

LEJYONELLOZİS'İN LABORATUVAR TANISINDA ENZİM İMMUNOASSAY (EIA) İLE İDRARDA ANTİJEN TESBİTİ YÖNTEMİ VE BALGAM KÜLTÜR YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARISON OF URINARY ANTIGEN DETECTION METHOD BY ENZYME IMMUNOASSAY (EIA) AND SPUTUM CULTURE METHOD IN THE LABORATORY DIAGNOSIS OF LEGIONELLOSIS

Nejat UÇARTÜRK, Haleh KHOSHBAHAR**

ÖZET: Bu çalışmada Legionella pneumophila'ya bağlı alt solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında, L.pneumophila serogrup 1 (SG1) idrar antijenlerinin Enzim İmmunoassay (EIA) yöntemiyle saptanarak duyarlılık, özgüllük ve uygulanabilirliğinin incelenmesi ve kültür yöntemine bir alternatif oluşturup oluşturmayacağına araştırılması amaçlanmıştır. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan 59 erkek ve 34 kadın olmak üzere toplam 93 hastadan alınan balgam örneklerinin selektif besiyerlerinde kültürü yapılmış, hastaların idrar örnekleri ise antijen varlığı yönünden EIA yöntemiyle incelenmiştir. Doksanüç hastanın balgam örneklerinin 3 ünden (%3.22) L.pneumophila SG1 izole edilmiş; idrar örneklerinin ise 6 sında (%6.45) L.pneumophila SG1 antijeni saptanmıştır. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan erkek ve kadın hastalarda, kültür ve EIA sonuçları arasında korelasyonun sırasıyla %73 ve %70 oranında olduğu belirlenmiştir. Kültür yöntemi altın standart olarak alındığında, EIA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %100 ve %96 olarak saptanmış ve EIA yönteminin, legionellozis'in erken tanısında kültür yöntemine alternatif olabilecek güvenilir, kolay uygulanabilen ve hızlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Lejyonellozis, idrar antijeni, EIA, kültür.

SUMMARY: The aim of this study was to investigate the sensitivity, specificity and utility of urinary antigen detection method by Enzyme Immunoassay (EIA) and to evaluate whether this method can be alternative to culture in the identification of lower respiratory tract infections caused by L.pneumophila serogroup 1 (SG1). For this purpose, sputum samples obtained from 59 men and 34 female with lower respiratory tract infection, were inoculated to selective Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar, and urine samples of the same

* Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

patients were analyzed by EIA for the presence of Legionella SG1 antigen. L.pneumophila SG1 were grown in cultures of 3 (3.22%), and urine antigens were detected in 6 (6.45%) of 93 patients. The correlation between the culture and EIA methods were found to be 73% and 70%, in men and women, respectively. The sensitivity and specificity of EIA test were found 100% and 96% respectively, when culture is accepted as gold standard method. As a result, urinary antigen detection by EIA test is a rapid, practical and reliable method which provides opportunity for early diagnosis and may be used as an alternative method to culture for the laboratory diagnosis of legionellosis.

Key words: Legionellosis, urinary antigen, EIA, culture.

GİRİŞ

Legionella pneumophila serogrup 1 (SG1), lejyonellozis'in başlıca etkeni olup bağışıklık sistemi normal fakat tedavi edilmemiş hastalarda %25'e varan mortaliteye yol açar. Bu oran bağışıklık sistemi baskılanmış ve tedavi edilmemiş hastalarda %80'e ulaşmaktadır^{1,2}. Pnömonilerin ampirik tedavilerinde kullanılan antibiyotiklerin lejyoner hastalığının tedavisinde yetersiz kalması ve hastalığın erken teşhis edilememesi sonucu özgül antimikrobiyal tedavinin uygulanamaması bu durumun başlıca nedenlerindedir^{3,4,5}.

Lejyonellozis'in laboratuvar tanısında kültür, direkt ve indirekt floresan antikor (DFA,IFA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemler kullanılabilir⁶. Ancak Legionella türlerinin özel seçici besiyerlerinde izolasyonunun uzun zaman gerektirmesi, DFA testinde, transtrakeal aspirasyon ve bronkoalveolar lavaj gibi invaziv girişimler ile alınan örneklerin kullanılma gereği, antikor düzeyinin hastalığın ancak 4-6. haftalarında belirlenebilir seviyeye ulaşması nedeniyle IFA testinin gecikmiş kullanımı ve PCR yönteminin standardizasyon ve uygulanma zorluğu gibi problemler birer dezavantaj teşkil etmektedir⁷⁻⁹.

