تشخیص آزمایشگاهی لژیونلا در نمونه‌های محیطی

دکتر حمیدرضا هنرمند
دکترای میکروبیولوژی

لژیونـلا یکی از عوامل مهم سـبب سـاز عفونت‌های بیمارسـتانی اسـت که در اغلـب موارد منشـا آن‌ها سیسـتم آب بیمارسـتان می‌باشد. تشـخیص سـریع مسـتقیم پادگن‌های لژیونلا در نمونه ادرار موجب شـد تعداد زیادتری از عفونت‌های بیمارسـتانی ناشی از این باکتری تشـخیص داده شـوند. به‌نظر می‌رسد کنترل سیستم آب بیمارسـتانی با آزمایـش نمودن دوره‌ای آن، هـم در کنترل این عفونـت موثر اسـت و هم یک تحقیق همه‌گیرشناسـی ارزشـمند می‌باشـد. ضمنا منبع بیماری را نیز می‌توان یافت . این تحقیقات تا حدود زیادی به مقایسـه تجزیه و تحلیل ملکولی لژیونلاهای جدا شـده از بیمار و جدا شده از کشت نمونه‌های محیطی متکی است.

اگر این‌گونه بررسی‌ها نشـان داد که باکتری‌های جدا شده از محیط و بیمـار یکسـان هسـتند در این‌صورت منبـع مزبـور را می‌توان مخزن اپیدمیولوژیکی تلقی نمـود. گونه‌های لژیونلا به‌طور طبیعی درآب‌های محیطی و مخازن آب سـاخته انسـان، ساکن می‌باشند. منابع محیطی بیماری‌های ناشـی از لژیونلا عبارتنداز:سیسـتم‌های لوله‌کشـی آب، سیسـتم‌های خنک‌کننده هوا، دسـتگاه‌های تنفس درمانـی، کندانسـورهای تبخیری، ویرپول‌ها و ماشـین‌های چرخ گوشـت. تنوع این منابع و تفاوت شدت آلودگی آن‌ها مانع استفاده از یک روش و یا یک محیط کشت واحد برای جدا کردن لژیونلا از نمونه‌های محیطی می‌گردد.

جمع آوری نمونه

لژیونلاها مثل سایر باکتری‌های آبزی به صورت بیوفیلم وجود دارند. بیوفیلم‌ها در سراسر یک سیستم آبرسانی به‌ویژه روی سطوح درونی لوله‌ها و در مخازن آب یافت می‌شوند. دو روش نمونه برداری وجود دارد:

۱- نمونه برداری مستقیم از آب

۲- نمونه برداری به کمک سواب از بیوفیلم

مقایسه این دو روش نشان داد که روش دوم از نظر تعداد باکتری‌ها و موارد جداسازی مثبت آن ها موفقیت زیادتری دارد و برای ردیابی وجود لپتوسپیرا در سیستم‌های آب با ارزش‌تر است. نمونه‌برداری سطحی از آب برج‌های خنک‌کننده به منظور جمع‌آوری بیوفیلم به‌دلیل وجود رقابت شدید باکتری‌ها کارآیی قابل توجهی ندارد.

اگر قرار است یک تحقیق همه‌گیر شناختی به‌دنبال بروز بیماری لژیونلایی در یک بیمارستان صورت گیرد بهتر است هم نمونه‌برداری مستقیم از آب و هم جمع‌آوری بیوفیلم‌ها با سواب انجام شود. اگر از سیستم لوله‌کشی نمونه‌برداری می‌کنیم بایستی ابتدا ۲۰۰میلی‌لیتر آب (قبل و یا بعد از نمونه‌برداری با سواب) برداریم و سپس جداگانه ۱۰۰میلی‌لیتر آب را پس از تراکم سازی با کمک صافی، جمع‌آوری نماییم. اگر پردازش این نمونه‌ها تا حداکثر ۲۴ساعت بعد صورت می‌گیرد نیازی به یخچال‌گذاری نیست در غیراین‌صورت بایستی آن‌ها را در یخچال و در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قرار داد. روش دیگر جمع‌آوری ۵-۱ لیتر آب و گذراندن آن از صافی است ولی این روش پرزحمت است و حساسیت را بالا نمی‌برد زیرا بیشتر بیمارستان‌ها نمونه‌های آب را به آزمایشگاه‌های مرجع می‌فرستند و ارسال چند نمونه آب با این حجم درچند روز متوالی مشکل است. اگر آب به تازگی تیمار شیمیایی شده است در این‌صورت بایستی هنگام نمونه‌برداری مقدار ۰/۵-۰/۱ میلی‌لیتر سدیم‌تیوسولفات۰/۱ نرمال به هر نمونه آب اضافه شود تا مواد شیمیایی ضد عفونی کننده موجود در آن خنثی شوند.

