پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، صفحات ۱۱۹ تا ۱۲۴

مقاله اصلی
(Original Article)

شناسایی لژیونلا پنوموفیلا از نمونه‌های خلط بیماران مبتلا به پنومونی با روش کشت، ایمنوفلورسانس مستقیم و PCR

دکتر حسین گودرزی*[۲،۱]، سیما السادات سید جوادی[۲]، مهدی گودرزی[۲]

[۱] مرکز تحقیقات عفونی گرمسیری،دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] گروه میکروب شناسی،دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *لژیونلا پنوموفیلا یکی از ۴ دلیل عمده پنومونی اکتسابی از جامعه و عامل بیش از ۹۵ درصد پنومونی لژیونلایی است. جداسازی عامل ایجاد کننده پنومونی از نمونه‌های خلط و ادرار با کشت، فرایندی بسیار زمان‌بر می‌باشد. از طرفی، بعضی از گونه‌های لژیونلا با وجود زنده ماندن در نمونه‌های بالینی در محیط کشت قادر به رشد نمی‌باشند. هدف از این مطالعه، جداسازی لژیونلا از نمونه‌های خلط با روش‌های کشت، ایمنوفلورسانس مستقیم و PCR است.*

روش بررسی: *در این تحقیق توصیفی، از ۲۱۰ بیمار مشکوک به پنومونی لژیونلایی نمونه خلط تهیه شد. نمونه‌ها از بیمارستان‌های آموزشی درمانی کودکان شهر تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بر روی محیط اختصاصی لژیونلا (BCYE) کشت داده شدند. تست ایمنوفلورسانس مستقیم بر روی نمونه‌های خلط انجام و تمامی نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن mip با روش PCR ارزیابی شدند.*

یافته‌ها: *از ۲۱۰ کودک مبتلا به عفونت‌های حاد تنفسی، ۱۲ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر ابتلا به لژیونلا مثبت بودند. از ۱۲ مورد مثبت مربوط به نمونه‌های خلط، ۳ مورد با کشت و ۵ مورد با DFA و ۹ مورد با PCR شناسایی شدند.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که حساسیت و سرعت روش PCR بسیار بیشتر از کشت و ایمنوفلورسانس مستقیم در نمونه‌های خلط برای شناسایی لژیونلا پنوموفیلا است. بنابر این روش PCR می‌تواند روش مناسبی جهت شناسایی و جداسازی لژیونلا از نمونه‌های خلط باشد.*

واژگان کلیدی: *لژیونلا پنوموفیلا، DFA، PCR.*

مقدمه

لژیونلا پنوموفیلا عامل اتیولوژیک بیماری لژیونر است که اکثریت موارد پنومونی را به خود اختصاص می‌دهد. تاکنون ۴۹ گونه و ۵۰ سروتیپ در این جنس تشخیص داده شده است. حدود ۸۵ درصد بیماری لژیونر توسط لژیونلا پنوموفیلا ایجاد می‌شود که ۵۰ درصد آن توسط سروگروه یک و ۱۰ درصد آن توسط سروگروه ۶ بوجود می‌آید. آب بزرگ‌ترین مخزن لژیونلاها می‌باشد و این باکتری درمحیط‌های آب شیرین در تمام دنیا پیدا شده است. ۱ تا ۳ درصد پنومونی اکتسابی از جامعه و بیش از ۳۰-۱ درصد پنومونی‌های اکتسابی از بیمارستان ناشی از لژیونلا است. (۲،۱). میزان مرگ و میر در افراد مختلف از ۵ تا ۳۰ درصد و در افراد مسن و افرادی که دارای نقص ایمنی می‌باشند تا۸۰ درصد هم گزارش شده است (۳). لژیونلا در نمونه‌های بالینی و بافت در روش رنگ‌آمیزی گرم به شکل کوکوباسیل می‌باشد. تفاوت این باکتری با سایر باکتری‌ها در این است که رنگ گرم را به سختی می‌گیرد. به همین دلیل استفاده از فوشین بازی به جای سافرانین جهت رنگ‌آمیزی بهتر باسیل توصیه شده است. جهت کشت و جداسازی این باکتری از محیط اختصاصی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، دکتر حسین گودرزی (**e-mail:** hgod100@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۵/۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۲/۱۲