Lejyonellozis'li hastaların idrarlarında, kantitatif olarak belirlenebilen, tripsine dirençli ve çözünür bir Legionella antijeninin varlığı saptanmıştır¹⁰. İdrardaki bu antijenin serumdakine oranla 30-100 kat daha fazla olduğu, semptomların ortaya çıkışından 4-14. günden (bazen de 1-3. günden) itibaren salınmaya başladığı ve 1 yıla kadar idrarla atılabildiği, bu nedenle de idrarda antijen tesbiti ile hastalığın erken teşhisinin yapılabileceği bildirilmektedir¹¹⁻¹³. L. pneumophila çözünür antijenleri, solunum sistemi salgılarında, balgam, serum ve idrarda Radio Immunoassay (RIA), Enzim Immunoassay (EIA), Lateks Aglutinasyon (LA) ve Hemaglutinasyon (HA) gibi yöntemlerle gösterilebilmektedir¹⁰⁻¹⁴.

Bu çalışmanın amacı, balgam örneklerinden L.pneumophila SG1 izolasyonu yapılan alt solunum yolu enfeksiyonlu hastaların idrar örneklerinde L.pneumophila SG1 çözünür antijenlerinin EIA yöntemiyle aranması ve bu yöntemin duyarlılık, özgüllük ve uygulanabilirliğinin değerlendirilerek kültür yöntemine alternatif oluşturup oluşturmayacağını araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 1995 ile Ekim 1996 ayları arasında Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Merkezi ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran ve serviste yatan 59 erkek, 34 kadın olmak üzere toplam 93 alt solunum yolu enfeksiyonu olan hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalardan balgam ve idrar örnekleri alınarak aşağıdaki yöntemler uygulandı.

Direkt mikroskopi ve boyalı preparatlar: Asepsiye dikkat edilerek steril kaplara alınan balgam örneklerinden hazırlanan yaymalar Gram ve Aside Dirençli Boyama (ARB) yöntemleri ile boyanarak incelendi.

Kültür, izolasyon ve tanımlama: Balgam örnekleri, ekilmenden önce normal florayı ortadan kaldırmak amacıyla düşük pH (2.2)'daki KCl-HCl tampon çözeltisi ile muamele edilerek dekontaminasyon uygulandı ve 30 dakika içinde 0.01 ml hacimde olmak üzere BCYE- α -L-sistein agara yayılarak ekildi. Seçici BCYE- α -L-sistein agar besiyeri, Centers for Disease Control (1980) önerileri doğrultusunda, Charcoal Yeast Extract (CYE) besiyerine; " α -ketoglutarate" (Sigma), ACES (Sigma), "L-cystein" (Merck), bromkrezol moru, bromtimol mavisı boyaları ile Vankomisin (1000 μ g/L), Polimiksin B (80.000 U/L) ve Sikloheksimid (0.08 g/L) ilavesi yapılarak hazırlandı.

Kültürler, 35°C de, %3-5 CO₂ ve %70-80 relatif nemli ortamda, 3. günden itibaren her gün kontrol edilerek iki hafta bekletildi^{7,14}.

İnkübasyon süresi içinde üreyen gri veya mavi-gri renkli kolonilerden yapılan boyamada Gram negatif boyananlar muhtemel Legionella olarak kabul edildi^{2,3,6}. Kanlı agarda ve 42°C'de üremeyenler, oksidaz (+), katalaz (+) ve hipurat hidroliz testi (+) olanlar L. pneumophila olarak ayrıldı ve bunların konfirmasyon ve tiplendirmesinde monoklonal DFA (Genetic Systems, Seattle, Washington) yöntemi kullanıldı. İzole edilen suşların L. pneumophila SG1 olduğu belirlendi.

İdrar örneklerinde antijen aranması: Doksanüç hastaya ait idrar örneği, L. pneumophila SG1 antijeni yönünden incelenmek üzere test uygulanıncaya kadar -20°C de saklandı. Kompetitif EIA yöntemi, Binax Legionella Urinary Antigen EIA (Binax South Portland, Me) kiti kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda yapıldı. Kit içinde; L. pneumophila SG1 IgG antikorlarıyla kaplı mikropleyt, pozitif ve negatif kontroller, standartlar, yıkama solüsyonu, HRP konjugatı (Horseradish Peroksidaz ile konjuge tavşan anti-L.pneumophila SG1 IgG antikorları), substrat ve durdurma solüsyonu mevcuttu.