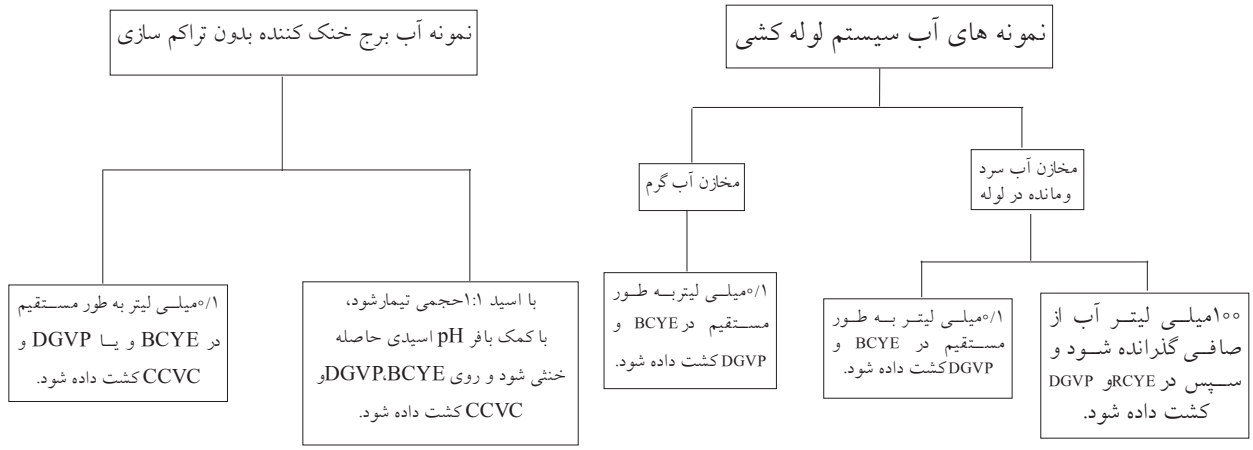
روش‌ها و محیط کشت‌ها

روش‌ها و محیط کشت‌هایی که برای جداسازی لژیونلاها از نمونه‌های محیطی به‌کار می‌روند همان‌هایی هستند که برای جداسازی آن‌ها از نمونه‌های بالینی استفاده می‌شوند. یک تفاوت مهم همانا لزوم وجود گلیسین در محیط کشت انتخابی برای جداسازی لژیونلاها از نمونه‌های محیطی است. گلیسین یک مهارکننده عالی فلورباکتریایی نمونه‌های محیطی است ولی بر فلورباکتریایی نمونه‌های تنفسی بی‌تاثیر است. شدت آلودگی باکتریایی یک منبع تعیین‌کننده انتخاب نوع پردازش و نوع محیط کشت مورد نیاز می‌باشد. آلودگی باکتریایی آب‌های سیستم لوله‌کشی به‌مراتب کمتر از آلودگی آب برج‌های خنک‌کننده است. برای نمونه آب‌هایی که رقابت باکتریایی و فلور کمتری دارند می‌توان از روش پردازش تراکم سازی[1] و از محیط کشت‌های دارای حداقل مواد ضد میکروبی استفاده نمود. ولی برای نمونه‌هایی که رقابت و فلور باکتریایی رقیب بیشتری دارند نباید روش تراکم سازی را به کار برد و باید از محیط کشت‌هایی که مواد ضدمیکروبی قوی‌تر دارند استفاده نمود.

