مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره دوم (پیاپی ۲۳) تابستان ۱۳۹۴
صفحات ۱۱۱-۱۰۳

Original Article

بررسی فراوانی ژن های *lepA* و *ralF* در *لژیونلا نموفیلا*های جدا شده از افراد مبتلا به عفونت های تنفسی

عباس دوستی*[1]، فاطمه علایی[2]، فروزان خدری[2]

[1]دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، [2]کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: *لژیونلا نموفیلا* باکتری گرم منفی، هوازی و ایجاد کننده بیماری لژیونر می باشد. ژن های *ralF* و *lepA* از اجزای سیستم ترشحی تیپ IV هستند و برای تکثیر درون سلولی و بقا ضروری می باشند. هدف از این مطالعه جداسازی *لژیونلا نموفیلا* از نمونه های برونکوآلوئولار و بررسی فراوانی ژن های *ralF* و *lepA* می باشد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۱۰۰ نمونه برونکوآلوئولار از بیماران مبتلا به عفونت تنفسی در چهارمحال و بختیاری انجام شد. در ابتدا جداسازی *لژیونلا نموفیلا* با استفاده از محیط کشت اختصاصی BCYE صورت گرفت. سپس تمامی نمونه‌ها با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* *لژیونلا نموفیلا* مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین فراوانی ژن های *ralF* و *lepA* در نمونه ها، با روش PCR ارزیابی گردید.

یافته ها: از بین ۱۰۰ نمونه کشت داده شده، ۹٪ از نظر *لژیونلا نموفیلا* مثبت تشخیص داده شدند. همچنین از بین ۱۰۰ نمونه، ۱۲ مورد آلوده به این باکتری با استفاده از روش مولکولی شناسایی گردید. فراوانی ژن های *ralF* و *lepA* در نمونه ها به ترتیب ٤١/٦٦ و ۲۵ درصد تعیین شد. ۸/۳۳ درصد از نمونه ها نیز به طور هم زمان هر دو ژن را دارا بودند.

نتیجه‌گیری: دو ژن *ralF* و *lepA* در *لژیونلا نموفیلا* های جدا شده از فراوانی نسبتاً بالایی برخوردارند. با استفاده از تکنیک PCR می توان عفونت ایجاد شده توسط *لژیونلا نموفیلا* را در نمونه های تازه بدون نیاز به کشت تعیین نمود. همچنین روش PCR نسبت به کشت از دقت و سرعت بیشتری برای تشخیص *لژیونلا نموفیلا* در نمونه‌های برونکوآلوئولار برخوردار می باشد.

واژگان کلیدی: *لژیونلا نموفیلا*، برونکوآلوئولار، ژن *ralF*، ژن *lepA*.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹۳

مقدمه

پس از همه گیری بیماری لژیونر در شهر فیلادلفیا در سال ۱۹۷٦ این بیماری تا به امروز از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است (۱). *لژیونلا نموفیلا* (*Legionella pneumophila*) عامل اتیولوژیک بیماری لژیونر است که اکثریت موارد پنومونی را به خود اختصاص می دهد (۲). حدود ۸۵ درصد بیماری لژیونر توسط *لژیونلا نموفیلا* ایجاد می شود که ۵۰ درصد آن توسط گروه سرولوژیکی یک و ۱۰ درصد آن توسط گروه ٦ به وجود می آید (۲ و ۳).

آب بزرگترین مخزن *لژیونلاها* می باشد و این باکتری در محیط های آب شیرین در تمام دنیا یافت شده است. حدود ۱ تا ۳ درصد از پنومونی های اکتسابی از جامعه و بیش از ۳۰ درصد از پنومونی های اکتسابی از بیمارستان ناشی از *لژیونلا* می باشد (٤). *لژیونلا* در نمونه‌های بالینی و بافتی در روش رنگ‌آمیزی گرم به شکل کوکوباسیل می‌باشد. تفاوت این

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.
تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

