مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۹۵/هفته اول شهریورماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۲

ردیابی باکتری لژیونلا در آب برج‌های خنک‌کننده

فرزانه بقال اصغری[۱]، دکتر مهناز نیک آئین[۲]، مریم حاتم‌زاده[۳]، مرضیه وحید دستجردی[۴]، اکبر حسن‌زاده[۵]

چکیده

مقدمه: لژیونلا باکتری گرم منفی و بدون اسپور می‌باشد که از منابع آبی متعددی جدا شده است. این باکتری دو نوع بیماری به نام‌های لژیونلوزیس و تب پونتیاک ایجاد می‌کند که انتقال آن‌ها به انسان از طریق آئروسل‌های ایجاد شده از منابع آبی آلوده به این ارگانیسم صورت می‌گیرد. برج‌های خنک‌کننده به طور معمول به عنوان یک منبع شیوع بیماری محسوب می‌شوند. بنابراین مطالعه‌ی حاضر به منظور ردیابی این باکتری در برج‌های خنک‌کننده طرح‌ریزی گردید.

روش‌ها: در این مطالعه ۳۳ نمونه از آب برج‌های خنک‌کننده برداشت گردید. نمونه‌ها بعد از اندازه‌گیری دما و pH به آزمایشگاه منتقل شدند و جهت ردیابی باکتری به دو روش کشت و Polymerase chain reaction (PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه همچنین اندازه‌گیری کدورت، آهن، منگنز، روی، مس و شمارش باکتری‌های هتروتروفیک نمونه‌ها نیز انجام گرفت.

یافته‌ها: با استفاده از روش کشت ۱۵ درصد نمونه‌ها و با استفاده از روش Nested PCR ۷۰ درصد نمونه‌ها آلوده به انواع لژیونلاها گزارش شدند. نتایج تست‌های تکمیلی نشانگر وجود لژیونلا پنوموفیلا به عنوان گونه‌ی اصلی بیماری‌زا در نمونه‌های آلوده بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که برج‌های خنک‌کننده منبعی بالقوه در انتشار باکتری لژیونلا می‌باشند. بنابراین جهت جلوگیری از بروز بیماری‌های وابسته به این باکتری به خصوص در محیط‌های بیمارستانی که افراد حساس و دارای نقص ایمنی وجود دارند، ردیابی باکتری و به کارگیری روش‌های مؤثر جهت کنترل باکتری ضروری می‌باشد.

واژگان کلیدی: لژیونلا، PCR، برج خنک‌کننده، آب

مقدمه

لژیونلاها باسیل‌های کوچک، هوازی و گرم منفی به ابعاد ۲ × ۰/۷-۰/۵ میکرون هستند که توانایی بقا در آب‌های با درجه حرارت و pH گوناگون، مواد مغذی و اکسیژن را دارند (۱). لژیونلا پنوموفیلا عامل اصلی بیماری لژیونر و تب پونتیاک، اولین بار در سال ۱۹۹۷ به دنبال شیوع پنومونی حاد در فیلادلفیا گزارش شد (۲). از آن به بعد این باکتری از منابع متعدد و از محیط های مختلف آبی و خاکی جدا شد و مشخص شد که این باکتری می‌تواند در همه‌ی منابع آبی از جمله آب موجود در سیستم‌های تهویه، آب‌های سطحی، آب شیر، برج‌های خنک‌کننده و آب گرم بیمارستان‌ها وجود داشته باشد و اغلب همه‌گیری‌ها از این منابع منشأ می‌گیرند (۴-۳).

بیش از ۵۲ گونه‌ی لژیونلا شناسایی شده‌اند که ۲۰ گونه‌ی آن‌ها برای انسان بیماری‌زا هستند. لژیونلا

[۱] مربی، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی پرستاری و بهداشت خوی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
[۲] دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۳] کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۴] کارشناس ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۵] مربی، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مهناز نیک آئین
Email: nikaeen@hlth.mui.ac.ir

پنوموفیلا خود دارای ۱۵ گونه‌ی سرمی متفاوت است و گونه‌ی یک آن عامل ۸۲ درصد اپیدمی‌ها و موارد تک گیر می باشد (۶-۵). مشخص شده است که انتقال میکروب از راه هوا، عامل اصلی انتقال بیماری می‌باشد. این باکتری از طریق استنشاق ذرات ریز آب حامل باکتری در دستگاه تنفسی انسان جایگزین می‌شود و منجر به بیماری می‌گردد (۷). تعداد باکتری‌های استنشاق شده به اندازه‌ی آئروسل‌های تولید شده (بیشترین خطرات را ذرات کوچک تر از ۵ میکرومتر دارند)، پراکندگی ذرات در هوا و زمان مواجهه با آن‌ها بستگی دارد.

لژیونلاها دو نوع بیماری مستقل کلینیکی را ایجاد می‌نمایند. یکی بیماری لژیونر که یک بیماری شدید با درگیری چند ارگان می‌باشد و دیگری تب پونتیاک است که نوعی بیماری خود به خود محدود شونده‌ی شبیه آنفولانزا می‌باشد (۷، ۵، ۲). افراد پیر، سالخورده، معتاد و همچنین اشخاص مبتلا به نقص ایمنی و نیز بیمارانی که به هر دلیل، سیستم دفاعی بدن شان تضعیف شده است، مورد تهدید جدی این نوع عفونت می‌باشند (۹-۸).

