# شناسایی لژیونلا در شبکه های آب وسیستم تهویه بیمارستان

اشرف محبتی مبارز[۱]، سیدرضا حسینی دوست[۲] ، داود اسماعیلی*[۲۳]

۱- میکروبیولوزیست، استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲- میکروبیولوژیست، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا۰۰۰ (عج) و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی
۳-دانشجوی Ph.D یاکتری شناسی ،دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا۰۰۰ (عج)

* نشانی برای مکاتبه : تهران- تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران – دانشگاه تربیت مدرس-دانشکده علوم پزشکی-گروه باکتری شناسی، داود اسماعیلی ، تلفن: ۸۸۰۰۴۴۳۲داخلی ۴۰۲ ،esmaeili14@Yahoo.com
دریافت مقاله: شهریور هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: آذر هشتاد و پنج

## چکیده

**سابقه و هدف:** *لژیونلا یک باکتری آبی همه جایی بوده و توانایی بقاء در آبهای با درجه حرارت و PH گوناگون ، موادمغذی و اکسیژن را دارد. سیستم های آب گرم محیط ایده آلی برای رشد مناسب این باکتری فراهم می نمایند. آب یکی از منابع معمولی انتقال دهنده لژیونلا در بیماران بستری شده در بیمارستانها می باشد. تشخیص اولیه لژیونلوزیس در داخل بیمارستانها برای درمان صحیح و کنترل و ممانعت از بروز بیماری ضروری می باشد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی لژیونلا درسیستم های توزیع آب بیمارستانی می باشد.*

**روش کار:** *در این تحقیق توصیفی نمونه های آب سرد و گرم در ظروف ۵ لیتری عاری از آلودگی جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل و سپس هر نمونه آب بلافاصله با استفاده از سیستم فیلتراسیون غشایی تغلیظ شد. محیط کشت BCYE آگار فرموله مطابق پروتکل ساخته شد. جهت حذف باکتری های مزاحم نمونه ها تیمار اسیدی و حرارتی گردیده و از هر نمونه آب تیمار شده در دو پلیت کشت و کلنی های رشد کرده از طریق ویژگیهای مورفولوژی و بیوشیمیایی شناسایی گردیدند. همچنین کلنی های رشد کرده مجددا روی محیط BCYE غنی نشده کشت داده شد و پس از اطمینان از عدم رشد انتصابشان به لژیونلا مورد تایید قرار گرفت. همچنین از متد PCR جهت تایید بعضی از نمونه های مثبت و منفی از نظر کشت و صحت کار استفاده گردید.*

**یافته ها :** *از ۱۱۰ نمونه از واحدهای سیستم تهویه ، دوش حمام و نبولایزر ۲۹ مورد مثبت با استفاده از متد کشت تشخیص داده شد. بیشترین میزان مثبت مربوط به نبولایزر و کمترین میزان مربوط به دوش حمام بود. از میزان ۲۶/۶ درصد نمونه های مثبت لژیونلا در سیستم تهویه ۱۳/۳ درصد مربوط به چیلر و ۱۳/۳ درصد مربوط به کولر بود. از میزان ۲۰ درصد نمونه های مثبت دوش حمام ۱۶/۴ درصد مربوط به دوش آب گرم و ۳/۶ مربوط به دوش آب سرد بود. میزان PH و کلر نمونه های آب با روش DPD اندازه گیری شد و میزان کلر ۰/۱۸ ، ۰/۲ ، ۰/۲۲، ۰/۳، ۰/۴، ۲/۲ بر حسب میلی گرم در لیتر و میزان PH نیز مقادیر ۶/۶ ،۶/۸، ۷/۲، ۷/۴ ،۷/۶ اندازه گیری شد.*

**نتیجه گیری:** *بیمارستان های مورد مطالعه همگی از آب تصفیه شده شهری استفاده می نمودند با این حال میزان ۲۶/۴ درصد نمونه های مربوط به آنها عامل بیماری بودند که از نوعی مقاومت یا ضدعفونی ناقص و موفقیت این باکتری خبر می دهد. روشهای رایج تصفیه و گندزدایی آب برای پاکسازی شبکه آب از این میکروارگانیسمها کافی نیست . اکثر آزمایشگاههای مرجع به خاطر اطمینان بالاتر ودقت وسرعت افزونتر در کنار کشت باکتری از روشهای تشخیصی مکمل نیز بهره می جویند. برای کنترل لژیونلا روشهای ضد عفونی کننده حرارتی ، سیستم حرارتی فوری ، هیپرکلریناسیون ، مونوکلر آمین ، دی اکسید کلراین ، یونیزاسیون مس- نقره ، استریلیزاسیون با اشعه اولتراویوله و فیلتراسیون استفاده می گردد.*

