

Klinik Belirtili Köpeklerde *Legionella pneumophila* Serogrup 1 Varlığının Kültür, PCR ve Üriner Antijen Aranması Yöntemleri ile Araştırılması[#]

Semiha AKSEL YALÇIN^{1*}, Atilla ILGAZ¹

¹ İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

* Sorumlu Yazar: Semiha AKSEL YALÇIN

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 34320 Avcılar İstanbul,
e-posta: semihaksel@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 07.05.2010

ÖZET

Legionellozis, legionella türleri içerisinde özellikle *Legionella pneumophila* serogrup 1 tarafından oluşturulan, başta insanlar olmak üzere hayvanlarda da görülebilen bakteriyel bir enfeksiyondur. Bu çalışmada, solunum yolu semptomları olan köpeklerde *L. pneumophila* serogrup 1 etkeninin varlığı Türkiye’de ilk kez araştırıldı. Solunum sistemi hastalığı semptomları gösteren 96 adet köpektan bakteriyolojik, PCR ve ELISA incelemeleri yapmak için sırasıyla kan, serum ve idrar örnekleri alındı. Kültür amacıyla pediatrik lizis izolatör tüplere alınan kanlardan BCYE ağara ekimler yapıldı. Etken identifikasyonu amacıyla legionella lateks aglutinasyon kiti kullanıldı. Serum örneklerinden DNA ekstraksiyonları QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kiti ile yapıldı ve örnekler bakterinin *mip* geni varlığı yönünden PCR yöntemiyle incelendi. İdrar örneklerinde bakteriyel antijen varlığı ELISA kiti ile incelendi. Kültür, PCR ve ELISA testleri sonucunda, tüm örnekler negatif olarak saptandı. Hayvanlarda Legionelloz enfeksiyonlarının varlığı hakkında oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu araştırmada incelenen örneklerde negatif sonuçların bulunmasında, örnek sayısı, örnek türü, mevsim faktörünün etkili olabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde özellikle pet hayvanlarında bu konu hakkında daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği, kliniklere solunum sistemi sorunları ile getirilen, etkeni belirlenemeyen olgularda legionellozisin de araştırılmasının hastalığın varlığının belirlenmesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Legionella pneumophila*, köpek, PCR, ELISA, kültür

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* SEROGROUP 1 PRESENCE IN CLINICAL SYMPTOMED DOGS BY CULTURE, PCR, AND URINARY ANTIGEN METHODS

Legionellosis is a bacterial infection which is generated especially by *Legionella pneumophila* serogroup 1 and can be seen particularly in humans in animals. In this study, dogs with respiratory symptoms were examined for the presence of *L. pneumophila* serogroup 1, for the first time in Turkey. Blood, sera and urine samples were collected from 96 dogs with respiratory symptoms for bacteriological, PCR, and ELISA examinations, respectively. For culture, blood samples collected with pediatric lysis isolator tubes were inoculated to BCYE agar. Latex agglutination kit was used for the identification. The DNA extraction was made from serum samples by using QIAamp DNA Mini extraction kit then the samples were examined for the presence of *Mip* gene by PCR. The presence of bacterial antigen in urine samples were examined with an ELISA kit. As the results of culture, PCR and ELISA tests, all the samples were found to be negative. There are very limited studies on the occurrence of Legionellosis in animals. The number and type of the samples collected and seasonal factors might have

[#] Birinci yazarın doktora tezinden özetlenmiştir.

played a role for the negative result obtained in this study. In conclusion, further studies relating this disease are needed especially for pet animals. For determining the disease status in our country each case with respiratory symptoms and indeterminate infectious agents should be examined for the presence of legionella species.

Key Words: *Legionella pneumophila*, dog, PCR, ELISA, culture

Giriş

Legionelloz başta insanlar olmak üzere hayvanlarda da görülebilen, pneumoni tablosundan ölüme kadar gidebilen, başta *Legionella pneumophila* olmak üzere diğer legionella türlerinin de oluşturduğu, akut karakterde, bakteriyel bir enfeksiyondur (Fabbi ve ark., 1998; WHO, 2009; Yardımcı, 2006).

