Çalışma……..…….20
4. SONUÇ VE ÖNERİLER……..……23
5. KAYNAKLAR……...……..27

1. AMAÇ ve KAPSAM

Legionella türleri doğal su kaynakları ve insan yapımı su sistemlerinde yaygın olarak bulunan aerobik, gram negatif basillerdir (24). Legionella cinsi içinde 58 tür ve 70 farklı serogrup yer almaktadır. Tüm türler potansiyel patojen olmakla birlikte bunların içinde en bilineni *Legionella pneumophilia*'dır ve vakaların % 90'ından sorumludur. Bunu Legionella micdadei ve Legionella longbeachae izlemektedir. L. *pneumophilia* içinde yer alan 15 serogrubun hepsi hastalık ile ilişkili olmakla birlikte *L. pneumophilia* serogrup 1 (*L. pneumophilia* sg 1) en virulan olanıdır ve vakaların % 82 sinde görülmektedir (5, 21).

Legionella bakterileri doğal su kaynaklarında bulunmakla birlikte optimal üreme koşullarını mühendislik ürünü su sistemlerinde (soğutma kuleleri, sıcak ve soğuk su sistemleri, su tankları, dekoratif havuzlar, jakuziler, termal banyolar, kaplıcalar, duş başlıkları, sıcak su muslukları, hastanelerde bulunan solunum terapi ekipmanları) bulmaktadırlar. Bu sistemlerde birçok faktör (eski tesisat, düşük akım hızı veya suyun durağan olması, suyun kimyasal bileşimi, ısısı, biofilm oluşumu, diğer mikroorganizmaların varlığı) Legionella proliferasyonunu desteklemektedir (11,21).

L. pneumophilia 50 °C ye saatlerce dayanabilmekte ve 20°C nin altında üreyememektedir. İntrasellüler bir parazit olarak amipler, silli protozoalar veya slime oluşturan mantarlar ile yaşamlarını sürdürürler. İnfekte amipler, doğal olarak oluşmuş mikrobiyal toplulukların meydana getirdiği biofilm içinde bulunur(10). Sularda serbest yaşayan amipler Legionella'nın doğal sığınağı ve rezervuarıdır (26).

Legionella türlerinin klorlamaya karşı artmış direnci onların bu su sistemlerine girişine ve farklı su kaynaklarında çoğalmalarına olanak sağlamaktadır (3,24). Bazı çalışmalar suda 2 mg/l klor varlığının serbest yaşayan Legionella türlerini eredike edebildiğini göstermekle birlikte biofilm içinde yaşayan *L.pneumophilia* klora karşı daha dirençli olmaktadır (1,20). Aynı şekilde amip içindeki intracellüler Legionella da klorlamadan pek etkilenmemektedir (3).

Bakteri kontamine sulardan aerosoller ile yayılır ve risk faktörü (sigara içen, 50 yaş üstü, immun sistemi baskılanmış, diabet, kanser, kronik akciğer hastalığı, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği) taşıyan bireylerde enfeksiyona neden olur. Aerosol oluşturan insan yapımı su sistemlerinin artmış kullanımı bu mikroorganizmanın insanlarla karşılaşma riskini artırmaktadır (5,6). İnsandan insana bulaş bildirilmemiştir (26).

Birçok vakada Legionner hastalığı *L. pneumophilia* sg 1 tarafından oluşturulur ve şiddetli pnömoni ile seyreder. Hastalığın daha hafif formu olan Pontiac ateşi ise non- pneumophilia Legionella türleri ile ortaya çıkar. Pnömoni ile seyreden Legionner hastalığında mortalite %10 civarında olup, bu oran nazokomiyal enfeksiyonlarda ve immun sistemi baskılanmış hastalarda % 25 den fazla olmaktadır (5). Toplum ve hastane kaynaklı pnömonilerde önemli bir etken olan Legionella, hastane kaynaklı pnömonilerin % 40 ında görülmektedir (26).

Birçok su sisteminde yer alan Legionella bakterilerinin hastane su sistemlerinde kolonize olmaları şaşırtıcı değildir ve özellikle sıcak su dağıtım sistemleri ve soğutma kulelerinde Legionella varlığı giderek artan önemli bir problemdir. En bilinen geçiş yolu ise inhalasyon ve kontamine aerosellerdir. Ayrıca kontamine suyun kullanıldığı nebulizatörler ve duş başlıkları da bulaşda önem taşımaktadırlar (12).

Nasokomiyal Legionner hastalığı, hastane su sistemlerinde Legionella varlığı ile bağlantılıdır. Yapılan çalışmalar hastanelerin %12-70 inin sıcak su sistemlerinde Legionella kolonizasyonu göstermektedir (10).

Hastane kaynaklı Legionellosis insidansı klinik farkındalığın olmaması, yanlış tanı, özellikle çok hasta veya immun sistemi baskılanmış hastalardaki non-klasik seyri, solunum sistemi dışındaki enfeksiyonlar (yumuşak doku enfeksiyonları, endokardit), gecikmiş serokonversiyon, tanı laboratuvarlarında özel kültür imkanlarının ve üriner antijen testinin olmaması gibi nedenlerle eksik değerlendirilmektedir(21).

İmmun sistemi baskılanmış bireylerde *L. pneumophilia* sg 1dışındaki serogruplarla enfeksiyon oranı % 20 nin üzerindedir. Bu klinikte önem taşımaktadır zira tanıda en çok kullanılan testlerden biri olan Legionella üriner antijen testi sadece *L. pneumophilia* sg 1'e spesifiktir. Bu nedenle de hastane kaynaklı Legionella enfeksiyonunda diğer serogruplardan ziyade *L. pneumophilia* sg 1 bildirilmektedir (18,21,23).

Nasokomiyal Legionellosis'in önlenmesinde ve kontrolünde ilk yaklaşım hastane su sistemlerinin izlenmesidir. Legionella sürveyansı için bakteriyi hızlı ve duyarlı bir şekilde saptayan metodlar önem taşımaktadır. Hastane su sistemlerinde Legionella surveyansı için en çok kullanılan yöntem kültürdür (2).

Hastane su sistemlerinin Legionella açısından test edilmesi hem primer hem de sekonder koruma programlarının bir parçasıdır. Primer koruma herhangi bir hastane kaynaklı Legionellosis vakası olmadan çevresel örneklerin test edilmesini ifade eder. Sekonder

koruma ise nasokomiyal legionellosis vakası görülmesini takiben başka vakaların çıkmasını önlemek amacıyla birtakım önlemlerin alınması anlamına gelir(21).

Legionella izolasyonu için kültür altın standart olmakla birlikte bakterinin zor üremesi, uzun enkübasyon periyodu, canlı fakat kültüre edilemeyen bakterilerin varlığı, özellikle çevresel örneklerde diğer bakterilerin yoğun olarak üremesi gibi bir takım kısıtlamaları vardır (2,12,19). Bu nedenle Legionella türlerinin saptanmasında, özellikle *L. pneumophilia* ile non- *L. pneumophilia* türleri arasında ayrım yapabilen effektif bir yöntemin saptanması oldukça önemlidir. Sulardaki Legionella türlerini belirlenmesinde çeşitli moleküler teknikler bildirilmiştir. Bunlar *L. pneumophilia* PAL antijen ve 5S rRNA, 23 S-5S spacer bölge, 16S rRNA ve macrophage infectivity potantiator (mip) gen bölgesini hedef alan PCR dır (19).

Bugün için Legionella cinsinin moleküler tanısı 16S rRNA geninin saptanmasına dayanırken, mip geninin saptanması Legionella pneumophilia tanısını sağlamaktadır. PCR, hastane su sistemlerinin Legionella açısından incelenmesinde, serbest yaşayan amiplerle birlikte olan Legionella türlerinin saptanmasındaki zorlukları aşarak kültüre üstün olma yolunda ilerlemektedir. Bununla birlikte moleküler tekniklerin spesifitesi ve sensivitesi ile ilgili olarak daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır.

