ORIGINAL ARTICLE

Frequency of Legionella Pneumophila in Tap Water and Water of Infant Incubators in Guilan Hospitals, Iran

Masoumeh Ahmadi Jalali Moghadam[1,2],
Hamidreza Honarmand[1],
Sajad Asfaram Meshginshahr[3],
Bahram Soltani Tehrani[1],
Majid Nojavan[2]

[1] Cellular and Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
[2] Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
[3] Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

(Received December 16, 2012 ; Accepted February 11, 2013)

Abstract

Background and purpose: Nosocomial outbreaks of legionnaires' diseases are usually related to contamination of water sources. This survey investigated the frequency of mip gene in cold and warm water taps and water containers of infant incubators containing legionella pneumophila in hospitals of Guilan province, Iran.

Materials and methods: This cross-sectional study used 140 samples. They were collected directly from sterile containers and were concentrated by centrifuge, then transferred to buffered charcoal yeast extract including both L-cyctein, Fe^{2+} ,glycin, and vancomycin and were incubated for 2-4 days. DNA was extracted using boiling method and PCR was performed to investigate legionella, mip gene and bacterial contamination using different primers.

Results: About 8.5% of the samples contained legionella pneumophila that 11.1% were isolated from infant incubators and 5.8% were found in hot and cold tap waters. Mip gene was found in 2.8% of the samples. One third of incubator's legionella pneumophila and half of the legionella pneumophila in hot water taps contained mip gene while the samples from cold taps were not found with mip gene. About 87.2% of negative samples showed bacterial contamination.

Conclusion: Today sterile water is used in incubators, however, legionella and bacterial contaminations are considerably high. This may be due to long-term storage of water in incubator container that is a predisposing factor for biofilm formation. In this study high temperature of hot water system and high rate of free residual chlorine in tap water system were the main causes of low rate legionella contamination which did not influence the contamination rate with other bacteria.

Keywords: Legionella pneumophila, PCR, mip gene, hospital water supply

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(98): 312-321 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۸ اسفند سال ۱۳۹۱ (۳۲۱-۳۱۲)

فراوانی لژیونلا پنوموفیلا در شیر آب سرد و گرم و مخزن آب انکوباتورهای بخش نوزادان بیمارستانهای گیلان

معصومه احمدی جلالی مقدم[۱،۲]
حمید رضا هنرمند[۱]
سجاد اسفرم مشگین شهر[۳]
بهرام سلطانی تهرانی[۱]
مجید نوجوان[۲]

چکیده

سابقه و هدف: شیوع عفونت بیمارستانی لژیونلایی، اغلب با آلودگی منابع آب بیمارستانی مرتبط است. این مطالعه به منظور تعیین فراوانی توالی ژن mip در لژیونلا پنوموفیلاهای موجود در شیر آب گرم و سرد و مخزن آب انکوباتورهای بخش نوزادان بیمارستان های استان گیلان انجام شده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه صیفی- مقطعی بوده که بر روی ۱۴۰ نمونه بیمارستانی انجام شد. نمونه‌گیری با روش جمع‌آوری مستقیم آب در ظرف استریل انجام گردید. تمام نمونه‌ها پس از تراکم‌سازی با انجام سانتریفیوژ، به محیط کشت یست اکستراکت براث حاوی ال سیستئن و گلیسین و وانکومایسین انتقال داده شده و انکوبه گردیدند. استخراج DNA با روش بویلینگ- پرسیپیتاسیون انجام گردید. نمونه‌ها با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای مربوطه از نظر وجود لژیونلا پنوموفیلا و ژن mip و آلودگی باکتریایی غیر لژیونلایی بررسی شدند.

یافته‌ها: حدود ۸/۵ درصد نمونه ها لژیونلا پنوموفیلا بودند که ۱۱/۱ درصد از آب انکوباتورها و ۵/۸ درصد از آب‌های شیر سرد و گرم جداسازی شدند. حدود ۲/۸ درصد کل نمونه‌ها ژن mip داشتند. یک سوم لژیونلاهای آب انکوباتورها و نیمی از لژیونلاهای آب گرم، ژن mip داشتند ولی لژیونلا پنوموفیلاهای آب سرد فاقد ژن mip بودند. حدود ۸۷/۲ درصد از نمونه‌های فاقد لژیونلا پنوموفیلا، آلودگی با باکتری‌های گرم منفی داشتند.

استنتاج: علی‌رغم استفاده از آب مقطر در مخزن انکوباتورهای بخش نوزادان، آلودگی لژیونلایی باکتریایی چشمگیر است که علت آن می‌تواند راکد ماندن طولانی آب در مخزن انکوباتور و تشکیل بیوفیلم باشد. بالا بودن دمای مخازن آب گرم بیمارستان‌ها و کلرین باقیمانده در آب لوله کشی، علت کم بودن درصد آلودگی لژیونلایی در نمونه‌های آب گرم و سرد بوده ولی این اقدامات بر آلودگی با باکتری‌هایی دیگر بی تأثیر بوده است.