Hastalık ilk olarak, 1976 tarihinde Philadelphia'da bir otelde görülen zatürre salgınından sonra belirlenmiştir (Kayabek, 2002; Yardımcı, 2006). Legionella türlerinin içerisinde en patojen tür *L. pneumophila*'dır. *L. pneumophila* enfeksiyonlarından ise en fazla *L. pneumophila* serogrup 1 sorumludur (Amemura-Maekawa ve ark., 2005; Rojas ve ark., 2005). Etken hücre içerisinde çoğalma yeteneğine sahiptir. Bu özellik *macrophage infectivity potentiator (mip)* gen tarafından kodlanan virulens faktörüyle ilgilidir (Özerol ve ark., 2006). *L. pneumophila* doğal su kaynaklarında ve yapay su sistemlerinde yaygın olarak bulunur (Amemura-Maekawa ve ark., 2005; Kayabek, 2002; Lück ve ark., 2002). Enfeksiyonun bulaşma şekli insanlarda görülen salgınlarda incelenmiştir. Bulaşma, *L. pneumophila* ile kontamine suyun su dağıtım ve soğutma sistemleriyle aerosolize hale gelerek ortama yayılması sonucu bakteriyi içeren su damlacıklarının inhalasyonu ya da aspirasyonu ile meydana gelmektedir (Özerol ve ark., 2006; Sonder ve ark., 2008). Salgınlar, çoğunlukla yaz ve sonbahar aylarında görülmektedir (Kayabek, 2002).

L. pneumophila sadece insanlara özgü bir patojen değildir ve bu etkenle farelerde ve koyalarda enfeksiyon oluşturulmuş ve enfeksiyon sonrası ölümler görülmüştür (Rolstad ve Berdal, 1981). Legionellaların çevresel kaynaklarda yaygın olarak bulunması ve insanlarda görülen legionella olguları yurt dışındaki bazı araştırmacıları hayvanların da *Legionella spp.* ile enfekte olabileceği

düşüncesine yöneltmiştir (Barth ve ark., 1983; Collins ve ark., 1982). İlk olarak 1978'de Page ve Lattimer (1978) tarafından, komplement fikzasyon yöntemiyle sığır, koyun, at ve koyalarda chlamydia ve legionella anikorları araştırılmış ve atlarda düşük seviyede (%6) legionella antikorları saptanmıştır. İzleyen yıllarda sığır, domuz, köpek, koyun, keçi ve vahşi hayvanlardan alınan kan serumlarında yapılan serolojik çalışmalarda değişik oranlarda anti-legionella antikorları saptanmıştır (Barth ve ark., 1983; Bazovská ve ark., 1992; Boldur ve ark., 1987; Cho ve ark., 1984; Collins ve ark., 1982; Pan ve Yang, 1999). Hayvanlarda doğal olarak ortaya çıkan, klinik belirtileri ve çevresel incelemeleri de içeren ilk olgu Fabbi ve ark. (1998) tarafından 20 günlük bir buzağıda bildirilmiştir. Burada belirlenen histolojik ve patolojik bulguların insanlarda görülen bulgularla çok benzediği belirlenmiştir. Buzağının akciğerlerinden *L. pneumophila* serogrup 1 ve serogrup 10, karaciğerinden ise serogrup 1 izole edilmiştir. Elektirikli bir su ısıtıcısından alınan ve buzağıya verilen sütlerin sulandırılmasında kullanılan su örneğinden *L. pneumophila* serogrup 1 izole edilmiştir. Bunların yanında alınan su örneklerinde *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türü amipler de üretilmiştir.

Türkiye'de yapılan araştırmalarda bu etkenin sadece beşeri hekimlik ve çevresel izolatları üzerinde durulmuştur ve veteriner hekimlik ve hayvan sağlığı açısından yapılan herhangi bir araştırma mevcut değildir. İnsanlar üzerine yapılan araştırmalar da sınırlı sayıdadır (Bağdatlı ve ark., 2004; Erdoğan ve Arslan, 2005; Özerol ve ark., 2006). Bu nedenle hayvanlarda görülen pneumoni olgularında bu enfeksiyon akla gelmediği gibi sağaltımı amacıyla da herhangi bir uygulama yapılmamaktadır. Çalışmamızda köpeklerde görülen pneumoni ve solunum yolları enfeksiyonu olgularında *L. pneumophila*

serogrup1 varlığının kültür, PCR ve üriner antijen aranması yöntemleriyle araştırılması ve bu tanı yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Örnekleme

