View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۷، شماره ۱/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴/ ۵۸-۵۱

مقاله پژوهشی

ردیابی لژیونلا پنوموفیلا در نمونه های بدست آمده از برونکوآلوئولار لاواژ در بیماران مبتلا به پنومونی همراه با ونتیلاتور بستری در بخش مراقبت های ویژه با روش Real- time PCR

فرزین خوروش[۱]، آرزو یوسفی[۲]، محسن میدانی[۳*]، سعید عباسی[۴]، مجید یاران[۳]، محمدرضا ذوافقاری[۲]، علی رضایی[۲]، بهروز عطایی[۳]

[۱]مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۲]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۴]گروه بیهوشی، فلوشیب مراقبت های ویژه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/٤ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/٦

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:34 +0430 on Saturday August 26th 2017

چکیده:

زمینه و هدف: **لژیونلا پنوموفیلا به خاطر توانایی آن در ایجاد پنومونی ناشی از ونتیلاسیون مکانیکی مورد توجه مراکز درمانی است. هدف از این مطالعه ردیابی گونه های لژیونلا پنوموفیلا در نمونه های بدست آمده از برونکوآلوئولار لاواژ با روش Real Time PCR در بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه ی بیمارستان الزهرا(س) اصفهان می باشد.**

روش بررسی: **در یک مطالعه توصیفی تحلیلی سی و نه نمونه برونکوآلوئولار لاواژ در بیماران مبتلا به پنومونی همراه با ونتیلاتور بستری در بخش مراقبت های ویژه (ICU) بیمارستان الزهرای اصفهان در سال ۱۳۹۰ گرفته و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. DNA به روش فنل کلروفرم استخراج و آزمایش Real Time PCR در ٤٥ چرخه شامل ۹۵°C برای ٤ ثانیه و ۵۸°C برای ۳۰ ثانیه انجام شد. در حالی که پروب به روش Taq Man عمل می کرد.**

یافته ها: **نتیجه برای حضور باکتری لژیونلا پنوموفیلا در همه نمونه ها منفی شد. حداقل سن افراد در مطالعه ۲۰ و حداکثر ۸٦ سال بوده است. مدت زمان بستری افراد مورد مطالعه در ICU حداقل ۲ روز و حداکثر ٦۵ روز است. مدت زمان ونتیلاسیون افراد مورد مطالعه حداقل ۲ روز و حداکثر ٦۵ روز بود.**

نتیجه گیری: **این مطالعه عدم حضور لژیونلا پنوموفیلا در بیماران دچار پنومونی وابسته به ونتیلاتور در ICU بیمارستان الزهرای اصفهان رادریک مقطع زمانی نشان می دهد؛ لذا بر اساس مطالعه فوق، شناخت الگوی میکروبیولوژیک لژیونلا پنوموفیلا در سایر مراکز درمانی نیز امری منطقی به نظر می رسد.**

واژه های کلیدی: **پنومونی، لژیونلا پنوموفیلا، برونکوآلوئولار لاواژ.**

مقدمه:

عفونت بیمارستانی ششمین عامل مرگ در ایالات متحده آمریکاست (۱). از دهه ۱۹۸۰ پنومونی بیمارستانی بعد از عفونت دستگاه ادراری دومین عفونت بیمارستانی معمول در آمریکا شده است (۲، ۳). پنومونی اکتسابی از بیمارستان (HAP) به انواعی از پنومونی اطلاق می شود که بیمار در ابتدای حضور در بیمارستان علائمی نداشته؛ ولی بعد از ۴۸ ساعت دچار آن شده است (۴، ۵). پنومونی وابسته به ونتیلاتور (VAP) زیرمجموعه ای از HAP است و پنومونی است که از ونتیلاسیون طولانی ریشه می گیرد (۵، ۶). ونتیلاسیون مکانیکی خصیصه ضروری بخش

*نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری- تلفن: ۰۹۱۳۲۷٤۹۱٦۵، E-mail:meidani@med.mui.ac.ir

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:34 +0430 on Saturday August 26th 2017

مراقبت های ویژه (ICU) مدرن است و متأسفانه با VAP ارتباط دارد (۷). لوله گذاری و ونتیلاسیون مکانیکی خطر پنومونی را ۶ تا ۲۱ برابر می کند (۴، ۶).