Bu projede hastanemiz su sistemlerindeki Legionella kontaminasyonunun prevalansını kültür ve konvansiyonel PZT ile araştırarak her iki yöntemin duyarlılıklarını karşılaştırmayı amaçladık.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. DNA ekstraksiyonu ve PZT Optimizasyonu : Optimizasyon için gerekli olan *Legionella pneumophilia* pozitif su örnekleri ve kültür plakları Halk Sağlığı Legionella Laboratuarından temin edildi.

2.1.1.Birinci Çalışma

DNA ekstraksiyonu

a. *L.pneumophilia* üremiş kültür plaklarından (A, B ve C plakları) klasik kaynatma yöntemi ile DNA elde edildi. 300 µl steril distile suya alınan koloniler, 100 °C' de kaynatılıp,10000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı.

b. *L.pneumophilia* pozitif olduğu bilinen 4 farklı su örneğinden 'Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit' ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bunun için önce 50 ml su örneği steril ependorfa alındı. 2700 g' de 30 dk santrifüj edildi. Sediment 1.5 ml' lik ependorflara aktarıldı ve 140000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Ardından sediment 100 µl süpernatant ile resüspanse edilip 140000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan pelletten kitin belirttiği prosedüre uygun şekilde (Gram-Negative Bacteria Genomic DNA Purification Protocol) DNA ekstraksiyonu yapıldı.

16S rRNA ve mip gen PZT

14 nolu sudan izole edilen DNA, pozitif kontrol olarak *L.pneumophilia* üremiş kültür plağındaki (A plağı) koloniden elde edilmiş DNA ve negatif kontrol olarak steril distile su ile 16S rRNA ve mip gen bölgesi için PZT gerçekleştirildi.

Her iki gen bölgesi için de PZT master mix karışımı final hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı:

10X PZT Buffer: 5 µl

$MgCl_2$: 4 µl

dNTP: 5 µl

Forward primer: 1 µl (25 pmol)

Reverse primer: 1 µl (25 pmol)

Taq DNA polimeraz : 0.5 µl

DNA : 5 µl

Steril distile su : 28.5 µl

16S rRNA için PZT Koşulları:

	Isı (°C)	Zaman (dk)	Çevrim
Ön-denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	30
Bağlanma	56	1	
Uzama	72	1.5	
Son uzama	72	10	1

Ürün Büyüklüğü: 386 bp

TmF: 58.19

TmR: 61.36

Forward primer JFP (5- AGGGTTGATAGGTTAAGAGC)

Reverse primer JRP (5-CCAACAGCTAGTTGACATCG)

mip gen bölgesi için PZT Koşulları:

	Isı (°C)	Zaman (dk)	Çevrim
Ön-denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	30
Bağlanma	58	1	
Uzama	72	1.5	
Son uzama	72	10	1

Ürün Büyüklüğü : 186 bp

TmF: 60.19

TmR: 62.46

Forward primer Lp-mip-PT69 (5'-GCA TTG GTG CCG ATT TGG)

Reverse primer Lp-mip-PT70 (5'G[CT]TTTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA)

Jel Elektroforezi :

PZT ürünleri 0.5 µg/mL nükleik asit boyası (SafeView™, abm) içeren %2 lik agaroz jele yüklendi. 100 bp DNA marker ile beraber 120 V'da 40 dakika boyunca yürütüldü. Yürütme sonrası bilgisayarlı görüntüleme yapıldı (Resim 1).

2.1.2.İkinci Çalışma

L.pneumophilia pozitif olduğu bilinen 4 farklı su örneğinden (örnek no 14,15,19,20) yeni bir PZT çalışması yapıldı.

DNA ekstraksiyonu:

1. çalışma ile aynı DNA ekstraksiyonu uygulandı.

16S rRNA ve mip gen PZT:

PZT döngülerinde bir değişiklik yapılmadan, 1. çalışmadaki PZT karışımındaki primer miktarları 1µl' den 1.5 µl' ye çıkarıldı (yine 25 pmol' lük konsantrasyonlar üzerinden). Bu şekildeki PZT karışımına hem 5 µl DNA, hem de 7.5 µl DNA eklenerek 16S rRNA ve mip gen bölgesi PZT çalışıldı. Pozitif kontrol olarak bir önceki çalışmada pozitiflik veren koloni DNA'sı kullanıldı (A plağı).

10X PZT Buffer: 5 µl

$MgCl_2$: 4 µl

dNTP: 5 µl

Forward primer: 1,5 µl (25 pmol)

Reverse primer: 1,5 µl (25 pmol)

Taq DNA polimeraz : 0.5 µl

DNA : 5 µl / 7.5 µl

Steril distile su : 27.5 µl / 25 µl

Aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 2).

2.1.3. Üçüncü Çalışma

Yeni Yöntem ile Sudan DNA İzolasyonu: *L.pneumophilia* pozitif olduğu bilinen, koloni miktarları ve serogrupları belirlenmiş olan 2 farklı su örneğinden (örnek no 64 ; L.pneumophilia SG 2-15, 1 CFU /ml ve örnek no 65; L.pneumophilia SG 1, 105 CFU/ml) yeni yöntem ile DNA izole edildi. Sulardan 700 ml' lik örnek 0.22 µm çaplı selüloz ester filtrelerden Sartorius vakum filtrasyon cihazı ile filtre edildi. Her bir su örneğine ait filtre kâğıdı aseptik koşullarda bistüri ile küçük parçalara bölündü ve 20

ml orijinal su içeren falkonlara konuldu. Bu falkonlar filtre kağıdına tutunan bakteri hücrelerinin suya karışması için 50 KHz' de 10 dk sonikasyona tabi tutuldu ve hemen ardından 20 dk çalkalama işlemi uygulandı. Sonrasında yine aseptik koşullarda filtre kağıtları sudan uzaklaştırıldı ve örnekler 2000 g' de 20 dk santrifüj edildi. Oluşan pelletten ticari kit ile kitin belirttiği prosedüre uygun şekilde (Gram-Negative Bacteria Genomic DNA Purification Protocol) DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Ayrıca aynı su örneklerinin besiyerlerinde üremiş olan *L.pneumophilia* kolonilerinden de 1.çalışmadaki prosedür ile DNA elde edildi.

16S rRNA ve mip gen PZT: PZT döngülerinde bir değişiklik yapılmadan, aşağıdaki karışım ile PZT çalışıldı. Pozitif kontrol olarak daha önceki çalışmada pozitiflik veren koloni DNA'sı kullanıldı (A plağı).

10X PZT Buffer: 5 µl

$MgCl_2$: 4 µl

dNTP: 5 µl

Forward primer: 1,5 µl (25 pmol)

Reverse primer: 1,5 µl (25 pmol)

Taq DNA polimeraz : 0.5 µl

DNA : 5 µl

Steril distile su : 27.5 µl

Aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 3).

2.1.4. Dördüncü Çalışma

PZT yürütme koşulları değiştirilerek reaksiyon duyarlılığı arttırılabilir mi düşüncesi ile yeni PZT koşulları denendi (touch-down PZT). Bunun için bir önceki çalışmada DNA' ları elde edilen 64 ve 67 nolu su örnekleri ile aynı izolasyon yöntemi ile DNA' sı elde edilen yeni alınan bir su örneği kullanıldı.

PZT karışımındaki miktarlar bir önceki çalışma ile aynı tutuldu. PZT yürütme koşulları ise aşağıdaki gibi düzenlendi. Aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 4).