Köpeklerde *Legionella pneumophila* enfeksiyonunun tahmini prevalansı %50 kabul edilerek, %95 güven düzeyi ve %10 absolut kesinliğe göre solunum bozukluğu semptomları gösteren 96 köpekten örnek alındı (Diker, 1994). Örneklerin alınması kasım ve mart ayları arasında gerçekleştirildi. Her bir köpekten, kültürde kullanılmak üzere kan, PCR için kan serumu ve üriner antijen aranması için ELISA'da kullanılmak üzere idrar örnekleri alındı. Kan örnekleri, kan kültüründe kullanılmak üzere, vakumlu izolatör tüplerin (wampole isolator 1.5, OXOID BC505C) içerisine direkt olarak alındı. Alınan örnekler izolatör tüpün kullanım kitapçığına uygun olarak laboratuvara getirildi ve ekimleri yapıldı. Köpeklerden, PCR'da kullanılmak üzere, içerisinde antikoagulan bulunmayan farklı tüplere kan örnekleri alındı ve soğuk zincir altında Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. Santrifüje edilerek serumları ayrıldı. Serumlar steril mikrosantrifüj tüplerine alınarak PCR'da kullanılmak üzere - 20 °C'de saklandı. ELISA'da üriner antijen aranması amacıyla, idrar alımı sistosentez yöntemiyle gerçekleştirildi. Örnekler soğuk zincir altında Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. Steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak ELISA'da kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

***L. pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152** Referans suş olarak kullanılmak üzere İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

Kültür

L. pneumophila'nın izolasyonu amacıyla Reinhardt ve ark. (1987)'nin kullandığı izolatör tüp yöntemi uygulandı. Bunun için 96

köpekten vakumlu izolatör tüplere 1,5 ml miktarında alınan kan örneklerinden, 0,1 ml alınarak BCYE- α (Himedia, M813) agara yayma ekim yöntemiyle ekimleri yapıldı, 35 °C'de, %5 CO₂'li ortamda 14 gün süreyle inkubasyona bırakıldı. Besiyerleri üreme yönünden her gün düzenli olarak kontrol edildi. Birinci günde oluşan üremeler dikkate alınmadı. İkinci günden sonra oluşan gri beyaz renkte, mukoid karakterde kolonilerden Gram ve Giemsa boyamalar yapılarak incelendi. *L. pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 suşundan kontrol amacıyla BCYE- α agara ekim yapıldı ve inceleme örnekleriyle aynı koşullarda inkubasyona bırakıldı. Giemsa ile iyi boyanan, Gram boyama ile zayıf boya alan, Gram negatif kokobasil ya da basillere ait koloniler, biyokimyasal testler ve latex aglütinasyon testleri (Oxoid, DR0800M) uygulanarak identifiye edildi.

PCR

Serum örneklerinden DNA Ekstraksiyonu: Serum örneklerinden *Legionella* DNA'sının ekstraksiyonu, QIAamp DNA Mini ekstraksiyon kiti (QIAGEN) yöntemine göre yapıldı.

Pozitif kontrol hazırlanması: Pozitif kontrol amacıyla kullanılan *Legionella pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 suşundan, BCYE- α agara ekim yapıldı. 35 °C'de 3-5 gün inkubasyondan sonra üreyen kolonilerden, aseptik koşullarda öze yardımıyla alınarak, sağlıklı bir köpekten alınan kan serumuna karıştırıldı ve yoğunluk Mac Farland 0,5'e göre ayarlandı. Bu serumdan *Legionella* DNA'sının elde edilmesi amacıyla da yukarıdaki yöntem kullanıldı.

DNA amplifikasyonu: Ekstraktlardan DNA amplifikasyonu kit içeriğinde (Aqua Screen, Minerva Biolabs 34-1025) üretici firma tarafından belirlenen yonteme göre yapıldı. Mastermix, kitin yönergesine göre hazırlandı.

Kross kontaminasyonu önlemek amacıyla ilk önce ekstraktlardan ve negatif kontrol olarak deiyonize DNA free sudan 5'er µl alınarak her biri 0,2 ml'lik PCR tüplerine (axygen) konuldu. Daha sonra kit içerisinde

verilen pozitif kontrolden ve *Legionella pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 suşundan hazırlanan pozitif kontrol ekstraktından 5'er µl alınarak, 0,2 ml'lik PCR tüplerine konuldu. Her bir PCR tüpüne 20'şer µl master mix eklendi. Tüm PCR tüpleri thermocycler'a (Techne TC-312 Thermal cycler) yerleştirildi. DNA amplifikasyonu 94 °C'de 2 dakika (1 siklus), sırayla 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 30 saniye (35 siklus) süreyle gerçekleştirildi.