واژه های کلیدی: لژیونلا پنوموفیلا، ژن mip، PCR، مخزن آب بیمارستانی

مقدمه

لژیونلاها، باکتری‌های گرم منفی پراکنده در طبیعت و آب دوست هستند و اصولا فلور نرمال طبیعت بوده تلقی می شوند و شامل گونه‌های متعدد متشکل از ۶۰ سروتیپ می باشند(۱) که بیشتر آن‌ها می‌توانند

مؤلف مسئول: حمیدرضا هنرمند- رشت، مجتمع دانشگاه گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی E mail: honarmand@gums.ac.ir
۱. دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، رشت، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، گروه زیست شناسی، ارومیه، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۹/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۱۱/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۱۱/۲۳

بیماری ایجاد کنند. آن‌ها اغلب به صورت استنشاقی انتقال می‌یابند و به صورت اپیدمیک و اسپورادیک منجر به پنومونی می‌گردند(۲) و در افرادی که دارای نقص ایمنی هستند به شکل عفونت‌های فرصت طلب یافت می شوند. حدود ۸۵ درصد از این عفونت ها، توسط لژیونلا پنوموفیلا ایجاد می‌شوند(۴،۳). موارد شیوع عفونت بیمارستانی لژیونلایی، اغلب با آلودگی منابع آب بیمارستانی در ارتباط است(۵) و مهم‌ترین منابع انتقال‌دهنده آن، منابع آب مورد استفاده در انکوباتور بخش نوزادان و آب آلوده رسپیراتورها است(۷،۶). چند اپیدمی مختلف با منشأ برج خنک کننده سیستم تهویه مطبوع، گزارش شده است(۸). محیط‌های آبی ساخته شده توسط بشر، به ویژه سیستم‌های آب گرم، مهم ترین مخازن لژیونلا هستند(۹) لژیونلا در سیستم های آب لوله کشی بیوفیلم تشکیل می‌دهد که بقا این باکتری را تضمین می کند و بدین ترتیب می‌تواند در برابر اثر بیوشیمیایی کلرین و بسیاری از مواد گندزدای دیگر مقاومت کند(۹). انتقال باکتری به انسان به‌طور مکانیکی و در اثر استنشاق آئروسل‌های تولید شده از منابع آب و سیستم‌های تهویه مطبوع، دوش، سونا، جکوزی، ویرپول و چشمه‌های آب گرم معدنی اتفاق می‌افتد(۹،۸).

کشت، شایع‌ترین روش آزمایشگاهی نظارت بر آب‌های محیطی است و برای جداسازی و شمارش میکروبی مناسب است(۸) ولی کند و وقت گیر بوده و برای تشخیص بالینی، که به جواب سریع آزمایشگاه نیاز است، مناسب نمی باشد(۱۱) به طور معمول، وجود تعداد 10^{4}-10^{5} cfu/ml لژیونلا پنوموفیلا در آب برای انسان خطرناک است(۸). اطلاعات اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند که بیش‌ترین موارد اپیدمی با این تعداد لژیونلا، در آب اتفاق می افتد(۱۲). نکته مهم این است که لژیونلاها در شرایط خاصی از جمله در مواجهه با فقر غذایی، استرس فشار اسمزی و استرس اکسیداتیو (کلر زنی آب) به حالتی در می‌آیند که هنوز زنده هستند ولی قابل کشت نمی‌باشند(۱۳، ۱۴). در اصطلاح به آن ها انواع Viable but non culturable (VBNC) گویند که از نظر بهداشتی خطرناک می باشند زیرا می‌توانند قابلیت رشد خود را در شرایط مناسب باز یابند(۱۶،۱۵).

در سال‌های اخیر، از برای تشخیص لژیونلا روش‌های جدید حساس‌تر و سریع‌تر استفاده می‌شود. و روش PCR جهت تشخیص باکتری‌های کند رشد از جمله لژیونلا، ایجاد شده است. در چند سال اخیر روش‌های مختلف مبتنی بر PCR، برای تشخیص کیفی و کمی لژیونلا در آب و نمونه های بالینی آزموده شده‌اند. PCR روشی است که برای ردیابی ژن 16S rRNA و ژن mip مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۷). با استفاده از روش PCR موارد VBNC را نیز می‌توان تشخیص داد(۱۴). ژن mip یکی از ژن های اصلی بیماری زایی لژیونلا پنوموفیلا است(۱۷). بنابراین با یک آزمون تشخیصی PCR مبتنی بر ردیابی این ژن می‌توان به طور مستقیم، گونه‌های بیماری زا را شناسایی نمود(۱۸) و بر مشکل بالا بودن موارد منفی کاذب با کشت که در بهترین شرایط حساسیت آن ۵۰-۶۰ درصد است(۱۹) فائق آمد. هدف این مطالعه بررسی فراوانی توالی ژن mip، در لژیونلا پنوموفیلاهای موجود در شیر آب گرم و سرد و مخزن آب انکوباتورهای بخش نوزادان بیمارستان‌های گیلان، با روش غنی‌سازی انتخابی و انجام PCR است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه گذشته نگر نمونه‌گیری به روش ساده و فراگیر از ۳۳ بیمارستان صورت گرفت. از شیر آب سرد و گرم پس از ۵ دقیقه جاری شدن واز مخزن آب انکوباتورهای بخش نوزادان بیمارستان‌های مزبور، به روش جمع‌آوری مستقیم در یورین باتل، نمونه‌گیری انجام شد. مقدار ۴۸ میلی لیتر از هر نمونه، در ۴ لوله فالکون استریل تقسیم شده و در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و