16S rRNA için PZT Koşulları:

	Isı (°C)	Zaman (dk)	Çevrim
Ön-denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	0.5	10
Bağlanma	56	0.5	
Uzama	72	1	
Denatürasyon	94	0.5	10
Bağlanma	54	0.5	
Uzama	72	1	
Denatürasyon	94	0.5	10
Bağlanma	50	0.5	
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	10	1

mip gen bölgesi için PZT Koşulları :

	Isı (°C)	Zaman (dk)	Çevrim
Ön-denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	0.5	10
Bağlanma	58	0.5	
Uzama	72	1	
Denatürasyon	94	0.5	10
Bağlanma	56	0.5	
Uzama	72	1	
Denatürasyon	94	0.5	10
Bağlanma	52	0.5	
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	10	1

2.1.5. Beşinci Çalışma

Sudan DNA izolasyonunda mı sorun var ya da sudaki hücre miktarı azaldıkça PZT ile yakalamak zorlaşıyor mu sorularının yanıtlarını bulabilmek için steril distile sulara serogrupları bilinen *L.pneumophilia* kolonilerinden karıştırılıp aynı protokollerle DNA izolasyonu ve PZT yapıldı. Buradaki amaç suların seri dilusyonlarını hazırlayıp PZT ile hangi konsantrasyona kadar saptama yapılabildiğini görmekti.

L.pneumophilia üremiş plaklardan ;

1-L.spp üremiş plaktan 25 koloni,

2- *L.pneumophilia* sg1 üremiş olan plaktan öze ile 1 loop,

3- *L.pneumophilia* sg 2-15 üremiş olan plaktan öze ile 1 loop alınarak 50 ml' lik steril distile suya karıştırıldı. Bakterilerin suda homojen çözünmesi için bu sular 40 ºC' lik su banyosunda 10 dk bekletildi.

Ayrıca her üç plaktaki bakteri kolonilerinden de 1. çalışmadaki protokol ile DNA elde edildi. 3.çalışmadaki yöntem ile sulardan DNA izolasyonları yapıldı. Sulardan ve kolonilerden elde edilen DNA örnekleri kullanılarak aynı koşullar ile her iki gen bölgesi, daha önce pozitiflik veren koloni DNA'sı (Plak A) pozitif kontrol olarak kullanılıp PZT yapıldı. Aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 5).

2.1.6. Altıncı Çalışma

16S rRNA gen bölgesi için yeni sipariş edilen primerler ile PZT bağlanma sıcaklığı olarak 54 ve 53 derecenin denendiği bir PZT çalışması yapıldı. (Yeni primerler için TmF= 55 °C, TmR=57 °C)

10X PZT Buffer: 5 µl

$MgCl_2$: 4 µl

dNTP: 5 µl

Forward primer: 1 µl (25 pmol)

Reverse primer: 1 µl (25 pmol)

Taq DNA polimeraz: 0.5 µl

DNA: 5 µl

Steril distile su: 28.5 µl

PZT Koşulları:

	Isı (°C)	Zaman (dk)	Çevrim
Ön-denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	30
Bağlanma	54	1	
Uzama	72	1.5	
Son Uzama	72	10	1

	Isı (°C)	Zaman (dk)	Çevrim
Ön-denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	30
Bağlanma	53	1	
Uzama	72	1.5	
Son Uzama	72	10	1

Bu çalışmada 1. Çalışmada kolonilerden elde edilen DNA'lar ile 5. Çalışmadaki üç örneğin kolonilerinden elde edilen DNA'ları ve suya karıştırıldıktan sonra sulardan elde edilen DNA'ları kullanılarak PZT yapıldı. Aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 6).

2.1.7. Yedinci Çalışma

L.spp, *L.pneumophilia* sg1 ve *L.pneumophilia* sg 2-15 kolonilerinin suda homojenize edilmesi ile oluşturulan örneklerden son hacim 50 ml olacak şekilde 1/10, 1/100 ve 1/1000' lik dilüsyonlar hazırlandı.

Bu dilüsyonlardaki suların her birinden 3. çalışmadaki protokol ile DNA ekstraksiyonu ve PZT yapıldı ve aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi. 1. çalışmada elde edilen, Plak A ve Plak B ye ait DNA örnekleri pozitif kontrol olarak kullanıldı (Resim 7).

2.1.8. Sekizinci Çalışma

L.spp, *L.pneumophilia* sg1 ve *L.pneumophilia* sg 2-15 kolonilerinin belirli miktarlarının suda homojenize edilmesi ile oluşan örneklerden son hacim 50 ml olacak şekilde hazırlanan 10^{-4}, 10^{-5} ve 10^{-6} lık dilüsyonlardan 3. çalışmadaki protokol ile DNA ekstraksiyonu ve PZT yapıldı ve 1. çalışmada elde edilen, Plak B ve Plak C ye ait DNA örnekleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 8).

2.1.9. Dokuzuncu Çalışma

L.spp, *L.pneumophilia* sg1 ve *L.pneumophilia* sg 2-15 kolonilerinin belirli miktarlarının suda homojenize edilmesi ile oluşan örneklerden son hacim 50 ml olacak şekilde hazırlanan 10^{-7}, 10^{-8} ve 10^{-9} dilüsyonlardan 3. çalışmadaki protokol ile DNA ekstraksiyonu ve PZT yapıldı. 1. çalışmada elde edilen, Plak B ve Plak C ye ait DNA örnekleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 9).

2.1.10. Onuncu Çalışma

Sulardan DNA izolasyonunda daha iyi izolasyon yapılabilir mi düşüncesi ile *L. pneumophilia* pozitif olduğu bilinen 3 su örneğinden, 3. çalışmadaki protokol ve aynı kit ile fakat ön aşama olarak su örnekleri birebir oranda HCl-KCl (pH:2.2) ile muamele edilip DNA izolasyonu yapıldı ve PZT çalışıldı (16).

2.1.11. On Birinci Çalışma

Kültüründe *L.pneumophilia üreyen* 3 yeni su örneğinden (örnek1,2,3) 3. çalışmadaki protokol ile DNA ekstraksiyonu ve PZT yapıldı. 1. çalışmada elde edilen, Plak B ve Plak C ye ait DNA örnekleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 9).

2.1.12. On İkinci Çalışma

11.çalışmada 16S rRNA bölgeleri saptanan 3 su örneğinin 1/10, 1/100,1/1000 dilusyonları yapıldı ve bu örneklerle 3.çalışmadaki protokol ile DNA ekstraksiyonu ve PZT yapılarak aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 10).

2.1.13. On Üçüncü Çalışma

DNA ekstraksiyonunda daha fazla DNA elde edilebilir mi diye düşünülürek e kstraksiyonun RNAse aşamasında su banyosu sıcaklığı artırılarak 11. çalışmadaki su örneklerinden ekstraksiyon yapıldı (14). Ekstraksiyonun ardından 3.çalışmadaki protokol ile PZT gerçekleştirildi ve aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi (Resim 10).

2.1.14.On Dördüncü Çalışma

PZT çalışmalarında su örneklerinden mip gen bölgesinin hiç yakalanamaması sonucunda, daha yoğun DNA eldesi için Chomczynski ve ark. (7) tarafından bildirilen guanidin-tiyosiyanat-fenol-kloroform yöntemi ile DNA ekstraksiyonu esasına dayanan bir ticari solüsyon kullanılarak, 11. çalışmadaki su örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Ardından 3.çalışmadaki protokol ile PZT gerçekleştirildi ve aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi.

2.1.15. On Beşinci Çalışma

Hastanemizin farklı bölgelerinden, 500 ml lik steril, ağzı kapaklı, plastik kaplara 52 farklı su örneği alındı ve hemen laboratuvara ulaştırıldı. Su örneklerinin alındığı yerler Tablo 1 de gösterilmektedir.

DNA ekstraksiyonu ve PZT : Örnekler laboratuvara geldiği anda bekletilmeden kültür ile eş zamanlı olarak 3. çalışmadaki protokol ile DNA ekstraksiyonu yapıldı, 16S rRNA ve mip gen bölgeleri PZT ile çalışıldı ve aynı agaroz jel elektroforezi protokolü ile PZT ürünleri görüntülendi.

Kültür için su örneklerinin alındığı yere göre işlem gerçekleştirildi.