Jel Elektrophorez Yöntemiyle DNA'nın Saptanması: 100 ml 1X TBE buffer'a (Biobasic INC) 1,5 gr agaroz (Applichem) katılarak %1,5 oranında jel hazırlandı. DNA'sı amplifiye edilmiş ürünler yükleme solusyonu (Genemark DL02) ile karıştırıldı. Elektrophorez işlemi 100 voltta 30-45 dakika süreyle (yaklaşık 2,5 cm yürütülecek şekilde) gerçekleştirildi. Elektrophorez sonunda jel ethidium bromide (Biobasic INC) solusyonuyla boyandı. DNA bantları UV transilatör (Biometra) kullanılarak gözlemlendi.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Agaroz jel elektrophorez sonucunda, İnternal kontrollerde 191 bp, pozitif kontrollerde 275 bp'de bantlar oluştu. 275 bp moleküler ağırlığında bant oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Negatif kontrolde 191 bp, pozitif kontrollerde 191 bp ve 275 bp moleküler ağırlığında bant oluşumu testin uygulama doğruluğunu belirledi.

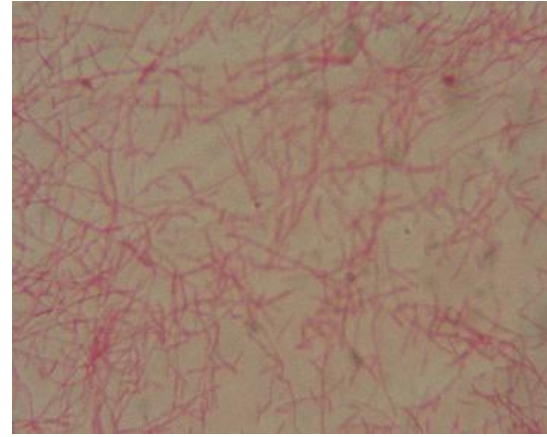
ELISA

İdrarda antijen aranması için **Aoki ve ark. (2003)** tarafından uygulanan ELISA yönteminden yararlanıldı. Üretici firma tarafından idrar örneklerinde *Legionella pneumophila* serogroup 1 antijeninin aranması amacıyla geliştirilen kitte (Diagnostic Automation, INC.) belirtilen yöntemle yapıldı ve kitin yönergesine göre değerlendirildi.

Bulgular

Kültür bulguları

Kan örneklerinin BCYE- α agarda on dört günlük inkubasyonları sonucunda *Legionella spp.* ve *L. pneumophila* izole edilmedi. *L. pneumophila* serogrup 1 ATCC 33152 kontrol suşundan Giemsa boyama yöntemi ile yapılan boyama sonucu bakterinin mikroskopik görünümü Şekil 1'de gösterilmiştir.