باکتری با سایر باکتری ها در این است که رنگ گرم را به سختی می گیرد و به همین دلیل استفاده از فوشین بازی به جای سافرانین جهت رنگ‌آمیزی بهتر توصیه شده است (٤). برای کشت و جداسازی این باکتری از محیط اختصاصی Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) با گرمخانه گذاری به مدت ۳ تا ۵ روز استفاده می شود (۵ و ٦). امروزه *لژیونلا* به عنوان عامل مهمی در پنومونی های اکتسابی از بیمارستان مطرح بوده و از آن جایی که راه اصلی ورود این ارگانیسم به بدن از طریق قطرات آب می باشد، بنابراین پنومونی در افرادی که در تماس با منبع آبی آلوده قرار دارند ایجاد می شود (۵). *ralF* و *lepA* و ژن موثر در بیماری زایی *لژیونلا پنوموفیلا* و محصول آنها از اجزای سیستم ترشحی نوع IV به نام DOT (Defect in organelle trafficking) و ICM (Intracellular multiplication) یا ICM/DOT هستند. از آنجایی که تعدادی از این ژن ها برای بقای باکتری *لژیونلا نموفیلا* و تکثیر داخل سلولی آن نیاز هستند به گروهی از این ژن ها تکثیر کننده داخل سلولی یا معیوب کننده انتقال ارگانل می گویند (۷). *لژیونلا نموفیلا* از این سیستم ترشحی برای تحویل دادن یا فرستادن افکتورها به سلول میزبان برای کنترل عبور ارگانل ها استفاده می کند (۷). پروتئین *RalF* نیز برای همانند سازی داخل سلولی باکتری مورد نیاز می باشد (۸). انتقال پروتئین *RalF* از طریق غشای فاگوزومی یک فرایند وابسته به سیستم ترشحی ICM/DOT است (۷ و ۹).

این باکتری قادر به ایجاد بیماری به صورت تک گیر (اسپورادیک) و همه گیر(اپیدمیک) می باشد (۵). بالاترین میزان بروز بیماری در مردان بالای ۵۵ سال است. زیرا عوامل خطر ساز مانند کشیدن سیگار و درمان با استروئیدها در این گروه بیشتر می باشد (٤). بیماری ممکن است به صورت یک عفونت خفیف یا تب پونتیاک که به صورت یک آنفلوانزای خود محدود شونده است دارای علایمی مانند تب، لرز، ترس از نور، سفتی گردن بروز نماید. همچنین ممکن است به صورت یک بیماری سیستمیک و سریعاً پیش رونده لژیونر بروز نماید (۱۰ و ۱۱). اگر بیماران مبتلا به *لژیونلا* در مراحل اولیه بیماری تشخیص داده شوند و مورد درمان قرار گیرند، خطر جدی آن ها را تهدید نخواهد کرد (۵). دوره درمان این بیماری ١٤-١٠ روز است. افراد دارای سیستم ایمنی طبیعی به درمان پاسخ خوبی خواهند داشت. این در حالی است که درمان در بیماران با ضعف سیستم ایمنی اغلب به دلیل تاخیر در درمان و تشخیص دیر هنگام، با شکست مواجه خواهد شد (۵ و ۱۰ و ۱۱).

برای تشخیص عفونت *لژیونلا* می توان از نمونه های متفاوتی مانند بیوپسی ریه، خلط و آسپیراسیون محتوی دستگاه تنفسی تحتانی، مایع پلور و خون استفاده نمود (٤). به منظور تشخیص *لژیونلا* از نمونه های بالینی از روش های کشت، رنگ آمیزی، آنتی بادی فلورسانت مستقیم و ردیابی آنتی ژنی *لژیونلا* در نمونه‌های ادراری استفاده می گردد. کشت به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص *لژیونلا* از ارزش بالایی برخوردار است. اما طولانی بودن زمان گرمخانه گذاری و تاثیر درمان آنتی بیوتیکی در نتیجه کشت، از جمله معایب این روش می باشد (۱۲ و ۱۳). نمونه های خلط را می‌توان با گیمسا یا به طور اختصاصی تری در روش DFA رنگ آمیزی نمود. حساسیت روش ایمنوفلورسانس حدود ۷۰ درصد است. با این وجود آزمون های جدیدتری برای شناسایی حضور آنتی ژن‌های محلول *لژیونلا نموفیلا* در ادرار توسعه یافته‌اند که دارای حساسیت ۷۵ تا ۹۰ درصد می باشند (۲ و ۱۳ و ١٤). نیاز به یک روش تشخیصی جامع و کامل که نسبت به سایر روش ها در تشخیص *لژیونلا* دارای حساسیت بالا، توانایی تشخیص بیماری در مراحل اولیه و تعیین بیماران فاقد علایم بالینی باشد ضروری به نظر می رسد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن های *lepA* و *ralF* در *لژیونلا نموفیلا*های جدا شده از افراد مبتلا به عفونت های تنفسی مراجعه کننده به مراکز بهداشتی شهرستان شهرکرد بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: این تحقیق به صورت مقطعی-توصیفی از مهر ماه تا بهمن ماه ۱۳۹۱ بر روی ۱۰۰ نمونه لاواژ

برونکوآلوئولار (Bronchoalveolar Lavage: BAL) جمع آوری شده از بیماران مبتلا به عفونت های تنفسی (٥٤ نفر زن و ٤٦ نفر مرد)، از مراکز بهداشتی استان چهارمحال و بختیاری ریه انجام شد. تمام نمونه ها با استفاده از روش برونکوسکوپی (Bronchoscopy) توسط پزشک متخصص تهیه گردید. در حدود ٥ میلی لیتر از مایع گرفته شده بلافاصله در لوله فالکون درپیچ دار استریل جمع آوری و در فلاسک حاوی یخ به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد منتقل گردید. نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دو لوله تقسیم شدند. یکی از نمونه ها بلافاصله برای کشت مورد استفاده قرار گرفت و دیگری تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- سیلیسیوس نگهداری شد.