I. Su tanklarından (soğuk ve sıcak) alınan örnekler için:

a. Direkt Ekim: Su şişesi çalkalandıktan sonra BCYE (buffered charcoal yeast extract) ve DGVP(dye-glycine-vancomycine-polymixine B) besiyerlerine 0.1 ml konuldu ve L öze ile yayıldı.

b. Filtre edilip asit ile muamele sonrası ekim: Su örneğinin 50 ml si 0.22 μm çaplı selüloz ester filtrelerden Sartorius vakum filtrasyon cihazı ile filtre edildikten sonra filtre 5 ml steril su içeren tüpe alındı ve 30 sn vortekslendi. Daha sonra bu tüpten

alınan 2 ml örnek, 2 ml HCl-KCl (pH: 2.2) asit çözeltisi içeren tüpe aktarıldı ve tüp 3 dk vortekslendi. Tüpten 0.1 ml örnek alınıp BCYE ve DGVP besiyerlerine L öze ile ekim yapıldı.

II. Soğutma kulesinden alınan su örnekleri için:

a. Direkt Ekim: Su şişesi çalkalandıktan sonra BCYE ve DGVP besiyerlerine 0.1 ml konuldu ve L öze ile yayıldı.
b. Asit ile muamele sonrası ekim : 2 ml su örneği, 2 ml HCl-KCl (pH: 2.2) asit çözeltisi içeren tüpeailave edildi, tüp 3 dk vortekslendi. Tüpten 0.1 ml örnek BCYE ve DGVP besiyerlerine konuldu ve L öze ile yayıldı.

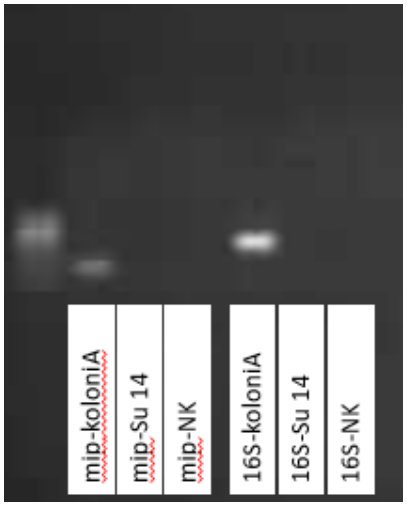
III. Musluk ve duşlardan şişeye doldurularak alınan örnekler için :

a. Filtrasyon sonrası asit ile muamele ardından ekim: Su örneğinden 50 ml, 0.22 μm çaplı selüloz ester filtrelerden Sartorius vakum filtrasyon cihazı ile filtre edildi. Daha sonra filtre 5 ml steril su içeren tüpe alındı ve 30 sn vortekslendi. Bu tüpten alınan 2 ml örnek, 2 ml HCl-KCl (pH: 2.2) asit çözeltisi içeren tüpe aktarıldı ve tüp 3 dk vortekslendi. Tüpten 0.1 ml örnek alınıp BCYE ve DGVP besiyerlerine L öze ile ekim yapıldı.

   Ekilen plaklar oda ısısında yüzeyleri kuruyuncaya kadar bekletildikten sonra etüve kaldırıldı ve 36.5 °C de, nemli ortamda 5 gün enkübe edildi.

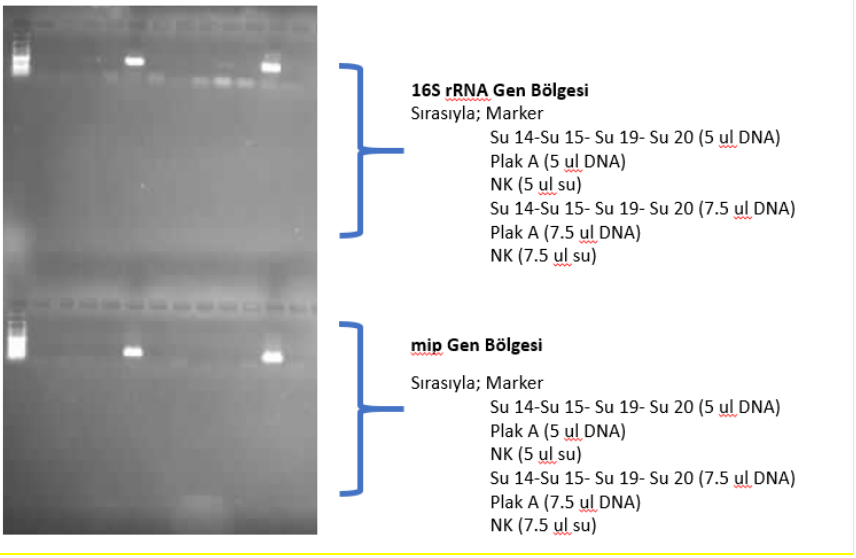
3. ANALİZ VE BULGULAR:

3.1. Birinci Çalışma: Koloniden elde edilen DNA ile çalışılan PZT ürünlerinde 16S rRNA ve mip gen bölgeleri beklenen bant büyüklüğünde gözlendi. Sudan izole edildiği düşünülen DNA ile çalışılan PZT ürünlerinde her iki gen bölgesine ait bantlar gözlenmedi.



Resim 1: Birinci çalışmaya ait jel görüntüsü

3.2. İkinci Çalışma : Kültür plağından elde edilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan DNA örneğinde her iki gen bölgesi, her iki PZT çalışmasında da gözlendi. Sulardan elde edildiği düşünülen DNA'ların üçünde hiçbir gen bölgesi gözlenmemekle birlikte sadece 19 numaralı su örneğinin 16S rRNA PZT sinde beklenen büyüklükte silik bir bant görüldü (7.5 µl'lik DNA'nın kullanıldığı reaksiyondaki bant daha belirgindi).

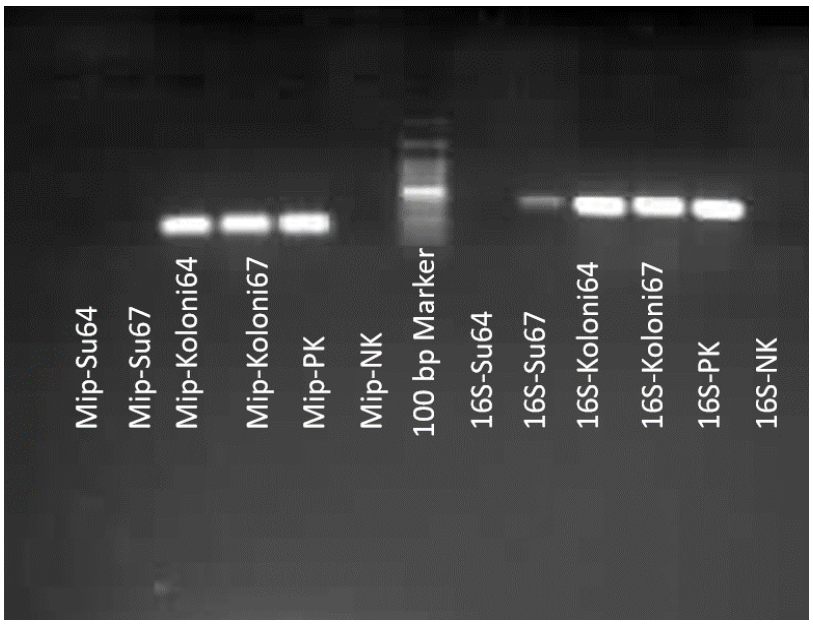


Resim 2: İkinci çalışmaya ait jel görüntüsü

Problemin DNA izolasyonu kaynaklı olabileceği düşünüldü. Sudan DNA izolasyonu aşamasında daha farklı bir yöntem ya da kitten önce bir ön işlem olabilir mi düşüncesi ile literatür gözden geçirildi.