لژیونلاها معمولا روی محیط کشت‌های استاندارد از قبیل بلاد آگار خون گوسفند و یا شکلات آگار رشد نمی‌کنند. بافر شارکول یست اکستراکت آگار غنی شده سیستئین و پیروفسفات فریک و آلفاکتوگلوتارات (BCYE-α) یک محیط کشت غیرانتخابی استاندارد برای جداسازی لژیونلاها است . ACES[2] و یا MOPS[3] بافرهای مناسبی هستند که pH مطلوب (۰/۰۵ ±۶/۹) را برای رشد لژیونلا تامین می‌نمایند. به‌طور معمول ۲ تا۵ روز وقت لازم است تا لژیونلا به آن اندازه رشد کند که کلنی‌های قابل مشاهده ایجاد نماید. بنابراین رشد افزون‌تر سایر باکتری‌ها اگر آن‌ها به‌قدر کافی توسط محیط کشت انتخابی مهار نشوند می‌توان مانع ظهور کلنی‌های لژیونلا گردد.

نمونه‌های آب لوله‌کشی

BCYE-α و نیز بافر شارکول یست اکستراکت آگار حاوی رنگ‌ها، گلیسین، وانکومایسین و پلی‌میکسین(DGVP) محیط کشت‌های مطلوب برای جداسازی لژیونلا از نمونه‌های آب سیستم لوله‌کشی می‌باشند. به محیط کشت DGVP می‌توان آنیسومایسین به مقدار ۸۰ mg/ml افزود که مانع رشد مخمرها می‌شود. مخمرها در آب



BCYE : بافر شارکول یست اکستراکت

BCYE: DGVP حاوی رنگ ، گلیسین، وانکومایسین و پلی‌میکسین

BCYE : CCVC حاوی سفالوتین، کولیستین، سیکلوهگزیمید، وانکومایسین

شکل ۱ : روش پردازش نمونه‌های آب‌های محیطی و محیط کشت‌های مناسب برای جداسازی لژیونلاها

سیستم لوله‌کشی حضور قابل توجهی ندارند بنابراین می‌توان از افزودن این ماده صرف‌نظر نمود. گلیسین برای بعضی از لژیونلاها اثرمهارکنندگی دارد بنابراین برای جداسازی سایر لژیونلاها(غیر از لژیونلاپنوموفیلا) نباید به محیط کشت گلیسین اضافه نمود. تیمار اسیدی نمونه آب با افزودن بافر HCL-KCL به آن که مانع رشد افزون فلور رقیب می‌شود،صورت می‌گیرد که به نظرمی‌رسد اثر مهارکنندگی بر لژیونلا ندارد.

برای ساخت این بافر می‌توان pH یک محلول ۰/۲ مولار کلرید پتاسیم (KCL) را با کمک اسید کلریدریک ۰/۲ مولار به حد ۲/۲ رساند و آن را با گذراندن از صافی استریل نمود. نمونه‌هایی که باسواب جمع‌آوری شده‌اندرا باید به مدت ۳ دقیقه در ۰/۲ میلی‌لیتربافر اسیدی قرار داد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتراز این نمونه تیمارشده رادر BCYE و DGVP آگار تلقیح نمود. درمورد نمونه‌های مخازن آب گرم بایستی مقدار ۰/۱ میلی‌لیتراز آن‌رابه‌طورمستقیم در BCYE و DGVP آگار تلقیح نمود و با کمک یک میله شیشه‌ای خمیده‌ی استریل آن‌را روی سطح محیط پخش نمود.

برای نمونه آب جمع‌آوری شده بایستی مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از آن‌را از صافی‌های پلی‌کربنات به قطر ٤٧ میلی‌لیتر دارای سوراخ‌های به قطر ۰/۲ میکرون گذراند و فیلتر رابه ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه اولیه آب اضافه کرد و باتکان دادن سعی نمود باکتری‌های گیر کرده در فیلتر رابه این مقدار آب وارد کرد. سپس باید از این نمونه مقدار ۰/۱ میلی‌لیتربرداشت کرده و در BCYE و DGVP آگار تلقیح نمود.