**واژگان کلیدی:** ***لژیونلا ، کنترل ،شناسایی، سیستم تهویه ، بیمارستان***

Archive of SID
www.SID.ir

لژیونلا یک باکتری هتروتروفیک شایع در شبکه آب رسانی بوده که به طور طبیعی در آبهای تازه مشاهده و همچنین به طور پلانکتونی در آب یا بیوفیلم ها زنده و از طریق تشکیل آئروسل در سیستمهای آبی وارد ریه انسان شده و پنومونی ایجاد می نماید(۱). لژیونلا یک باکتری آبی همه جایی بوده ، توانایی بقاء در آبهای با درجه حرارت و PH مختلف ، مواد مغذی و اکسیژن را دارد. سیستم های آب گرم محیط ایده آلی برای رشد مناسب این باکتری فراهم می نمایند(۲و۳).

تاکنون ۴۹ گونه از این باکتری شناسایی که منابع آبی طبیعی و مصنوعی را آلوده می نمایند. شبکه های آب موجود در بیمارستانها منبع مهم بیماری لژیونر در اینگونه مراکز محسوب می شوند(۲). انتقال لژیونلا از طریق آئرو سیلیزاسیون یا آسپراسیون آبهای آلوده حاوی لژیونلا اتفاق می افتد. همچنین زخمها نیز ممکن است از طریق تماس با آب آلوده عفونی شوند. بروز عفونتهای بیمارستانی را از طرق آب شیر ، تجهیزات درمانی تنفسی (نبولایزر ، ماسک )، دوش حمام، دستگاه بخور آب، آب بن ماری، انکوباتورهای نگهداری نوزادان، استفاده از خرده های یخ جهت رفع تشنگی بیماران تحت عمل جراحی قلب ، سوندهای بینی ، سیستم های خنک کننده (کولر و چیلر ) نشان داده اند. دستگاه تهویه مطبوع بیش از همه سبب ایجاد بیماری می شود(۴). در یک جمعیت بیمارستان همیشه بیمارانی وجود دارند که به عفونت حساس بوده و این بیماران همیشه در ریسک بالای لژیونلوزیس هستند. تشخیص اولیه لژیونلوزیس و حالات اپیدمیک در داخل بیمارستانها نه تنها برای درمان صحیح و موثر بلکه برای کنترل و ممانعت از بروز بیماری ضروری می باشد. به واسطه نسبت بالای مرگ ومیر بیماری لژیونر ومیزان شیوع مقاومت به ضد عفونی کننده های گوناگون جهت جلوگیری از انتشار گونه های لژیونلایی در محیط بیمارستان باید اقدامات موثری صورت گیرد. این مطالعه به منظور شناسایی لژویونلا در محیط بیمارستانی انجام شد.

## روش کار

نمونه های آب سرد و گرم در ظروف تمیز ۵ لیتری عاری از آلودگی جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. هر نمونه بلافاصله با استفاده از سیستم قیلتراسیون غشایی ( Multi pore nylon membrane filters, pore size , 0.22-0.45 um ) تغلیظ شد. کلیه اجزای دستگاه فیلتراسیون شامل پمپ و لوله های مربوط به آن پس از هر بار استفاده با عبور دادن آب جوش از داخل آنها استریل شدند. پس از تغلیظ هر نمونه ، فیلتر آن از دستگاه فیلتراسیون جدا شد و درون ۵۰ میلی لیتر همان نمونه آب در یک ظرف تمیز مناسب قرار گرفت تا به خوبی مخلوط شود و سپس تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. محیط کشت BCYE آگار مطابق پروتکل موجود ساخته شد(۵). از هر نمونه تغلیظ شده دو قسمت ۱۰ میلی لیتری جدا و باکتریهای مزاحم موجود در آن توسط بافر اسیدی (HCL/KCL,PH=2.2 ) در حرارت ۵۶ درجه سانتی گراد حذف شدند(۵). از هر نمونه آب دو پلیت کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور ۵ درصد دی اکسیدکربن انکوبه شدند. رشد لژیونلا در روزهای سوم تا چهارم کنترل و ثبت شد. کلنی های لژیونلا به کمک اندازه ، رنگ ، نوع و خصوصیات ویژه و خواص بیوشیمیایی تشخیص داده شدند. علاوه بر این کلنی های رشد کرده مجددا روی محیط اختصاصی BCYE غنی نشده کشت داده شد و پس از اطمینان از عدم رشد انتصابشان به لژیونلا مورد تایید قرار گرفت. همچنین از روش PCR جهت بررسی و تایید نمونه های کشت مثبت استفاده گردید.