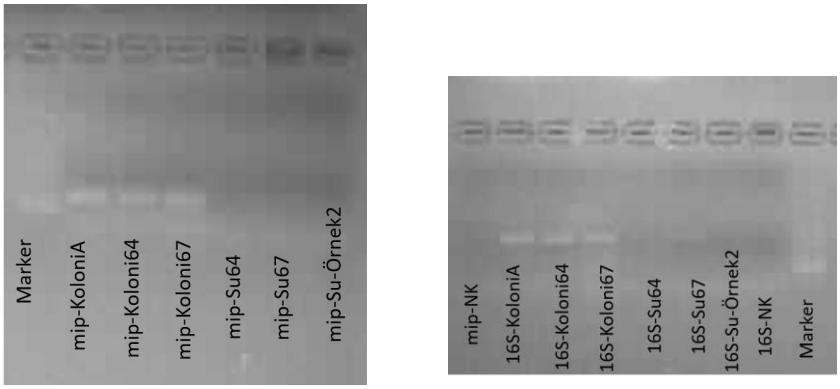
3.3. Üçüncü Çalışma:

64 numaralı su örneğinden elde edilen DNA örneğinde her iki gen bölgesi de gözlenmedi. 67 numaralı su örneğinden elde edilen DNA' da ise 16S rRNA gen bölgesi saptanırken, mip gen bölgesi gözlenmedi.



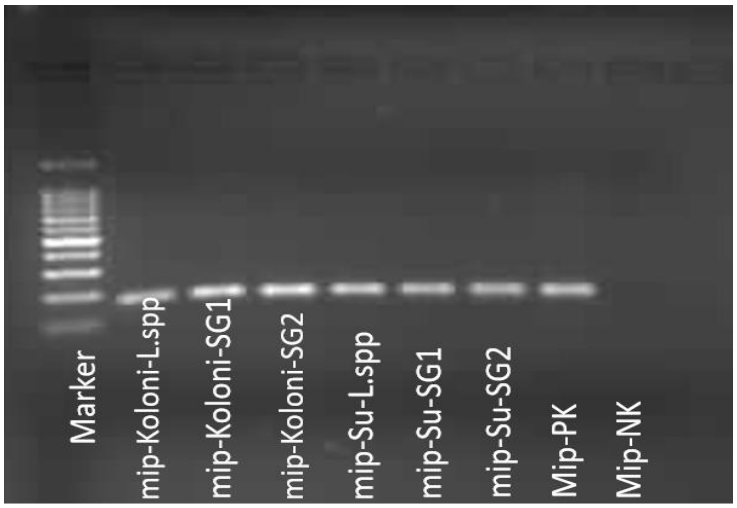
Resim 3: Üçüncü çalışmaya ait jel görüntüsü

3.4. Dördüncü Çalışma: Yeni PZT koşullarında da koloni DNA' larından her iki bölge, 67 nolu su örneğinden ise sadece 16S rRNA bölgesi gösterilebildi. Daha önceki protokol ile bir fark olmadığı saptandı.



Resim 4: Dördüncü çalışmaya ait jel görüntüleri

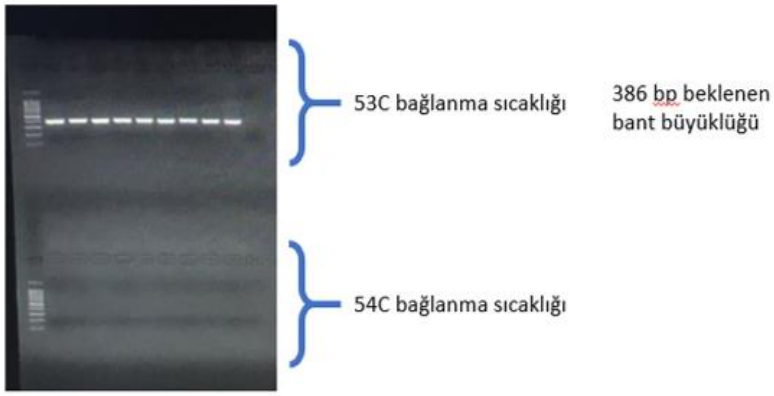
3.5. Beşinci Çalışma : Bu çalışmada mip gen bölgesine ait bantlar jel elektroforezinde gözlenirken, 16S rRNA gen bölgesine ait primerlerin çalışmadığı saptandı ve yeni primer siparişi verildi.



Resim 5: Beşinci çalışmaya ait mip gen bölgesinin çalışıldığı ürünlerin jel görüntüsü

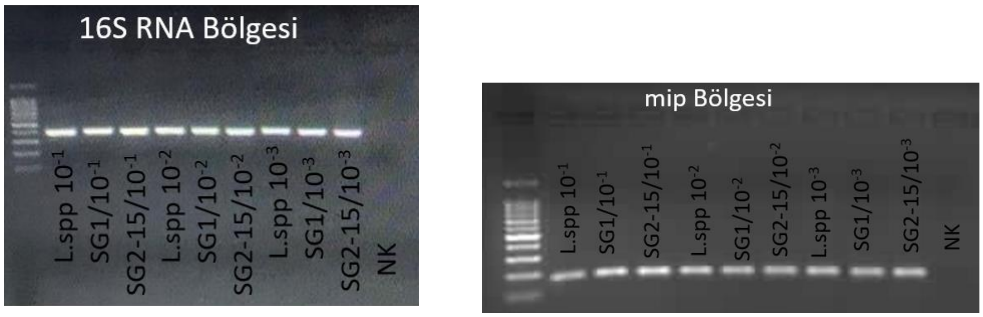
3.6. Altıncı Çalışma: Bu çalışmada bağlanma sıcaklığı 53 ºC olan PZT' de 16S rRNA gen bölgesi beklenen bant büyüklüğünde (386 bp) gözlendi.

• Belirtilen koşullar ile aşağıdaki sıraya uygun olarak örnekler çalışıldı;
PlakA-PlakB-PlakC-PlakLspp-PlakSG1-PlakSG2-SuLspp-SuSG1-SuSG2-NK



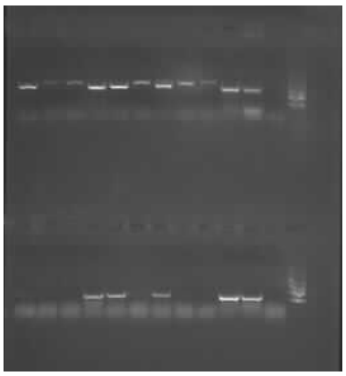
Resim 6: Beşinci çalışmaya ait örneklerde iki farklı bağlanma sıcaklığı ile 16S RNA bölgesinin çalışıldığı ürünlerin jel görüntüsü

3.7. Yedinci Çalışma: L.spp, *L.pneumophilia* sg1 ve *L.pneumophilia* sg 2-15 kolonilerinin suda homojenize edilmesi ile oluşturulan örneklerin 1/10, 1/100 ve 1/1000' lik dilüsyonlarında PZT sonucunda agaroz jel elektroforezinde her iki gen bölgesine ait bantlar gözlendi.



Resim 7: Yedinci çalışmaya ait jel görüntüleri

3.8. Sekizinci Çalışma: L.spp, *L.pneumophilia* sg1 ve *L.pneumophilia* sg 2-15 kolonilerinin suda homojenize edilmesi ile oluşturulan örneklerin 10^{-4}, 10^{-5} ve 10^{-6} lık dilüsyonlarında PZT sonucunda agaroz jel elektroforezinde 16S rRNA tüm örneklerin bu üç dilusyonunda ve pozitif kontrollerde saptandı. mip gen bölgesi ise pozitif kontroller dışında *L.pneumophilia* sg1'in 10^{-4} ve 10^{-5} dilusyonlarında, *L.pneumophilia* sg 2-15'in ise 10^{-4} dilusyonunda gözlendi.



