

بررسی میزان آلودگی منابع آب محیطی و بیمارستان های شهر اهواز به باکتری لژیونلا، با استفاده از کشت و تکثیر ژن 16S rRNA

مینا مرادزاده^{۱*}، سید مجتبی موسویان^۲

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲. گروه میکروب شناسی، انستیتو تحقیقات بهداشتی - مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: بیماری لژیونر در نتیجه ی استنشاق آئروسول های آلوده، از منابع آبی مختلف ایجاد می شود. هدف از این مطالعه، بررسی میزان آلودگی منابع آب محیطی و بیمارستان های شهر اهواز به باکتری لژیونلا، با استفاده از روش استاندارد کشت و روش مولکولی مبتنی بر PCR می باشد.

مواد و روش ها: تعداد ۱۰۰ نمونه آب از منابع مختلف محیطی و بیمارستانی سطح شهر اهواز برداشت و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها بعد از تریتمنت اسیدی جهت حذف باکتری های مزاحم به محیط های کشت BCYE و MWY تلقیح گردیدند. هم چنین از متد PCR، جهت تکثیر ژن 16S rRNA و تایید ایزوله های جدا شده بر روی محیط کشت استفاده شد.

یافته ها: نتایج این مطالعه از طریق کشت نشان داد که ۱۵٪ از مجموع ۱۰۰ نمونه آب مورد بررسی از نظر حضور لژیونلا ها مثبت بودند که فراوانی نسبی آنها در نمونه های بیمارستانی ۸٪ و در نمونه های محیطی ۷٪ بوده است. تمام نمونه های مثبت از طریق کشت، با انجام PCR ژن 16S rRNA مورد تایید قرار گرفتند.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که علی رغم استفاده از آب تصفیه شهری ۱۵٪ نمونه ها به باکتری لژیونلا آلوده بودند. بنابراین جلوگیری از انتشار باکتری با استفاده مداوم از ضد عفونی کننده ها، امری ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: لژیونلا-سیستم های آبی-PCR

مقدمه

شرایطی را برای باکتری به وجود می آورد که می تواند به راحتی در مقابل عملیات تصفیه آب (کلر زنی و...) مقاومت کند. در نتیجه به طور طبیعی در آب های تازه به صورت پلانکتونی یا بیوفیلم زنده مانده و از طریق تشکیل آئروسول وارد ریه انسان شده و ایجاد بیماری می کند. لژیونلا با استفاده از روش های کشت و PCR به ترتیب در ۴۰ و ۸۰ درصد آب های شیرین قابل جداسازی است (۱۶). این باکتری علاوه بر منابع آبی مثل دریاچه ها، رودخانه ها از شبکه های لوله کشی شهری، تأسیسات خنک کننده و تهویه مطبوع، سیستم های توزیع آب سرد و گرم در ساختمان های بزرگ و هتل ها و بیمارستان ها حتی از منازل مسکونی جدا شده است (۱۹). کلیه وسایل و تجهیزات آبی که در حین کار قطرات و ذرات ریز (آئروسول=افشانه) ایجاد می کنند از قبیل دوش حمام ها، کولرهای آبی، شیر آب و مرطوب کننده ها در انتقال لژیونلا از آب به هوا و آلودگی آن نقش دارند.

لژیونلا ها کوکوباسیل های گرم منفی، هوازی، بدون اسپور می باشند (۱۸،۱۳). لژیونلا یک باکتری هتروفیلیک در شبکه آبرسانی می باشد که می تواند بعضی تک یاخته ها را آلوده کرده و سپس در داخل آن ها تکثیر نماید. این خصوصیت امکان بقای لژیونلا را در منابع و مخازن آبی ساخت انسان (لوله کشی های منازل و ساختمان ها، کولرهای آبی و استخر ها) فراهم می کند و

نویسنده مسئول:

گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور

اهواز، اهواز، ایران

آدرس پست الکترونیکی: mi.1366@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۰۷/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۱/۱۷