لژیونلاها در ارتباط نزدیکی با آمیب‌های دارای زندگی آزاد مثل آکانتامبا، پروتوزوئرها و سیانوباکتری‌ها زندگی می‌کنند و درون آن‌ها به عنوان یک انگل درون سلولی به سر می‌برند. این آمیب‌ها به عنوان محافظت کننده‌ی لژیونلاها در طبیعت و تکثیردهنده‌ی آن‌ها در برج‌های خنک‌کننده دارای اهمیت می‌باشند؛ چرا که پناه گرفتن لژیونلا در کیست تک یاخته‌ها باعث زنده و فعال باقی ماندن آن‌ها در شرایط خشک و مدت زمان طولانی‌تر می‌شود و تا زمانی که آئروسل های محتوی باکتری توسط انسان استنشاق شوند، مدتی در فضا به صورت معلق باقی می‌مانند (۱۱-۱۰).

کشت باکتری لژیونلا هنوز روشی معمول در شناسایی باکتری به شمار می‌رود، ولی با توجه به مشکلات روش کشت از جمله حساسیت کمتر آن و با توجه به این که جهت جداسازی لژیونلا از نمونه‌ها مدت زمان طولانی (حداقل ۷ روز) نیاز می‌باشد، امروزه روش‌های پیشرفته‌تری از جمله PCR (Polymerase chain reaction) با استفاده از تکثیربخشی از ژن 5S rRNA و 16S rRNA مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲-۱۱، ۳).

مطالعات زیادی در سراسر جهان بر روی بیماری لژیونلوزیس صورت گرفته است. نتایج این مطالعات حاکی از آن است که سیستم‌های آبی ساخت بشر به ویژه برج‌های خنک‌کننده از عوامل اصلی شیوع لژیونلوزیس در بیمارستان‌ها و در جوامع می‌باشند (۱۳).

با توجه به نقش برج‌های خنک‌کننده به عنوان عاملی بالقوه در انتقال باکتری لژیونلا و مشکلات مرتبط با بهره‌برداری و نگهداری صحیح برج‌ها در کشور در زمینه‌ی کنترل و حذف این باکتری، بررسی آلودگی میکروبی برج های خنک کننده جهت انجام اقدامات کنترلی در پیش‌گیری از شیوع عفونت لژیونلایی ضروری می‌باشد (۱۳). بنابراین هدف از این مطالعه، ردیابی لژیونلا در آب برج های خنک کننده به ویژه برج های موجود در بیمارستان ها بود. همچنین تأثیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب بر روی وجود این باکتری در برج‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه از برج های خنک کننده‌ی بیمارستان های

وابسته به دانشگاه علوم پزشکی و همچنین از برج های خنک‌کننده‌ی کل محوطه‌ی دانشگاه اصفهان و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان نمونه برداری انجام گرفت. از هر محل یک لیتر برای روش کشت و ۵۰۰ سی سی برای روش PCR نمونه برداشت شد. ظروف نمونه‌برداری جهت بررسی باکتری لژیونلا، ظروف شیشه ای استریل بود که به طور کامل پر نشده بودند و اندکی فضای خالی جهت تأمین اکسیژن مورد نیاز ارگانیسم‌ها مد نظر قرار گرفت. نمونه‌ها بلافاصله بعد از اندازه‌گیری دما و pH به آزمایشگاه منتقل شدند و همان روز از نظر کشت میکروبی مورد آزمایش قرار می‌گرفتند.

جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای کشت و PCR در ابتدا عمل فیلتراسیون روی نمونه‌ها با استفاده از صافی ۰/۲ میکرون انجام گرفت. سپس صافی‌ها داخل ظروف حاوی آب مقطر استریل قرار گرفتند. پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در Shaker قرار گرفتند و با دور متوسط Shake شدند تا باکتری‌ها از صافی جدا و وارد محلول شوند. نمونه‌ها بعد از Shake شدن به مدت ۵ دقیقه داخل حمام اولتراسونیک قرار گرفتند تا از جدا شدن باکتری‌ها از صافی و ورود به محلول شستشو اطمینان حاصل شود.

در این مطالعه جهت کشت باکتری لژیونلا، عمل پیش تصفیه‌ی اسیدی و حرارتی روی نمونه‌ها انجام گرفت. هدف از تصفیه‌ی نمونه‌ها در واقع رفع عوامل مزاحم (سایر میکروارگانیسم‌ها) و ایجاد شرایط بهینه برای رشد لژیونلا بود.

در تصفیه‌ی اسیدی یک سی‌سی از نمونه‌ی آماده شده در لوله‌ی درب‌دار و پیچ‌دار حاوی یک سی‌سی محلول اسیدی ۰/۲ مولار KCL/HCL با pH = ۲ ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. بعد از ۱۵ دقیقه یک سی سی از محلول خنثی‌کننده‌ی قلیایی به آن اضافه گردید. pH محلول حدود ۶/۹ بود که pH مناسب برای باکتری لژیونلا می‌باشد. جهت تصفیه‌ی حرارتی، نمونه‌ها درون حمام بخار در حرارت ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس کشت داده شدند (۱۴).