ب) کشت نمونه ها: نمونه‌های انتخاب شده برای کشت، در حرارت ٥٦ درجه سیلیسیوس و به مدت ۱۲ دقیقه در بن‌ماری تیمار حرارتی شدند. سپس ۰/۲ میلی لیتر از نمونه تیمار شده با حرارت، روی محیط کشت اختصاصی BCYE غنی شده با L-سیستئین (محیط انتخابی *لژیونلا* حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین B، ونکومایسین و آنیزومایسین) به روش خطی کشت داده شد. تمام پلیت‌های تلقیح شده در جار بی‌هوازی در ۳۷ درجه سیلیسیوس و رطوبت ۷۰ تا ۹۰ درصد گرمخانه گذاری شدند. این پلیت‌ها پس از ۳ روز مورد بازدید قرار گرفتند و در صورت عدم مشاهده کلنی، با توجه به رشد کند *لژیونلا*، گرماگذاری به مدت ١٤ روز ادامه می یافت.

ج) آزمون های مولکولی: ابتدا به منظور حذف مهار کننده ها، نمونه های BAL با بافر فسفات نمکی (PBS)، ۳ بار شستشو داده شدند و با دور g ۸۰۰۰ به مدت ٥ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. در هر بار روماند دور ریخته شد. به منظور استخراج DNA از نمونه ها از کیت تخلیص DNA (شرکت سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت DNA استخراج شده، پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و تابش نور ماورای بنفش بررسی گردید. همچنین از کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت اختصاصی نیز به روش بالا، استخراج DNA صورت پذیرفت.

در تمامی مراحل انجام این تحقیق از باکتری *لژیونلا نموفیلای* ATCC33152 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

به منظور تشخیص *لژیونلا پنوموفیلا* از پرایمر اختصاصی ژن *16S rRNA* استفاده شد (جدول ۱). پرایمرها از روی توالی موجود در بانک ژن جهانی با شماره ثبت AB811078 و با نرم افزار *Generunner* طراحی شدند. همچنین به منظور تشخیص ژن های *ralF* و *lepA* از پرایمرهای اختصاصی ویژه این ژن ها استفاده گردید (جدول ۱). توالی ثبت شده در بانک جهانی ژن که برای طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گرفت به ترتیب AY056455 برای تشخیص *ralF* و AY261385 برای ردیابی *lepA* می باشد.

در این مطالعه واکنش PCR در حجم نهایی ٥٠ میکرولیتر شامل ٥ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۱٥٠ میکرومول dNTPs mix، ۲ میلی مول $MgCl_2$، ۱ میکرومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۱ میکرولیتر از DNA مربوطه انجام شد. مواد و واکنشگرهای مورد استفاده در آزمایش PCR از شرکت سیناژن ایران تهیه گردیدند.

برنامه حرارتی با دستگاه مستر سایکلر گرادیانت ساخت شرکت اپندرف آلمان برای تکثیر ژن *16S rRNA* به منظور تشخیص *لژیونلا*، با شرایط دمایی ٥ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ٩٤ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ٩٤ درجه سیلیسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ٥٨ درجه سیلیسیوس به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. مشاهده باند ۳۳۷ جفت بازی

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش.

نام پرایمر	توالی '3'-5'	طول قطعه (جفت باز)
Leg-F	5'-GGTGACTGCGGCTGTTATGG-3'	۳٦۱
Leg-R	5'-GGCCAATAGGTCCGCCAACG-3'	
***RalF* –F**	5'-ACCAGCCCAGGATATGAACTTAC -3'	۲۳۰
***RalF* –R**	5'-ATAGTAGCTTGTGCGGATGTTTTG -3'	
***LepA* -F**	5'-GTTGGGCACTACAGTTATCTCTTC -3'	۳٥٤
***LepA*-R**	5'-GTTAGTTACTACGGTTTCAATACGAC -3'	

نشان دهنده مثبت بودن این آزمایش بود.