استنشاق این آئروسول های آلوده توسط انسان به بیماری و در نتیجه ایجاد همه گیری منجر می شود (۱۶). تاکنون ۵۲ گونه و ۷۱ سرگروپ از لژیونلا شناسایی شده که حداقل ۲۳ گونه از آن برای انسان بیماری زا می باشد (۱۲). لژیونلا می تواند عامل ۲ نوع بیماری باشد. تب پونتیاک (Pontiac fever) یک بیماری شبه آنفلوآنزای خود محدودشونده و از سوی دیگر بیماری سیستمیک و کشنده لژیونر (Legionnaire's disease) که یک بیماری پنومونیک بالقوه خطرناک می باشد (۲۳). از عوامل اصلی شیوع لژیونلوزیس در بیمارستان ها و ساختمان های بزرگ ، می توان به برج های خنک کننده و سیستم آب لوله کشی اشاره نمود (۲۴). در مقاله ها مختلف گزارش ها فراوانی مبنی بر انتقال عفونت لژیونلا از سیستم های آب گرم، تانک های ذخیره آب، دوش آب، سیستم های تهویه هوا، دستگاه های همیشه مرطوب و هم چنین استخرهای آب درمانی ، سیستم های و دستگاه های تنفس، یونیت های دندانپزشکی، سیستم های دیالیز و دستگاه های آب سرد صنعتی منتشر شده است در ایران میزان شیوع متفاوتی گزارش شده است با توجه به عوارض ناشی از لژیونلا و عدم توجه کافی در تشخیص و جداسازی این باکتری در بخش های تنفسی ، این مطالعه با هدف بررسی میزان آلودگی منابع آب محیطی و آب های مصرفی بیمارستان های شهر اهواز به جنس لژیونلا به کمک روش کشت و PCR انجام شد.

روش کار

جمع آوری نمونه ها

این مطالعه توصیفی- تحلیلی طی مدت ۶ ماه از اردیبهشت تا تیر و از مهر تا آذر ۱۳۹۳ بر روی مجموع ۱۰۰ نمونه آب جمع آوری شده از منابع مختلف آبی ۵ بیمارستان آموشی (۵۶ نمونه) و نیز از منابع محیطی سطح شهر اهواز (۴۴ نمونه) صورت گرفت. مکان هایی که از بیمارستان ها و منابع محیطی جهت نمونه برداری مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از: بن ماری های آزمایشگاه ها، شیرهای آب ،سیستم نبولایزر، انکوباتور نوزادان، یونیت های دندانپزشکی، تانکرهای ذخیره آب ، دوش های حمام منازل و بیمارستان، چیلرها و سیستم های خنک کننده ، حوضچه و میادین سطح شهر. از هر منبع یک نمونه با حجم ۵۰۰ سی سی در ظروف استریل جمع آوری شده و با دقت تمام به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهوا منتقل و مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند.

آماده سازی و کشت نمونه ها

نمونه های تهیه شده برای کشت، با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰

دقیقه در لوله فالكون های ۵۰ سی سی استریل (هر نمونه ۱۰ بار)سانتریوفیوژ شدند. سپس مایع رویی را دور ریخته و از رسوبات حاصل به اندازه نیم سی سی به لوله های حاوی ۵/۴ سی سی بافر اسیدی HCL-KCL با pH= ۲/۲ جهت تیمار اسیدی و حذف آلودگی سایر باکتری ها اضافه شد. این لوله ها به آرامی ورتکس شده و بعد چند قطره از هر نمونه به حداقل یک محیط کشت غیر انتخابی (Bufferd Charcoal Yeast BCYE Extract Agar به همراه مکمل SR110A و نیز یک محیط انتخابی (MWY(Modified Wadowsky and Yee) به همراه مکمل SR118E (Oxoid CO.UK) تلقیح گردیدند. پلیت های کشت داده شده در جار شمع دار، حاوی ۲/۵ درصد CO₂ به مدت ۷-۱۴ روز در محیط مرطوب در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. سپس کلنی های رشد یافته مشکوک به لژیونلا مورد بررسی بیش تر قرار گرفتند . از هر کلنی مشکوک لام گرم ، جهت بررسی و مشاهده باسیل های گرم منفی نازک تهیه شد. بعد از تایید لام گرم، کلنی ها بر روی دو محیط بلاد آگار و مک کانگی آگار (MERCK) کشت داده شدند .بعد از ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، این محیط ها مورد بررسی قرار گرفتند.عدم رشد باکتری، بر روی محیط های بلاد آگار و مک کانگی آگار، جهت تایید احتمالی حضور لژیونلا در نمونه های مورد بررسی می باشد(۱۵،۱۴،۴).بعد از تهیه کشت خالص از کلنی های مشکوک، به منظور تایید نهایی لژیونلاهای ایزوله شده، از روش PCR جهت تکثیر ژن 16S rRNA استفاده گردید.

PCR نمونه ها

برای آماده سازی نمونه ها به منظور PCR، کشت خالص از کلنی های تایید شده تهیه شد و استخراج DNA به روش جوشاندن در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد(۲). به منظور تکثیر ژن 16SrRNA از یک جفت پرایمر اختصاصی (جدول ۱) جنس لژیونلا جهت تولید قطعه ۶۵۰ bp استفاده شد (۲۱). در این مطالعه از سویه استاندارد لژیونلا پنوموفیلا 33152 ATCC به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

ژن و پرایمر 16SrRNA	توالی (3' - 5')	اندازه محصول PCR (bp)	رفرنس
Forward Revers	5'-AAGATTAGCCTGCGTCCGAT-3' 5'-GTCAACTATCGCGTTTGCT-3'	۶۵۰	۲۱

جدول ۱- توالی پرایمر و شرایط PCR

نتایج

بررسی بر روی ۱۰۰ نمونه آبی جمع آوری شده از منابع

ATCC 13152، چاهك ۸: كن منفى و چاهك M: سايز ماركر (DNA Ladder) ۱۰۰۰ جفت بازى

محل نمونه گيرى	تعداد نمونه ها	موارد مثبت	درصد
بن ماري ۳۷ درجه	۱۴	۴	۴٪
دوش حمام و فيلتر آب	۱۴	۲	۲٪
آب سرد كن ورسوپ شير آب	۱۰	۲	۲٪
يونيت دندانپزشكى	۱۵	۱	۱٪
چيلر و برج خنك كننده	۶	۱	۱٪
ميادين و حوضچه سطح شهر	۱۶	۳	۳٪
انكوباتور نوزادن	۸	۰	۰٪
نبولايير	۸	۰	۰٪
تانكر ومنايع ذخير آب	۹	۲	۲٪
جمع كل نمونه ها	۱۰۰	۱۵	۱۵٪

جدول ۲ - توزيع فراوانى نمونه هاى آبي مورد آزمون و نتايج جداسازى
لژیونلا طريق كشت و PCR از كل نمونه هاى بیمارستانی و محیطی

بحث

ویژگی های خاص اکولوژیکی لژیونلا و همزیستی آن با تک
یاخته ها، به ویژه در بیوفيلم سیستم های آبرسانی شرایط لازم
برای رشد و تکثیر باکتری را فراهم میکند (۱۷،۵). بیماری
لژیونر به عنوان یک علت کشنده در میان پنومونی های باکتریال
شناخته شده است. میزان مرگ ومیر بستگی به شدت بیماری
چگونگی ابتلا، تشخیص و درمان به موقع به وضعیت سیستم
ایمنی افراد دارد. شایع ترین علت مرگ ومیر در بیماران، نارسایی
تنفسی می باشد (۲۰). بر اساس مطالعات انجام شده در ایالات
متحده از سال ۲۰۰۳-۲۰۰۵ هر ساله به طور متوسط ۲۰۰۰ نفر از
طریق آب آلوده به این بیماری مبتلا شده اند (۱۰).