BCYE (Buffered charcoal yeast extract) با انکوباسیون ۳ تا ۵ روز استفاده می‌شود (۴). امروزه لژیونلا به عنوان عامل مهمی در پنومونی‌های اکتسابی از بیمارستان مطرح بوده و از آنجایی که راه اصلی ورود این ارگانیزم به بدن از طریق قطرات آب می باشد، لذا پنومونی در افرادی که در تماس با منبع آبی آلوده قرار دارند ایجاد می‌شود (۵). این باکتری قادر به ایجاد بیماری به صورت اسپورادیک و اپیدمیک است. از طرفی عفونت همزمان لژیونلا با سایر عوامل بیماری‌زای تنفسی مثل استرپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفلونزا و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند مشکلات عدیده‌ای به بار آورد. اگر بیماران مبتلا به لژیونلا در مراحل اولیه بیماری تشخیص و مورد درمان قرار گیرند، خطر جدی آنها را تهدید نخواهد کرد. دوره درمان این بیماری ۱۴-۱۰ روز طول می‌کشد. البته افراد دارای سیستم ایمنی طبیعی به درمان پاسخ خوبی خواهند داشت. این در حالی است که درمان در بیماران با ضعف سیستم ایمنی این چنین نخواهند بود و اغلب به علت تاخیر در درمان و تشخیص دیر هنگام، درمان آنها با شکست مواجه خواهد شد (۶). آسپیراسیون‌های برونش نمونه‌های بهتری هستند و حساسیتی حدود ۹۰ درصد دارند، این در حالی است که نمونه‌های خلط حساسیتی حدود ۷۰ درصد دارند (۷). آسپیراسیون ترشحات برونش و نای، لاواژ آلوئولار، بیوپسی بافت ریه و جمع‌آوری نمونه‌های خلط از جمله روش‌های نمونه‌گیری از دستگاه تنفس تحتانی می‌باشند (۸). به طور کلی جهت تشخیص لژیونلا از نمونه‌های بالینی از روش‌های کشت، رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی فلورسانت مستقیم و ردیابی آنتی ژن لژیونلا در نمونه‌های ادراری استفاده می‌شود.کشت به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص لژیونلا از ارزش بالایی برخوردار است، ولی طولانی بودن زمان انکوباسیون و تاثیر درمان آنتی‌بیوتیکی در نتیجه کشت، از جمله معایب این روش است (۹). نمونه‌های خلط را می‌توان با گیمسا یا به طور اختصاصی‌تری در روش ایمنوفلورسانس (DFA) رنگ‌آمیزی کرد. حساسیت تست DFA حدود ۷۰ درصد است. البته تست‌های جدیدتری برای شناسایی حضور آنتی‌ژن‌های محلول لژیونلا پنوموفیلا در ادرار توسعه یافته‌اند که دارای حساسیت ۷۵ تا ۹۰ درصد می‌باشند (۱۰). نیاز به یک روش تشخیصی جامع و کامل که نسبت به سایر روش‌ها در تشخیص لژیونلا دارای حساسیت بالا، توانایی تشخیص بیماری در مراحل اولیه و تعیین بیماران فاقد علایم بالینی باشد، ضروری به نظر می‌رسد. لذا به منظور شناسایی لژیونلا پنوموفیلا از نمونه‌های خلط بیماران مبتلا به پنومونی با روش کشت، ایمنوفلورسانس مستقیم و PCR این تحقیق بر روی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان در سال ۱۳۸۹ انجام گرفت.