رسوب حاصله که حاوی بخش اعظم جمعیت باکتریایی بود در مقدار یک میلی‌لیتر از ته مانده آب هر لوله حل گردید و تمامی آن به یک لوله فالکون واحد انتقال داده شد و در دمای ۵۰°C در بن ماری به مدت نیم ساعت قرار داده شده تا باکتری‌های همراه کاهش یابند. سپس محتویات هر لوله به یک لوله حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت یست اکستراکت براث غنی شده با اسیدیته نهایی PH =۶/۹ منتقل شدند. ان محیط غنی شده حاوی با ال-سیستئین (۰/۰۴ درصد) و نیترات فریک (۰/۲۵ g/L) بوده که برای تسریع رشد لژیونلا ضروری است و از طرفی حاوی وانکومایسین (5µg/ml) و گلیسین (۰/۳ درصد) برای مهار رشد سایر باکتری‌ها مفید می باشد سپس در دمای ۳۵°C تحت شرایط مرطوب به مدت ۳-۴ روز نگه داری گردیدند تا غنی سازی جمعیت لژیونلا احتمالی موجود در نمونه، صورت گیرد. پس از بروز کدورت بارز که نشانه رشد باکتریایی بود، تمام حجم محیط کشت در ۶ میکرو تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری تقسیم شده و در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مجموع رسوب، حاوی بخش اعظم جمعیت باکتریایی تکثیر یافته بود. سپس استخراج DNA با روش بویلینگ، در دمای۹۶°C به مدت ۱۲ دقیقه انجام شد. بعد از آن مرحله پرسیپیتاسیون با ایزوپروپانل سرد برای تخلیص DNA انجام شد. پس از استخراج DNA تمام نمونه ها توسط دستگاه نانودراپ[1] مورد ارزیابی از نظر غلظت و کیفیت DNA قرار گرفتند. جهت اجرای PCR از یک جفت پرایمر اختصاصی گونه لژیونلا پنوموفیلا که توسط Pourcel و همکاران طراحی شده بود(۲۰) استفاده گردید. بدین ترتیب تمام نمونه‌ها غربالگری شدند. سپس نمونه‌های مثبت با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی ژنmip که توسط Engleberg و همکاران از توالی‌های میانی ژن mip طراحی شده و قطعه bp ۹۹۶ تولید می‌کند بررسی شدند(۱۷). این پرایمر توسط Higa و همکاران هم مورد آزمون قرار گرفت و حساسیت بالایی نشان داده است(۲۱). بالاخره تمام نمونه‌های منفی، با استفاده از یک جفت پرایمر یونیورسال طراحی شده از بخش حفظ شده ژن 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفتند تا وجود آلودگی باکتریایی غیر لژیونلا در آن‌ها جستجو شود. توالی پرایمرهای فوق‌الذکر به صورت زیر است:

Legionella pneumophila-species specific primers (Lp-16S)
F: 5- CCTGGGCTTAACCTGGGAC -3
R: 5- CTTAGAGTCCCCACCATCACAT -3

Legionella pneumophila-mip gene specific primers (Lmip R)
F: 5- ATGATAGCTTATGACTGGTA -3
R: 5- TTCCTTTGTTCACTCAGTAT -3

Universal primer 16S rRNA
F: 5- ATC AAG TAC AGT TAG TCT TTA G-3
R: 5- ACG ATT CAA AGC TAA CTG AAT CAG T-3

در این مطالعه، از یک سویه استاندارد لژیونلا پنوموفیلا Legionella pneumophila type strain (NCTC 11192) تهیه شده از بخش میکروب شناسی دانشگاه تربیت مدرس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. مخلوط PCR به صورت زیر تهیه شد:

PCR premix[2]	10 µl
Primer (forward)	1 µl
Primer (reverse)	1 µl
ddH2o	3 µl
DNA (template)	5 µl
Total	20 µl

برنامه عملی PCR برای هر دو جفت ژن لژیونلا به صورت زیر تدوین و اجرا شد:

Initial Denaturation	94 °C	5 min	1 cycle
Denaturation	94 °C	40sec	35 cycle
Annealing	44°C	40sec	
Extension	72°C	40sec	
Final Extension	72°C	7 min	1 cycle

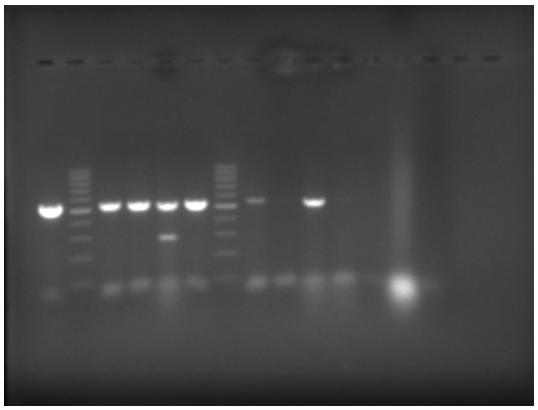
1. Thermo Scientific NanoDrop 2000 made in USA

2. Prime Taq Premix (2x) G2002 made in Korea

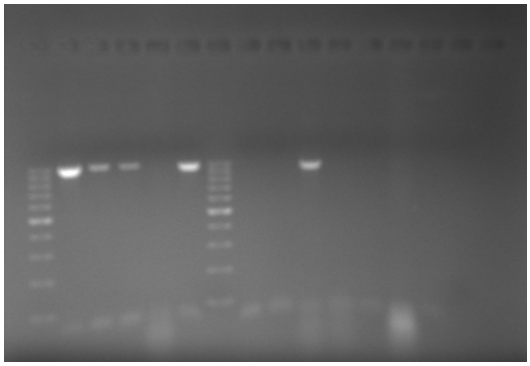
دمـای anealing برابـر ۴۶ درجـه و بـرای پرایمـر یونیورسال 16S rDNA، دمای anealing برابر ۴۶ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. در نهایت محصول توسـط ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۱۲۵ ولت و به مدت ۴۵ دقیقـه الکتروفـورز شـده و توسـط دسـتگاه ژل داک نمایـان و عکسبرداری گردید.