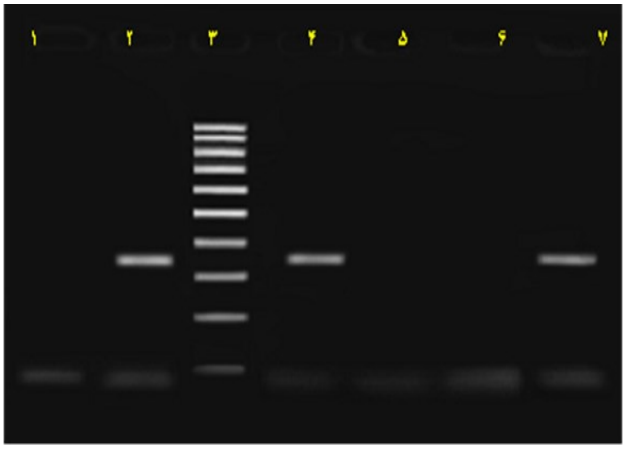
برنامه دمایی برای تکثیر دو ژن *ralF* و *lepA* نیز به همین ترتیب بود. با این تفاوت که دمای اتصال پرایمرها برای *ralF* ۵۹ درجه سیلیسیوس و برای *lepA* ٦١ درجه سیلیسیوس تنظیم گردید. برنامه دمایی بهینه، با انجام آزمون های مختلف و به صورت تجربی حاصل گردید. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با دستگاه تصویر برداری از ژل مشاهده و تصاویر مربوطه ثبت گردید. اندازه محصول PCR در این تحقیق برای هر یک از ژن های *ralF* و *lepA* به ترتیب ۲۳۰ و ۳٥٤ جفت باز بودند.

د) آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نسخه هفدهم نرم افزار آماری *SPSS* و آزمون آماری مربع کای انجام گرفت. مرز معنی داری بر روی ۰/۰۵ >p قرار گرفت.

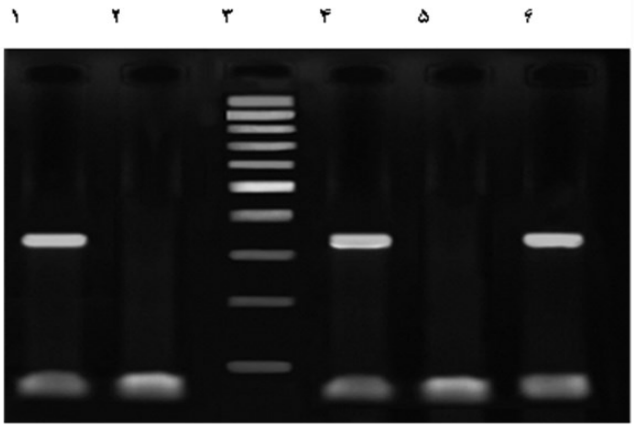
یافته ها

در این مطالعه هر دو روش کشت و PCR برای جدا سازی و تشخیص باکتری *لژیونلا نموفیلا* بر روی ۱۰۰ نمونه به کار برده شد. از این میان، تعداد ۹ مورد (۹ درصد) با روش کشت و ۱۲ مورد (۱۲ درصد) با روش PCR مثبت تشخیص داده شدند. کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت اختصاصی BCYE نیز با انجام PCR، از نظر وجود *لژیونلا نموفیلا* تایید گردیدند. نتایج حاصل در شکل شماره ۱ آورده شده است.

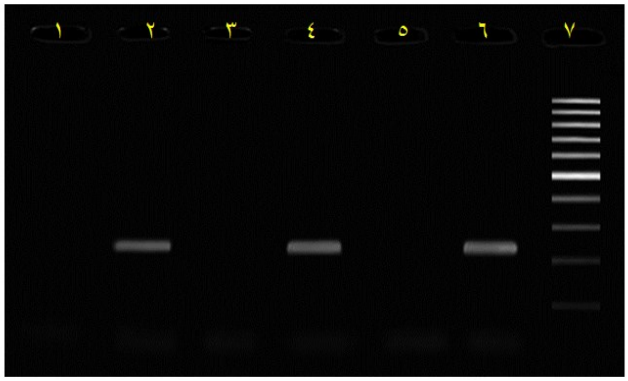
حضور ژن های *ralF* و *lepA* در تمامی نمونه های مثبت از نظر *لژیونلا* با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۲ نمونه آلوده به *لژیونلا*، تعداد ۵ نمونه (٤١/٦٦ درصد) دارای ژن *ralF* بودند. همچنین حضور ژن *lepA* در تعداد ۳ نمونه



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR برای ژن *lepA*. ستون ۱) کنترل منفی، ستون های ۲ و ٤) کنترل مثبت (ATCC 33152)، ستون ۳) مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون های ۵ و ٦) نمونه منفی از نظر حضور ژن *lepA*. ستون ۷) نمونه های مثبت از نظر حضور ژن *lepA* (تکثیر قطعه ۳٥٤ جفت بازی).