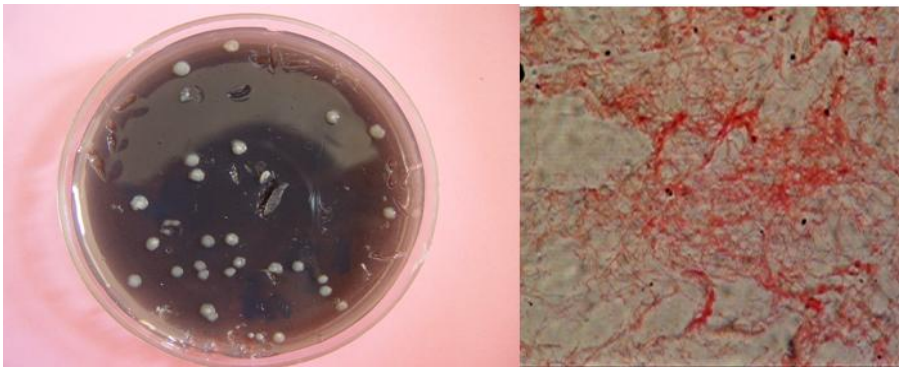
## یافته ها

در این مطالعه توصیفی حضور باکتریهای جنس لژیونلا در شبکه آب بیمارستانهای مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. در مجموع ۱۱۰ نمونه از واحدهای سیستم تهویه ،دوش حمام و نبولایزر بیمارستانهای سطح شهر تهران جمع آوری گردید( تصویر ۱ و ۲).

در بین نمونه های آزمایش شده مجموعا ۲۹ مورد مثبت لژیونلا(۲۶/۴) با استفاده از متد کشت تشخیص داده شد. آلودگی نبولایزرها، سیستم های تهویه و دوش های حمام به ترتیب ۴۰، ۲۶/۶ و ۲۰ درصد بود. از میزان۲۶/۶ درصد نمونه های مثبت لژیونلا در واحد سیستم تهویه ۱۳/۳ درصد مربوط به چیلر و ۱۳/۳ درصد مربوط به کولر می بود. از میزان ۲۰ درصد نمونه های مثبت دوش حمام میزان ۱۶/۴ درصد مربوط به دوش آب گرم و میزان ۳/۶ درصد مربوط به دوش آب سرد بود. از ۲۶ نمونه آب گرم جمع آوری شده ۹ مورد مثبت (۳۶/۴٪) و از ۸۴ نمونه آب سردجمع آوری شده ۲۰ مورد مثبت (۲۳/۸٪)گزارش گردید. میزان PH و کلر نمونه های آب با روش DPD اندازه گیری شد. میزان کلر شامل مقادیر ۰/۱۸ ،۰/۲، ۰/۲۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۲/۲ بر حسب میلی گرم در لیتر اندازه گیری شد و میزان PH نیز مقادیر ۶/۶ ،۶/۸ ، ۷/۲ ،۷/۴ و ۷/۶ اندازه گیری شد.