Sonuçlar, spektrofotometrik olarak (Diagnostic Pasteur, LP 400) 450 nm dalga boyunda okundu. Optik dansite (OD) değerleri elde edildikten sonra hastaların sonuçları, EIA kiti kullanım kılavuzunda önerilen standart 3 sayısına göre değerlendirildi. Bu sayıdan daha yüksek OD veren idrar örnekleri L. pneumophila SG1 antijeni yönünden pozitif, daha düşük değerler ise negatif olarak kabul edildi.

B U L G U L A R

Alt solunum yolu enfeksiyonu olan toplam 93 hastanın cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı Tablo I'de, bu hastaların klinik bulguları Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo I: Çalışmaya Alınan Hastaların Cins ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Yaş Grubu	Erkek	Kadın	Toplam
10-19	2	–	2
20-29	4	2	6
30-39	4	4	8
40-49	8	8	16
50-59	9	6	15
60-69	18	7	25
70 ve üstü	14	7	21
Toplam	59	34	93

Tablo II: Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu Olan Hastaların Klinik Bulguları

Klinik Belirtiler	Var	Yok
Yüksek ateş	56	37
Öksürük	82	11
Göğüs ağrısı	50	43
Karın ağrısı	39	54
Bulantı-Kusma	28	65
Dişare	13	80

59 erkek hastadan 2'sinin (%3.4) ve 34 kadın hastadan 1'inin (%2.95) olmak üzere toplam 3 hastanın (%3.2) balgam örneğinde L. pneumophila SG1 üremiştir (Tablo III). Erkek ve kadın hasta grupları arasında kültür sonuçları "Fisher's Exact" yöntemi karşılaştırılmış ve L. pneumophila SG1 izolasyon sıklığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$).

Tablo III: Hastalarda L.pneumophila SG1 Kültür ve İdrarda Antijen Pozitifliği

Kültür	İdrarda Antijen			
	Pozitif (%)	Negatif (%)	Pozitif (%)	Negatif (%)
Erkek	2 (3.4)	57 (96.6)	4 (6.7)	55 (93.2)
Kadın	1 (2.9)	33 (97.0)	2 (5.8)	32 (94.1)
Toplam	3 (3.2)	90 (96.7)	6 (6.4)	87 (93.5)

Kültürü pozitif 3 hastanın hepsinin idrar örneğinde EIA ile *L.pneumophila* SG1 antijen pozitifliği saptanırken (%100), kültür negatif 57 erkek hastanın 2'sinde (%3.5) ve 33 kadın hastanın birisinde (%3.03) olmak üzere toplam 3 (%3.33) hastada da antijen pozitifliği belirlenmiştir. Böylece 93 hastadan 6'sının (%6.4) idrarında antijen pozitif bulunmuştur.

Hastaların kültür ve antijen pozitiflikleri Tablo III'de, EIA yöntemi ile kültür yöntemi sonuçlarının karşılaştırması ise Tablo IV'de gösterilmiştir.

Tablo IV: *L. pneumophila* SG1 Kültür Sonuçları ile EIA Sonuçlarının Karşılaştırılması

EIA Sonuçları	Kültür Sonuçları			
	Pozitif (n:3)		Negatif (n:90)	
	n	%	n	%
Pozitif (n:6)	3	100	3	3.3
Negatif (n:87)	—	0	87	96.6
Toplam	3	100	90	100

Bu sonuçlara göre; idrarda *L.pneumophila* SG1 antijeninin aranmasında EIA yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %96 olarak belirlenmiştir. Erkek ve kadın hasta gruplarında kültür yöntemi ile EIA yöntemi arasındaki korelasyonun Cramer's V istatistiksel analizi ile erkekler için %73, kadınlar için %70 olduğu saptanarak iki yöntem arasındaki uyumun önemli olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Bir çok ülkede her yıl artan sporadik lejyonellozis olgularının ortaya çıkışı, bu enfeksiyonun tanısının daha fazla önem kazanmasına neden olmuştur. Legionella pnömonisinin tanısı, balgam yayma preparatlarında bakterinin görülebilme zorluğu nedeniyle daha ziyade kültüre dayanmaktadır. Ancak kesin pozitif sonucun elde edilebilmesi ise bazı tamamlayıcı testlere bağlı olarak değişmekte ve zaman almaktadır. Bu durum kültür yönteminin duyarlılığını %50-70'e kadar düşürmektedir^{2,3}. Ayrıca rutin laboratuvarların çoğunda *L.pneumophila* kültürü yapılamadığından bu enfeksiyonlar gözden kaçabilmektedir. Bu nedenle enfeksiyonun tanısında kullanılabilecek hızlı ve duyarlı yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Son zamanlarda enfeksiyonun erken tanısı için idrarda *L.pneumophila* SG1 antijenlerini araştıran bir çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan birisi olan EIA yöntemi, kolay uygulanabilirliği, tekrarlanabilme özelliği ve üstün teknolojiye gereksinim göstermemesi gibi nedenlerle bir çok enfeksiyonun yanı sıra lejyonellozis'in tanısında da rutin uygulamada tercih edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, EIA yöntemiyle idrarda antijen aranmasının, duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi ve