هر ساله حدود ۳۰۰۰۰۰ مورد پنومونی اکتسابی از بیمارستان در آمریکا اتفاق می افتد. بیشتر موارد آن در بیماران تحت ونتیلاسون رخ می دهد و VAP دومین عفونت بیمارستانی معمول در ICU های آمریکاست (۸). میزان مرگ و میر برای VAP از ۲۰ تا ۷۶٪ در مطالعات مختلف متغیر است (۳).

در بیماران هوادهی شده لوله درون نای از دفاع دستگاه تنفسی تحتانی از جمله سرفه و پاکسازی موکوسیلیاری می گذرد. تجمع ترشحات آلوده، ساکشن نشدن و چکه کردن آن درون دستگاه تنفس، ورود باکتری ها از طریق تجهیزات پزشکی و بیوفیلم ایجاد شده در لوله، دستگاه تنفسی تحتای را آلوده می سازد. دستگاه معدی روده ای نیز می تواند منبع اصلی باکتری باشد (۲).

تشخیص میکروبی HAP به وسیله نمونه جمع آوری شده از بزاق یا خلط، تکنیک های غیر پرونکوسکوپی مانند آسپیره کیفی درون نای (Blinded Bronchial Sampling= BBS) و تکنیک های برونکوسکوپی مانند (Bronchoalveolar Lavage= BAL)، mini BAL، Protected Specimen Brush= PSB و BAL حفاظت شده هستند. انتخاب بستگی به تجربه، دسترسی و هزینه دارد (۴، ۵، ۹).

تنوعی از باکتری ها، مایکوباکتری ها، قارچ ها و انگل ها از سیستم آب بیمارستان جدا شده اند و بر عفونت های بیمارستانی اپیدمی و اندمی دلالت دارند (۷، ۸). لژیونلا ارگانیسمی است که به خاطر توانایی آن در ایجاد عفونت در افراد حساس و حضور آن در سیستم های آب گرم مورد توجه مراکز درمانی می باشد (۱۰).

چون تظاهات بالینی و رادیوگرافی برای تشخیص بیماری لژیونرها خاص نیستند تست آزمایشگاهی نیاز است. پنج تست تخصصی برای تشخیص بیماری لژیونرها مورد استفاده قرار گرفته است: سرولوژی، کشت، رنگ آمیزی آنتی بادی فلورسنت مستقیم (DFA)، آنتی ژن ادراری و واکنش رشته پلیمراز (PCR). سه مورد از این آزمایشات برای ترشحات تنفسی (DFA، PCR و کشت) و دو مورد دیگر روی خون (سرولوژی) و یا نمونه ادرار (آنتی ژن ادراری) استفاده می شوند. ۳ مورد از آزمایشات به عنوان آزمایش سریع در نظر گرفته می شوند و نتایج ظرف چند ساعت در دسترس است. DFA و PCR، آنتی ژن ادراری و کشت در آزمایشگاه های اغلب بیمارستان ها قابل دسترسی است (۱۱).

PCR توسعه مقدار جزئی DNA را امکان پذیر می سازد، نتیجه را در زمان کوتاهی آماده می کند و پتانسیل تشخیص عفونت ایجاد شده توسط گونه ها و سروگروپ های لژیونلا را دارد (۱۲). آزمایش PCR می تواند روی نمونه های مختلف انجام شود (۱۳، ۱۴).

از آنجایی که شیوع بیماری پنومونی وابسته به ونتیلاتور در بیماران بستری در ICU بسیار بالاست و عوامل ایجاد کننده این بیماری با توجه به علائم ایجاد شده از یکدیگر قابل تمیز نمی باشند محقق برآن شد تحقیقی در زمینه بررسی فراوانی نسبی گونه های لژیونلا در نمونه های بدست آمده از برونکوآلوئولار لاواژ با روش Real Time PCR در بیماران مبتلا به پنومونی همراه با ونتیلاتور بستری در بخش مراقبت های ویژه ی بیمارستان الزهراء (س) اصفهان انجام دهد.