شکل ۱: ژل الکتروفورز محصولات PCR برای تشخیص *لژیونلا نموفیلا*. ستون ۱) کنترل مثبت (ATCC 33152)، ستون ۲) کنترل منفی، ستون ۳) مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون های ٤ و ٦) نمونه های مثبت *لژیونلا نموفیلا* (تکثیر قطعه ۳۳۷ جفت بازی)، ستون ۵) نمونه منفی از نظر حضور *لژیونلا نموفیلا*.



شکل ۳: ژل الکتروفورز محصولات PCR برای ژن *ralF*. ستون ۱) کنترل منفی، ستون های ۲) کنترل مثبت (ATCC 33152)، ستون های ۳ و ۵) نمونه منفی از نظر حضور ژن *ralF*، ستون های ٤ و ٦) نمونه های مثبت از نظر حضور ژن *ralF* (تکثیر قطعه ۲۳۰ جفت بازی)، ستون ۷) مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز.

(۲۵ درصد) مشاهده گردید. یکی از نمونه ها (۸/۳۳ درصد) به طور هم زمان دو ژن *ralF* و *lepA* را داشت (شکل ۲ و ۳).

از میان ٤٦ مرد مورد آزمون، ٤ نفر (۸/٦۹ درصد) و از بین ٥٤ زن مورد بررسی، ۸ نفر (١٤/۸١ درصد) آلوده به *لژیونلا نموفیلا* بودند. بیشترین فراوانی آلودگی به *لژیونلا نموفیلا* مربوط به گروه سنی بین ٥٥ تا ٦٥ سال با تعداد ٥ نفر (٤١/٦٦) و پس از آن به ترتیب در گروه های سنی ٤٥ تا ٥٥ سال، ۲۵ تا ۳۵ سال، ۳۵ تا ٤٥ سال ٦٥ تا ۷۵ سال و ۱۵ تا ۲۵ سال به ترتیب با فراوانی ۳۳/۳۳، ١٦/٦٦، ۸/۳۳ ، ۰ و ۰ درصد بودند (جدول ۲). پس از بررسی نتایج با نرم افزار آماری مشخص شد که بین شیوع این بیماری با سن و جنس ارتباط معنا داری وجود ندارد. با این وجود مشخص شد که در منطقه مورد مطالعه بیماری عفونت *لژیونلایی* در زنان شایع تر از مردان و در افراد با سن بین ٤٥ تا ٥٥ سال بیشتر رخ می دهد.

بحث

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه برونکوآلوئولار که از افراد مبتلا به عفونت تنفسی مراجعه کننده به مرکز بهداشت شهرستان شهرکرد جمع آوری شده بود، تعداد ۱۲ مورد (۱۲ درصد) *لژیونلا نموفیلا* تشخیص داده شدند. کشت باکتری *لژیونلا* از نمونه های بالینی به دلیل طولانی بودن دوره گرمخانه گذاری و مهار رشد آن توسط سایر ارگانیسم های سریع رشد و ناتوانی روش های متداول تشخیص *لژیونلا*، موجب شده که تشخیص و درمان عفونت های ناشی از *لژیونلا* با مشکل جدی مواجه شود. روش PCR محدودیت های کشت را ندارد و از سرعت و دقت بالاتری نسبت به سایر روش های تشخیصی *لژیونلا نموفیلا* برخوردار است. به دلیل اهمیت *لژیونلا نموفیلا* در ایجاد پنومونی در انسان، تا کنون محققان زیادی آن را مورد مطالعه قرار داده اند.

یزدانی (Yazdani) و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی تشخیص *لژیونلا نموفیلا* به روش کشت و فلورسنت آنتی بادی مستقیم در نمونه های برونکو آلوئولار بیماران مبتلا به پنومونی مراجعه کننده به مراکز پزشکی اصفهان پرداختند. از کشت ۹٦ نمونه برونکوسکوپی، چهار سویه باکتری مشکوک جداسازی گردید. با انجام آزمایشات بیوشیمیایی و روشDFA (Direct fluorescent antibody) مشخص گردید که باکتری های مشکوک جدا شده *لژیونلا نموفیلا* بودند. آن ها دریافتند که فراوانی پنومونی با منشا *لژیونلا نموفیلا* ارتباطی با جنسیت بیماران ندارد و می توان از روش DFA به منظور تشخیص سریع *لژیونلا نموفیلا* استفاده نمود (۱۵). در مطالعه حاضر نیز عدم ارتباط جنسیت با این بیماری به اثبات رسید.