kültür yöntemiyle uyumluluğunun araştırılması planlanmış ve bu amaçla alt solunum yolu enfeksiyonu olan 93 hastanın balgam örnekleri kültür yöntemiyle, idrar örnekleri ise idrar antijen varlığı yönünden incelenmiştir.

Çalışmamızda erkek hastaların 2'sinin (%3.4), kadın hastaların ise 1'inin (%2.9) balgam kültürlerinde *L.pneumophila* SG1 izole edilmiştir. Karius ve arkadaşları¹⁵, pnömonili 77 hastanın balgam örneklerinden 4'ünde (%5.2), Kohler ve arkadaşları¹⁶ ise, 222 pnömonili hastanın 58'inden (%26) *L.pneumophila* SG1 izole etmişlerdir. İngiltere'den Birtles ve arkadaşları¹¹, 120 pnömoni olgusundan 51'inde (%42.5) bakteriyi izole edebilmelerini balgam örneklerinin, hastalık belirtilerinin görülmesinden itibaren ilk 7 gün içinde yani akut dönemde alınmasına, Almanya'da Ruf ve arkadaşları¹⁷, 1243 pnömoni olgusunda %1.5 gibi düşük bir oranda *L.pneumophila* izole etmelerini ise materyalin uygun şekilde alınamayışına bağlamaktadırlar. Dolayısıyla çeşitli ülkelerde alt solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda *L.pneumophila* SG1 izolasyonu %1.5 ile %42.5 arasında değişmektedir.

Türkiye'de *L.pneumophila*'nın pnömonili hastalarda kültür yöntemi ile tanısına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmadığından, bulgularımızın karşılaştırılma olanağı olmamıştır. Çalışmamızda elde edilen %3.2'lik (3/93) izolasyon oranı, yabancı çalışmalarla karşılaştırıldığında bazıları ile uyumlu, bazılarından ise daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun nedeni çalışmaların farklı yaşam standardı olan toplumlarda yapılması, farklı laboratuvar şartlarında farklı teknikler kullanılması ve belki de bazılarında standart yöntemlere uyulmaması olabilir. Ayrıca bu çalışmada elde ettiğimiz kültür sonuçları, alt solunum yolunun bakteriyel enfeksiyonları arasında yer alan ancak rutin bakteriyolojik yöntemlerle tesbit edilemeyen olgularda *L.pneumophila* SG1'in de etken olarak gözardı edilmemesi ve özel kültür yöntemlerinin kullanılması gereğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızın diğer bölümünü teşkil eden EIA yöntemi ile *L.pneumophila* SG1 idrar antijenlerinin araştırılmasında; *L.pneumophila* kültür pozitifliği saptanan 2 erkek hastanın her ikisinde ve kültür negatif bulunan 57 erkek hastanın da ikisinde (%3.5) idrar antijen pozitifliği saptanmıştır. Buna karşın kültür pozitifliği belirlenen bir kadın hastada ve kültür negatif olan 33 kadının birinde (%3.03) idrar antijen pozitifliği belirlenmiştir. Bu sonuçlara, göre erkek ve kadın hastalarda kültür ve EIA yöntemleri sonuçları arasında korelasyonun sırasıyla %73 ve %70 olduğu belirlenmiştir.

Kültürü negatif olan toplam 90 hastanın 3'ünde antijen pozitifliğinin saptanması, enfeksiyondan sonra *Legionella* antijenürisinin bir yıla yakın süre devam etmesine bağlı olabilir. Ayrıca bu durum, enfeksiyonun ileri dönemlerinde bakterinin kültür yöntemleri ile izolasyon şansının azaldığını da açıklamaktadır. Dolayısıyla akut enfeksiyonun tanısında bu konular dikkate alınmalıdır.