روش بررسی:

از ۳۹ بیمار بالای ۱۸ سال مبتلا به پنومونی وابسته به ونتیلاتور که ممنوعیت انجام برونکوآلوئولار لاواژ نداشتند نمونه BAL گرفته شد و فرم اطلاعاتی مربوطه تکمیل گردید (۱۵). نمونه ها تا زمان انجام آزمایش در مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. DNA ی کل با استفاده از روش پروتئیناز K و فنل کلروفرم استخراج گردید (۱۶). سپس نمونه ها با استفاده از روش Real Time PCR از لحاظ وجود DNA باکتری لژیونلا پنوموفیلا مورد بررسی قرار گرفت. ترادف پرایمرها به صورت زیر انتخاب شد:

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:34 +0430 on Saturday August 26th 2017

Forward primer: 5 -GTA CTA ATT GGC TGA TTG TCT TGA CC-3

Reverse primer: 5 -CCT GGC GAT GAC CTA CTT TCG-3

و پروب شناسایی کننده گونه لژیونلا پنوموفیلا که به روش Taq Man عمل می کرد ترادف زیر را داشت:

(۱۷) 5 -Fam-ATC GTG TAA ACT CTG ACT CTT TAC CAA ACC TGT GG-BHQ-1-3

برای پروسه ۴۵ سیکل شامل$95^{\circ}C$ برای ۴ ثانیه و$58^{\circ}C$ برای ۳۰ ثانیه انتخاب شد.

یافته ها:

نتیجه real time PCR برای همه ۳۹ نمونه BAL منفی بدست آمد. در نمودار منحنی استاندارد هیچ یک از منحنی های مربوط به نمونه ها از حد آستانه در نظر گرفته شده بالاتر نیامدند.

۴۶/۲ درصد افراد مورد مطالعه را زنان و ۵۳/۸ درصد را مردان تشکیل می دادند. حداقل سن افراد در مطالعه ۲۰ سال و حداکثر ۸۶ سال بود. میانگین سن افراد مورد مطالعه ۲۰±۵۴ سال، ۳۵/۹ درصد افراد مورد مطالعه زیر ۵۰ سال و ۶۴/۱ درصد بالای ۵۰ سال سن داشتند. مدت زمان بستری در ICU افراد مورد مطالعه حداقل ۲ روز و حداکثر ۶۵ روز بود. میانگین مدت زمان بستری در ICU برای افراد مورد مطالعه ۱۴±۱۷ روز بود. ۲۵/۶ درصد افراد مورد مطالعه یک هفته و یا کمتر ۵۶/۴ درصد بیش از ۱ هفته تا ۱ ماه و ۱۷/۹درصد بیش از ۱ ماه مدت زمان بستری داشته اند. مدت زمان ونتیلاسیون افراد مورد مطالعه حداقل ۲ روز و حداکثر ۶۵ روز است. میانگین مدت زمان ونتیلاسیون برای افراد مورد مطالعه ۱۴±۱۷ روز بود. ۳۰/۸ درصد افراد مورد مطالعه یک هفته و یا کمتر ۵۱/۳ درصد بیش از ۱ هفته تا ۱ ماه و ۱۷/۹ درصد بیش از ۱ ماه تحت ونتیلاسیون مکانیکی بوده اند. بیماری زمینه ای که بیمار به خاطر آن در بخش ICU بستری شده بود به ۴ دسته بیماری های داخلی، بیماری های مغزی، تروما و جراحی تقسیم بندی شد. ۲۵/۶ درصد دچار بیماری داخلی و ۲۰/۵ درصد دچار بیماری مغزی بوده اند و ۳۳/۵۳ درصد افراد مورد مطالعه جراحی شده بودند. ۲۰/۵ درصد افراد دچار تروما شده اند.