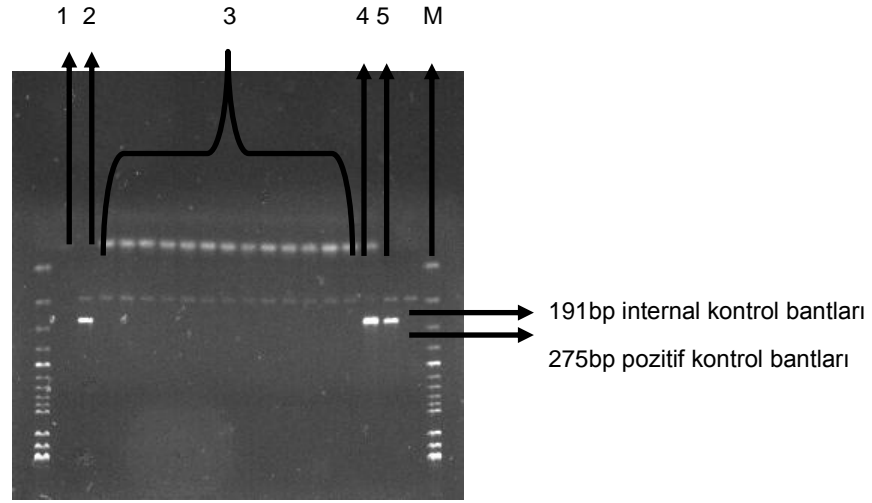


Şekil 1. *L. pneumophila* serogrup1 ATCC33152'nin mikroskopik görünümü

Figure1. The microscopic appearance of *L. pneumophila* serogroup1 ATCC33152

PCR bulgular

Serum örneklerinde *L. pneumophila* DNA'sına ait bant oluşumu saptanmadı. Negatif kontrolde 191 bp moleküler ağırlığında internal kontrol bantları, kit içerisinde bulunan pozitif kontrol ile referans suştan hazırlanan pozitif kontrolde 191 bp ve 275 bp moleküler ağırlığında bantlar saptandı (Şekil 2).



1- (-) kontrol, 2- (+) kontrol, 3- serum örnekleri, 4- *L. pneumophila* ATCC33152 ile hazırlanan (+) kontrol, 5- (+) kontrol, M- 100 bp'lik DNA marker.

Şekil 2. PCR sonrası elektroforezde şekillenen bantların görüntüsü

Figure 2. The image of the bands that occur at electrophoresis after PCR

ELISA bulguları

Tüm idrar örneklerinde 0,15 OD değerinin altında değerler saptandı. İdrarlar *L. pneumophila* serogrup 1 antijeni yönünden negatif bulundu.

Tartışma

Philadelphia'da bir otelde ortaya çıkan salgının incelenmesiyle 1977'de bir pneumoni etkeni olarak adı konulan *Legionella pneumophila* üzerine dünyada çok sayıda araştırma yapılmış ancak Türkiye'de bu etken üzerinde yeteri kadar durulmamıştır. Dünyada ise bu infeksiyonla ilgili hayvanlar üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir.

Legionella infeksiyonlarının tanı metodları arasında kültür altın standart olarak kabul edilir. Ancak Legionellaların izolasyonu için geliştirilen optimal bir kan kültür metodu bildirilmemiştir (Lück ve ark., 2002; Reinhardt ve ark., 1987). Fabbi ve ark. (1998) tarafından 20 günlük bir buzağıda ortaya çıkarılan *L. pneumophila* infeksiyonu

olgusunda akciğer, karaciğer, dalak ve böbrek otopsi materyallerinden aseptik koşullarda alınan doku örneklerinden, BCYE agar yüzeyine yayılarak direkt ekimler yapılmıştır. Akciğer ve karaciğerden *L. pneumophila* izole edilmiştir. Reinhardt ve ark. (1987), kobaylarda *L. pneumophila* ile oluşturdukları deneysel infeksiyon modelinde bifazik BCYE (agar-broth) yöntemi, pediatrik izolator tüp yöntemi, buffy coat ekimi ve direkt ekim olmak üzere dört farklı kan kültürü metodunu karşılaştırmalı olarak incelemişler, 15 kobayın tamamında bu yöntemlerle kandan *L. pneumophila* serogrup 1 izole etmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar ilk önce izolator metodun *L. pneumophila* üzerine inhibitör etkisinin bulunup bulunmadığını W82-063A standart *L. pneumophila* serogrup 1 suşunu kullanarak araştırmışlar ve fizyolojik tuzlu su ile sulandırılmış *L. pneumophila* serogrup 1 süspaniyonunun izolator tüp metoduyla kültüre edilmesi sonucunda üremede önemli derecede inhibitör etkinin görülmediğini belirtmişlerdir. Baron ve Scott (2005) tarafından insanlar üzerinde yapılan bir