مواد و روشها

تحقیق به روش توصیفی انجام گرفت. طی ۱۲ ماه کلیه نمونه‌های خلط کودکان ۶ ماه تا ۱۴ سال مبتلا به عفونت حاد تنفسی در بیمارستان کودکان توسط پزشک متخصص اطفال تهیه شد. نمونه خلط گرفته شده بلافاصله در لوله‌های درپیچ دار استریل جمع‌آوری و در فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های خلط به سه قسمت جهت انجام تست‌های کشت، ایمنوفلورسانس مستقیم و PCR تقسیم شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام تکنیک PCR در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت کشت باکتری‌ها، نمونه‌های خلط در حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تیمار حرارتی شدند. سپس نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سوسپانسیون رویی دور ریخته شد. سپس باقیمانده سلول‌ها در محیط اختصاصی BCYE (محیط اختصاصی لژیونلا حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین B، ونکومایسین و سیکلوهگزامید) به روش خطی کشت داده شدند. تمامی پلیت‌های تلقیح شده در جار شمع دار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰-۷۰ درصد انکوبه شدند. پلیت‌ها پس از گذشت سه روز مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت مشاهده کلنی، از مراحل رنگ‌آمیزی، آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز هیپورات سدیم جهت تشخیص قطعی بهره گرفته شد و در صورت عدم مشاهد کلنی پس از گذشت سه روز با توجه به کند رشد بودن لژیونلاها انکوباسیون به مدت ۱۲ روز ادامه یافت (۷).

پس از انتقال نمونه‌های خلط به آزمایشگاه جهت انجام آزمایش ایمنوفلورسانس مستقیم، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰۰rpm سانتریفیوژ شدند و سپس مایع رویی دور ریخته شد و باقیمانده سانتریفیوژ در نرمال سالین حل شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از آن بر روی اسلاید مخصوص در معرض هوا قرار داده شد تا به خوبی خشک شوند. سپس آنتی‌بادی نشان‌دار شده با فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) بر علیه لژیونلا به آن اضافه و پس از انجام سایر مراحل و شستشو با بافر فسفات سالین بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (SciMedX) توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردید (۱۱).

در آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام PCR، به هم حجم نمونه‌های خلط، بافر فسفات سالین اضافه و در ۲۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شد. بر مبنای آلودگی بزاق این مرحله تا سه بار تکرار شد. مایع رویی دور ریخته شد و سپس به محتویات باقیمانده ۵ میکرولیتر پروتئیناز اضافه و در دمای ۵۵ درجه به

مدت ۳ ساعت و سپس در دمای ۹۵ درجه بـه مـدت ۳۰ دقیقـه قرار داده شد. DNA بـه روش فنـل کلروفـرم اسـتخراج و در ۵۰ میکرولیتر بافر TE نگهداری شـد. DNA اسـتخراج شـده توسـط روش اسـپکتروفتومتری مـورد بررسـی قـرار گرفـت و optical density DNA (OD) استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (۷).

برای تـشخیص لژیـونلا در روش PCR از پرایمرهـای اختـصاصی بخشی از کروموزوم باکتری که ژن mip را کد می‌کننـد اسـتفاده شد که دارای توالی زیر بود:

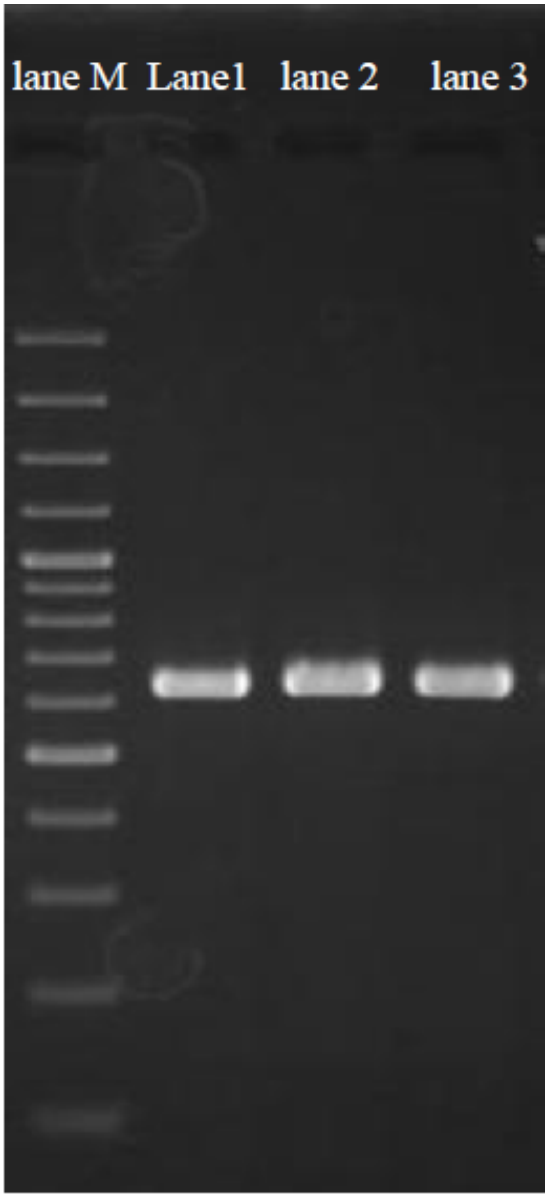
forward پرایمر 5-GGT GAC TGC GGC TGT TAT GG-3

reverse پرایمر 5-GGC CAA TAG GTC CGC CAA CG-3

توسط پرایمرهای فوق یک قطعه به طول ۶۳۲ جفت بـاز تکثیـر شـد. ۵ میکرولیتـر از DNA اسـتخراج شـده در ۵۰ میکرولیتـر مخلوط واکنش شامل غلظت‌های PCR بافر ۱x، ۰/۳ میکرومول از هرکدام پرایمـر، ۲ میکرومـول از Mgcl2، ۰/۲ میکرومـول از هـر کدام dNTP، ۰/۵ واحد از taq polymerase و آب مقطر دیـونیزه به کار برده شد. برای انجام PCR از 3 step PCR استفاده کـردیم که شامل شرایط زیر می‌باشد و ایـن سـیکل ۴۰ بـار تکـرار شـد. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد بـه مـدت ۶۰ ثانیه، annealing در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گـراد بـه مـدت ۱۰۰ ثانیه، extension در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت extension نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گـراد بـه مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. آب خالص بـه عنـوان کنتـرل منفـی جهت تکثیر استفاده شد. در نهایت قطعه‌ای به طول ۶۳۲ جفـت بازی را تکثیر نمودیم (۹).

یافته‌ها

در کل، ۲۱۰ نمونه واجد شرایط مورد بررسی قـرار گرفـت. سـن بیماران ۶/۱±۴/۵ سال گزارش شد که از این تعداد ۱۲ مورد (۵/۷ درصد) از نظر ابتلا به لژیونلا مثبت بودند. از ۲۱۰ نمونه، ۳ نمونه (۱/۴ درصد) با کشت مثبت بودند و ۵ مورد آن (۲/۴ درصـد) بـا روش ایمنوفلورسنت مثبت ارزیابی شدند. ۱۲ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر ژن *mip* مثبت بودند. شکل ۱ نتایج محصول PCR را بعد از انجام الکتروفورز نشان می‌دهد. در این شکل، وجـود بانـد ۶۳۲ جفت بازی نشان‌دهنده وجود ژن *mip* در نمونه‌های خلط و مثبت بودن نتیجه جهت شناسایی لژیـونلا محـسوب مـی‌گـردد. از ۱۲ بیمار مبتلا به لژیونر، ۳ نمونه (۲۵ درصد) توسط کشت و ۵ نمونه (۴۱/۷ درصد) توسط ایمنوفلورسنت مستقیم و ۱۲ نمونـه (۱۰۰ درصد) توسط روش PCR تشخیص داده شدند.