جدول شماره ۱: فراوانی بیماران مورد مطالعه براساس متغیر های مورد بررسی

متغیر	سطح متغیر	فراوانی	درصد فراوانی
جنس	مرد	۲۱	۵۳/۸
	زن	۱۸	٤٦/۲
سن	بیشتر از ۵۰ سال	۲۵	٤٦/۱
	کمتر از ۵۰ سال	۱٤	۳۵/۹
بیماری زمینه ای	جراحی	۱۳	۳۳/۳
	بیماری داخلی	۱۰	۲۵/٦
	بیماری مغزی	۸	۲۰/۵
	تروما	۸	۲۰/۵
مدت زمان بستری در ICU	کمتر از یک هفته	۱۰	۲۵/٦
	یک هفته تا یک ماه	۲۲	۵٤/٤
	بیشتر از یک ماه	۷	۱۷/۹
مدت زمان ونتیلاسیون	کمتر از یک هفته	۱۲	۳۰/۸
	یک هفته تا یک ماه	۲۰	۵۱/۳
	بیشتر از یک ماه	۷	۱۷/۹

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:34 +0430 on Saturday August 26th 2017

۱۲/۸ درصد افراد مورد مطالعه mortalty داشته اند و ۸۷/۲ درصد mortalty نداشته اند. در رادیوگرافی قفسه سینه ۳ مورد ارتشاح جدید یا پیشرونده یا مزمن، تجامد یا حفره ای شدن بررسی می شد. حفره ای شدن در هیچ یک از بیماران مشاهده نشد. ۵۳/۸ درصد افراد مورد مطالعه ارتشاح داشتند و ۴۶/۲ درصد این عارضه را نداشتند. ۳۸/۵ درصد افراد مورد مطالعه تجامد داشتند و ۶۱/۵ درصد این عارضه را نداشتند. ۴۳/۶ درصد افراد مورد مطالعه تب داشتند و ۵۶/۴ درصد تب نداشتند.

۳۳/۳ درصد افراد مورد مطالعه لکوپنی دارند و ۶۶/۷ درصد این عارضه را ندارند. ۴۸/۷ درصد افراد مورد مطالعه لکوسیتوز داشتند و ۵۱/۳ درصد این عارضه را نداشتند. در وضعیت هوشیاری ۶۴/۱ درصد افراد مورد مطالعه تغییر مشاهده می شد و ۳۵/۹ درصد این عارضه را ندارند. ۴۶/۲ درصد افراد مورد مطالعه شروع ناگهانی خلط چرکی داشته اند و ۵۳/۸ درصد این عارضه را نداشته اند. تغییر در خصوصیات خلط یا افزایش ترشحات تنفسی یا افزایش نیاز به ساکشن کردن در ۷۶/۹ درصد از بیماران دیده شد و در ۲۳/۱ درصد آن ها دیده نشد. ۱۲/۸ درصد افراد مورد مطالعه شروع ناگهانی یا بدتر شدن سرفه داشته و ۸۷/۲ درصد این عارضه را نداشتند. ۲۰/۵ درصد افراد مورد مطالعه تنگی نفس داشته و ۷۹/۵ درصد این عارضه را نداشته اند. ۴۱ درصد افراد مورد مطالعه تندی نفس داشته و ۵۹ درصد این عارضه را نداشته اند. ۶۶/۷ درصد افراد مورد مطالعه صداهای تنفسی برونشیال داشته و ۳۳/۳ درصد این عارضه را نداشتند. تبادل گاز در ۳۵/۹درصد افراد مورد مطالعه بدتر شده و ۶۴/۱ درصد این عارضه مشاهده نشده است.

بحث:

آزمایش Real Time PCR بر نمونه های BAL در این مطالعه نشان داد که این نمونه ها فاقد DNA باکتری لژیونلا پنوموفیلا هستند. Mokhless و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ با منظور تخمین نقش بالقوه باکتری های آتیپیک از جمله لژیونلا پنوموفیلا در پنومونی وابسته به ونتیلاتور در ICU بیمارستان دانشگاه Alexandria انجام داده است خاطر نشان کرده است که باکتری های آتیپیک علت نامعمول VAP نیستند و این یافته ها باید وقتی که داروی مناسب به بیمار مبتلا به VAP داده می شود در نظر گرفته شوند. در این مطالعه از ۶۰ بیمار بستری در ICU بیمارستان دانشگاه Alexandria نمونه آسپیره درون نای تهیه شد به روش کشت در محیط های بلاد آگار، مک کانکی آگار و سابرودکستروز و PCR و از لحاظ وجود سه باکتری مایکو پلاسما، کلامیدیا و لژیونلا مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۴ نمونه انتروباکتر، از ۱۳ نمونه سودوموناس، از ۱۴ نمونه کاندیدا و از ۱۰ نمونه MRSA به وسیله کشت جدا شد. PCR در ۵ مورد برای مایکوپلاسما، ۳ مورد برای لژیونلا و یک مورد برای کلامیدیا مثبت بود (۱۸).

