

جداسازی و تعیین هویت عوامل بیماری لژیونر از تجهیزات درمانی و منابع آب محیطی

نادر خسروشاهی* دکتر سید مجتبی موسویان**

Isolation and identification of Legionnaire's disease agents from the medical equipments and environmental water sources

N.Khosroshahi SM.Moosavian

Abstract

Background: The legionellaceae family has a single genus legionella which is a major cause of respiratory disease in human. These agents are water – born organisms with a wide distribution in natural and artificial environmental water supplies. Transmission to human may occur through contaminated aerosols.

Objective: This study was performed to isolate and identify determine the legionnaire's disease agents from the medical equipments and environmental water sources.

Methods: 210 samples were collected from hospitals and other aquatic sources in Ahwaz. The samples were examined for legionella bacteriology.

Findings: The results indicated that the legionella were present in 14 out of 210 samples. Using biochemical tests, 9 serogroups of legionella species were recognized as pneumophila and the remaining 5 serogroups were reported as other legionella species.

Conclusion: It seems that legionellas exist at the location of the sampling areas. Recognition of different serogroups of these bacteria needs more epidemiological studies.

Keywords: Legionella, Legionella pneumophila, Pneumonia, Water microbiology, Isolation

چکیده

زمینه: خانواده لژیونلاسه یک جنس لژیونلا دارد که یکی از عوامل مهم بیماری های تنفسی انسان است. لژیونلاها ارگانیسم های آبی-محیطی هستند و در طبیعت و منابع آبی ساخت انسان به طور وسیعی پراکنده هستند و انتقال آنها به انسان از طریق آئروسول های ایجاد شده از منابع آبی آلوده با این ارگانیسم صورت می گیرد.

هدف: این مطالعه به منظور جداسازی و تعیین هویت عوامل بیماری لژیونر از تجهیزات درمانی و منابع آب محیطی انجام شد.

مواد و روش ها: تعداد ۲۱۰ نمونه جمع آوری شده از منابع آبی در بیمارستان های گلستان، رازی، امام و سطح شهر اهواز، از نظر وجود لژیونلاها مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تشخیص نهایی سویه های مجزا شده از روش کشت روی محیط های اختصاصی و ویژگی های زیست شیمیایی استفاده شد.

یافته ها: از ۲۱۰ نمونه آبی جمع آوری شده، ۱۹۶ نمونه از نظر وجود لژیونلاها منفی و ۱۴ نمونه مثبت بودند. ۹ سویه از گونه پنوموفیلا و ۵ سویه باقی مانده از سایر گونه های لژیونلا بودند.

نتیجه گیری: لژیونلاها در محیط های آبی اطراف ما وجود دارند و جهت تشخیص سرگروپ های مختلف این باکتری مطالعه های همه گیرشناسی بیش تری مورد نیاز است.

کلید واژه ها: لژیونلا، لژیونلا پنوموفیلا، پنومونی، میکروب شناسی آب، جداسازی

* کارشناس ارشد دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

** استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

۱. مقدمه :

خانواده لژیونلاسه (Legionellaceae) دارای یک جنس لژیونلاست که یکی از عوامل مهم بیماری های تنفسی در انسان محسوب می شود.^(۸) لژیونلاها ارگانسیم های آبی-محیطی هستند و در طبیعت و منابع آبی ساخت انسان به طور وسیعی پراکنده اند. انتقال این عوامل به انسان از طریق آئروسول های ایجاد شده از منابع آبی آلوده با این ارگانسیم صورت می گیرد. شیوع بیماری لژیونر به میزان آلودگی منابع آبی و حساسیت افراد بستگی دارد.^(۸)