**تصویر۱ : لژیونلا ایزوله شده از نمونه آب بیمارستانی در روی محیط BCYE (سمت چپ)-تصویر۲ : اسمیر تهیه شده ازلژیونلا روی محیط کشت کهنه با رنگ آمیزی گرم تغییر یافتهدر کشت کهنه لژیونلا به صورت فیلامنتوس دیده می شود(سمت راست).**

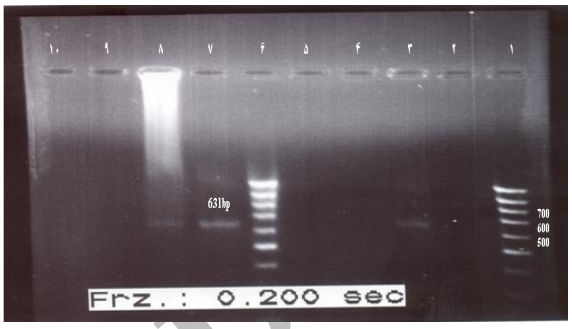
**DNA استخراج شده از نمونه های آب کشت منفی، کشت مثبت، باکتری لژیونلا با روش فریز و ذوب با نیتروژن و فنل کلروفرم**





Archive of SID
www.SID.ir

**تصویر۳: ۱--مارکر ۱۰۰ جفت بازی ، ۲- کنترل منفی ۳- نمونه آب کشت منفی ۴- نمونه آب کشت منفی ۵- نمونه آب کشت منفی ۶- مارکر ۱۰۰جفت بازی۷- باکتری لژیونلا به عنوان کنترل مثبت۸- نمونه آب کشت مثبت ۹- نمونه آب کشت منفی ۱۰- نمونه آب کشت منفی**




## بحث

عفونتهای لژیونلوزیس از عفونتهای بیمارستانی محسوب می شوند و در ایران هنوز گزارشی در خصوص میزان خطرآلودگی به آن موجود نیست. مقاومت این باکتری به ضد عفونی کننده های گوناگون و فاکتورهای ویرولانس آن این باکتری را قادر می سازد در شرایط مختلف و گوناگون محیطی زنده مانده، تکثیر یافته و سبب بیماری شود. لذا شناسایی این باکتری و کنترل آن در آبهای بیمارستانی از اهمیت به سزایی برخوردار است(۹-۶). در این بررسی ۲۶/۴ درصد نمونه های جمع آوری شده آب مصرفی بیمارستانها به لژیونلا آلوده بودند. کلیه بیمارستانهای مورد مطالعه از آب لوله کشی تصفیه شده مصرف می کردند، و به نظر می رسد که روشهای رایج تصفیه و گندزدایی آب برای پاکسازی شبکه آب از این میکروارگانیسم کافی نیست. اکثر آزمایشگاههای مرجع به خاطر اطمینان بالاتر و دقت و سرعت افزونتر در کنار کشت باکتری از روشهای تشخیصی مکمل نیز بهره می جویند(۵،۱۰). بیمارستانهای مورد مطالعه همگی از آب تصفیه شده شهری استفاده می کردند با این حال میزان ۲۶/۴ درصد نمونه های مربوط به آنها به عامل بیماری آلوده بود که از نوعی مقاومت خبر می دهد. کلر آزاد به میزان ۰/۴ میلی گرم در لیتر برای از بین بردن لژیونلا در مخازن آب کافی بوده (۱۱) ولی تحت شرایطی باکتری توانسته حتی در برابر ۵ میلی گرم در لیتر آن نیز به خوبی مقاومت کرده و زنده بماند(۱۲). این امکان وجود دارد که لژیونلا قبل از تشکیل کیست آمیب در آن پناه بگیرد و از آن به مثابه یک سنگر بیولوژیک برای تحمل شرایط کشنده محیط استفاده نماید(۱۱). این باکتری با داشتن سیستم ترشحی عمومیTatسبب تشکیل بیوفیلم، رشد در شرایط فقر آهن و تکثیر داخل سلولی می شود. به واسطه ترشح RTXA از طریق سیستم ترشحی تیپ یک در ورود به پروتوزوآ نقش دارد. همچنین به علت داشتن سیستم ترشحی تیپ دو توانایی رشد و تکثیر در درجه حرارت زیر ۲۰ درجه سانتی گراد را دارد. این باکتری به سبب داشتن لکوس ژنی helABC که افلوکس پمپهای میکروبی را در این باکتری کد می کند وهمچنین ژن rcp مقاومت دارویی و دزانفکتانی زیادی کسب نموده و دارای انتقالات ژنتیکی فوق العاده زیادی خصوصا در محیط بیوفیلم هتروژنی می باشد(۹-۷). ویژگیهای خاص این میکروارگانیسم سبب شده توجه خاصی به این باکتری مبذول گردد.