در سال ۲۰۱۱ گودرزی (Goudarzi) و همکاران *لژیونلا نموفیلا* را از نمونه های خلط بیماران مبتلا به پنومونی با روش کشت، ایمنوفلورسانس مستقیم و PCR مورد شناسایی قرار دادند. از مجموع ۲۱۰ کودک مبتلا به عفونت های حاد تنفسی، ۱۲ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر مبتلا به *لژیونلا* مثبت بودند. از مجموع نمونه های مثبت، ۳ مورد با روش کشت، ۵ مورد با آزمون DFA و ۹ مورد با روش PCR شناسایی شدند. یافته های آنها نشان داد که حساسیت و سرعت روش PCR در شناسایی *لژیونلا نموفیلا* بسیار بیشتر از کشت و ایمنوفلورسانس مستقیم در نمونه های خلط می باشد (١٦).

علوی (Alavi) و همکاران در سال ۲۰۰۸ شیوع سرمی *لژیونلا نموفیلا* را در بیماران مبتلا به پنومونی اکتسابی از جامعه بر روی ۸۰ بیمار دچار CAP بستری در بیمارستان رازی اهواز مورد ارزیابی قرار دادند. از مجموع ۸۰ نمونه آزمایش شده، ۱۲ مورد از نظر IgG و IgM مثبت بودند. تمام بیماران با سرولوژی مثبت، سابقه سیگار کشیدن و دریافت قبلی

جدول ۲: توزیع فراوانی آلودگی به *لژیونلا* بر اساس گروه های سنی و جنسیت.

گروه های سنی	تعداد (٪)	تعداد مردان (٪)	تعداد زنان (٪)
۱۵-۲۵	(۳) ۳	-	-
۲۵-۳۵	(۷) ۷	(۱) ۱	(۱) ۱
۳۵-۴۵	(۱۲) ۱۲	-	(۱) ۱
۴۵-۵۵	(٦٤) ٦٤	(۲) ۲	(۲) ۲
۵۵-۶۵	(۹) ۹	(۱) ۱	(٤) ٤
۶۵-۷۵	(۵) ۵	-	-
مجموع	(۱۰۰) ۱۰۰	(٤) ٤	(۸) ۸

آنتی بیوتیک داشتند (۱۷). احمدی نژاد (Ahmadinejad) و همکاران در سال ۲۰۱۱ با روش PCR میزان آلودگی آب سردکن های بیمارستان های شهر کرمان به *لژیونلا* را بررسی نمودند. این محققان میزان آلودگی را ۳۹ درصد گزارش نمودند (۱۸). جالهاک (Jaulhac) و همکاران در سال ۱۹۹۲ برای اولین بار *لژیونلا نموفیلا*، *لژیونلا بزمانی* (*Legionella bozemanii*) و *لژیونلا میک دادیی* (*Legionella micdadei*) را در نمونه های BAL با استفاده از قطعه ٦۳۰ جفت بازی از ژن *mip* تشخیص دادند. در این مطالعه از ٦۸ نمونه، ۱۵ نمونه مثبت تشخیص داده شد (۸).

بنیتز (Benitez) و همکاران در سال ۲۰۱۳ روش Real time PCR چندگانه را برای تشخیص چندین گونه از *لژیونلا* به کار بردند. یافته های آنها نشان داد که روش یاد شده به صورت ۱۰۰ درصد قادر به ردیابی *لژیونلا* در نمونه های بالینی می باشد (۱۹). در تحقیق دیگری که توسط فرناندز (Fernandez) و همکاران از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۰ در اسپانیا بر روی ۱۰۵ بیمار مبتلا به پنومونی اکتسابی با روش کشت و DFA انجام شد، ۳۲ مورد *لژیونلا نموفیلا* و ۹٤ مورد سایر باکتری ها گزارش شد. از کشت خلط ۱۰۲ بیمار، ۱۸ مورد *لژیونلا نموفیلا* مثبت و ۸۵ نمونه سایر باکتری ها گزارش گردید. شایع ترین پاتوژن تنفسی جدا شده در این مطالعه *استرپتوکوکوس نمونیه* (*Streptococcus pneumoniae*) بود و فراوانی پاتوژن های غیر متداول (آتیپیک) عبارت بودند از: *مایکوپلاسما نمونیه* ۷/۵ درصد، *لژیونلا نموفیلا* ۱۷ مورد (۵/۳ درصد) که ۷ مورد با آزمون های سرولوژیکی، ٦ مورد با استفاده از آزمون آنتی ژن ادراری و یک مورد با کشت خلط مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۰).