شکل ۱– نتایج الکتروفورز به دست آمده از نمونه PCR بیماران.
Lane M : مارکر؛ Lane 1 :کنترل مثبت؛ Lane 2 : نمونه مثبـت بیمـار؛ Lane 3 :نمونه مثبت بیمار

از ۵ نمونـه‌ای (۲/۴ درصـد) کـه توسـط روش ایمنوفلورسـنت مستقیم شناسایی شدند، تنها ۲ نمونـه آن توسـط روش کـشت تایید و ۵ نمونه (۱۰۰ درصد) آن توسط روش PCR تاییـد شـد. این در حالی است کـه روش PCR قـادر بـود کـه ۶ نمونـه (۵۰ درصد) را که توسط هیچ کدام از دو روش بـه کـار رفتـه در ایـن تحقیق قابل شناسایی نبودند، را تشخیص دهد.

بحث

در این مطالعه، از ۲۱۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۱۲ مورد (۵/۷ درصد) از نظر ابتلا به لژیونلا مثبت بودند. در این تحقیق از نمونه خلط بیماران مشکوک به پنومونی مراجعه کننده به بیمارستان برای جداسازی لژیونلا استفاده شد. کشت باکتری لژیونلا از نمونه‌های بالینی به علت طولانی بودن دوره انکوباسیون و مهار رشد آن توسط سایر ارگانیسم‌های سریع رشد و ناتوانی روش‌هایی که هم اکنون برای تشخیص لژیونلا در دسترس است، سبب شده است تشخیص عفونت لژیونلایی و درمان آن هم با مشکل جدی مواجه شود. از نمونه‌های مختلفی جهت تشخیص عفونت ناشی از لژیونلا استفاده می‌شود. نمونه‌های مناسب برای جداسازی باکتری، آسپیراسیون برونش یا خلط مجاور شده با اسید می‌باشند. البته ناتوانی بیماران به خصوص کودکان در دادن خلط از یک طرف و نیز آلوده شدن خلط با ترشحات دهان و بزاق در هنگام دادن نمونه و ایجاد نتیجه منفی کاذب سبب شده است که این نمونه‌ها کمتر مورد اطمینان باشند (۷). روش PCR محدودیت‌های کشت را ندارد. در تحقیق حاضر نیز ۱۰۰ درصد نمونه‌های مشکوک به عفونت لژیونلایی، با روش PCR از نظر حضور لژیونلا، مثبت ارزیابی شدند. برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا توسط روش PCR از ژن *mip* استفاده شد. سویه‌های فاقد این پروتئین، کاهش ۸۰ درصدی عفونت را نشان می‌دهند (۱۲،۹). بنابراین در این تحقیق نیز با استفاده از ژن *mip* که برای لژیونلا پنوموفیلا اختصاصی‌تر است، اقدام به شناسایی لژیونلا در نمونه‌های خلط شد. درصد آلودگی با لژیونلا پنوموفیلا در بین سایر اعضای این خانواده از درصد بالای برخوردار است. هدف این تحقیق، تعیین فراوانی لژیونلا در نمونه‌های خلط کودکان دارای علایم تنفسی و نیز راه‌اندازی روش PCR بر اساس ژن mip لژیونلا پنوموفیلا در نمونه‌های خلط بیماران مبتلا به پنومونی و تشخیص موارد مثبت توسط PCR و مقایسه آن با روش‌های تشخیصی دیگر از جمله DFA و کشت که استاندارد طلایی برای تشخیص باکتری محسوب می‌شود، بود. در مطالعه حاضر تعداد موارد مثبت لژیونلای تشخیص داده شده با روش PCR تقریبا دو برابر موارد تشخیص داده شده با روش کشت و ایمنوفلورسنت مستقیم است که نشان دهنده حساسیت بالای PCR نسبت به کشت و ایمنوفلورسنت مستقیم است. از طرف دیگر تعداد موارد مثبت لژیونلای تشخیص داده شده با روش ایمنوفلورسنت مستقیم تقریبا دو برابر موارد تشخیص داده شده با روش کشت است که نشان دهنده بالاتر بودن حساسیت ایمنوفلورسنت مستقیم نسبت به کشت است. تمامی نمونه‌های مثبت با روش کشت و ایمنوفلورسنت از نظر PCR هم مثبت بودند، ولی ۲۵ درصد از نمونه‌هایی که با روش کشت مثبت و ۴۱ درصد آنها با روش ایمنوفلورسنت مستقیم مثبت بودند. در این بررسی، نتایج PCR صحت موارد جدا شده با کشت و ایمنوفلورسنت مستقیم را تایید می‌کند، این در حالی است که تنها در یک مورد اختلاف بین نتیجه کشت و ایمنوفلورسنت مستقیم مشاهده می‌شود. بنابراین مورد منفی کاذب مشاهده نمی‌شود.