کنترل لژیونلا با ضد عفونی کننده های حرارتی ، سیستم حرارتی فوری ، هیپر کلریناسیون ، مونوکلر آمین ، دی اکسید کلراین ، یونیزاسیون مس- نقره ، استریلیزاسیون با اشعه اولتراویوله ، فیلتراسیون ، ماسکهای بیمارستانی و ضد عفونی نبولایزرها میسر است (۱۷-۱۰). فیلتراسیون درست در کانال های هواساز و کارگزاری لامپ های UVC در داخل کانال های هوا ساز، جلوی فیلتر هوا و کویلینگ کویل ها روش مناسب است. استفاده از کلر به میزان ۲-۱ میلی گرم در لیتر پیشنهاد شده ولی با وجود این استفاده از کلر به میزان ۵-۳ میلی گرم در لیتر موثرتر است(۱۸). هیپر کلریناسیون مداوم با بیش از ۲ میلی گرم در لیتر باعث فرسایش لوله ها ، خرابی سیستمهای پمپاژ و وسایل آن و تشکیل تری هالومتانها به عنوان فرآورده جانبی و هزینه زیاد می شود. غلظت کلر باقیمانده بین ۰/۶ تا ۱ میلی گرم در لیتر مشکلاتی در ارتباط با مقبولیت آب ایجاد خواهد کرد(۱۲). کلر فرار بوده و سریع در درون لوله ها از بین می رود بنابراین باید به میزان بیشتری تزریق شود و همچنین لژیونلا نسبت به کلر در حال مقاوم شدن بوده و کلر بیشتر اثر مهاری دارد. PH در کارآیی ضد عفونی کننده ها مهم می باشد و در محدوده ۵ تا ۸/۵ قابل قبول است. PH خیلی اسیدی یا خیلی بازی سبب نقص در هیپرکلریناسیون ، یونیزاسیون مس-نقره و تاثیر بیوسایدها می گردد (۱۹و۲۰). توجه دقیق به PH در کلیه مراحل تصفیه آب ضروری است تا از تصفیه و گندزدایی رضایت بخش آب اطمینان حاصل شود. کوتاهی در انجام این امر می تواند منجر به آلودگی آب و اثرات سوء بر روی بو، طعم و ظاهر آب شود. مقادیر خیلی زیاد PH می تواند ناشی از ریزش اتفاقی آلاینده ها، ازکار افتادن سیستم تصفیه و اندودکاری داخل لوله ها با روکش های ملات سیمانی که به خوبی عمل آوری نشده اند باشد(۲۰). طراحی ساختمان و سیستم ها و جلوگیری از رسوب سدیمانتها و بررسی ها و بازرسی های مناسب نقش به سزایی در کاهش آلودگی سیستم های توزیع آب دارد. در تحقیقات انجام شده توسط محققین در نقاط مختلف جهان ازافزایش رشد این باکتری در درجه حرارت بالا خبر می دهد. با توجه به اینکه نبولایزرها برای بیماران ریوی در بخش های مراقبت های ویژه و بیماران پیوندی استفاده می شوند، لذا حضور باکتری در بیماران مذکور سبب مرگ و میر بالایی می شود. بنابراین استفاده از آب استریل و تخلیه آب و شستشو با آب و صابون بعداز استفاده و شستشوی رابط ها با آب گرم بالای ۷۰ درجه و خشک نمودن لازم است. اگر این تجهیزات به طور پیوسته و طولانی توسط بیماران استفاده می شوند با این شیوه حداقل به مدت یک هفته ضدعفونی می شوند. استفاده از آب شیر، سدیمانتها ،رکود آب ، ایجاد رسوب و حضور میکروارگانیسمهای همسفره سبب افزایش رشد لژیونلا و تهدید جدی بیماران می گردد.جایگاه دوش حمام گاهی موجب پنومونی به ویژه در بیمارستانها می شوند. بعضی از مواد مانند لوله پلاستیکی سیاه درواشرهای شیر آب سرد و سردوش های پلاستیکی و حضور آمیب ها در سردوش ها رشد لژیونلاها را افزایش می دهند. لژیونلا هیدروفوبیک بوده و تمایل به تغلیظ در کف داشته و به آسانی می تواند به عنوان منبع آئروسل تا شعاع یک کیلومتری پخش شود. اپیدمی های لژیونلوزیس توسط سیتم های تهویه آلوده به علت آلودگی آب یا سیستم های توزیع می باشد. جلبک ها ، تک یاخته ها ، سدیمانتها، درجه حرارت مطلوب در این سیستم ها سبب رشد و حفاظت این باکتری در شرایط استرسی می شوند. با توجه به اینکه سیستم های تهویه دارای کانال های ارتباطی به بخش های مختلف می باشند لذا هر گونه آلودگی بیماران بستری در بیمارستانها را با تهدید جدی مواجه می کند.