Üst sıra 16S RNA; alt sıra MIP bölgesi olacak şekilde aynı sıra ile

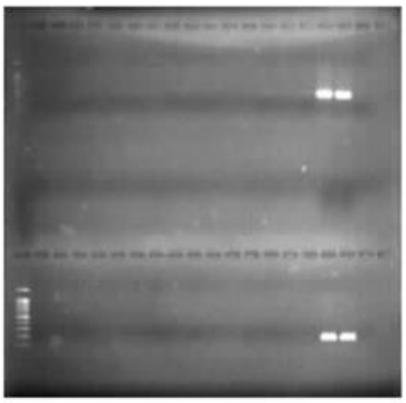
1. L.spp 10^4
2. L.spp 10^5
3. L.spp 10^6
4. SG1 10^4
5. SG1 10^5
6. SG1 10^6
7. SG2 10^4
8. SG2 10^5
9. SG2 10^6
10. Plak B (PK)
11. Plak C (PK)
12. NK
13. Marker

Resim 8: Sekizinci çalışmaya ait jel görüntüleri

3.9. Dokuzuncu Çalışma: L.spp, *L.pneumophilia* sg1 ve *L.pneumophilia* sg 2-15 kolonilerinin suda homojenize edilmesi ile oluşturulan örneklerin 10^{-7}, 10^{-8} ve 10^{-9} dilüsyonlarında PZT sonucunda agaroz jel elektroforezinde 16S rRNA ve mip gen bölgeleri gözlenmedi (Resim 9). Bu seyreltmelerin her iki gen bölgesi için de bant elde edilemeyecek kadar düşük DNA miktarı içeren seyreltmeler olduğu görüldü.

3.10. Onuncu Çalışma: Ön aşamada asit ile muamele edilen 3 su örneğinden yapılan DNA ekstraksiyonu ve PZT sonucunda agaroz jel elektroforezinde tüm örneklerde 16S rRNA ve mip gen bölgeleri gözlenmedi (Resim 9).

3.11. On Birinci Çalışma: Bu çalışmada yeni alınmış üç su örneğinde yapılan PZT sonucunda 16 S rRNA bölgesi saptanırken, mip gen bölgesi gözlenmedi (Resim 9).



Üst sıra JFP; alt sıra MIP bölgesi olacak şekilde aynı sıra ile;

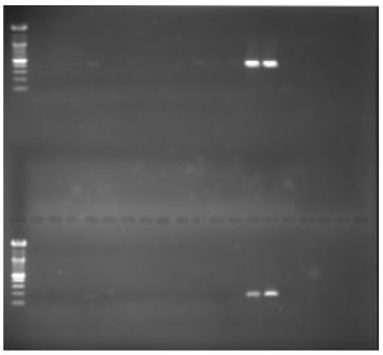
1. Marker
2. L.spp 10^7
3. L.spp 10^8
4. L.spp 10^9
5. SG1 10^7
6. SG1 10^8
7. SG1 10^9
8. SG2 10^7
9. SG2 10^8
10. SG2 10^9
11. Asit ile ön işlem-Örnek72
12. Asit ile ön işlem-Örnek73
13. Asit ile ön işlem-Örnek76
14. Yeni Su örneği/1-4070-9
15. Yeni Su örneği/2-4067-7
16. Yeni Su Örneği/3-4079-10
17. Plak B (PK)
18. Plak C (PK)
19. NK

Pozitif Kontroller dışında buradaki görüntüde çok belli olmamakla beraber silik olarak JFP bölgesinde, son üç suya ait bantlar görülmüştür

Resim 9: 9, 10 ve 11. çalışmalardaki PZT ürünlerine ait jel görüntüsü

3.12. On İkinci Çalışma: Bir numaralı su örneğinin her üç dilusyonunda, 2 numaralı su örneğinin ise sadece 1/10 dilusyonunda 16S rRNA bölgesi saptanrken. 3 numaralı su örneğinin hiçbir dilüsyonunda saptanmadı. Bununla birlikte her üç su örneğinin hiçbir dilüsyonunda mip genine ait bant gözlenmedi (Resim 10).

3.13. On Üçüncü Çalışma: Bu çalışmada ekstraksiyonun RNAse aşamasında su banyosu sıcaklığının artırılmasının bir değişiklik oluşturmadığı gözlendi.11. çalışmada olduğu gibi yine her üç su örneğinde 16S rRNA gen bölgesine ait bantlar gözlenirken, mip genine ait hiçbir bantın gözlenmediği saptandı (Resim 10).



Üst sıra JFP; alt sıra MIP bölgesi olacak şekilde aynı sıra ile;

1. Marker
2. 1-4070 10^1
3. 1-4070 10^2
4. 1-4070 10^3
5. 2-4067 10^1
6. 2-4067 10^2
7. 2-4067 10^3
8. 3-4079 10^1
9. 3-4079 10^2
10. 3-4079 10^3
11. 1-4070 60 derece
12. 2-4067 60 derece
13. 3-4079 60 derece
14. Plak A (PK)
15. Plak B (PK)
16. NK

Resim 10. 12 ve 13. Çalışmalarda elde edilen PZT ürünlerine ait jel görüntüsü

3.14. On Dördüncü Çalışma: Trizol yöntemi ile yapılan DNA izolasyonu sonucu gerçekleştirilen PZT de bir fark görülmedi.

3.15. On Beşinci Çalışma: Hastanemizin farklı bölgelerinden alınan 52 su örneğinin hiçbirinde PZT sonucunda Legionella 16S rRNA ve mip gen bölgeleri gözlenmedi. Bu su örneklerinden yapılan kültürlerde de Legionella üremesi saptanmadı.

Tablo 1: Su örneklerinin alındığı yerler, kültür ve PZT sonuçları

Örnek no	Alındığı Yer	Kültür	16S rRNA PZT	mip gen PZT
1	400 tonluk su deposu (1. Örnek)	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
2	400 tonluk su deposu (2. Örnek)	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
3	200 tonluk su deposu (1.örnek)	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
4	200 tonluk su deposu (2.örnek)	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
5	Soğutma kulesi CHİLLER	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
6	1.Blok ısıtma kazanı sıcak su kollektörü	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
7	Soğutma kulesi	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
8	Yumuşatma tankı 1. örnek	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
9	Yumuşatma tankı 2. örnek	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
10	İlhan Onat onkoloji boyler 1.örnek	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
11	İlhan Onat onkoloji soğuk su 2.örnek	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
12	İlhan Onat soğuk su tankı 1. örnek	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
13	Kum filtresi 1.örnek	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
14	Kum filtresi 2.örnek	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
15	Erişkin onkoloji 1.kat 6115 no'lu hasta odası	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
16	Hematoloji servisi 2.kat 6205 no'lu hasta odası	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
17	Hematoloji servisi 2.kat hemşire odası	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
18	Kemoterapi 5.bina kadın wc	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
19	İlhan Onat boyler 2.örnek	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
20	Onkoloji poliklinik kadın wc	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif

21	Diyaliz musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
22	Kök hücre onkoloji 3.kat 6306 no'lu oda	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
23	2107 Musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
24	3313 duş başlığı	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
25	Koroner yoğun bakım musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
26	Çocuk servisi 3.kat 321 musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
27	GKDYB musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
28	Dahiliye yoğun bakım musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
29	Çocuk kemoterapi ünitesi zemin kat musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
30	Yeni doğan servisi ilaç hazırlama	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
31	Yeni doğan yoğun bakım ilaç hazırlama musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
32	Çocuk yoğun bakım ilaç hazırlama	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
33	3.kat beyin cerrahisi 2321 musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
34	Genel cerrahi servisi ilaç hazırlama	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
35	Radyasyon onkolojisi poliklinik-2B	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
36	Çocuk hastanesi BOYLER kollektör	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
37	Anestezi yoğun bakım ilaç hazırlama musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
38	Çocuk endokrin poliklinik 1.kat	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
39	Dahiliye polikliniği genel dahiliye bilim dalı sekreterliği	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
40	Tıbbi onkoloji poliklinik personel wc	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
41	Çocuk hematoloji servisi duş başlığı 420	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif

42	Nefroloji polikliniği kadın wc	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
43	1506 duş başlığı	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
44	2.kat üroloji servis ilaç hazırlama	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
45	2.kat kalp damar servisi 3210 duş başlığı	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
46	4.kat FTR servis ilaç hazırlık	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
47	Çocuk servisi ilaç hazırlama 3.kat musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
48	Çocuk alerji polikliniği 2.kat musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
49	3516 musluk Nöroloji servisi	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
50	Dahiliye servis 2507 musluk	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
51	Çocuk onkoloji servisi duş başlığı 409	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif
52	Geriatri 2.kat ilaç hazırlama	Üreme saptanmadı.	Negatif	Negatif

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hastane su sistemlerinin Legionella spp ile kontaminasyonu nasokomiyal Legionellosisin en iyi bilinen nedenidir ve kontaminasyon seviyesinin nosokomiyal legionellosis ile paralel olduğu bildirilmektedir. Legionella ile kontamine suların aerosollerinin inhalasyonu infeksiyona neden olur. Bu nedenle su sistemlerinin Legionella kontaminasyonu açısından düzenli olarak takip edilmesi infeksiyon riskini azaltmak açısından önem taşımaktadır (13,19).