یافته‌ها

درمجموع تعداد ۱۴۰ نمونه از ۳۳ بیمارستان جمع‌آوری گردید. تعداد ۷۲ نمونه از انکوباتورها و ۳۴ نمونه از شیر آب گرم و ۳۴ نمونه از شیر آب سرد گرفته شد. متوسط زمان انکوباسیون جهت تسریع رشد و تکثیر باکتری بـرای نمونه آب انکوباتورها ۳ روز و بـرای نمونـه‌هـای آب شـیر سرد و گرم بیمارستان‌ها ۴ روز بود. حـدود ۱۲ درصـد از نمونه‌ها دارای غلظت ناکافی DNA و حدود ۱۹ درصـد از نمونه‌ها کیفیت DNA پایین داشتند. در مجموع تعـداد ۱۲ نمونه واجد لژیونلا پنوموفیلا بودند (۸/۵ درصد) و از این تعـداد فقـط ۴ نمونـه (۳۳/۳ درصـد) دارای ژن mip بودند (۲/۸ درصد از کل نمونه‌ها) (تصاویر شماره ۱و۲).



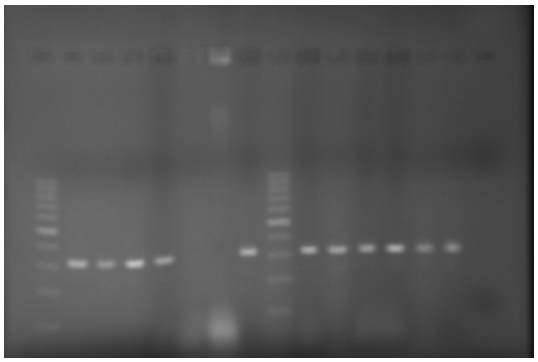
تصویر شماره ۱: نتایج PCR با پرایمر اختصاصی گونه بـرای ۱۳ نمونـه. ردیف ۱ کنترل مثبت (ژنـوم سـویه اسـتاندارد NCTC 11192 کـه بانـد اختصاصـی ۳۵۰ bp تشـکیل داده اسـت. ردیـف ۲ Lader 100bp، ردیـف‌هـای ۳و۴و۵و۶و۸و۱۰و۱۱ نمونـه‌هـای مثبـت دارای بانـد اختصاصی ۳۵۰ bp ، ردیف‌های ۹و۱۲و۱۳و۱۴و۱۵ نمونه‌های منفـی، ردیف ۱۶ کنترل منفی (آب)



تصویر شماره ۲: نتایج PCR بـا پرایمـر اختصاصـی ژن mip بـرای ۱۱ نمونـه. ردیـف ۱ و۷ Lader 100bp ، ردیـف ۲کنتـرل مثبـت (ژنـوم سویه استاندارد NCTC 11192 که باند اختصاصی ۹۹۶ bp تشـکیل داده است، ردیف ۳و۴و۶و۱۰ نمونه‌های مثبت دارای بانـد اختصاصـی ۹۹۶ bp ،ردیف های ۵و۸ و۹و۱۱و۱۲و۱۳ نمونه های منفی، ردیـف ۱۴ کنترل منفی(آب)

از ۷۲ نمونه آب انکوباتورها تعداد ۸ مـورد لژیـونلا پنوموفیلا تشخیص داده شد (۱۱/۱ درصد) که ۳ مورد از آن‌ها (۳۷/۵ درصد) ژن mip داشتند و بـه عبـارت دیگـر ۴/۲ درصد از آب انکوباتورها دارای لژیونلا پنوموفیلای واجد ژن mip بودند. از ۳۴ نمونـه آب سـرد لولـه‌کشـی بیمارستان‌ها تعداد ۲ مورد و از ۳۴ نمونـه آب گـرم شـیر بیمارستان‌ها نیز تعـداد ۲ مـورد واجـد لژیـونلا پنومـوفیلا بودنـد (هـر کـدام ۵/۸ درصـد). شـایان ذکـر اسـت کـه لژیونلا پنوموفیلا های موجود در آب سرد هیچ‌کـدام ژن mip نداشتند ولی نیمی از لژیونلا پنوموفیلا های موجـود در آب گـــرم ژن mip داشـــتند (۲/۹ درصـــد از کـــل نمونه‌هـای آب گـرم). از کـل نمونـه هـای فاقـد لژیـونلا پنومـوفیلا، تعـداد ۱۰۹ مـورد (۸۷/۲ درصـد) بـا پرایمـر یونیورسال 16S rRNA، باند اختصاصـی تشـکیل دادنـد که حاکی از آلـودگی باکتریـایی آن‌هـا بـود و چـون در محیط کشت غنی‌کننده، وانکومایسین افزوده شده بود و هر نمونه آب قبل از کشت یک مرحله تیمار حرارتـی را گذرانده بود، به نظر می‌رسد بـاکتری‌هـای مزبـور، گـرم منفی‌های فلور آب و انواع مقاوم به حرارت بـوده باشـند (تصویر شماره ۳). در صد آلودگی با این بـاکتری‌هـا در آب انکوباتورها ۸۷/۱ درصد و در نمونه‌هـای آب گـرم

۸۲/۷ درصد و در نمونه های آب سرد ۹۳/۵ درصد بود (جدول شماره ۱).