Lim و همکارانش در مطالعه‌ای به بررسی اتیولوژیک CAP در بالغین بستری شده در بیمارستان پرداختند. از ۲۶۷ نفر با علایم پنومونی، تنها ۹ مورد (۳/۳ درصد) لژیونلا پنوموفیلا جداسازی گردید. این در حالی است که در تحقیق حاضر در کودکان این میزان ۵/۷ درصد می باشد که حاکی از شیوع بیشتر این ارگانیزم در کودکان مورد مطالعه می‌باشد (۶).

Arnouts و همکارانش در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که در مبتلایان به عفونت تنفسی، لژیونلا ۱۸/۴ درصد موارد را شامل می‌شود و بیماران دارای بیماری‌های مستعد کننده‌ای مثل نقص کلیوی، بیماری‌های قلبی و یا اعتیاد به الکل استعداد بالایی از نظر ابتلا به این بیماری دارند، این در حالی است که در کودکان به خاطر تنفس هوای بیشتر، نوشیدن آب و غذای بیشتر و عفونت‌های منتقله از راه دست به دهان در معرض بیشتر این باکتری قرار داشته، ولی کمتر به این باکتری مبتلا می‌شوند که نتایج حاصل از این تحقیق مبین این نکته است (۱۳).

مطالعه Fang و همکارانش در ۳۵۹ بیمار مبتلا به پنومونی اکتسابی از جامعه نشان داد که میزان شیوع پنومونی‌های ناشی از کلامیدیا پنومونیه و لژیونلا نسبت به سایر عوامل رو به افزایش است. از این رو انجام تست‌های تشخیصی این ارگانیسم‌ها خصوصاً در مورد بیمارانی که به درمان‌های استاندارد پاسخ نمی‌دهند، به نظر ضروری می‌رسد (۱۴).

Jaulhac و همکارانش در سال ۱۹۹۲ با انجام تکنیک PCR ژن mip بر روی نمونه‌های BAL، لژیونلا پنوموفیلا، لژیونلا بزمانی (*Legionella bozemanii*) و لژیونلا میکددی (*Legionella micdadei*) را تشخیص دادند و حساسیت روش آنها ۵۰ فیکوگرم گزارش شد. در این مطالعه از ۶۸ نمونه، ۱۵ نمونه (۲۲ درصد) مثبت تشخیص داده شدند (۱۵).

امروزه مشخص شده است که روش‌های بر پایه تکثیر اسیدهای نوکلئیک محدودیت‌های کشت را نداشته و در مورد

نمونه‌های برونکوآلوئولار لاواژ، سواپ نازوفارنژیال، سواپ فارنژیال و سلول‌های تک هسته‌ای در خون و ادرار سودمند واقع شده است. ادرار بیماران مبتلا به پنومونی مورد بررسی قرار گرفت که در آن فراوانی لژیونلا ۱۸/۳ درصد به دست آمد. DFA قادر به شناسایی ۶۷ درصد، IFA قادر به شناسایی ۲۶ درصد و DFA و IFA با هم قادر به شناسایی ۷۵ درصد از موارد احتمالی لژیونلا بودند (۱۶).

در مطالعه‌ای که توسط Winn و همکارانش در سال ۱۹۸۰ بر روی بیماران مشکوک به پنومونی صورت گرفت، از ۲۰ نمونه مورد مطالعه، ۶ نمونه (۴ نمونه مثبت و ۲ نمونه مشکوک) با روش DFA مثبت ارزیابی شدند که نسبت به کشت و تست‌های سرولوژی از حساسیت بالایی برخوردار بود (۱۷).