یکی از گونه های مهم شناخته شده در این جنس، گونه پنوموفیلاست که تاکنون متجاوز از ۱۵ سروگروپ آن شناسایی شده و مسوول ۹۰ درصد موارد بیماری لژیونر هستند.^(۱۱،۸) تنها سروگروپ ۱ این باکتری عامل بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت است.^(۵) گزارش های مختلف حاکی است که ۱ تا ۳ درصد پنومونی های اکتسابی از جامعه و نیز بیش از ۳۰ درصد پنومونی های اکتسابی بیمارستانی ناشی از لژیونلاها هستند.^(۴) لژیونلاها باکتری های میله ای شکل با عرض تقریبی ۰/۳ تا ۰/۹ و طول ۲ تا ۲۰ میکرومتر، چندشکلی و گرم منفی هستند، ولی رنگ گرم را به سختی به خود می گیرند.^(۵) این باکتری ها در روی محیط های معمولی آزمایشگاهی رشد نمی کنند و در اصطلاح مشکل پسند نامیده می شوند و محیط کشت اختصاصی با یک ترکیب ویژه نیاز دارند. لژیونلاها ارگانسیم های مقاومی هستند و قادرند بیش از ۱۳۹ روز در دمای اتاق و در آب مقطر زنده بمانند.^(۷) این مطالعه با هدف تعیین نقش احتمالی سیستم تهویه مطبوع، انکوباتور نوزادان، بن ماری های آزمایشگاهی، واحدهای دندان پزشکی، منابع آب خوراکی، حوضچه های موجود در پارک ها و میادین، شیرهای آب و دوش های حمام در انتقال عامل بیماری لژیونر در شهر اهواز انجام شد.

۱. مواد و روش ها :

طی یک تحقیق ۹ ماهه از خرداد لغایت اسفند ۱۳۷۹ تعداد ۲۱۰ نمونه جمع آوری شده از منابع آبی مختلف در بیمارستان های گلستان، رازی و امام و همچنین سطح شهر اهواز، از نظر وجود لژیونلاها مورد بررسی قرار گرفتند. منابع مورد نمونه برداری عبارت بودند از: سیستم های خنک کننده بیمارستانی (ایرکاندیشنرها)، انکوباتورهای نگه داری نوزادان، بن ماری های آزمایشگاهی، منابع آب خوراکی، واحدهای دندان پزشکی، شیرهای آب و دوش های حمام، حوضچه های پارک ها و میادین شهر.

ابتدا ظروف شیشه ای مناسب با گنجایش ۱۰۰ میلی لیتر آب برای نمونه گیری انتخاب و در اتوکلاو استریل شدند. نمونه های جمع آوری شده با احتیاط به آزمایشگاه میکروپ شناسی دانشکده پزشکی منتقل و مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند. سه محیط اصلی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از:

۱- محیط کشت Buffered charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) که یک محیط غیر انتخابی است و از ترکیب محیط پایه CYE Agar و مکمل رشد SR 110 تهیه می شود.

۲- محیط کشت اختصاصی BMBA که از ترکیب CYE با مکمل SR111 (شامل آنتی بیوتیک سفاماندول، پلی میکسین B و انیزومایسین) تهیه می شود.

۳- محیط کشت اختصاصی MWY با مکمل رشد SR118

هر نمونه بعد از ۱۰ دقیقه شستشو با بافر اسیدی با PH=2.2، بر روی سه محیط اختصاصی کشت داده می شد و پلیت های کشت حداکثر ۷ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری می شدند. کلنی های مشکوک به وجود لژیونلاها از نظر ماکروسکوپی مورد بررسی قرار می گرفتند و از هر کلنی مشکوک لام تهیه و با روش گرم رنگ آمیزی و از نظر

از ۱۴ سویه لژیونلای جدا شده از منابع مورد بررسی، ۹ سویه (۶۴/۳ درصد) متعلق به گونه پنوموفیلا بود. ۵ سویه باقی مانده (۳۵/۷ درصد) نیز به گونه های دیگر لژیونلا متعلق بود.