تصویر شماره ۳: نتایج PCR با پرایمر یونیورسال 16S rRNA برای ۱۳ نمونه. ردیف۱ و Lader 100bp۹ ، ردیف ۲ کنترل مثبت (ژنوم سویه استاندارد NCTC 11192 که باند اختصاصی bp ۳۲۰ تشکیل داده است، ردیف‌های ۳و۴و۵و۸و۱۰و۱۱و۱۲و۱۳و۱۴و۱۵ نمونه‌های مثبت دارای باند اختصاصی bp ۳۲۰، ردیف‌های ۶و۷و۱۳ نمونه‌های منفی، ردیف ۱۶ کنترل منفی (آب)

بحث

در اغلب مطالعات قبلی، از کشت برای جدا سازی لژیونلا استفاده شد، ولی در مطالعه ما به منظور سرعت بخشیدن به روند تشخیص از محیط کشت مایع برای غنی سازی جمعیت باکتریایی استفاده گردید در اغلب موارد به ۲-۴ روز وقت نیاز بود تا کدورت محیط کشت مایع مبنی بر رشد انبوه باکتریایی پدیدار شود. به نظر می‌رسد علت این کندی مربوط به حجم کم نمونه (۴۸ میلی لیتر) باشد، در حالی‌که در مطالعاتی که از کشت برای جداسازی باکتری استفاده شده است، از حجم زیاد آب (نیم لیتر) به عنوان نمونه و از فیلتراسیون برای متراکم سازی جمعیت باکتریایی استفاده گردید. با توجه به این نکته که مقایسه کشت و PCR در چندین مطالعه تکرار گردید و حساس تر بودن PCR تأیید شده است در این مطالعه از مقایسه دو روش مزبور خودداری شد. در مطالعه ما، برای کاهش دادن جمعیت باکتری های همراه در نمونه و برای برتری دادن جمعیت لژیونلا، از دو روش تیمار حرارتی (۵۰°C به مدت ۳۰ دقیقه) و افزودن گلیسین و آنتی بیوتیک (وانکومایسین) استفاده شد. این دو روش در مطالعات قبلی تأیید شده اند. افزودن گلیسین به محیط کشت اختصاصی لژیونلا جهت انتخابی کردن محیط کشت و مهار رشد باکتری های همراه، اولین بار توسط Wadosky و همکاران صورت گرفت(۲۲). محیط کشت حاوی گلیسین برای جداسازی گونه های لژیونلا از نمونه های محیطی مناسب است. مطالعه Yee و همکاران (۱۹۸۲) نشان داد که لژیونلا ها می‌توانند در دمای ۴۲°C رشد و تکثیر یابد و در دمای ۵۰°C زنده می ماند و این دما می تواند در شیر آب گرم لوله کشی، تانک آب گرم و برج خنک کننده زنده باقی مانده و تکثیر یابد(۲۳). علت بیشتر جدا شدن لژیونلا در منابع آب گرم را به این نکته می‌توان نسبت داد ولی دماهای بالاتر از ۵۰°C برای لژیونلا مهارکننده است، به ویژه دماهای بالاتر از دمای ۵۵°C را می‌توان برای کنترل جمعیت لژیونلا در آب بکار برد، در مطالعه ما علت کم بودن موارد مثبت در نمونه های آب گرم بیمارستان‌ها را می‌توان به این نکته نسبت داد، زیرا در اغلب بیمارستان‌های ایران، دمای مخزن آب گرم را ۶۰°C و حتی بالاتر تنظیم می نمایند.

مطالعه Legnani و همکاران (۲۰۰۲) که بر روی ۱۲۱ نمونه آب گرم مرکز بهداشتی و درمانی شهر بولونی ایتالیا صورت گرفت، نشان دادکه تراکم جمعیت لژیونلا در آب گرم با دمای آب رابطه معکوس دارد (۲۴). مطالعه Darelid و همکاران (۲۰۰۲) نیز نشان د اد که با تنظیم کردن دمای مخزن آب گرم بیمارستان بالاتر از ۵۵°C، وقوع پنومونی در بیمارستان مورد مطالعه آن‌ها که قبلا یک اپیدمی لژیونلایی را تجربه کرده بود، بسیار کاهش یافت و آنرا روش کنترل موثری ارزیابی کردند(۲۵).

شایان ذکر است که در اغلب بیمارستان‌های کشورهای اروپایی و آمریکایی برای اجتناب از بروز موارد سوختگی با آب گرم، دمای مخازن آب گرم

حدود ۵۰°C تنظیم و نگهداری می شود و به همین دلیل هنوز آب گرم منشأ پنومونی های بیمارستانی لژیونلایی قلمداد می‌شود. مطالعه Meenhorst و همکاران (۱۹۸۵) که بر روی تعداد ۲۱ مورد پنومونی لژیونلایی یک بیمارستان دانشگاهی هلند و با ایزوله کردن باکتری از ترشحات تنفسی و سروتایپینگ آن‌ها صورت گرفت، نشان داد که سروگروپ های باکتری های ایزوله شده از بیماران و ایزوله شده از سیستم آب گرم یکسان بوده است(۲۶).

مطالعه Reinthaler و همکاران (۱۹۹۳) که بر روی ۲۱۰ نمونه آب سرد و گرم ۲۱ بیمارستان که با روش ایزوله کردن روی محیط کشت انتخابی صورت گرفت، نشان داد که درصد قابل توجهی از نمونه ها (۳۴ درصد) مثبت شدند(۲۷).