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ توسط مسعود حاجیا و همکارانش در بیمارستان آموزشی همدان بر روی نمونه BAL انجام شد، فراوانی لژیونلا ۸/۶ درصد به دست آمد. از ۴۶ بیمار، در کشت فقط یک مورد (۲/۲ درصد) مثبت شد، ولی در روش PCR چهار مورد (۸/۷ درصد) مثبت گزارش شد (۱۸). این نشانگر حساسیت بالاتر روش PCR است، ولی در مورد کشت در حدود ۵۰-۶۰ درصد ذکر شده که می‌تواند به علت مصرف آنتی‌بیوتیک توسط بیمار و یا کشته شدن باکتری تا مرحله انتقال به محیط کشت باشد. این در حالی است که در مقایسه با تحقیق حاضر، نمونه‌های BAL ارجحیت بیشتری نسبت به نمونه‌های خلط دارند. بعضی از محققین معتقدند که PCR توانایی بیشتری نسبت به کشت در تشخیص لژیونلا دارد که نتایج تحقیق حاضر نیز این مورد را تأیید می‌کند. در تحقیقی مشابه که در سال ۲۰۰۳ توسط توسط مسعود حاجیا و همکارانش انجام شد، روش PCR را روشی با حساسیت بالاتر و سریع‌تر از کشت نشان داد (۱۹).

درمطالعه‌ای در مصر (۲۰۰۳)، روش‌های اسمیر مستقیم، کشت، DFA و PCR روی نمونه‌های تنفسی مقایسه شدند. حساسیت و ویژگی PCR و DFA به ترتیب ۹۹ و ۵۲/۴ درصد گزارش شد. DFA به عنوان تست غربالگری سریع و ویژه برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا از نمونه‌های تنفسی به کار رفت. DNA ارگانیسم توسط PCR در ۲۱ نمونه از ۵۰ نمونه (۴۲ درصد) و ۱۱ نمونه از ۵۰ نمونه (۲۲ درصد) توسط DFA شناسایی شدند (۲۰).

در سال ۲۰۰۳، ویلسون و همکارانش با روش PCR کمی و با استفاده از ژن *mip* به بررسی لژیونلا پنوموفیلا پرداختند که در نهایت از ۱۵۰ نمونه، ۲۷ ایزوله آن لژیونلا پنوموفیلا بود که ۷ نمونه از نظر کشت لژیونلا پنوموفیلا مثبت بودند و تمامی ۷ نمونه به وسیله روش PCR شناسایی شدند و فقط ۵ مورد از این ۷ مورد مثبت توسط کشت و PCR با روش DFA مثبت بودند (۲۱).

در بررسی دیگر که توسط Cloud و همکارانش در سال ۲۰۰۰ به منظور شناسایی لژیونلا در نمونه‌های تنفسی صورت گرفت، تمامی نمونه‌های مثبت توسط کشت یا روش PCR مثبت شدند و ۴ نمونه با روش کشت منفی، ولی در PCR مثبت شدند (۲۲).

اطلاعات کافی در زمینه فراوانی لژیونلا در کودکان ایرانی وجود ندارد. در این پژوهش، میزان فراوانی لژیونلا در کودکان تهرانی ۵/۷ درصد بود و مشخص شد که اگرچه تست‌های DFA از تست‌های سریع در تشخیص لژیونلا محسوب می‌شوند، ولی از حساسیت نسبتا پایینی برخوردار هستند. بنابراین تست تشخیصی PCR احتمالا گزینه مناسبی از نظر سریع بودن و حساسیت بالا است. با توجه به نتایج به دست آمده در مورد نمونه‌های خلط،کشت دارای حساسیت نسبتا پایینی در مقایسه با سایر روش‌ها می‌باشد. زیرا عواملی همچون مصرف سالین یا درمان آنتی‌بیوتیکی در بیماران ممکن است که به کشت منفی منجر گردد. در مورد نمونه‌های خلط، تست PCR با حساسیت بالا، تست تشخیصی مناسبی است. این نتاج حاکی از آن است که PCR با ویژگی و حساسیت بالا نسبت به سایر روش‌های تشخیصی در نمونه‌های خلط می‌تواند کاربرد داشته باشد.