Kültür, Legionella saptanmasında halen "gold standart" olarak değerlendirilmektedir. Ancak uzun enkübasyon zamanı, zayıf sensivite, canlı ama kültüre edilemeyen hücrelerin saptanmasında yetersizlik ve rekabet halindeki microbiatanın inhibisyonu gibi bazı kısıtlamaları mevcuttur (9). Bu nedenle son yıllarda çevresel örneklerden Legionella saptanmasında PZT nin kültüre alternatif olacağı düşünülmekte ve bununla ilgili çalışmalar yapılmaktadır. PZT'nin avantajları yanında bazı kısıtlılıkları da vardır. Bunlardan biri de canlı olmayan ve kültürü yapılamayan Legionella bakterilerini de saptamasıdır. Bu nedenle kültüre göre daha duyarlı görünebilmektedir (13, 25). 5S rRNA, 23S-5S spacer region, 16S rRNa ve macrophage infektivity potentiator (mip) gen PZT de hedef alınan bölgelerdir (19,26). Bunlardan cinse spesifik 16S rRNA PZT tüm Legionella türlerini saptar. 16S rRNA geni PZT de hedef gen olarak son derece uygundur ve genomda birçok kopyasının olması PZT ye yüksek sensivite kazandırmaktadır (13). Filogenetik çalışmalar Legionella türlerinin ayrımında mip geninin 16S r RNA ya göre çok daha büyük kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. mip geni bir virulans faktörüdür ve insan yapımı sistemlerde *L.pneumophilia* varlığının genetik göstergesidir. Bu faktör memeli ve protozoa fagositik hücrelerinde intrasellüler öldürülmeye karşı koyar. İnsan yapımı su sistemlerinde *L.pneumophilia* dan başka diğer legionella türleri de bulunabilir, ancak *L.pneumophilia'*nın daha fazla bulunması serbest yaşayan amipler ile arasındaki simbiotik ilişkiye bağlı olabilir. Ayrıca *L.pneumophilia* dışındaki Legionella türleri düşük infektivite ve zayıf intrasellüler üreme hızına sahiptirler (19,26).

Çevresel örneklerden, sudan DNA eldesinde ilk basamakta önerilen filtrasyondur ve filtrasyon için de önerilen 0.2 μm selluloz filtre kağıtlarıdır. Ayrıca maksimum DNA eldesi için su örneklerinin 24 saat içinde filtre edilmesi önem taşımaktadır. Bunlarla birlikte

saklama ve ekstraksiyon metodu da elde edilecek DNA'nın miktarını ve kalitesini etkilemektedir. Filtrasyon sonrası hemen ekstraksiyon yapılamayacaksa filtre kağıtlarının soğukta saklanması önerilmektedir (14). Biz de çalışmamızda su örneklerini hiç bekletmeden filtre ettik ve 0.2 μm selluloz filtre kullandık. Filtrasyon sonrası ise hemen ekstraksiyon yapıldı.

DNA ekstraksiyonu PZT'de kritik bir basamaktır. Optimal bir DNA ekstraksiyon metodu örneğin tipine ve olası PZT inhibitörlerinin varlığına göre dikkatlice seçilmelidir (15). Biz çalışmamızda 'Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit'ile DNA ekstraksiyonu yaptık. Hinlo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Qiagen DNeasy kit ile yüksek miktarda DNA elde ettiklerini belirtmişlerdir (14). Bu kitte RNAse aşamasında su banyosu sıcaklığı bizim kullandığımız kittekinden yüksek olduğu için biz de elimizdeki kit ile ekstraksiyon yaparken RNAse aşamasında su banyosu sıcaklığını artırarak ekstraksiyon yaptık, ancak ekstraksiyon sonrası yaptığımız PZT de bir fark göremedik.

Sularda serbest yaşayan amipler Legionella'lar için doğal rezervuardır (26). Çevresel su örneklerinden Legionella saptanmasında en çok kullanılan standart yöntem olan kültürde, su örnekleri diğer mikroorganizmaların eliminasyonu için asit buffer ile muamele edilir. Legionella'lar asit ortama diğer mikroorganizmalara kıyasla kısa bir süre için daha dirençlidirler. En çok kullanılan asit buffer ise HCl-KCl dir (16). Kültürde uygulanan bu işlem DNA ekstraksiyonunda da işe yarayabilir mi düşüncesi ile ekstraksiyon öncesi su örneklerini HCl-KCl ile muamele ettikten sonra DNA ekstraksiyonu ve ardından PZT çalıştık. Ancak bu işlemin bir fark yaratmadığını gördük.

Ghotaslou ve ark yaptıkları çalışmada hastane su sistemlerinden Legionella araştırılmasında kültür ve PZT nin mükemmel bir korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Yine bu çalışmalarında suyun sıcaklığının önemli bir rol oynadığını özellikle sıcak su örneklerinde Legionella pozitifliğini gördüklerini ifade etmişlerdir. Sıcak su sistemlerinde Legionella pozifliği ile Legionellosis ortaya çıkışı arasında belirgin bir ilişki olduğu birçok çalışmada da gösterilmiştir. Bu nedenle de özellikle hastanenin sıcak su sistemlerinin incelenmesi kritik öneme sahiptir (13).

PZT, kültür ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir negatif prediktif değere sahiptir (%80-100). Örneklerde PZT sonucu yanlış pozitif sonuçlar gereksiz ve maliyeti yüksek acil dekontaminasyon prosedürlerine neden olabilir. Bu nedenle PZT sonuçlarının çok dikkatli

yorumlanması gerekmektedir. Çevresel örneklerden Legionella saptanmasında kültür referans metod olarak kalmalıdır (17).

Asghari ve ark da hastane su sistemlerinde Legionella araştırılmasında PZT'nin etkin olduğunu ve çeşitli faktörlerin Legionella amplifikasyonuna etkili olabildiğini belirtmişlerdir (2). Çevresel su örneklerinde PZT inhibitörlerinin varlığı bilinmektedir ve bu PZT yi kısıtlayan bir faktördür (25). PZT de hedef gen seçimi testin etkinliği ve özgüllüğü için çok önemlidir (2). Cinse özgü 16S rRNA geninin saptanması Legionella varlığını göstermek açısından değerlidir (25). Çalışmamızda PZT optimizasyonu sonucu oluşturduğumuz protokol ile su örneklerinden DNA ekstraksiyonu ve PZT sonucunda 16S rRNA yi saptayabildik. Bununla birlikte L.pneumophilia'nın varlığını araştırmada kullanılan mip gen temelli PZT de çevresel su örneklerinde gen bölgesini saptayamadık. Ancak L. pneumophilia kolonilerinden karıştırarak elde ettiğimiz pozitif su örneklerinde mip genini gözlemleyebildik. Bizim sonuçlarımız çevresel su örneklerinde konvansiyonel PZT'nin L. pneumophilia'nın saptanmasında etkin olamadığını göstermektedir. Shen ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada konvansiyonel PZT'nin çevre sularında reaksiyon ihibitörlerinin varlığı nedeniyle L. pneumophilia'nın saptanmasında yeterli olamadığını belirtmişlerdir (22).