۱. بحث و نتیجه گیری :

در این مطالعه ۶/۶ درصد منابع آبی مورد بررسی آلوده به لژیونلا بودند. در تحقیق بر روی مخازن آبی شش بیمارستان در امریکا، پنج بیمارستان آلوده به لژیونلا بودند.^(۹) در بررسی دیگری بر روی سیستم های خنک کننده بیمارستانی در انگلیس (۱۹۹۴)، ۲۹ مورد از این عوامل شناسایی شدند.^(۳) همچنین در بررسی ۱۷ بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد در چندین آزمایشگاه بیمارستانی تهران، ۶ مورد آلودگی با لژیونلاها داشتند.^(۱۱)

در تحقیق حاضر یونیت های دندان پزشکی بیش ترین میزان آلودگی را بین ۷ منبع آبی مورد بررسی نشان دادند که مستلزم انجام بررسی های بیش تری است. در مطالعه انجام شده در ایتالیا نیز از ۱۰۱ نمونه برداشته شده از ۲۳ یونیت دندان پزشکی، ۲۲ سویه مختلف از لژیونلا پنوموفیلا (سرگروپ های ۳ و ۱) جدا شدند.^(۱۴) به نظر می رسد عواملی نظیر رکود آب، ایجاد رسوب، حضور میکروارگانیسم های همسفره و وفور آمیب های آزاد در آب و به ویژه درجه حرارت مطلوب رشد (۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد) مهم ترین عوامل مؤثر بر رشد و تکثیر لژیونلا هستند که به جداسازی باکتری مزبور از منابع فوق منجر می شوند.^(۴۳) نتیجه این تحقیق نشان داد که لژیونلاها نیز مانند بسیاری از باکتری های محیطی، در محیط های آبی اطراف ما وجود دارند و تماس گسترده و مستمر با انواع منابع آبی و استفاده از تجهیزات درمانی که به نوعی با یک مخزن آبی مرتبط هستند، موجب انتشار لژیونلاها از طریق آئروسل های آبی می شود. در این بین، افراد با نقص سیستم ایمنی (نوزادان و افراد مسن) یا با عوامل

میکروسکوپی نیز بررسی می شدند. کشت کلنی ها در مرحله بعد بر روی دو محیط Blood Agar و Eosine-Methylen Blue انجام می شد و بعد از ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون در شرایط مساعد رشد، مورد بررسی قرار می گرفت. از آنجا که لژیونلاها قادر به رشد بر روی هیچ کدام از محیط های معمولی نیستند، چنان چه رشدی بر روی این دو محیط دیده می شد، نمونه مربوطه از دور مطالعه حذف و عدم رشد بر روی این محیط ها تأیید کننده حضور لژیونلا در نمونه مورد آزمایش بود.^(۸۵)

به منظور تعیین گونه (species) لژیونلاهای ایزوله شده، دوباره کشت خالصی از کلنی های تأیید شده بر روی محیط BCYE تهیه و سپس با انجام آزمایش های زیست شیمیایی مختلف و مقایسه نتایج آنها با جدول استاندارد، گونه مربوطه تعیین می شد. آزمایش های زیست شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: آزمایش اکسیداز، آزمایش کاتالاز، آزمایش بتالاکتاماز، آزمایش هیدرولیز هیپورات و آزمایش تحرک.

۱. یافته ها :

نتایج حاصل از کشت ۲۱۰ نمونه آبی جمع آوری شده از منابع مختلف نشان داد، ۱۹۶ نمونه (۹۳/۴ درصد) از نظر وجود لژیونلاها منفی و ۱۴ نمونه (۶/۶ درصد) مثبت بودند.