برای کشت نمونه‌ها از دو نوع محیط کشت ساده و انتخابی استفاده شد. محیط کشت ساده، محیط BCYE (Buffered charcoal yeast extract) حاوی مکمل های L-cystein و پیروفسفات آهن بود و محیط کشت انتخابی همانند محیط ساده بود که مکمل انتخابی به آن اضافه شد (یک ویال CCVC به ازای هر ۵۰۰ سی‌سی). بعد از کشت نمونه‌ها در پلیت‌ها، نمونه‌ها در درجه حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با رطوبت ۹۰ درصد و دی اکسید کربن ۲/۵ درصد در انکوباتور CO_2 نگهداری شدند (۱۵-۱۴).

بعد از کشت باکتری‌ها در محیط ساده و انتخابی، با مشاهده‌ی رشد باکتری مشکوک به لژیونلا که به طور معمول ۵ تا ۷ روز به طول می‌انجامد، آزمایش‌های تأییدی جهت باکتری‌های مشکوک به لژیونلا به کار رفت. این آزمایش‌ها شامل رنگ‌آمیزی گرم، کشت روی محیط کشت BCYE بدون L-cystein، آزمایش کاتالاز، آزمایش اکسیداز، آزمایش اوره‌آز، آزمایش بلاد آگار، آزمایش هیدرولیز هیپورات و آزمایش بتالاکتاماز بود (۱۷-۱۶).

کلنی‌های مشکوکی که بعد از رنگ‌آمیزی گرم به طور ضعیف گرم منفی بودند، روی محیط کشت های L سیستئین‌دار و بدون L سیستئین ایزوله شدند. در صورتی که کلنی ایزوله شده روی محیط بدون L سیستئین رشد نمی‌کرد، ولی روی محیط L سیستئین‌دار

رشد می‌کرد، دیگر آزمایش‌های تأییدی روی نمونه‌ی مورد نظر انجام می‌گرفت. این ارگانیسم کاتالاز مثبت، به طور ضعیف اکسیداز مثبت و اوره‌آز منفی است که روی محیط بلاد آگار رشد نمی‌کند (۱).

جهت تشخیص افتراقی پنوموفیلا از سایر لژیونلاها، آزمون هیدرولیز هیپورات و آزمون بتالاکتاماز با استفاده از تست نواری انجام شد (۱۷).

در این مطالعه همچنین کشت نمونه‌ها جهت شمارش باکتری‌های هتروتروف (HPC یا Heterotrophic plate count) نیز انجام گرفت. برای این هدف، محیط کشت R_2Aagar تهیه شد و برای کشت، مقدار ۰/۲ سی‌سی از نمونه‌ها روی محیط کشت و در کنار شعله کشت داده شد و در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت دو تا سه روز نگهداری و شمارش شد (۱۴).

جهت انجام عمل PCR، در ابتدا عمل استخراج و آماده‌سازی DNA نمونه‌ها، با استفاده از عمل Freez-thaw و کیت تجاری Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Madison, USA) طبق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده انجام گرفت.

پس از استخراج DNA نمونه ها، در مرحله ی اول جهت تشخیص عمومی باکتری‌ها و اطمینان از عدم وجود عوامل بازدارنده، بخشی از ژن 16s rRNA تکثیر داده شد. جهت این کار از پرایمرهای AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-A-<G>-3´ Eubac27F 5´ و Eubac 1492R 5´-TAC-GGY-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-<T>-3´ استفاده گردید و در مرحله‌ی بعد بر روی DNA تکثیر یافته، عمل Nested PCR با استفاده از پرایمرهای LEG 448 5´- AGG-GGT-TGA-TAG-GTT-AAG-AG-<C> -3´ و LEG JRP 5´-CCA-ACA-GCT-AGT-TCA-CAT-CG -3´ جهت تشخیص باکتری لژیونلا انجام گرفت (۱۸).

جهت تکثیر DNA در هر دو مرحله از ۲۵ میکرولیتر محلول PCR حاوی بافر با غلظت 1X، dNTP با غلظت ۰/۲ میلی مولار، هر کدام از پرایمرها با غلظت ۰/۲ میکرومولار، ۲ واحد Taq DNA polymerase و ۱ میکرولیتر DNA الگو استفاده شد. در کنار نمونه‌ها یک ویال به عنوان شاهد مثبت (DNAی تهیه شده از سوش استاندارد) (FEPTU, HPA center for infections, L.pneumophila NCTC 12821, United Kingdom, London) و یک ویال دیگر به عنوان شاهد منفی (آب مقطر) در نظر گرفته شد.