در مطالعه ای که توسط لیندسی (Lindsay) و همکاران در سال ۲۰۰٤ بر روی ۱۰۷ نمونه و با روش کشت، DFA، IFA و PCR انجام دادند مشخص گردید که با روش DFA به ۵ مورد مثبت و با روش کشت به ۱۰ مورد مثبت *لژیونلا نموفیلا* دست یافتند که ویژگی ۱۰۰ درصد و اختصاصیت به ترتیب ۱۹ و ۸/٤۲ درصد را داشتند. بنابراین از این روش ها می توان به عنوان آزمون های مطمئنی در جداسازی *لژیونلا نموفیلا* استفاده نمود (۲۱).

قوتاسلو (Ghotaslou) و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی *لژیونلا* در ۱۷ بیمارستان شهر تبریز با استفاده از روش PCR پرداختند. در این تحقیق از بین ۱٤۰ نمونه آب لوله کشی، ۷/۱ درصد آلوده به *لژیونلا* و ۲/۸۵ درصد به *لژیونلا نموفیلا* آلوده بودند (۲۲). در مطالعه گروس (Grúas) و همکاران در سال ۲۰۱٤، تشخیص *لژیونلا* در نمونه های آب مورد آزمایش قرار گرفت. در این تحقیق ردیابی *لژیونلا* با روش Real time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* بسیار موفقیت آمیز بود (۲۳). مطالعه الیکس (Alix) و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ژن *ralF* از سیستم ترشحی تیپ ٤ *لژیونلا پنوموفیلا* نشان داد که این ژن سبب آزاد شدن پروتئین های مؤثر می شود که برای تکمیل مسیر بیماری زایی این باکتری ضروری است. همچنین ژن *ralF* مانند ژن های *lidA* و *lepA* برای تکثیر درون سلولی باکتری ضروری می باشد. همچنین دارای سیستمی برای تنظیم عملکرد پروتئین های مؤثر موثر در بیماری زایی این باکتری می باشد (۷). اختلاف در شیوع عفونت لژیونلایی می‌تواند ناشی از عوامل متعددی باشد که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از:

۱) گوناگونی جوامع مطالعه شده از نظر شرایط اجتماعی، آب و هوایی و فصل و زمان مطالعه.

۲) شیوع سرمی عفونت *لژیونلایی* در افراد عادی جامعه که انعکاس‌دهنده میزان مواجهه افراد با این ارگانیسم است. به عنوان نمونه در بین کشورهای اروپایی، اسپانیا بیشترین و اتریش پایین‌ترین شیوع را داشته است.

۳) بافت جمعیتی و وجود افراد با بیماری‌های زمینه‌ای و عوامل خطرسازی مانند مصرف سیگار.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان دریافت که روش های مولکولی، به ویژه PCR نسبت به کشت، روش مناسب تری برای تشخیص *لژیونلا نموفیلا* به محسوب می شود

و می تواند به صورت موفقیت آمیزی این باکتری را از نمونه های بالینی یا نمونه های آبی با دقت و سرعت بالا تشخیص دهد. با توجه به اهمیت تشخیص عفونت *لژیونلا*یی به خصوص در روزهای اول بیماری، نقش روش PCR بیش از پیش نمایان می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین از مرکز بهداشت شهرستان شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Wang CM, Hsu CY, Wang ET, Chen JH, Liu DP. The control strategies of legionnaires' disease in public places. Taiwan Epidemiol Bull. 2012; 28(12): 180-192.

2. Lin YE, Stout JE, Yu VL. Controlling *Legionella* in hospital drinking water: an evidence-based review of disinfection methods. Infect Control Hosp Epidemiol. 2011; 32(2): 166-173.

3. Qin T, Zhou H, Ren H, Guan H, Li M, Zhu B, Shao Z. Distribution of sequence-based types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated from cooling towers, hot springs, and potable water systems in China. Appl Environ Microbiol. 2014; 80(7): 2150-2157.

4. Friedman H, Yamamoto Y, Klein TW. *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity. Semin Pediatr Infect Dis. 2002; 13: 273-279.

5. Arora B, Kaur P, Sethi B. Review article legionellosis: An update. J Clin Diagn Res. 2012; 6(7): 1331-1336.

6. Diederen BM. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. J Infect. 2008; 56(1): 1-12.

7. Alix E, Chesnel L, Bowzard BJ, Tucker AM, Delprato A, Cherfils J, Wood DO, Kahn RA, Roy CR. The capping domain in ralF regulates effector functions. PLoS Pathog. 2012; 8(11): e1003012.

8. Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, Meunier O, Prevost G, Piemont Y, Fleurette J, Monteil H. Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. J Clin Microbiol. 1992; 30(4):920-924.

9. 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.