Hackman ve arkadaşları^{13,26} *Legionella* pnömonili hastada EIA ve RIA yöntemleri ile yaptıkları idrar antijeni araştırmasında EIA ile %88, RIA yöntemi ile %77 oranında antijen pozitifliği saptamışlar ve bu iki yöntemin özgüllüğünün

%100, uyumluluğunun %95 olduğunu belirtmişlerdir. Bakteri antijenlerinin idrarla atılmasını inceleyen diğer bir çalışmada Ruf ve arkadaşları¹⁷, DFA, IFA, RIA ve ELISA yöntemlerini uygulamışlar ve *L.pneumophila* SG1 enfeksiyonlarının tanısında idrar antijenlerinin gösterilmesinin %86 duyarlılığa sahip olduğunu belirtmişlerdir. Birtles ve arkadaşları¹¹ da, ELISA yönteminin duyarlılığını %84 oranında tasbit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar, lateks aglütinasyon yönteminin duyarlılığının ise ELISA ve RIA yöntemlerine göre çok daha az olduğunu ifade etmektedir^{10,18}. Bizim çalışmamızda ise idrarda *L.pneumophila* SG1 antijen tesbitinde EIA yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %96 olarak bulunmuş ve bu yöntemin, kültür yöntemi ile iyi bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Ülkemizde *L. pneumophila* ile ilgili olarak yapılan çalışmalar arasında^{14,19-21}, idrar antijenlerinin saptanması ile ilgili bir bulguya rastlayamadığımızdan, karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır. Ancak bu oranların desteklenmesi için daha fazla sayıda hasta grupları ile çalışılması yararlı olacaktır.

Alaçam¹⁹, mikroaglütinasyon yöntemiyle *L.pneumophila* serogrup 1-6 antijenleriyle yaptığı seroepidemiolojik çalışmasında, serogrup 1 enfeksiyonlarının diğerlerinden daha az olduğunu belirtilmiştir. Kocabeyoğlu ve arkadaşları²⁰, tüberkülozlu hastaların serumlarında IFA tekniği ile *L.pneumophila* SG 1-4' e karşı antikor düzeylerini araştırmışlar ve %10.6 oranında seropozitiflik saptamışlardır. Yılmaz ve arkadaşları¹⁴ ise, *Legionella* pnömonili bir olguda ELISA yöntemi ile serokonversiyon saptadıklarını bildirmektedirler. Yine Öğünç ve arkadaşları²¹, böbrek transplantasyonu sonrası üçlü immünosüpresif tedavi alan iki hastada *Legionella* pnömonisi saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların bulguları ile bizim sonuçlarımız, yurdumuzda *L.pneumophila* enfeksiyonlarının azımsanamayacak oranda olduğunu ve bu enfeksiyonların çoğunun asemptomatik yada hafif seyrettiğini vurgulamaktadır. Ancak Lejyoner hastalığının klinik önemi; nozokomiyal pnömonilerin başlıca etkenlerinden birisi olması, epidemilere yol açabilmesi ve tedavisiz olgularda yüksek ölüm oranının görülmesi ile pnömoni tedavisinde ampirik olarak kullanılan kemoterapötiklerin bu hastalıkdaki yetersizliği gibi nedenlerle gittikçe artmaktadır¹⁴.

Lejyonellozis tanısında EIA yöntemi, pratik ve hızlı olması ve kültür sonuçları ile gösterdiği uyum bakımından tercih edilebilecek serolojik bir yöntemdir. Ayrıca bu yöntemin rutin kullanımdaki avantajları, enfeksiyonun 3. gününden itibaren 1 yıla kadar yani hem akut hem de kronik dönemlerde tanı konulabilmesi, monoklonal tavşan *L.pneumophila* SG1 antikorlarının diğer serogruplarla ve bakterilerle çapraz reaksiyon vermemesi, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması sayılabilir. Testin ekonomik olmaması ve sadece serogrup 1 tanısında kullanılabilmesi ise dezavantaj olarak görülebilir. Yine de *Legionella* pnömonilerinin %50'sinin *L.pneumophila* SG1 tarafından oluşturulduğu ve en basit kültür yöntemlerinin bile pahalı olduğu düşünülürse, bu dezavantajlar gözardı edilebilir.