مطالعه Borella و همکاران (۲۰۰۵) که بر روی ۱۱۹ نمونه آب گرم هتل‌های ایتالیا صورت گرفت، نشان داد که در ۸۵ درصد از نمونه ها لژیونلا وجود داشته است که ۴۵/۸ درصد از آن‌ها لژیونلا پنوموفیلا بودند(۸). این مطالعه نشان داد که فراوانی موارد لژیونلا پنوموفیلا در آب گرم هتل‌های مطالعه شده، به سن هتل و دمای آب بستگی مستقیم داشته و با میزان کلرین باقیمانده رابطه معکوس دارد. علت کم بودن موارد مثبت در نمونه‌های آب سرد مطالعه ما را می توان به میزان کلرین باقیمانده نسبت داد. سیستم های آب سرد بیمارستان های مطالعه شده از آب لوله کشی شهر تأمین می شود که کلر زنی آن همواره بیش از حد معمول است که برای لژیونلا ها کشنده است. مطالعه Tison و همکاران (۱۹۸۳) نشان داد که جمعیت گونه های لژیونلا در آب با کلر زنی حدود ۱۰۰۰ برابر کاهش می یابد و دماهای پایین نیز تأثیر دارد، بطوری که جمعیت لژیونلا در دمای زیر ۱۵°C بسیار کم می شود و بندرت ایزوله می گردد. ضمناً، جمعیت لژیونلا پنوموفیلا در آب سرد در مقایسه با لژیونلاهای غیر بیماریزا به مراتب کمتر است(۲۸). Lin و همکاران نیز روش های افزایش دما، هیپر کلرینه کردن و پرتو ماورا بنفش را برای حذف لژیونلا از آب بیمارستان ها مؤثر دانسته اند(۲۹).

مطالعه Palmer و همکاران (۱۹۹۵) نیز نشان داد که کلر زنی جمعیت لژیونلاهای آب، بویژه جمعیت لژیونلاهای زنده و قابل کشت را کاهش می‌دهد(۳۰). در مطالعه ما علت کم بودن موارد مثبت در آب انکوباتورها به این دلیل است که در اغلب بیمارستان‌ها از آب مقطر استفاده می‌شود. Qasem JA و همکاران در مطالعه خود ایزوله‌های لژیونلا پنوموفیلا جدا شده از نمونه‌های بالینی و نمونه‌های آب بیمارستانی را با استفاده از روش تشخیصی مولکولی شناسایی و ژنوتایپینگ نمودند(۳۱).

مطالعه Joly و همکاران (۲۰۰۶) که بر روی تعداد ۲۲۳ نمونه آب آزمایشگاه‌ها و برج‌های خنک کننده و با روش Quantitative Real-Time PCR صورت گرفت نشان داد که دمای بالای ۶۰ درجه سلسیوس و کلرین باقیمانده می‌تواند جمعیت لژیونلایی آب را بسیار پایین آورد به طوری‌که با روش مزبور قابل تشخیص نباشند(۳۲). نکته قابل توجه دیگر حجم هر نمونه است که می‌تواند در حساسیت تست اثرگذار باشد. اصولا هر چه مقدار نمونه آب زیادتر باشد حاوی تعداد بیشتری باکتری خواهد بود و احتمال نتیجه مثبت بیش‌تر خواهد بود.

مطالعه Borella و همکاران (۸) و نیز مطالعه Joly و همکاران(۳۲) نشان داد که cut off تعداد باکتری برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا توسط PCR ، برابر با 10^3 ≥Cfu/L است. با توجه به نکته مزبور و با ملاحظه این‌که در مطالعه ما از مقدار ۵۰ میلی‌لیتر نمونه استفاده شده است می‌توان را برای این حجم از نمونه آب ۵۰ ≥Cfu در نظر گرفت و چون حساسیت PCR در مقایسه با کشت به مراتب بیشتر است و می‌تواند حتی تعداد ۱۰ باکتری و کمتر را ردیابی کند(۳۳)، بنابراین در مطالعه ما منفی شدن تست را نمی توان به موارد منفی کاذب نسبت داد به ویژه آن‌که در مطالعه ما از سانتریفیوژ دور بالا (۱۲۰۰۰rpm) در دمای پایین (۴°C) برای متراکم کردن باکتری های موجود در نمونه

استفاده شد و نمونه متراکم شده به مدت ۲-۴ روز در شرایط مناسب و در محیط کشت غنی‌کننده انکوبه شد تا جمعیت باکتری زیاد شود، بنابراین می‌توان بیان نمود که تقریبا تمام باکتری های موجود در هر نمونه مورد آزمایش قرار گرفتند. ضمناً نتایج ارزیابی DNA استخراج شده از نمونه ها به خوبی کارآیی بالای روش استخراج مورد استفاده را نشان می دهد. بنابراین به نظر می‌رسد که نتایج کسب شده در مطالعه ما به واقعیت نزدیک است و به نتایج مطالعه مشابه که توسط Yaslianfard و همکاران (۲۰۱۲) صورت گرفته است(۳۴) نزدیک است.

در مطالعه مزبور تعداد ۵۲ نمونه آب لوله کشی ۷ بیمارستان از نظر وجود لژیونلا پنوموفیلا، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر با روش کشت و Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت و در ۹/۶ درصد از نمونه ها لژیونلا پنوموفیلا تشخیص داده شد (در مطالعه ما ۵/۸ درصد از نمونه‌های شیر آب گرم به میزان و همان درصد از شیر آب سرد، مثبت بودند). علت این تفاوت را می‌توان به نوع نمونه‌ها نسبت داد. در مطالعه مزبور بیش از نیمی از نمونه‌ها از سر دوش ها برداشته شد که اغلب دارای بیوفیلم است و بیوفیلم مکان استقرار دائمی لژیونلا است ولی در مطالعه ما نمونه‌ها از شیر آب گرم و سرد پس از ۵ دقیقه جاری شدن اخذ گردید و بیوفیلم دخالت نداشت.