در تحقیقی که توسط احمدی نژاد و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی نمونه آب خنک کننده های جمع آوری شده از ۴ بیمارستان مختلف، ۲ خانه سالمندان و یک خوابگاه در کرمان انجام گرفت نشان داده شد که سیستم های خنک کننده آب بیمارستان ها و خانه های سالمندان در کرمان به مقدار زیادی با لژیونلا پنوموفیلا آلوده هستند و در معرض تهدید می باشند. بخش بزرگی از سیستم خنک کننده آب در بیمارستان ها و خانه های سالمندان با این باکتری آلوده هستند و نقش اساسی در سلامت بیماران بیمارستان ها و افراد مسن ساکن خانه های سالمندان در شهر کرمان بازی می کند (۱۹).

در تابستان ۲۰۰۶، ۱/۵ لیتر از ۷۷ سیستم خنک کننده جمع آوری شد؛ هر نمونه فیلتر شد. از قطعات فیلتر DNA استخراج شد و برای PCR و seminested PCR استفاده شد. از ۷۷ نمونه آب ۳۰ (۳۹٪) نمونه برای کل گونه های لژیونلا نتیجه PCR مثبت دادند. Semi nested PCR ۱۴ نمونه را (۱۸/۲٪) برای گونه لژیونلا پنوموفیلا مثبت نشان داد (۱۹).

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:34 +0430 on Saturday August 26th 2017

در تحقیقی که توسط Anbumani و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در هند انجام شد نشان داده شد که لژیونلا در محیط بیمارستانی وجود دارد و عامل اتیولوژیک عفونت دستگاه تنفسی تحتانی در ۲/۵۵٪ بیماران است. نمونه ها شامل خلط، BAL، آسپیره نای و مایع پلور (PLEURAL) بودند. ۴۷۰ نمونه ای که در کشت معمول، کلنی نداده بودند برای لژیونلا مورد بررسی قرار گرفته و در محیط BCYE کشت داده شدند. ۲۴ نمونه آب از بخش های مختلف و ICU های بیمارستان به وسیله سواپ از شیرآب گرفته و در BCYE کشت داده شد. ۱۲مورد از ۴۷۰ نمونه برای لژیونلا کشت مثبت شد که بیشتر مذکر و بالای ۵۰ سال بودند. از ۲۴ نمونه آب ۸ مورد برای لژیونلا کشت مثبت داشتند (۲۰).

دکتر یزدانی در سال ۱۳۸۵ مطالعه ای در رابطه با تشخیص لژیونلا پنوموفیلا با روش کشت و فلورسنت آنتی بادی مستقیم (DFA) نمونه های برونکوآلوئولاژ بیماران مبتلا به پنومونی مراجعه کننده به مراکز پزشکی اصفهان انجام داده و نتیجه گرفته است که در این مطالعه فراوانی پنومونی با منشاء لژیونلا پنوموفیلا ارتباطی با جنسیت بیمار ندارد. در این مطالعه جمعیتی از بیماران مبتلا به پنومونی مراجعه کننده به مراکز پزشکی شهر اصفهان که به درمان مرسوم آنتی بیوتیکی آمینوگلیکوزیدی پاسخ مناسبی نشان نمی دادند پس از قطع دارو به مدت سه روز، ۹۶ نمونه BAL از آن ها گرفته شد. برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا از دو روش کشت بر روی محیط های (Buffered charcoal yeast extract= BCYE) و (Legionella Selective Supplement IV= MWY) و DFA استفاده شد. از ۹۶ نمونه ۱۶ مورد باسیل گرم منفی جدا گردید که با انجام کشت بر روی محیط های (Blood Agar= BA) و (Eosin Methylene Blue= EMB) و انجام تست های بیوشیمیایی ۴ مورد آن به طور قطعی لژیونلا تشخیص داده شد؛ همچنین آزمون آماری نیز نشان داد که بین نتایج کشت و روش DFA اختلاف معنی داری وجود ندارد (۲۱).