Collins ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, kültür ve PZT arasında zayıf bir korelasyon gözlediklerini, bunun daha önce başka araştırıcılar tarafından da ortaya konulan bulgular ile uyumlu olduğunu, kültür ve PZT arasında direkt bir karşılaştırma yapılamayacağını bildirmişler ve buna neden olarak da birçok çalışmada belirtildiği gibi PZT'nin cansız, canlı fakat kültüre edilemeyen, amip içindeki hücreleri saptamasını göstermişlerdir. PZT canlı ve cansız hücreler arasında ayırım yapamadığı için yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle çevresel su örneklerinden Legionella saptanmasında kültür altın standart olarak yerini korumaktadır. PZT, Legionella açısından negatif su örneklerin taranmasında kültüre yardımcı bir araç olarak kullanılabilir (8,9).

Toplitsch ve arkadaşları çalışmalarında çevresel su örneklerinde Legionella saptanmasında PZT ve kültürün karşılaştırılmasında bir başka zorluğun ise genomic unit (GU) ve colony forming unit arasında olduğunu, bu birimler arasında henüz bir karşılaştırmanın tanımlanmadığına dikkat çekmişlerdir. Aynı zamanda örnek tipinin de kültür ve PZT sonuçlarını etkilediğini, PZT'nin rutin olarak su örneklerinin

değerlendirilmesinde kullanıma sokulmadan önce değerlendirilip geçerliliğinin onaylanması gerektiğini bildirmişlerdir (23).

Çalışmamızda hastanemizin çeşitli bölgelerinden alınan su örneklerinde gerek kültür, gerek PZT sonucunda Legionella bakterileri saptanmamıştır. Bu da hastanemizde bu yönde yapılan çalışmaların etkinliğini göstermektedir. Nasokomiyal Legionellosisin önlenmesi için hastane su sistemlerinin düzenli aralıklarla Legionella varlığı açısından izlenmesi önem taşımaktadır. Su örneklerinde Legionella'nın taranmasında 16S rRNA temelli PZT, kültür ile birlikte kullanılabilir. Kültür sonucu oluşan kolonilerden DNA izolasyonu, PZT ve DNA dizi analizi ile virulan Legionella türleri belirlenebilir. Moleküler tekniklerin, konvansiyonel kültürün yerini almadan önce duyarlılık ve özgüllüğü hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır.

5. KAYNAKLAR

1. Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, et al.Biofilms: the stronghold of Legionella pneumophila. Int J Mol Sci 2013; 14: 21660–21675
2. Asghari FB, Nikaeen M, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Surveillance of Legionella species in hospital water systems: the significance of detection method for environmental surveillance data. J Water Health. 2013;11(4):713-9. doi: 10.2166/wh.2013.064. PMID: 24334845
3. Berjeaud JM, Chevalier S, Schlusselhuber M, et al. Legionella pneumophila: the paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. Front Microbiol 2016; 7: 486
4. Berjeaud JM, Chevalier S, Schlusselhuber M, Portier E, Loiseau C, Aucher W, Lesouhaitier O,Verdon J. Legionella pneumophila: The Paradox of a Highly Sensitive Opportunistic Waterborne Pathogen Able to Persist in the Environment. Front. Microbiol. 2016, 7, 486.
5. Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and epidemiology of Legionnaires' disease. Infect Dis Clin N Am. 2017; 31: 7–27
6. CDC 2017.What clinicians need to know about Legionnaires' disease. Available from: https://www.cdc.gov/legionella/downloads/fs-legionella-clinicians.pdf
7. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques. 1993 Sep;15(3):532-4, 536-7.
8. Collins S, Jorgensen F, Willis C, Walker J. Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of Legionella in environmental samples. J Appl Microbiol. 2015 Oct;119(4):1158-69. doi: 10.1111/jam.12911. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26218315.
9. Collins S, Stevenson D, Walker J, Bennett A. Evaluation of Legionella real-time PCR against traditional culture for routine and public health testing of water samples. J Appl Microbiol. 2017 Jun;122(6):1692-1703. doi: 10.1111/jam.13461. Epub 2017 May 10. PMID: 28376265.
10. Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. Lancet. 2016;23;387(10016): 376-385. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60078-2. Epub 2015 Jul 28. PMID: 26231463

11. D'Alò GL, Messina A, Mozzetti C, Filippis PD. Legionella Detection in Hot Water Distribution Systems of Closed Community and Tourist Accommodation Facilities in the Lazio Region, Italy: Risk Assessment and Prevention.Biomedicine & Prevention 2019;1-13
doi: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.87980
12. Doust RH, Mobarez AM, Esmailli. D. Detection of Legionella in Hospital Water Supply using Mip Based Primers .Journal of Biological Sciences 2008; 8 (5): 930-934
13. Ghotaslou R, Yeganeh Sefidan F, Akhi MT, Soroush MH, Hejazi MS. Detection of legionella contamination in tabriz hospitals by PCR assay. Adv Pharm Bull. 2013;3(1):131-4. doi: 10.5681/apb.2013.022. Epub 2013 Feb 7. PMID: 24312825; PMCID: PMC3846038.
14. Hinlo R, Gleeson D, Lintermans M, Furlan E. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. PLoS One. 2017 Jun 12;12(6):e0179251. doi: 10.1371/journal.pone.0179251. PMID: 28604830; PMCID: PMC5467897
15. Hwang C, Lıng F, Andersen GL, Lechevallıer MW, Lıu WT. Evaluation of Methods for the Extraction of DNA from Drinking Water Distribution System Biofilms. Microbes Environ 2012; 27(1): 9–18)
16. Inoue H, Iwasawa T, Saruwatari Y, Agata K. Improved Acid Pretreatment for the Detection of Legionella Species from Environmental Water Samples Using the Plate Culture Method. Biocontrol Science, 2004;9(3):43-50
17. Lin YE, Stout JE, Yu VL. Prevention of hospital-acquired legionellosis. Curr Opin Infect Dis. 2011 Aug;24(4):350-6. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283486c6e. PMID: 21666459.
18. Mendez Y, Rueda G,Garcia I, Luna J. A Clinical Overview of Hospital-Acquired Legionella Pneumonia: Prevention Is the Key. 2019
19. Moosavian M, Moradzadeh M, Ghadiri A, Saki M. Isolation and Identification of *Legionella* spp. in environmental water sources based on macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene sequencing in southwest Iran. AIMS Microbiol. 2019;16;5(3): 223-231. doi: 10.3934/microbiol.2019.3.223. PMID: 31663058; PMCID: PMC6787354

20. Mraz A, Weir M.Knowledge to predict pathogens: Legionella pneumophila lifecycle critical review part I uptake into host cells. Water 2018;10: 132–151
21. O'Neill E, Humphreys H. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence? J Hosp Infect. 2005 Apr;59(4):273-9. doi: 10.1016/j.jhin.2004.09.031. PMID: 15749313.
22. Shen, Shu-min, Ming-Yuan Chou, B. Hsu, Wen-Tsai Ji, Tsui-Kang Hsu, Hsiu-Feng Tsai, Yu-li Huang, Yi-Chou Chiu, Erl-Shyh Kao, Po-Min Kao and Cheng-Wei Fan. "Assessment of Legionella pneumophila in recreational spring water with quantitative PCR (Taqman) assay." *Pathogens and Global Health* 109 (2015): 236 - 241.
23. Toplitsch D, Platzer S, Pfeifer B, Hautz J, Mascher F, Kittinger C. Legionella Detection in Environmental Samples as an Example for Successful Implementation of qPCR. Water 2018; 10: 1012
24. Van Heijnsbergen E, Schalk JAC, Euser SM, et al. Confirmed and potential sources of Legionella reviewed. Environ Sci Technol 2015;49: 4797–4815.
25. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR. Appl Environ Microbiol. 2001 Sep; 67(9): 3985–3993
26. Xiao-Yong Zhan, Chao-Hui Hu,Qing-Yi Zhu. Legionella Pathogenesis and Virulence Factors. Annals of Clinical and Laboratory Research 2015 Vol. 3 No. 2: 15