محلول آماده سازی شده برای واکنش PCR در داخل میکروتیوب‌ها با برنامه‌ی دمایی زیر داخل ترموسایکلر قرار گرفت:

۱- یک چرخه‌ی ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

۲- ۳۰ چرخه به ترتیب شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد

۳- یک چرخه‌ی ۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد

۴- یک چرخه‌ی ۳ دقیقه‌ای در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد

جهت تشخیص و بررسی محصولات PCR، عمل الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز بر روی ژن تکثیر یافته ی حاصل از عمل Nested PCR، باند ۳۸۶ جفت بازی حاصل شد که با استفاده از دستگاه آشکارساز ماورای بنفش قابل مشاهده بود (UV Tech, France).

برای بررسی میزان کلر باقی‌مانده‌ی نمونه‌ها از دستگاه کلرسنج پرتابل METER RC، مقدار pH نمونه‌ها از دستگاه Corning pH meter، میزان کدورت نمونه‌ها از

دستگاه Eutech instruments turbidimeter TN-100 و جهت اندازه‌گیری آهن، منگنز، روی و مس نمونه‌ها از دستگاه جذب اتمی (Perkins-Elmer ۲۳۸۰) استفاده شد.

یافته‌ها

خصوصیات شیمیایی نمونه‌های برداشت شده از آب برج‌های خنک‌کننده در جدول ۱ ارائه شده است. همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، میزان دمای برج‌های خنک‌کننده در محدوده‌ی ۲۲/۵ تا ۲۸/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد متغیر بود و دمای بیشتر برج‌ها حدود ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. گستره‌ی pH نمونه‌ها نیز در محدوده‌ی ۹-۶ قرار داشت.

جدول ۲ نتایج به دست آمده از کشت و PCR نمونه‌ها را نشان می‌دهد. همان گونه که در جدول ۲ مشخص است، در این مطالعه در مرحله‌ی تصفیه‌ی اسیدی در دو محیط ساده و انتخابی، لژیونلایی رشد نکرد و بر اساس آزمون Cochran اختلاف معنی‌داری بین رشد لژیونلا در دو محیط ساده و انتخابی مشاهده نشد (P = ۰/۸).

در این مطالعه سعی بر این بود که در نمونه‌های مثبت از نظر وجود لژیونلا، رابطه‌ی بین HPC و لژیونلا نیز مورد بررسی قرار گیرد. نتایج به دست آمده در مورد HPC بیانگر این بود که HPC نمونه‌ها از ۸۵۰۰-۱۰۰۰ cfu در میلی‌لیتر متغیر بود (به طور متوسط ۳۰۳۱ cfu در میلی‌لیتر). میانگین لژیونلای نمونه‌های مثبت ۹۷ cfu در لیتر بود. از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین مقادیر HPC آب و وجود لژیونلا مشاهده نشد (P = ۰/۱). در شکل ۱ نمونه‌ی ایزوله شده‌ی آلوده به لژیونلا آورده شده است.

در این مطالعه همچنین ردیابی لژیونلا، از طریق دو روش کشت و PCR مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که با استفاده از روش PCR ۷۰ درصد نمونه‌ها و با استفاده از روش کشت ۱۵ درصد نمونه‌ها آلوده به لژیونلا بودند.

با توجه به آزمایش های تکمیلی انجام گرفته بر روی نمونه‌های حاصل از روش کشت (شکل ۲)، ۶۰ درصد نمونه های مثبت گزارش شده به عنوان لژیونلا پنوموفیلا شناخته شدند.

جدول ۱. خصوصیات شیمیایی نمونه‌ها

مکان برج‌ها		دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	pH	کدورت NTU	هدایت الکتریکی (میلی‌زیمنس بر سانتی‌متر)	آهن (میلی‌گرم در لیتر)	منگنز (میلی‌گرم در لیتر)	روی (میلی‌گرم در لیتر)	مس (میلی‌گرم در لیتر)
	حداقل	۲۲/۵	۶/۵	۰/۸	۰/۰۳	۰/۲	۰/۰۳۶	۰/۰۲۳	۰/۰۲۶
بیمارستان‌ها	حداکثر	۲۸/۵	۹	۴/۸	۵/۷	۱/۶	۱	۰/۶	۰/۴
	میانگین	۲۵/۷۵	-	۱/۷۷	۱/۶	۰/۵۹	۰/۲۳	۰/۲۶	۰/۱
	حداقل	۲۲/۵	۶	۰/۷	۰/۰۲	۰/۲	۰/۰۳	۰/۰۳۲	۰/۰۲۲
دانشگاه‌ها	حداکثر	۲۷	۹	۲/۵	۴/۵	۱/۵	۰/۶	۰/۵۵	۰/۴
	میانگین	۲۴/۶۵	-	۱/۵۴	۱/۸۱	۰/۵۳	۰/۲۱	۰/۲۳	۰/۰۹
	حداقل	۲۲/۵	۶/۵	۰/۸	۰/۰۳	۰/۲	۰/۰۳۶	۰/۰۲۳	۰/۰۲۶
جمع	حداکثر	۲۸/۵	۹	۴/۸	۵/۷	۱/۶	۱	۰/۶	۰/۴
	میانگین	۲۵/۷		۱/۹	۱/۷	۰/۶	۰/۳	۰/۳	۰/۱