Javed و همکارانش طی تحقیقی درباره پنومونی اکتسابی از اجتماع گفته اند ترکیب روش سرولوژی و شناسایی آنتی ژن ادرار می تواند یک ابزار ارزشمند برای تشخیص عفونت لژیونلا در غیاب کشت مثبت باشد (۲۲).

در یک مطالعه که توسط میرکلانتری و همکاران انجام شده است ۷۰ نمونه BAL جمع آوری شده از بیماران بیمارستان بقیه الله طی ۶ ماه را از لحاظ وجود باکتری لژیونلا به روش کشت بر روی محیط BCYE و PCR مورد بررسی قرار داه اند. برای PCR از بخشی از کروموزوم باکتری که ژن mip را کد می کند استفاده شد. از ۷۰ نمونه ۳ نمونه (۴/۲٪) با کشت و ۶ نمونه (۸/۵۷٪) با روش PCR مثبت گزارش شد. لژیونلا پنوموفیلا در نمونه آب این بیمارستان نیز یافت شده است. از آنجا که تمامی موارد مثبت از نظر کشت در این تحقیق با روش PCR هم مثبت تشخیص داده؛ بنابراین حساسیت روش PCR در بررسی حاضر۱۰۰ درصد و بسیار بیشتر از کشت است و PCR می تواند روشی مناسب برای جداسازی و شناسایی لژیونلا پنوموفیلا از نمونه مایع برونکوآلوئولار لاواژ در بیماران مبتلا به پنومونی شدید باشد (۲۳).

در تحقیقی که توسط دکتر گودرزی و همکارانش در سال ۱۳۹۰ انجام شد طی ۱۲ماه نمونه خلط کودکان ۶ ماه تا ۱۴ سال مبتلا به عفونت حاد تنفسی در بیمارستان کودکان توسط پزشک متخصص اطفال تهیه شد. نمونه ها ابتدا برای ۳ روز و در صورت عدم مشاهده کلنی برای ۱۲ روز در محیط BCYE کشت داده شدند. برای انجام PCR، DNA به روش فنل کلروفرم استخراج و پرایمر بخشی از ژن mip استفاده شد. از ۲۱۰ نمونه ۳ نمونه با کشت ۵ نمونه با روش ایمنوفلورسانت و ۱۲ نمونه با PCR مثبت نشان داده شدند؛ بنابراین نتیجه گرفته شد که حساسیت و سرعت روش PCR بسیار بیشتر از کشت و ایمنوفلورسانت است و PCR روش مناسبی جهت شناسایی و جداسازی لژیونلا از نمونه های خلط می باشد. زیرا عواملی همچون مصرف سالین یا درمان

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:34 +0430 on Saturday August 26th 2017

آنتی بیوتیکی در بیماران ممکن است که به کشت منفی منجر گردد (۲۴).

Hajia و همکارانش در تحقیقی در سال ۲۰۰۴، به بررسی وجود لژیونلا در بیمارستان اکباتان همدان پرداختند. در این مطالعه نیز از ژن mip و روش PCR برای تشخیص استفاده شد که از ۴۶ نمونه گرفته شده، یک مورد به روش کشت و ۴ مورد با PCR مثبت شناخته شدند. این مطالعه نشان داد که حساسیت PCR برای شناسایی لژیونلا پنوموفیلا در نمونه های BAL کافی می باشد (۲۵).

Herpers و همکارانش در تحقیق خود در سال ۲۰۰۳ حساسیت و اختصاصی بودن Real Time PCR را به ترتیب ۹۴٪ و ۱۰۰٪ تعیین کرده اند (۲۶)؛ بنابراین روش های مولکولی، خصوصاً PCR نسبت به کشت روش مناسبتری برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا به حساب آمده و به صورت موفقیت آمیزی می تواند لژیونلا پنوموفیلا را از نمونه های بالینی یا نمونه های آبی با حساسیت و سرعت بالاتر تشخیص دهد. حساسیت این روش، خصوصاً در روزهای اول بیماری، بسیار بالا است و سلول های مرده و زنده را از طریق PCR تشخیص می دهد. نتایج این روش، در کمتر از یک روز و ظرف ۱۵ ساعت به دست می آید. آمپلیفیکاسیون DNA از طریق PCR سبب شناسایی DNA حتی در تعداد بسیار کم باکتری در نمونه های مورد بررسی می شود؛ همچنین قادر به غربالگری گونه های لژیونلا و سرو گروه های آن ها با یک آزمون می شود (۲۳).