çalışmada en iyi üremenin izolatör tüpler kullanılarak sedimentin BCYE agara inokulasyonu ile elde edildiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada da, **Reinhardt ve ark. (1987)**'nin uyguladığı izolatör tüp yöntemi kullanıldı. Legionella infeksiyonlarında görülen bakteriyemi olgularında kandaki gerçek bakteri konsantrasyonu bilinmemekte, ancak 10-700 cfu/ml arasında değiştiği düşünülmektedir. Araştırmacılar kandaki bakteri konsantrasyonunun 50-100 cfu/ml'den az olması durumunda etkeni saptamanın daha zor olabileceğini belirtmişler ve kültür amacıyla daha çok konsantre edilmiş yada amplifiye edilmiş kan örneklerinin tercih edilmesinin yararlı olabileceğini belirtmişlerdir (**Reinhardt ve ark., 1987**). **Dorn ve Barnes (1979)**, Legionellozis olgularında *L. pneumophila*'nın kandaki konsantrasyonunun bilinmediğini, pneumoni ile ilişkili bir infeksiyon olduğundan hastalığın akut döneminde bakterinin kanda değişen konsantrasyonlarda bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada vena jugularisten alınan kanlar izolatör tüplere aktarıldı. Besiyerlerinin inkubasyonu sonrasında sıklıkla *Staphylococcus spp.* kontaminasyonu görüldü. Bunun nedeninin örnek alımı sırasında çevresel bir kontaminasyonun oluşması ya da köpeklerde bu etkenin yol açtığı bir infeksiyonun neden olduğu bakteriyemi varlığı olabileceği düşünüldü. **Reinhardt ve ark. (1987)**'nin yaptıkları çalışmada en fazla kontaminasyonun izolatör metodda görüldüğünü fakat bu durumun istatistiksel olarak sonucu etkilemediğini belirtmişlerdir.

L. pneumophila infeksiyonlarında idrarla atılan *L. pneumophila* serogrup 1 antijenlerinin saptanması amacıyla birçok ticari ELISA kiti geliştirilmiştir (**Benson ve ark., 2000; Guerrero ve ark., 2004; Horn ve ark., 2001**). Bu yöntem, erken ve hızlı bir şekilde tanıya ulaşılabilmesi ve bir an önce antibiyotik tedavisine karar verme açısından yararlı bir test yöntemidir (**Guerrero ve ark., 2004**). Diğer tanı metodlarıyla karşılaştırıldığında, örneklerin kolay sağlanabilmesi, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir test olması ve pontiac

ateşi gibi nonpneumonik olguların da saptanabilmesi bakımından üriner antijen aranması yönteminin birçok avantajı bulunmaktadır (**Lück ve ark., 2002**). **Aoki ve ark. (2003)** tarafından yapılan çalışmada, farelerde oluşturulan deneysel infeksiyon modelinde idrar örnekleri *L. pneumophila* serogrup 1 yönünden ticari ELISA kitleri ile test edilmiş, antijen atılımının 30 gün kadar artarak devam ettiği belirtilmiştir.

Legionella infeksiyonlarının PCR ile tanısında tüm legionella türlerinin saptanması amacıyla 5S rRNA, 16S rRNA, *L. pneumophila*'nın saptanması amacıyla da *mip* (macrophage infectivity potentiator) genleri hedef alınmaktadır (**Lück ve ark., 2002**). **Matsiota-Bernard ve ark. (1994)** tarafından yapılan bir çalışmada hastalardan balgam, bronşiyal aspirat ve bronkoalveoler lavaj sıvısı örnekleri alınmış ve bu ticari kit ile ekstrakte ve amplifiye edilmiştir. Araştırmacılar bu ticari kitin bronkoalveoler lavaj sıvı örneğinde de uygulanabileceğini ve uygulama kolaylığı ve 1 günde sonuç alınabilmesi bakımından kültür metoduna alternatif olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada ELISA için idrar ve kültür için kan örnekleri alınan 96 köpekten ayrıca PCR ile bakterinin genetik materyalini aramak amacıyla serum örnekleri alındı. **Lindsay ve ark. (2004)**, serum örnekleri kullanarak yaptıkları PCR çalışmasında hastalığın erken dönemlerinde ve birden çok örnek alınmasının testin sensitivitesini artırması yönünde yararlı olabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan araştırmalarla da legionella infeksiyonlarının tanısında serum örnekleri kullanılarak uygulanan PCR yöntemiyle özellikle hastalığın akut döneminde olmak üzere iyileşme döneminde de etkenin saptanabildiği belirlenmiştir (**Diederer ve ark., 2006; Lück ve ark., 2002**).

Bu çalışmada, örnek toplama aşamasında invaziv metodlara gerek duyulmaması, solunum yolları örneklerinde ihtiyaç duyulan araçlar gibi özel ekipman gerektirmemesi ve örneklerin antemortem dönemde alınabilmesi açısından noninvaziv yöntemlerle sağlanan kan, serum ve idrar örnekleri tercih edildi.