یافته قابل توجه دیگر مطالعه ما این است که نسبت بالایی از نمونه ها (۸۷/۲ درصد) در PCR، با پرایمر یونیورسال 16S rRNA مثبت شدند که نشان دهنده وجود آلودگی باکتریایی (غیر از لژیونلا پنوموفیلا) است. مطالعه مشابه توسط Stojek و همکاران (۲۰۱۱) با روش ایزوله کردن و شناسایی باکتری های گرم منفی همراه لژیونلا صورت گرفته است (۳۵) که مشخص نمود در نمونه آب‌های ذکر شده اغلب باکتری های گرم منفی همراه لژیونلا، به گونه سودوموناس آئروژینوزا و سپس به گونه‌های آئروموناس، گزانتوموناس، ویبریو و گونه فلاوباکتریوم بروه[1] تعلق داشتند. در مطالعه مزبور، میزان آلودگی باکتریایی نمونه آب های لوله کشی شهری تیمار شده با کلرین ۷۷/۵ درصد گزارش گردید که به مطالعه ما نزدیک است (۸۷/۲ درصد). همچنین در مطالعه قبلی Stojek و همکاران (۲۰۰۸) تعداد ۶۷ نمونه آب لوله کشی ۶ بیمارستان در شرق لهستان و با روش ایزوله کردن و شناسایی باکتری ها تحت بررسی قرار گرفتند و در ۴۷/۸ درصد از نمونه‌ها، لژیونلا پنوموفیلا جدا گردید و در ۷۹/۱ درصد از نمونه‌ها باکتری‌های گرم منفی غیر انتروباکتریاسه یافت شد که ۷۱/۵ درصد آن‌ها سودوموناس آئروژینوزا بودند(۳۶).شایان ذکر است که تفاوت درصد آلودگی لژیونلایی و غیر لژیونلایی نمونه آب‌های بررسی شده در مطالعات مختلف را به عوامل متنوع، بویژه شیوه تیمار آب(۳۷) و نیز اکوسیستم منبع اصلی آب نسبت داد. این مطالعه نشان داد که علی‌رغم استفاده از آب مقطر در مخزن انکوباتورهای بخش نوزادان، آلودگی لژیونلایی و باکتریایی قابل توجه است که علت آن می‌توان راکد ماندن طولانی آب در مخزن انکوباتور و تشکیل بیوفیلم دانست. به نظر می‌رسد بالا بودن دمای مخازن آب گرم و بالا بودن کلرین باقیمانده در آب لوله کشی، علت کم بودن درصد آلودگی لژیونلایی در نمونه‌های آب گرم و سرد باشد ولی این اقدامات بر آلودگی باکتریایی دیگر بی‌تأثیر می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی گیلان صورت گرفته است. بدین‌وسیله از کمک شایان خانم دکتر اشرف محبتی مبارز سپاس و قدردانی به عمل می‌آید.

1. Flavobacterium breve

References

1. Benson RF, Fields BS. Classification of genus Legionella. Semin Respir Infect 1998; 13: 90-99
2. 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. PMID: 15749313
3. Fang GD, YU VL, Vickers RM. Diseases due to the Legionellaceae (other than *Legionella Pneumophila*). Historical, microbiological, clinical and epidemiological Review. Medicine (Baltimore) 1989; 68: 116-132
4. Tronel H, Hartemann P. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and Legionella spp. Lett Appl Microbiol 2009 Jun;48(6):653-6 PMID: 19291209
5. Stout JE, Muder RR, Mietzner S, Wagener MM, Perri MB, DeRoos K, et al. Role of environmental surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national surveillance study with clinical correlations. Infect Control Hosp Epidemiol 2007 ;28(7):818-24 PMID: 17564984
6. Levin AS. Nosocomial legionellosis: prevention and management. Expert Rev Anti Infect Ther 2009 ;7(1):57-68 PMID: 19622057
7. Delgado-Viscogliosi P, Simonart T, Parent V, Marchand G, Dobbelaere M, Pierot, et al. Rapid method for enumeration of vaible *Legionella Pneumophila* and other Legionella spp in water. Appl Environ Microbiol 2005; 71(7): 4086-4096. PMID: 16000824
8. Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al. Legionella contamination in hot water of Italian hotels. Appl Environ Microbiol 2005; 71(10): 5805-5813. PMID: 16204491
9. Helbig JH, Bernander M, Castellani-Pastoris M, Etienne K, Gaia V, Lauwers S, et al. Pan-Europcan study on culture-proven Legionnaire's disease: distribution of *Legionella Pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. Eur J Clin Microb Infect Dis 2002; 21: 710-716. PMID: 12415469
10. Delgado-Viscogiosi P, Solignac L, Delattre Jm. Viability PCR, a culture-independene method for rapid and selective qunantification of viable *Legionella Pneumophila* cells in enviromental water samples. Appl Environ Microbiol 2009; 75(11): 3502-12. PMID: 19363080
11. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylors A, Limberger RJ, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of Legionella in clinical and environmental samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2008 Oct;62(2):125-32 PMID: 18621500
12. Hay J, Seal DV, Billciffe B,Freer JH. Non-cultureable *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoba castellanii* detection of bacterium using DNA amplification and hybridization. J Appl Bacteriol 1995 ;78:61-65. PMID: 7883646
13. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Study of non-cultureable legionella pneumophila cells during multiple-nutrient starvation. FEMS Microbiol Ecol 1996 ; 20 : 149-154
14. Garcia MT, Jones S,Pelaz C,Millar D,Abu Kwaik Y. *Acanthamoba Polyphaga*

resuscitates viable non- cultureable *Legionella pneumophila* after disinfection. Environ Microbiol 2007 ;9:1267-1277. PMID: 17472639