نمونه‌های آب برج‌های خنک‌کننده و آب‌های دارای مقادیر زیاد فلور رقیب باکتریایی

برای این نمونه آب‌ها افزودن مواد مهار کننده به محیط کشت و نیز اجتناب از فنون تراکم‌سازی لازم است. اگر از محیط کشت DGVP استفاده شود باید نمونه راتوسط بافر اسیدی تیمار نمود تا شرایط مطلوب برای جداسازی لژیونلاها تامین شود. این نمونه آب‌ها اغلب حاوی قارچ هستند بنابراین افزودن ماده ضد قارچی

سیکلوهگزیمید ۸۰ µg/mg الزامی می‌باشد. CCVC یک محیط کشت مناسب برای این‌گونه نمونه آب‌ها است. در این محیط کشت سفالوتین،کولیستین، وانکومایسین و سیکلوهگزیمید وجود دارد.

نمونه‌هایی که با سواب گرفته می‌شوند دارای جمعیت زیادی از باکتری‌های رقیب هستند و تراکم‌سازی برای آن‌ها لازم نیست. این نمونه‌ها باید به‌طور مستقیم درمحیط کشت‌های BCYE و DGVP و CCVC تلقیح شوند.بایستی مقدار۰/۱ میلی‌لیتر آب را روی محیط کشت ریخت و توسط یک میله شیشه‌ای خمیده استریل آن‌را روی سطح محیط کشت پخش نمود. ضمنا باید ۰/۲ میلی‌لیتر از آن‌را با افزودن همان حجم بافر اسیدی تیمار نمود(۳ تا۱۵ دقیقه) و صبر نمود تا واکنش مناسب صورت گیرد و آن‌گاه در محیط کشت تلقیح نمود.

گرچه طولانی‌تر کردن مدت زمان تیمار اسیدی احتمال جداسازی لژیونلا را کاهش می‌دهد ولی چون تعداد باکتری‌های غیر لژیونلا را کم می‌نماید در مجموع مفید است. برای بیشتر نمونه‌ها مدت زمان ۳ دقیقه کافی است . تیمار حرارتی نمونه آب‌های برج‌های خنک‌کننده نیز شرایط جداسازی لژیونلا را بهبود می‌بخشد. بدین منظور بایستی نمونه آب‌ها را به‌مدت ۳۰ دقیقه درون حمام آب‌گرم ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داد و سپس به‌سرعت آن‌ها راسرد نمود. این روش به‌ویژه اگر رشد سنگین سودوموناس آئروژینوزا مشکل‌ساز باشد مفید است.

تمام ظروف محیط کشت‌های تلقیح شده را باید در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای مرطوب به‌مدت ۱۰-۷ روز گرم‌خانه گذاری کرد و پس از ۳ روز شروع به خواندن نمود. بعضی از لژیونلاها در هم‌جواری ۵-۲/۵ درصد CO_2 بهتر رشد می‌کنند ولی بیشتر لژیونلاهای بیماری‌زا که با آن‌ها مواجه می‌شویم نیازی به افزودن CO_2 اضافی ندارند. کلنی‌های لژیونلاها ظرف ۵-۳ روز قابل مشاهده می‌گردند این کلنی‌ها کمی محدب، دایره‌ای و کامل هستند و ظاهر آن‌ها زمینه شیشه‌ای دارند. کلنی‌های جوان لبه‌های رنگین‌کمانی دارند که سبز،صورتی یا ارغوانی به‌نظر می‌رسد. کلنی‌های کهنه‌تر ظاهر مومی شکل دارند و وقتی با لوپ تماس داده می‌شوند چسبنده هستند.

ظروف محیط کشت باید زیر نور لامپ ماوراءبنفش (طول موج ۳۶۵ نانومتر) مورد بررسی قرار گیرند.

بعضی لژیونلاهای بیماری‌زا از جمله : لژیونلابوزمانی[۴]،لژیونلا دوموفی[۵]، لژیونلاشری[۶]، لژیونلاگورمانی[۷]، لژیونلاتوکسوننیس[۸]، و لژیونلاآنیسا[۹] زیر نور ماوراءبنفش با طول موج ذکر شده اتوفلوئورسانس آبی- سفید دارند و بعضی از گونه‌ها از قبیل: لژیونلاروبروی‌لوسنس[۱۰] و لژیونلاریترا[۱۱] اتوفلوئورسانس قرمز دارند.