10. Motaharinia Y, Shapuri R, Rahnama M, Aliramaie MR, Rahmani MR, Rezaie MA. Isolation of *legionella pneumophila* from environment and water system samples and evaluation of immuno-protective efficiency of its whole killed cell in mice model. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2010; 15(2): 70-78.

11. O'Neill E, Humphreys H. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence? J Hosp Infect. 2005; 59(4): 273-279.

12. Liang JL, Dziuban EJ, Craun GF, Hill V, Moore MR, Gelting RJ, Calderon RL, Beach MJ, Roy SL; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for waterborne disease

and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking United States, 2003-2004. MMWR Surveill Summ. 2006; 55(12): 31-65.

13. Pancer K, Rabczenko D, Krogulska B, Matuszewska R, Ozygała J, Stanisławska A, Trzcińska A, Stypułkowska-Misiurewicz H. Microbiological evaluation of risk of legionellosis and practical methods applied for elimination of *Legionella pneumophila* from hospital water systems. Przegl Epidemiol. 2008; 62(2): 439-446.

14. Stockwell BR. Frontiers in chemical genetics. Trends Biotechnol. 2000; 18: 449-455.

15. Yazdani RA. Detection of *Legionella pneumophila* culture and direct fluorescent antibody method in bronchoalveolar samples of pneumonia patients admitted to the medical centers of Esfahan. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci Health Serv. 2005; 14(4): 64-68. [In Persian]

16. Goudarzi H, SeyedJavadi S, Goudarzi M. Detection of *Legionella pneumophila* by sputum culture, direct immunoflurscence and PCR. Pajouhesh. 2011; 35 (2): 119-124. [In Persian]

17. Alavi SM. Seroprevalence of *Legionella pneumophila* in patients with community acquired pneumonia. J Guilan Univ Med Sci. 2008; 18(72): 63-69. [In Persian]

18. Ahmadinejad M, Shakibaie MR, Shams K, Khalili M. 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: 20-23.

19. Benitez AJ, Winchell JM. Clinical application of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Legionella* species, *Legionella pneumophila*, and *Legionella pneumophila* serogroup 1. J Clin Microbiol. 2013; 51(1): 348-351.

20. Fernández JA, López P, Orozco D, Merino J. Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21(10): 729-735.

21. Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GF. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J Med Microbiol. 2004; 53(3): 183-187.

22. Ghotaslou R, Yeganeh Sefidan F, Akhi MT, Soroush MH, Hejazi MS. Detection of *legionella* contamination in Tabriz hospitals by PCR assay. Adv Pharm Bull. 2013; 3(1): 131-134.

23. Grúas C, Llambi S, Arruga MV. Detection of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in water samples of Spain by specific real-time PCR. Arch Microbiol. 2014; 196(1): 63-71.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 2, June 2015

Original Article

A survey of the frequency of *rahF* and *lepA* genes in *Legionella pneumophila* isolated from the patients suffering of respiratory infections

Abbas Doosti[1], **Fatemeh Alaei**[2], **Froozan Khedri**[3]

[1]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[2]M.Sc., Biotechnology Research Center, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Legionella pneumophila* is an aerobic gram-negative bacterium and etiology of legionnaires disease. The *ralF* and *lepA* genes belong to the members of type IV secretion system are essential for intracellular growth and survival of bacteria. The aim of this study was to isolate *L. pneumophila* from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid samples and the frequency of *lepA* and *ralF* genes.

Materials & Methods: This cross-sectional study was carried out on100 BAL fluid samples collected from the patients suffering of respiratory infections who visited Charmahal-O-Bakhtiri health centers. Isolation of *L. pneumophila* was performed using a specific medium (BCYE). Then, all the samples were evaluated using PCR and specific primers designed for *16S rRNA* gene. Furthermore, the frequency of *lepA* and *ralF* genes was determined using PCR method.

Results: Overall, 9% of the total 100 samples were infected to *L. pneumophila.* Furthermore, molecular tests showed that 12 cases out of these samples were positive for this bacterium. The frequency of the *ralF* and *lepA* genes in these samples were measured 41.66 and 25%, respectively. In addition, 8.33% of the samples carried both genes.

Conclusion: Our studies indicated high frequency of the *ralF* and *lepA* genes in *L. pneumophila* isolated from this area. It is possible to determine *L. pneumophila* in fresh samples based on PCR technique without using in media. Furthermore, PCR technique is faster and more accurate for detection of *L. pneumophila* in bronchoalveolar samples in comparison to culture method.

Keywords: *Legionella pneumophila,* Bronchoalveolar, *ralF* gene*, lepA* gene.

Correspondence to: Abbas Doosti

Tel: +989133838830

E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 8(2): 103-111