بیش ترین میزان موارد مثبت مربوط به واحدهای دندان پزشکی بود که از ۲۱ نمونه مورد بررسی ۴ مورد (۱۹ درصد) مثبت بود. کمترین میزان موارد مثبت مربوط به شیرهای آب و دوش های حمام بود که از ۳۵ نمونه مورد بررسی تنها یک مورد (۲/۹ درصد) مثبت به دست آمد. در این تحقیق هیچ مورد مثبتی از ۲۵ نمونه برداشته شده از حوضچه های پارک ها و میادین شهر به دست نیامد (نمودار شماره ۱).

microbiology 15th ed, Lippincott company, 1997, 473-88

5. Finegold SM. Legionnaires disease still with us. *New Engl J Med* 1988;318(9):571-3

6. Fischer G, Bang H, Ludwig B et al. Crystallization and structural determination of macrophage infectivity potentiator protein (MIP) from *Legionella Pneumophila*. *Mol Microbiol* 1992; 6(10): 1375-83

7. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH et al. Isolation of *Legionella Pneumophila* from non-epidemic related habitats. *Appl Environ Microbiol* 1979; 37: 1239-42

8. Gerald L, Mandell John E, Bennett Raphael D. *Infectious diseases*. 5th ed, Churchill Livingstone, 2000, 2424-40

9. Goetz RM, Stout JE, Jacobs SL et al. Nosocomial legionnaires disease discovered in community hospitals following cultures of the water system. *Am J Infect Control* 1998; 26(1): 8-11

10. Joklik W K, Willett H P, Amos D B, Wilfert G M. *Zinsser Microbiology*. 19th ed, 1988, 588-91

11. Moosavian M, Fatholahzaden B et al. Isolation of *Legionella Pneumophila* serogroups 1,8,10 from water sources in Tehran. *Iranian Biomedical Journal* 1998; 2(2): 83-7

12. Roig J, Aguilar X, Ruiz J et al. Comparative study of *Legionella Pneumophila* and other nosocomial-acquired pneumonia. *Chest* 1991; 99(2): 344-50

13. Marrie T J W, Johnson S, Tyler C et al. Potable water and nosocomial Legionnaires disease check water from all rooms in which patient has stayed. *Epidemiol Infect* 1995; 114: 267-76

زمینه ای مناسب مانند اعتیاد، مصرف داروهای کورتیکواستروئید، ابتلا به بیماری های مزمن ریوی، دیابت، داشتن عضو پیوندی، شیمی درمانی و حتی مسافران و توریست ها بیش تر در معرض ابتلا به بیماری لژیونر هستند.^(۱۳و۱۴) ایجاد نوع حاد پنومونیک در این افراد و در صورت عدم درمان ۱۵ درصد مرگ و میر در میان آنها، ضرورت توجه بیش تر مسوولین به امر کنترل و پیشگیری از انتشار باکتری را بیش از پیش آشکار می سازد.^(۱۳و۱۴)

تخلیه آب و تمیز کردن مستمر منابع و سیستم های آبی، تعمیر و نگه داری به موقع تجهیزات، استفاده از فیلترهای باکتریولوژیک مناسب در مسیر گردش آب، افزودن مواد ضد باکتری مناسب، بالابردن درصد کلر، استفاده از دستگاه تبدیل حرارتی یا استفاده از آب استریل جهت پرکردن تجهیزات درمانی-تنفسی و انکوباکترهای نوزادان، روش های کنترل و پیشگیری از انتشار این باکتری هستند.

۱ سپاسگزاری :

بدین وسیله از همکاری خانم دکتر آذر خسروی صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

۱ مراجع :

1. Brooks G F, Butel J S, Morse S A. *Medical microbiology* 21st ed, Appleton and lange, International librairie du Liban, 1998, 273-8

2. Baron E J, Finegold S m. *Bailey and scotts' diagnostic microbiology* 8th ed, USA, Mosby company 1990, 578-83

3. Brown CM, Muorti PJ, Breiman RF et al. A community outbreak of legionnaires disease linked to hospital cooling towers. *Int J Epidemiol* 1999 Apr ; 28(2): 353-9

4. Elmer W, Koneman Stephen D, Allen William M Janda. *Diagnostic*

14.Zanetti F, Stampi S, De-Luca C et al.
Water characteristics associated with the
occurrence of Legionella Pneumophila in
dental units. Eur J Oral Sci 2000 Feb;
108(1): 22-8