Sonuç olarak, ülkemizde özellikle kültür yönteminin uygulanamadığı durumlarda lejyonellosis tanısı için EIA ile idrar antijenlerinin saptanmasının, kolay uygulanabilir ve kısa zamanda sonuç veren bir yöntem olduğunu ve özellikle erken tanıda güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Eldestein PH: Legionella, pp: 373-381. In: Lennette EH (Ed), Manual of Clinical Microbiology, 1985, 4th ed. Amer Soc Microb, Washington DC.
2. Rodgers FG, William P: Legionnaires' diseases, pp: 442-453. Manual of Clinical Microbiology, 1991. 5th ed. Amer Soc Microb, Washington DC.
3. Murray PR, Drew WL, Kabayashi GS, Thompson JH: Legionella, pp: 159-166. Medical Microbiology, 1990. 9th ed., C V Mosby Company, St. Louis.
4. Salyers AK, Whitt DD: Bacterial pathogenesis a molecular approach, pp: 301-306. 1994. Amer Soc Microb, Washington DC.
5. Hall MAL, Verbon A, Huisman MV, et al: Reinfection with Legionella pneumophila documented by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Clin Infect Dis 1994, 19: 1147-1149.
6. Bilgehan H: Alt solunum yolu enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı, L.pneumophila için yapılacak işlemler, s: 341. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 1995, 2. baskı, Barış Yayınları, İzmir.
7. Centers For Disease Control: Legionella Cultures, pp: 1-5. Department of Public Health Service, 1980.
8. Hughes MS, Steele TW: Occurrence and distribution of Legionella species in composed plant materials. Appl Environ Microbiol 1994, 60: 2003-2005.
9. Darelid J, Bengtson L, Gastrin B, et al: An outbreak of Legionnaires' Disease in a Swedish Hospital. Scand J Infect Dis 1994, 26: 417-425.
10. Leland DS, Kohler RB: Evaluation of the L-Clone Legionella pneumophila SG1 urine antigen Latex Test. J Clin Microbiol 1991, 29: 2220-2223.
11. Oliverio MJ, Fisher MA, Vickers RM, et al: Diagnosis of Legionnaires' Disease by Radioimmunoassay of Legionella antigen in pleural fluid. J Clin Microbiol 1991, 29: 2893-2894.
12. Birtles RJ, Harrison TG, Samuel D, Taylor AG: Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosing Legionella pneumophila SG1 infection. J Clin Pathol 1990, 43: 685-690.
13. Hackman BA, Plouffe J, Benson RF, et al: Comparison of Binax Legionella urinary antigen kit with Binax RIA urinary antigen kit for detection of Legionella pneumophila SG1 antigen. J Clin Microbiol 1996, 34: 1579-1580.
14. Yılmaz G, Badur S, Çetin ET, Çelikel T: Serokonversiyonun ELISA ile belirlendiği bir legionella pnömonisi olgusu. Enfeksiyon Derg 1991, 5: 71-73.
15. Karius NC, Cursons RT, Leng RA, et al: Community acquired pneumonia: Aetiology and prognostic index evaluation. Thorax 1991, 46: 413-418.
16. Kohler RB, Wilde C, Johnson, W, et al: Immunologic diversity among serogroups 1 Legionella pneumophila urinary antigens demonstrated by monoclonal antibody Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay. J Clin Microbiol 1988, 26: 2059-2063.
17. Ruf B, Schurmann D, Horbach I, Fehrenbach FJ, Pohle HD: Prevalence and diagnosis of Legionella pneumophila: A 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. J Infect Dis 1990, 162: 1341-1348.
18. Sathapatayavovgs B, Kohler RB, Wheat LJ, et al: Rapid diagnosis of Legionnaires' Disease by Latex Agglutination. Am Rev Respir Dis 1983, 127: 559-562.
19. Alaçam R: Ankara'da Legionella pneumophila serogrup 1-6 antijenlerine karşı antikor düzeyleri ve normal titre üst sınırının belirlenmesi. Doçentlik Tezi, 1982, Ankara.
20. Kocabeyoğlu Ö, Emekdaş G: Akciğer tüberkülozlu hasta serumlarında Legionella pneumophila antikorlarının araştırılması. Sağlık Dergisi 61:27-33.
21. Ögünç G, Özdemir T, Vural T ve ark: Böbrek transplantasyonu sonrası gelişen Lejyoner Hastalığı. Mikrobiyol Bül 1993, 27: 137-142.