Örnekler kasım ve mart ayları arasında toplandı. İnsanlar arasındaki legionella salgınlarının daha çok yaz aylarında görüldüğü göz önüne alındığında yaz aylarında da solunum yolu hastalığı bulunan köpeklerden örneklerin alınmasının enfeksiyonun varlığının belirlenmesi bakımından yararlı olabileceği düşünüldü. Bunun yanında örneklerin barınaklarda bulunan köpeklerden sağlanması ve akciğer röntgeni gibi tanı kriterlerinin kullanılmamasının, pneumoni tanısını zorlaştırdığı göz önüne alınırsa, özellikle kliniklere getirilen ve antibiyotiklere cevap vermeyen pneumoni olgularında, başta bronkoalveoler lavaj sıvısı olmak üzere örnekler alınmasının hastalığın antemortem dönemde saptanabilmesinde etkili olabileceği düşünüldü. Ayrıca pneumoni nedeni ölümlerde başta akciğer olmak üzere iç organlarından ekimler yapılmasının, hastalığın klinik olarak varlığının belirlenmesinde yararlı olabileceği düşünülmüştür. Bunların yanında seroepidemiolojik çalışmaların da yapılması enfeksiyonun varlığının ortaya konması açısından oldukça önemlidir.

Dünyada hayvanlar arasında ilk klinik şüpheyle gelen ve izolasyon yapılan *L. pneumophila* enfeksiyonu olgusu **Fabbi ve ark. (1998)** tarafından 20 günlük bir buzağıda bildirilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları serolojik çalışmalarda evcil hayvanlarda *Legionella* antikorlarına rastladıklarını belirtmişlerdir. Ancak bu konuda yapılan çalışmaların yeterli olmadığı gerçektir. Bu çalışmaların köpekler dışında diğer evcil hayvanlarda da uygulanabileceği düşünülmelidir. İnsanlarda yapılan çalışmalar göz önüne alındığında etken izolasyonu ve seroepidemiolojik tanıdaki başarının sağlanabilmesinde örnek sayısı, örnek türü ve mevsim faktörünün de önemli olduğu göz ardı edilmemelidir.

KAYNAKLAR

Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Chang, B., Watanabe H., 2005. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan from a distinct genetic cluster. *Microbiology and Immunology* 49 (12), 1027-1033

- Aoki, S., Hirakata, Y., Miyazaki, Y., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Tomono, K. ve ark., 2003.** Detection of *Legionella* DNA by PCR of whole-blood samples in a mouse model. *Journal Of Medical Microbiology* 52, 325-329
- Bağdatlı, D., Vural, T., Metin, D.Y., 2004.** Hemodiyaliz hastalarında *Legionella pneumophila* antikorlarının araştırılması. *Turkish journal of infection* 18 (4), 407-416
- Baron, E.J., Scott, J.D., Tompkins, L.S., 2005.** Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clinical Infectious diseases* 41, 1677-1680
- Barth, T.C., Renner, E.D., Gabrielson, D.A., 1983.** A survey of domestic animals to detect serological responses against *Legionella spp.* by indirect fluorescent antibody. *Canadian Journal Of Comparative Medicine* 47, 341-346
- Bazovská, S., Awad-Masalmeh, M., Kmety, E., 1992.** Spaleková M. *legionella* antibodies in domestic animals. *Ceskoslovenská Epidemiologie Mikrobiologie Imunologie* 41 (5), 268-273
- Benson, R.B., Tang, P.W., Fields, B.S., 2000.** Evaluation of the binax and biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (7), 2763-2765
- Boldur, I., Cohen, A., Tamarin-Landau, R., Sompolinky, D., 1987.** Isolation of *Legionella pneumophila* from calves and the prevalence of antibodies in cattle, sheep, horses, antelopes, buffaloes and rabbits. *Veterinary Microbiology* 13 (4), 313-320
- Cho, S.N., Collins, M.T., Reif, J.S., 1984.** Serologic evidence of *Legionella* infection in horses. *American Journal of Veterinary Research* 45 (12), 2600-2602
- Collins, M.T., Cho, S.N., Reif, J.S., 1982.** Prevalence of antibodies to *Legionella pneumophila* in animal populations. *Journal of Clinical Microbiology* 15 (1), 130-136
- Diederren, B.M.W., De Jong, C.M.A., Kluytmans, J.A.J.W., Van Der Zee, A., Peeters, M.F., 2006.** Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of the literature. *Journal of Medical Microbiology* 55, 639-642
- Diker, K.S., 1994.** Epidemiyoloji A.Ü. Veteriner Fakültesi öğrenci ders notu. Ankara Üniversitesi, Ankara.