NTU: Nephelometric Turidity Unit

www.mui.ac.ir

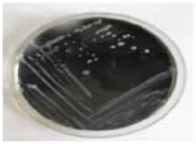
جدول ۲. نتایج کشت میکروبی و PCR آب برج‌های خنک‌کننده

آب برج‌های خنک کننده		HPC cfu/ml	کشت						لژیونلا cfu/L	PCR
			بدون پیش تصفیه		تصفیه‌ی اسیدی		تصفیه‌ی حرارتی			
			محیط کشت ساده	محیط کشت انتخابی	محیط کشت ساده	محیط کشت انتخابی	محیط کشت ساده	محیط کشت انتخابی		
بیمارستان‌ها	۱	۱۷۵۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۲	۱۸۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۳	۳۲۵۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۴	۲۰۰۰	-	+	-	-	-	-	۱۵۰	+
	۵	۱۷۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۶	۴۰۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۷	۳۵۵۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۸	۲۰۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۹	۸۵۰۰	-	-	-	-	+	-	۷۵	+
	۱۰	۳۴۵۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۱۱	۱۸۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۱۲	۳۵۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۱۳	۲۰۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۱۴	۳۴۵۰	+	-	-	-	-	-	۱۰۰	+
	۱۵	۴۲۵۰	-	+[۱]	-	-	+[۲]	+[۳]	۱ = ۵۰ ۲ = ۱۵۰ ۳ = ۶۰ Ave (۸۷)	+
	۱۶	۲۵۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+

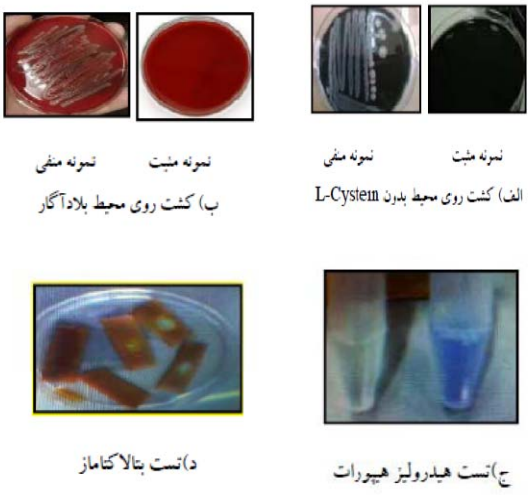
جدول ۲. نتایج کشت میکروبی و PCR آب برج‌های خنک‌کننده (ادامه)

آب برج‌های خنک کننده		HPC cfu/ml	کشت						لژیونلا cfu/L	PCR
			بدون پیش تصفیه		تصفیه‌ی اسیدی		تصفیه‌ی حرارتی			
			محیط کشت ساده	محیط کشت انتخابی	محیط کشت ساده	محیط کشت انتخابی	محیط کشت ساده	محیط کشت انتخابی		
	۱۷	۱۰۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۱۸	۱۲۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۱۹	۳۰۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۲۰	۱۸۰۰	-	+	-	-	-	-	۷۰	+
	۲۱	۲۱۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۲۲	۳۸۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۲۳	۳۵۵۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۲۴	۲۰۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
دانشگاه‌ها	۲۵	۸۴۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۲۶	۳۴۲۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۲۷	۱۷۵۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۲۸	۳۲۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۲۹	۲۵۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۳۰	۳۴۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۳۱	۴۲۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	-
	۳۲	۲۶۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	+
	۳۳	۲۶۰۰	-	-	-	-	-	-	۰	-

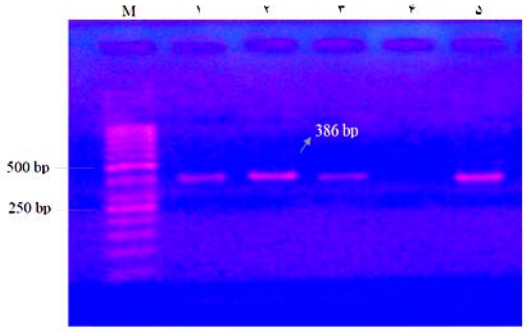
HPC: Heterotrophic plate count
PCR: Polymerase chain reaction



شکل ۱. نمونه‌ی ایزوله شده‌ی آلوده به لژیونلا



شکل ۲. نتایج تست‌های تکمیلی کشت لژیونلا: الف) کشت روی محیط بدون L-Cystein ب) کشت روی محیط بلاد آگار ج) تست هیدرولیز هیپورات د) تست بتالاکتاماز



شکل ۳. الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌ها جهت بررسی لژیونلا با پرایمرهای LEG448 و JRP بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد

M: شناساگر مولکولی (۵۰ جفت بازی)؛ ۱، ۲ و ۳: محصولات PCR؛ ۴: شاهد منفی؛ ۵: شاهد مثبت

در شکل ۳ نتایج الکتروفورز محصولات PCR جهت تشخیص باکتری های لژیونلا آورده شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روش PCR در شناسایی لژیونلا دقیق تر از روش کشت بود؛ به طوری که بر اساس آزمون آماری McNemar اختلاف معنی داری بین استفاده از روش کشت و PCR مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۱$).