REFERENCES

1. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. Ecological distribution of Legionella pneumophila. Appl Environ Microbiol 1981; 41: 9-16.
2. Falcó V, Fernández de Sevilla T, Alegre J, Ferrer A, Martínez Vázquez JM. Legionella pneumophila. A cause of severe community-acquired pneumonia. Chest 1991; 100: 1007-11.
3. Roig J, Aguilar X, Ruiz J, Domingo C, Mesalles E, Manterola J, et al. Comparative study of Legionella pneumophila and other nosocomial-acquired pneumonias. Chest 1991; 99: 344-50.
4. Konmane EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and text book of diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1997. p.437-88.

5. Marston BJ, Plouffe JF, File TM Jr, Hackman BA, Salstrom SJ, Lipman HB, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. Arch Intern Med 1997; 157: 1709-18.

6. Lim WS, Macfarlane JT, Boswell TC, Harrison TG, Rose D, Leinonen M, et al. Study of community acquired pneumonia etiology (SCAPA) in adults admitted to hospital: implications for management guidelines. Thorax 2001; 56: 296-301.

7. Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 871-78.

8. Socan M, Marinic-Fiser N, Kese D. Comparison of serologic tests with urinary antigen detection for diagnosis of legionnaires' disease in patients with community-acquired pneumonia. Clin Microbiol Infect 1999; 5: 201-204.

9. Lindsay DS, Abraham WH, Fallon RJ. Detection of mip Gene by PCR for diagnosis of Legionnaires' disease. J Clin Microbiol 1994; 32: 3068-69.

10. 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: 49-55.

11. Hayden RT, Uhl J R, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, et al. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of light cycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. J Clin Microbiol 2001; 39: 2618–26.

12. Engleberg NC, Carter C, Weber DR, Cianciotto NP, Eisenstein BI. DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. Infect Immun 1989; 57: 1263-70.

13. Arnouts PJ, Ramael MR, Ysebaert DK, Verpooten GA, de Broe ME, van Marck EA, et al. *Legionella pneumophila* peritonitis in a kidney transplant patient. Scand J Infect Dis 1991; 23: 119-22.

14. Fang GD, Yu VL, Vickers RM. Disease due to the *Legionellaceae* (other than *Legionella pneumophila*). Historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. Medicine (Baltimore) 1989; 68: 116-32.

15. Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, Meunier O, Prevost G, Piemont Y, et al. Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. J Clin Microbiol 1992; 30: 920-24.

16. Helbig JH, Engelstadter T, Maiwald M, Uldum SA, Witzleb W, Luck PC. Diagnostic relevance of the detection of Legionella DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 716-22.

17. Winn WC Jr, Cherry WB, Frank RO, Casey CA, Broome CV. Direct immunofluorescent detection of Legionella pneumophila in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1980; 11: 59-64.

18. Hajia M, Hosseini doust R, Rahbar M. identification of *Legionella pneumophila* in bronchoalveolar lavage fluid specimens by PCR. Arch Iranian Med 2004; 7: 287-91.

19. Hosseini doust R, Mohabbati Mobarez A, Hajia M. Detection of *L. pneumophila* by PCR within culture negative samples. Yakhteh 2003; 4: 219-23. [In Persian]

20. Shaker OM, Nafeh AM, Nafeh MM. Diagnosis of *Legionella pneumonia* in immunocompromised patients in intensive care unit by polymerase chain reaction. Egypt J Med Lab Sci 2003; 12: 123-28.

21. Wilson DA, Liberman BY, Reishl U, GordonSM, Procop GW. Detection of *Legionella pneumophila* by real time PCR for the mip gene. J Clin Microbiol 2003; 41: 3327-30.

22. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Microbiol 2000; 38: 1709-12.