- Dorn, G.L., Barnes, W.R., 1979.** Rapid isolation *Legionella pneumophila* from seeded donor blood. *Journal of Clinical Microbiology* 10 (1), 114-115
- Erdoğan, H., Arslan, H., 2005.** Colonization of *Legionella* species in hotel water system in Turkey. European Working Group for Legionella Infections 20. annual meeteng 16-17 Mayıs. Istituto Superiore Di Sanità: <http://www.iss.it/binary/publ/publi/05-C2.1115128370.pdf> (Erişim 24.03.2009)
- Fabbi, M., Pastoris, M.C., Scanziani, E., Magnino, S., Matteo, L.D., 1998.** Epidemiological and environmental investigations of *Legionella pneumophila* infection in cattle and case report of fatal pneumonia in a calf. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (7), 1942-1947
- Guerrero, C., Toldos, C.M., Yague, G., Ramirez, C., Rodriguez, T., Segovia, M., 2004.** Comparison of diagnostic sensitivities of three assay (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (1), 467-468
- Horn, J., Benson, R.F., Fields, B.S., 2001.** Binax and biotest *Legionella* urinary antigen kits. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (4), 1682
- Kayabek, C.Y., 2002.** Legionellosis Enfeksiyonları. http://www.mmoistanbul.org/yayin/cumartesis_oylesileri/3/index.html (Erişim 21.05.2009)
- Lindsay, D.S.J., Abraham, W.H., Findlay, W., Christie, P., Johnston, F., Edwards, G.F.S., 2004.** Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *Journal of Medical Microbiology* 53, 183-187
- Lück, P.C., Helbig, J.H., Schuppler, M., 2002.** Epidemiology and laboratory diagnosis of *Legionella* infections. *Laboratory Medicine* 26 (3/4), 174-182
- Matsiota-Bernard, P., Pitsouni, E., Legakis, N., Nauciel, C., 1994.** Evaluation of commercial amplification kit for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (6), 1503-1505
- Özerol, I.H., Bayraktar, M., Çizmeci, Z., Durmaz, R., Akbaş, E., Yıldırım, Z. ve ark., 2006.** Legionnaire's disease: a nosocomial outbreak in Turkey. *Journal of Hospital Infection* 62, 50-57
- Page, L.A., Lattimer, G.L., 1978.** Detection of complement-fixing antibodies to Legionnaires' disease bacterium and *Chlamydia* in animal and human sera. *Current Microbiology* 1, 331-334
- Pan, X., Yang, X., 1999.** A serological investigation of *Legionella* infection in six-species poultries and domestic animals in Luzhou city, Sichuan province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 20 (2), 108-110
- Reinhardt, J.F., Nakahama, C., Eldestein, P.H., 1987.** Comparison of blood culture methods for recovery of *Legionella pneumophila* from the blood of guinea pigs with experimental infection. *Journal of Clinical Microbiology* 25 (4), 719-721
- Rojas, A., Navarro, M.D., Fornés, F.E., Serra, E., Simarro, E., Rojas, J. ve ark., 2005.** Value of serological testing for diagnosis of Legionellosis in outbreak patients. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (8), 4022-4025
- Rolstad, B., Berdal, B.P., 1981.** Immune defenses against *Legionella pneumophila* in rats. *Infection and Immunity* 32 (2), 805-812
- Sonder, G.J., van den Hoek, J.A., Bovee, L.P., Aanhane, F.E., Worp, J., Du Ry van Beest Holle ve ark., 2008.** Changes in prevention and outbreak management of Legionnaires' disease in the Netherlands between two large outbreaks in 1999 and 2006. *Euro Surveill.* 13 (38): 18983 Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18983>
- WHO, 2009.** Legionella 1. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob4.pdf (Erişim 30.03.2009)
- Yardımcı, H., 2006.** Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar) içinde Legionella enfeksiyonları; pp.215-217