نتیجه گیری:

آزمایش Real Time PCR بر نمونه های BAL در این مطالعه نشان داد که این نمونه ها فاقد DNA باکتری لژیونلا پنوموفیلا هستند. البته بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه و متفاوت بودن الگوهای میکروبیولوژیک در مناطق مختلف، شناخت الگوی میکروبیولوژیک لژیونلا پنوموفیلا در سایر مراکز درمانی نیز امری منطقی به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی:

لازم است از زحمات پرسنل بخش مراقبت های ویژه بیمارستان الزهرای اصفهان قدردانی به عمل آید.

منابع:

1. Peleg AY. Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. N Engl J Med. 2010; 362: 1804-13.
2. Bash B, Buckley JD. Hospital-Acquired and ventilator-associated Pneumonia in adults. Crit Care Med. 2005; 8(1): 1-10.
3. Joseph NM, Sistla S, Dutta TK, Badhe AS, Parija SC. Ventilator-associated Pneumonia: a review. Eur J Intern Med. 2010; 21(5): 360-8.
4. Rotstein C, Evans G, Born A, Grossman R, Light RB, Magder S, et al. Clinical practice guidelines for hospital-acquired Pneumonia and ventilator-associated Pneumonia in adults. Can J Infect Dis Med Microbial. 2008; 19(1): 19-53.
5. Kieninger AN, Lipsett PA. Hospital-acquired Pneumonia: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Surg Clin North Am. 2009; 89(2): 439-61.
6. Chandler B, Hunter J. Ventilator-associated Pneumonia; a concise review. Intensive Care Soc. 2009; 10(1): 29-33.
7. Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated Pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. Respir Care. 2005; 50(6): 725-39.
8. Crnich CJ, Safdar N, Maki DG. The role of the intensive care unit environment in the pathogenesis and prevention of ventilator-associated Pneumonia. Respir Care. 2005; 50(6): 813-36.
9. Rotstein C, Evans G, Born A, Grossman R, Light RB, Magder S, et al. Clinical practice guidelines for hospital-acquired Pneumonia and ventilator-associated Pneumonia in adults. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2008; 19(1): 19-53.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:34 +0430 on Saturday August 26th 2017