15. Dusserre E, Ginerva C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G,Etieme J,et al. A PCR-based method for monitoring Legionella pneumophila in water sample detects viable but non-cultureable legionella that can recover their cultiveability. Appl Environ Microbiol 2008;74:4817-4824. PMID: 18515476
16. Villari P,Motti E,Farullo C,Torre I. Comparison of conventional culture and PCR methods for detection of *Legionella pneumophila* in water. Lett Appl Microbiol 1998; 27: 106-110. PMID: 9750332
17. Engleberg NC, Carter C, Weber DR, Cianciotto NP, Eisenstein BI. DNA sequence of mip, a *Legionella Pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. Infect Immun 1989; 57: 1263-1270. PMID: 2925252
18. Lindsay DS, Abraham WH, Fallon RJ. Detection of mip gene by PCR for diagnosis of Legionnaire's disease. J Clin Microbiol 1994; 32: 3068-3069. PMID: 7883904
19. Qasem JA, Mustafa AS, Khan ZU. Legionella in clinical specimens and hospital water supply facilities: molecular detection and genotyping of the isolates. Med Princ Pract 2008;17(1):49-55.
20. Pourcel C, Visca P, Afshar B, D'Arezzo S, Vergnaud G,. Fry N K. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. J. Clin. Microbiol 2007. 45:1190–1199.PMID: 17251393
21. Higa F, Koide M, Shinzuto T, Nokamoto A, Miyars T, Gaja M, et al. Detection of *Legionella Pneumophila* using a nested-PCR. J Jpn Assoc Infect Dis 1992; 66: 1084-89
22. Wadowsky RM,Yee RB. Glycin containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens. Applied And Enviromental Microbiology 1981; 42(5) : 768-772. PMID: 7316506
23. Yee RB ,Wadosky RM. Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water. Applied And Enviromental Microbiology 1982; 43(6): 1330-1334. PMID: 7103487
24. Legnani PP, Leoni E, Corradini N. Legionella contamination of hospital water supplies: monitoring of private healthcare facilities in Bologna, Italy. J Hosp Infect 2002; 50(3): 220-223. PMID: 11886199
25. Darelid J, Lofgren S, Malmvall BE. Control of nosocomial legionnaires' disease by keeping the circulating hot water temperature avove 55˚ c: experience from a 10-year surveillance in a district general hospital. J Hosp Infect 2002; 50(3): 213-219. PMID: 11886198
26. Meenhorst PL,Reingold Al, Groothuis DG, Gorman GW, Wilkinson HW, McKinney RM, et al. Water-related nosocomial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 and 10. J Infect Dis 1985; 152(2): 356-364. PMID: 4031547
27. Reinthaler EF, Stattler J, Schaffler-Duling K, Weinmauer B, Marth E. comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella Pneumophila* from tap water in hospitals. J Clin Microbial 1993; 31(5): 1213-16.PMID: 8501221

28. Tison DL, Seidler RJ. Legionella incidence and density in potable drinking water supplies. Applied and Enviromental Microbiology 1983; 45(1): 337-339. PMID: 6337552
29. Lin YS, Stout JE, Yu VL, Vidic RD. Disinfection of water distribution systems for legionella. Emin Respir Infect 1998; 13(2): 147-159. PMID: 9643393
30. Palmer CJ, Bonilla GF, Roll B, Paszk-kolva C, Sangermano LR, Fujiuoka RS. Detection of legionella species in reclaimed water and air with Enviro Amp Legionella PCR kit and direct fluorescent antibody staining. Applied and Enviromental Microbiology 1995; 61(2): 407-412. PMID: 7574578
31. Al-Matawah QA, Al-Zenki SF, Qasem JA, Al-Waalan TE, Ben Heji AH. Detection and Quantification of Legionella pneumophila from Water Systems in Kuwait Residential Facilities. Journal of Pathogens 2012 ,2012 : PMID: 22888441
32. Joly P, Falconnet PA, Andre J, et al. Quantitative Real-time legionella PCR for environmental water samples: Data interpretation. Applied and Enviromental Microbiology 2006; 72(4): 2801-2808. PMID: 16597985
33. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M. Hillyard DR. Detection of legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Microbiol 2000; 38(5): 1709-1712. PMID: 10790085
34. Yaslianfard S, Mobarez AM, Fatolahzade MM. Colonization of hospital water system by *legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeroginosa*, and *Acintobacter* in ICU ward of Tehran hospital. Indian journal Pathol Microbiol 2012; 55(3): 352-356. PMID: 23032830
35. Stojek NM, Dutkiewicez J. Co-existence of Legionella and other Gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban sources. Ann Agric Environ Med 2011; 18(2): 330-334. PMID: 22216808
36. Stojek NM, Szymanska J, Dutkiewicz J. Gram-negative bacteria in water distribution systems of hospitals. Ann Agric Environ Med 2008; 15(1): 135-42. PMID: 18581992
37. Vonberg RP, Eckmanns T, Bruderek J, Rüden H, Gastmeier P. Use of terminal tap water filter systems for prevention of nosocomial legionellosis. J Hosp Infect 2005 Jun; 60(2): 159-62. PMID: 15866015