بحث

از آن جایی که گزارش‌های حاصل از مطالعات بر روی عوامل لژیونلایی و نیز جداسازی و تعیین هویت گونه‌های مختلف لژیونلا، حاکی از انتشار جهانی عوامل لژیونلایی است و آلودگی ناشی از برج‌های خنک کننده به عنوان یکی از عوامل اصلی ابتلا به لژیونلوزیس در محیط های بیمارستانی و جوامع به شمار می‌رود؛ بنابراین شناسایی سریع منابع آلودگی جهت جلوگیری از بروز و مشاهده ی این بیماری ضرورت پیدا می‌کند (۱۹).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که با استفاده از روش کشت ۱۵ درصد نمونه ها (۵ نمونه) و با استفاده از روش PCR ۷۰ درصد نمونه ها (۲۳ نمونه) آلوده به لژیونلا تشخیص داده شدند. نکته‌ی مورد توجه این است که در هر دو روش کشت و PCR، درصد آلودگی بالاتری مربوط به برج‌های خنک‌کننده‌ی بیمارستان‌ها بود و لژیونلا پنوموفیلا گونه‌ی غالب جدا شده (در ۶۰ درصد نمونه‌ها) بود.

نتایج مطالعه ای که توسط Miyamoto و همکاران در خصوص شناسایی گونه‌های لژیونلا در آب برج‌های خنک‌کننده و با استفاده از روش Seminested PCR انجام گرفت، نشان داد که ۹۱/۸ درصد نمونه ها (۴۵ نمونه از ۴۹ نمونه) با استفاده از روش PCR و ۷۹/۵ درصد نمونه‌ها با استفاده از روش

کشت، آلوده به لژیونلا تشخیص داده شدند (۲۰).

مطالعه‌ی انجام گرفته توسط Mouchtouri و همکاران در خصوص شناسایی گونه‌های لژیونلا در برج‌های خنک‌کننده نیز بیانگر این بود که از ۱۳۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۶۵ نمونه (۵۰ درصد) آلوده به انواع لژیونلاها بودند که ۷۹/۷ درصد از ایزوله‌ها در نمونه‌های آلوده، لژیونلا پنوموفیلا تشخیص داده شد (۲۱). در این مطالعه که بر روی ۹۶ دستگاه برج خنک کننده انجام گرفت، از میان برج‌های مورد بررسی آلودگی در ۴۷ برج مشاهده گردید.

به طور کلی نتایج مطالعات گسترده در سراسر جهان نشان می‌دهد که برج‌های خنک‌کننده از عوامل اصلی شیوع لژیونلوزیس در بیمارستان ها و جوامع می‌باشند (۱۳). بر این اساس در بسیاری از کشورها رهنمودها و حتی قوانینی در مورد نصب برج‌های خنک‌کننده، بهره‌برداری و نگهداری از آن‌ها توسط سازمان های بهداشتی در نظر گرفته شده است. سازمان بهداشت جهانی نیز انجام طرح های سالم سازی آب شامل ضد عفونی، پایش و نگهداری منظم برج‌ها را جهت کنترل خطر عفونت لژیونلایی ناشی از این دستگاه‌ها پیشنهاد کرده است (۲۲). انجام این اقدامات اگر چه هزینه بر است، اما بر اساس گزارش سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا در کل به دلیل کنترل بیماری و صرفه‌جویی در هزینه‌های مرتبط با درمان سودمند می‌باشد (۱۳).

با توجه به این که لژیونلا باکتری گرمادوست می‌باشد و دمای مناسب برای رشد این باکتری به طور معمول بیشتر از ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد گزارش شده است (۲۴-۲۳)، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان دمای برج‌های خنک‌کننده با گستره‌ی ۲۸/۵-۲۲/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و میانگین حدود ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد جهت رشد لژیونلا خیلی مناسب نیست و لژیونلا در درصد کمتری از نمونه‌ها قادر به رشد بوده است. یافته های مطالعه ای که توسط Jeppesen و همکاران در دانمارک انجام گرفت، نشان داد که لژیونلا فقط در ۱۰ درصد نمونه‌های آب گرم با درجه حرارت بالای ۳۲ درجه‌ی سانتی گراد رشد کرده است؛ در حالی که در نمونه های آب سرد با درجه حرارت کمتر از ۲۸ درجه‌ی سانتی گراد، لژیونلا در هیچ یک از نمونه‌ها رشد نکرده بود (۲۵).