Archive of SID
www.SID.ir

## REFERENCES

1. Bondero T.J. An out breaks of legionnaires disease associated with a contaminated cooling tower.New Eng J Med. 1980:302; 365-370

2. England A.c,Fraser D.W. Sporadic and epidemic nosocomial Legionellosis in the United state , epidemiology features. Am J Med , 1981:70; 707-711

3. Pruckler M.Y. Comparison of legionella pneumophila isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed field gel electrophoresis analysis, analysis from seven epidemic investigation. J Clin Microbiol. 19955:33(11);2872-5

4. Janson D.B. Antimicrobial and infectious disease new sletter. Clin Microbiol Lab . 1997: 16(10);73-77

5. Kreig R.N and Holt G.J. Bergey Manual of systematic Bacteriology 20 th ed . Williams and wilkins, London, 279-88:1984

6. Friedman S. Spitanly K. Barbaree J.M. Faur Y. MC Kinney R.M. Pontiac fever outbreak associated with a cooling tower. Am J Publ Health. 1987:77; 568-572

7. Michael A. Bachman and Michele S. The Let E protein enhance expression of multiple LetA/S-Dependent Transmission trials by Legionella pneumophila . Infection and Immunity . 2004: 72(6); 3284-3293

8. Viswanathan V.K. The Legionella pneumophila ira AB Locus is requited for iron assimilation , intracellular infection and virulence . Infection and Immunity . 2000: 68(3);1069-1079

9. Maria S. The type II protein secretion system of Legionella oneumophila promotes growth at low tempreture. J Bacteriol . 2004: 186(12); 3712-3720

10. Peiro callizo E.F. Sierra J. Santos J.M. Evaluation of effectiveness of pastormaster metod from disinfection of legionella in a hospital water distribution system .Journal of Hospital Infection . 2005: 60(2):150-157

11. Muraca P.W, Yu V.L. Goetz A. Disinfection of water distribution system for legionella : A review of application procedures and methodologies. Infect Control Hosp Epidemiol . 1990 : 11(20); 79-88

12. Alary M. and Joly J.R. Risk factors for contamination of domestic hot water systems by legionellae. Applied and Environmental Microbiology . 1991: 570;2360-2367

13. Frank P. and Janet E. Keeping Legionella out of water system s . American water works Association . 2004: 111-119

14. Nguyen M.H. Stout J.E. YU Y.L, Legionellosis , Infectious disease clinics of north America. 1991: 5(3); 561-584

15. Mooney J. and Donaghy M. Legionella in hospital water system – prevention and control measure. SCIEH. 2004: 38;1357-1493

16. Zeming L. and Janet E. Efficacy of UV light in preventing legionella colonization of a hospital water distribution of a hospital water distribution system. Wat Res . 1995:2(10); 2276-2280

17. Vonberg R.P and Eckmanns T. Use of terminal tap water filter systems for prevention of nososcomial Legionellosis . Journal of Hospital Infection . 2005: 60;159-162



Archive of SID
www.SID.ir

18. Helms C.M. Massanari R.M. Wenzel R.P. Legionnaires Disease associated with a hospital water system: A five year progress report on continous hyperchlorination . J M A. 1998: 259(16): 2423-2427

19. Yu-Sen E.L and Radisav D.V. Negative effect of high PH on biocidal efficacy of copper and silver Ions in controlling Legionella pneumophila . Applied and Environmental microbiology . 2002: 6(68); 2711-15

20. Joseph A.and Salvato M Environmental engineering sanitation. AED. 1992: 238-271

Archive of SID

www.SID.ir