10. Taylor M, Ross K, Bentham R. Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. Microb Ecol. 2009; 58(3): 538-47.
11. Vergis EN, Akbas E, Yu VL. Legionella as a cause of severe Pneumonia. Semin Respir Crit Care Med. 2000; 21(4): 295-304.
12. Murdoch DR. Diagnosis of Legionella infection. Clin Infect Dis. 2003; 36(1): 64-9.
13. Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 23(12): 871-8.
14. Horan TC, Gaynes RP. Surveillance of nosocomial infections. In: Mayhall CG (editor). Hospital epidemiology and infection control. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004: 1659-1702.
15. Blic J. Midulla F. Barbato A. Clement A, Dab I, Eber E, et al. Bronchoalveolar lavage in children. Eur Respir J. 2000; 15: 217-31.
16. Sambrook J. Fritch EF. Maniatis T. Molecular Cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pub; 1989.
17. Yang G, Benson R, Pelish T, Brown E, Winchell JM, Fields B. Dual detection of Legionella Pneumophila and Legionella species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(3): 255-61.
18. Mokhless NA-S, El-Mofty MF, Hanafi NF, Muhammad A. A typical bacteria in ventilator associated Pneumonia; an Egyptian university hospital experience. J Am Sci. 2010; 6(12): 1074-79.
19. Ahmadinejad M. Shakibaie MR. Shams KM. Detection of Legionella Pneumophila in cooling water systems of hospitals and nursing homes of Kerman city, Iran by Semi- Nested PCR. World Acad Sci Eng Technol. 2011; 76: 20-3.
20. Anbumani S, Gururajkumar A, Chaudhury A. Isolation of Legionella Pneumophila from clinical & environmental sources in a tertiary care hospital. Indian J Med Res. 2010; 131: 761-4.
21. Yazdani R. Diagnosis of legionella Pneumophila by direct fluorescent antibody (dfa) technique in bronchoalveolar specimens of Pneumonia patients referring to medical centers in isfahan. 2002. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci. 2007; 14(4): 64-8.
22. Javed S, Chaudhry R, Passi K, Sharma S, K P, Dhawan B, et al. Sero diagnosis of Legionella infection in community acquired Pneumonia. Indian J Med Res. 2010; 131: 92-6.
23. Mirkalantari S, Mohabati Mobarez A, Hoseini Dost SR Aslani J. Isolation of Legionella from BAL samples of Legionella Pneumonia patients, by PCR and culture method. Modares J Med Sci Pathol. 2008; 10(3): 75-83.
24. Goudarzi H. SeyedJavadi SS. Goudarzi M. Detection of Legionella Pneumophila by sputum culture, direct immunoflurscence and PCR. J Res Med Sci. 2011; 2(35): 119-24.
25. Hajia M, Hossieni-Doust R, Rahbar M. Identiication of Legionella Pneumophila in Bronchoalveolar Lavage fluid specimens by PCR. Arch Iran Med. 2004; 7(4): 287-91.
26. Herpers BL, De Jongh BM, Van der Zwaluw K, Van Hannen EJ. Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of Legionella spp. and Legionella Pneumophila. J Clin Microbiol. 2003; 41(10): 4815-6.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2015 Apr, May; 17(1): 51-58.

Original article

Detection of *Legionella pneumophila* in the bronchoalveolar lavage samples by real time PCR in patients with ventilator-associated pneumonia in ICU

Khorvash F[1], Yousefi A[2], Meidani M[3*], Abassi S[4], Yaran M[3], Zolfaghari MR[2], Rezaei A[2], Ataei B[3]

[1]Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; [2]Microbiology Dept., Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, I.R. Iran; [3]Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; [4]Anesthesiology Dept., Intensive Care Fellowship, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Received: 24/Jan/2014 Accepted: 27/May/2014

Background and aims: *Legionella pneumophila* is an organism of public health interest because of its ability to cause mechanical ventilation. The aim of this research was determination of *Legionella pnemophila* in bronchoalveolar lavage samples in patients with ventilator-associated pneumonia by real time PCR in ICU at Al Zahra hospital.

Methods: In this descriptive analytic study, Pneumonia patients hospitalized in ICU of Isfahan Al Zahra hospital were studied in one year in 2011. Thirty-nine Bronchoalveolar lavage specimens were collected from patients with ventilator associated Pneumonia and kept in- 20°C until the test. DNA was extracted by phenol chloroform and Real time PCR process was done in 45 cycles consist of 95°C for 4 seconds in the first step and 58°C for 30 seconds, while experiments were performed using Taq Man method.

Results: The results for presence of *Legionella pneumophila* bacteria in all samples were negative. Minimum age of patients was 20 and maximum age was 86 years. Duration of hospitalization in ICU was at least 2 days and maximum was 65 days. Maximum ventilation period was 65 days and minimum period was 2 days.

Conclusion: This study demonstrates the absence of *Legionella pneumophila* in patients with ventilator associated pneumonia in ICU of this hospital. It seems that *Legionella pneumophila* microbiological pattern recognition is also logical for other medical centers.

Keywords: Pneumonia, *Legionella pneumophila*, Bronchoalveolar lavage**.**

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 8:34 +0430 on Saturday August 26th 2017

Cite this article as: Khorvash F, Yousefi A, Meidani M, Abassi S, Yaran M, Zolfaghari MR, Rezaei A, Ataei B. Detection of *Legionella pneumophila* in the bronchoalveolar lavage samples by real time PCR in patients with ventilator-associated pneumonia in ICU. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(1): 51-58.

[*]**Corresponding author:**
Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; Tel: 00989132749165, E-mail: meidani@med.mui.ac.ir