گستره‌ی pH در نمونه‌های این مطالعه در محدوده ی ۹-۶ بود. با توجه به این که محدوده ی pH مناسب برای لژیونلا ۹-۵ می‌باشد، می‌توان گفت در این مطالعه pH نمونه‌ها برای رشد باکتری لژیونلا در حد مطلوبی بوده است. در مطالعه ای که در توسط Hsu و همکاران در تایوان انجام گرفت، مشخص شد که در ۳۷/۵ درصد نمونه‌های مثبت لژیونلا pH در محدوده‌ی ۷-۵ و در ۲۰/۸ درصد نمونه‌های مثبت در محدوده‌ی ۹-۷ بوده است (۲۶).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در مرحله‌ی تصفیه‌ی اسیدی در دو محیط ساده و انتخابی، لژیونلایی رشد نکرد و بر اساس آزمون Cochran اختلاف معنی‌داری بین رشد لژیونلا در دو محیط ساده و انتخابی در دو مرحله‌ی بدون پیش تصفیه و تصفیه‌ی حرارتی مشاهده نشد. اما در مطالعه‌ای که در ایتالیا انجام گرفت، نتایج مثبت به دست آمده در مرحله ی پیش تصفیه ی حرارتی بیشتر بود و همچنین محیط های انتخابی نسبت به محیط ساده در رشد لژیونلا مؤثرتر گزارش شدند (۲۷).

در مطالعه‌ی Hsu و همکاران مشخص شد که

وجود لژیونلا با HPC بیشتر از ۵۰۰ cfu در میلی‌لیتر ارتباط دارد (۲۶)، اما در مطالعه‌ی حاضر، اگر چه ارتباط معنی‌داری بین مقادیر HPC آب‌ها و وجود لژیونلا مشاهده نشد، اما مقادیر HPC کلیه‌ی نمونه‌ها بالاتر از ۱۰۰۰ cfu در میلی‌لیتر گزارش گردید.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که روش PCR روش حساس‌تری در ردیابی باکتری لژیونلا می‌باشد؛ به گونه‌ای که با استفاده از روش PCR ۷۰ درصد نمونه‌ها و با استفاده از روش کشت ۱۵ درصد نمونه‌ها آلوده به لژیونلا گزارش شدند.

تحقیقات محققین در این زمینه بیانگر این مطلب بود که استفاده از PCR در شناسایی لژیونلای موجود در آب‌ها دقیق‌تر از روش‌های دیگر از جمله کشت بوده است؛ به طوری که نتایج نمونه‌ها با استفاده از PCR بیشتر از ۸۰ درصد مثبت بود، در حالی که تنها ۶۰-۲۰ درصد همین نمونه‌ها با استفاده از روش کشت مثبت گزارش شده بودند (۲۸).

در کل نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آلودگی برج‌های خنک‌کننده به لژیونلا می‌تواند عاملی بالقوه در انتشار و شیوع بیماری لژیونلوزیس باشد.

بنابراین جهت جلوگیری از بروز این بیماری به خصوص در محیط های بیمارستانی که افراد حساس و دارای نقص ایمنی وجود دارند، باید همانند بسیاری از کشورها به طراحی، بهره‌برداری و نگهداری برج‌های خنک کننده توجه ویژه نمود. به این منظور اقدامات کنترلی نظیر جلوگیری از سکون آب در برج های خنک‌کننده، تمیز کردن دوره‌ای برج‌ها، استفاده از آبی با کیفیت بالا و تصفیه‌ی مداوم آب به ویژه با استفاده از عوامل ضد عفونی کننده نظیر کلر باید مد نظر قرار گیرد. علاوه بر این پایش منظم کیفیت میکروبی آب به منظور بررسی اثربخشی اقدامات کنترلی و جلوگیری از شیوع بیماری لژیونلوزیس از طریق برج‌های خنک‌کننده ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر نتایج حاصل از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره‌ی ۲۸۷۰۶۲ می‌باشد. نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل فراهم نمودن بودجه‌ی این طرح کمال تشکر را دارند.

References

1. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, Twenty-Fifth Edition (LANGE Basic Science). 24th ed. New York, NY, NY: McGraw-Hill Medical; 2007.
2. Friedman H, Klein TW, Bendinelli M. Infectious Diseases and Substance Abuse (Infectious Agents and Pathogenesis). New York, NY: Springer; 2005.
3. Pepper IL, Gerba CP. Environmental Microbiology. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.
4. Chin KS, Rosli AA, Wee CSL, Ngeow YF. Isolation of legionella from cooling towers and potable water systems in hospital and non-medical buildings in a university campus. Journal of the University of Malaya Medical Centre 2005; 8(1): 23-7.
5. O'Neill E, Humphreys H. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence? J Hosp Infect 2005; 59(4): 273-9.
6. Palusinska-Szysz M, Cendrowska-Pinkosz M. Occurrence and pathogenicity of the family of Legionellaceae. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2008; 62: 337-53. [In Polish].
7. Ishimatsu S, Miyamoto H, Hori H, Tanaka I, Yoshida S. Sampling and detection of Legionella pneumophila aerosols generated from an industrial cooling tower. Ann Occup Hyg 2001; 45(6): 421-7.
8. Tello R, Hill T, Hartnell G, Costello P, Stokes K.