تشخیص لژیونلاها

تشخیص گونه‌های لژیونلا مستلزم ترکیبی از خصوصیات کشت (نیاز به سیستئین)، سوخت و ساز غیر تخمیری، و سروتایپینگ (با کمک آگلوتیناسیون روی لام و یا رنگ‌آمیزی فلوئورسانس آنتی‌بادی مستقیم [DFA]) آن‌ها است. این آزمون‌ها در تشخیص گونه‌های لژیونلا دقت متفاوتی دارند.

عفونت ناشی از لژیونلاپنوموفیلا را با اطمینان بیشتر می‌توان تشخیص داد . رنگ‌آمیزی ایمنوفلوئورسانس مستقیم و یا معرف‌های آگلوتیناسیون روی لام برای تشخیص گونه‌های لژیونلا به‌صورت تجاری موجودند.برای رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسانس مستقیم از پادتن‌های تک‌رده‌ای یا چند رده‌ای و معرف‌های یک ظرفیتی و چند ظرفیتی می‌توان استفاده نمود. یک کیت تجاری آگلوتیناسیون روی لام وجود دارد که سروگروپ‌های۱ و۲ را از میان ۱۴ سروگروپ لژیونلا پنوموفیلا همراه با ۷ گونه لژیونلاهای دیگر تشخیص می‌دهد[۱۲].

علی رغم وجود معرف‌های با کیفیت بالا هنوز احتمال تشخیص غلط لژیونلاپنوموفیلا در سطح سروتایپ وجود دارد زیرا سروگروپ‌ها واکنش متقاطع زیادی با یکدیگر دارند. لژیونلاپنوموفیلا ۱۴ سروگروپ دارد. سروگروپ‌های ۳ و ٦ با یکدیگر و سروگروپ‌های ۱۲ و ۱ و ٦ نیز با یکدیگر واکنش متقاطع دارند. واکنش متقاطع سروگروپ‌های ۳ و ٦ هنگام استفاده از معرف‌های چند ظرفیتی و واکنش متقاطع سروگروپ‌های ۱۲ و ۱ و٦ در رنگ‌آمیزی DFA آشکار می‌گردند.

لژیونلاهای گروه واجد اتوفلوئورسانس آبی _ سفید در صورت استفاده از معرف‌های چند رده‌ای تک ظرفیتی با یکدیگر واکنش

متقاطع نشان می‌دهند. واکنش متقاطع بین لژیونلا بوزمانی و آنیسا نیز زیاد است و تفکیک این دو مشکل می‌باشد.
خطـر مواجهه با عوامل بیماریزای آبزی را باید جدی گرفت. اکنون زمان آن فرا رسـیده است که آزمایشگاه‌ها خود را برای کشت دادن لژیونلاها از نمونه‌های آب بیمارستان‌ها مجهز کند.

.....

پی‌نوشت:

1-Concentration procedure
2-[N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid]
3-[3-(n-morpholino) propane sulfonic acid]
4-L.bozemanii
5-L.dumoffii
6-L.cherrii
7-L.gormanii
8-L.tucsonensis
9-L.anisa
10-L.rubrilucens
11-L.erythra
12-oxid Ltd.Hampshire، uK.

References:

1- Ta, A.C et al. 1995. Comparsion of culture methods for monitoring Legionella species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. J. clin. Microbiol. 33: 2118-2123.

2- Wadowsky, R.M. and R.B.Yee. 1981. Glycin containing - selective medium for isolation of legionellaceae from environmental speciemens. Applied Enviromental Microbiology. 42: 768-772.

3- Edelstein, P.H. 1981. Improred semiselective medium for isolation of legionella pneumophila from contaminated clinical and enviromental specimens. J. Clin. Microbiol. 14: 298-303.

4- Ede/stein, P.H. 1982. Comparative study of selective media for isolation of legionella pneumophila from potable water. J. Clin. Microbiol, 16: 697-699.

5- Reinthaler, F.F. et al. 1993. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of legionella pneumophila from tap water in hospitals. J. Clin. Microbiol. 31: 1213-1216.

6- Vickers, R.M. and V.L. YU. 1984. Clinical laboratory differentiation of legionellaceae family members with pigment production and fluorescence on media supplemented with aromatic substrates. J. Clin. Microbiol. 19: 583-587.

7- Wikinson, I.J. et al. 1990. problems associated with identification of legioneila species from enviroment and isolation of six possible new species. Applied Enviromental microbiology. 56: 796- 802.