Case report: legionella infected thoracic aortic graft. Comput Med Imaging Graph 1993; 17(1): 61-7.
9. Ahmadinejad M, Shakibaie MR, Shams K, Khalili M. Detection of Legionella pneumophila in Cooling Water Systems of Hospitals and Nursing Homes of Kerman City, Iran by Semi-Nested PCR. International Journal of Biological and Life Sciences 2011; 7(2): 70-3.
10. Paszko-Kolva CH, Shahamat M, Colwell RR. Long-term survival of Legionella pneumophila serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. FEMS Microbiology Letters 1992; 102(1): 45-55.
11. Yasmon A, Yusmaniar, Karuniawati A, Bela B. Simultaneous detection of Legionella species and Legionella pneumophila by duplex PCR (dPCR) assay in cooling tower water samples from Jakarta, Indonesia. PCR for simultaneous detection of Legionella species 2010; 19(4): 223-7.
12. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. Appl Environ Microbiol 2001; 67(9): 3985-93.
13. National Service Center for Environmental Publications. Legionella: Human Health Criteria Document. Washington, PA: National Service Center for Environmental Publications; 1999.
14. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, PA: American Public Health Association; 2003.
15. Leoni E, Legnani PP, Bucci Sabattini MA, Righi F. Prevalence of Legionella spp. in swimming pool environment. Water Res 2001; 35(15): 3749-53.
16. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 2007.
17. Harrison TG, Taylor AG. Phenotypic characteristics of Legionellae. In: Harrison TG, Taylor AG, editors. A laboratory manual for Legionella. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1988. p. 45–56.
18. Devos L, Clymans K, Boon N, Verstraete W. Evaluation of nested PCR assays for the detection of Legionella pneumophila in a wide range of aquatic samples. J Appl Microbiol 2005; 99(4): 916-25.
19. Yu VL, Beam TR, Jr., Lumish RM, Vickers RM, Fleming J, McDermott C, et al. Routine culturing for Legionella in the hospital environment may be a good idea: a three-hospital prospective study. Am J Med Sci 1987; 294(2): 97-9.
20. Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, et al. Development of a new seminested PCR method for detection of Legionella species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. Appl Environ Microbiol 1997; 63(7): 2489-94.
21. Mouchtouri VA, Goutziana G, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. Legionella species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. Am J Infect Control 2010; 38(1): 50-5.
22. WHO. Legionella and the prevention of legionellosis. [Online]. 2007. Available from: URL: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella/en/index.html.
23. Uzel A, Ucar F, Hames-Kocabas EE. Prevalence of Legionella pneumophila serogroup 1 in water distribution systems in Izmir province of Turkey. APMIS 2005; 113(10): 664-9.
24. Ruef CH. Nosocomial Legionnaires' disease — strategies for prevention. J Microbiol Methods 1998; 33(1): 81-91.
25. Jeppesen C, Bagge L, Jeppesen VF. Legionella pneumophila in pool water. Ugeskr Laeger 2000; 162(25): 3592-4. [In Danish].
26. Hsu BM, Chen CH, Wan MT, Cheng HW. Legionella prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. Water Res 2006; 40(17): 3267-73.
27. Leoni E, Legnani PP. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of Legionella species from hot water systems. J Appl Microbiol 2001; 90(1): 27-33.
28. Hoffman P, Friedman H, Bendinelli M. Legionella pneumophila: Pathogenesis & immunity (Infectious agents & pathogenesis). New York, NY: Springer; 2007.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 195, 1st week, September 2012 Received: 17.9.2011 Accepted: 2.7.2012

Detection of *Legionella Spp.* in Water from Cooling Towers

Farzaneh Baghal Asghari MSc[1], Mahnaz Nikaeen PhD[2], Maryam Hatamzadeh[3], Marzieh Vahid Dastjerdi MSc[4], Akbar Hassanzadeh[5]

Abstract

Background: *Legionella* are Gram negative and non-spore bacteria which are found in various natural and manmade aquatic environments. *Legionella* can cause legionnaires' disease or Pontiac fever. Inhalation of aerosols from contaminated water sources leads to *Legionella* infections or legionellosis. Contamination of waters from cooling towers with *Legionella* was recognized as a major source for legionellosis. Therefore, this study was conducted to survey the *Legionella* contamination of waters from cooling towers.

Methods: A total of 33 water samples were taken from cooling towers. After measuring temperature and pH, the samples were examined for the presence of *Legionella* in two methods of culture and polymerase chain reaction (PCR). We also evaluated turbidity, iron, magnesium, zinc, and copper content, and heterotrophic bacteria of the samples.

Findings: From the 33 cooling towers examined, 15% and 70% of the samples were positive for *Legionella* by the culture method and nested PCR, respectively. Biochemical tests showed *Legionella pneumophila* to be the main detected species in contaminated water samples.

Conclusion: The results of the study indicated that cooling towers can potentially transmit *Legionella* infections. Therefore, regular monitoring and application of control measures such as disinfection of waters of cooling towers are needed to minimize human exposure to *Legionella*, especially in hospital environments with high risk patients.

Keywords: *Legionella*, Water, Cooling tower, Polymerase chain reaction

[1] Lecturer, Department of Environmental Health Engineering, Khoy School of Nursing and Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

[2] Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, Environment Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

[3] Laboratory of Microbiology, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

[4] Department of Environmental Health Engineering, Environment Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

[5] Lecturer, Department of Statistics and Epidemiology, School of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Mahnaz Nikaeen PhD, Email: nikaeen@hlth.mui.ac.ir