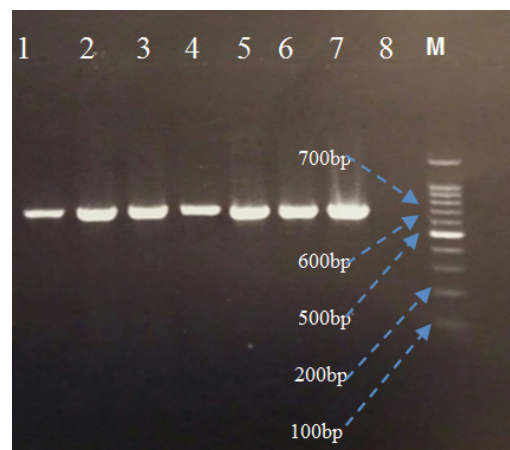
بر اساس مطالعه صورت گرفته مشخص شد که از ۵۶ نمونه آبی
بیمارستانی جمع آوری شده ۸ مورد (۱۴/۳٪) به لژیونلا آلوده
بودند با توجه به این که بیش ترین میزان آلودگی نمونه های
بیمارستانی در این مطالعه مربوط به بن ماری های آزمایشگاه
می باشد به نظر می رسد که عواملی مانند راکد بودن آب، درجه
حرارت، فراوانی آمیب های آزادزی، تشکیل بیوفيلم از جمله
عوامل موثر در رشد و تکثیر لژیونلا به حساب می آیند و همه

بیمارستانی و محیطی شهر اهواز نشان داد که بطور کلی ۱۵٪
نمونه ها از نظر جداسازی لژیونلا مثبت بودند. فراوانی مطلق
ونسبی موارد مثبت لژیونلا از طریق کشت و PCR به تفکیک
در ۵۶ نمونه آبی منابع بیمارستانی، ایزوله (۱۴/۳٪) و در ۴۴
نمونه آبی محیطی ۷ ایزوله (۱۵/۹٪) بوده است. توزیع فراوانی
تعداد نمونه های مورد بررسی در منابع آبی بیمارستانی مورد
مطالعه و نیز انواع منابع آبی مورد بررسی و هم چنین تعداد و
درصد موارد مثبت لژیونلا در جداول (۱) و (۲) ذکر شده است.

نام بیمارستان	تعداد نمونه	تعداد ایزوله لژیونلا	درصد نسبت به کل
بیمارستان گلستان	۵	۱	۱/۸٪
بیمارستان شفا	۵	۱	۱/۸٪
بیمارستان امام خمینی	۹	۴	۷/۱۴٪
بیمارستان ابوذر	۳	۱	۱/۸٪
بیمارستان رازی	۷	۱	۱/۸٪
بیمارستان مهر	۸	۰	۰٪
بیمارستان سینا	۶	۰	۰٪
تعداد کل	۵۶ نمونه	۸	۱۴/۳٪

جدول ۱ - توزيع فراوانى نمونه هاى آبي در بیمارستان های مختلف و میزان
ایزوله های لژیونلا از طریق کشت و PCR

پس از انجام PCR و تکثیر ژن 16S rRNA در ایزوله های
مشکوک به لژیونلا، مشخص گردید که تمام نمونه های مثبت
شده توسط کشت، با روش مولکولی PCR نیز مثبت شدند
(شکل ۱).



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR: چاهك ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷
نمونه های آب كشت مثبت لژیونلا؛ چاهك ۱: كنترل مثبت (*Legionella*)

این شرایط به جدا سازی این باکتری از این منابع ذخیره آب کمک می کند. (۲۱،۱۰). Darelid و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادن که با تنظیم دمای مخازن آب گرم بیمارستان بالاتر از ۵۵ درجه سانتی گراد، وقوع پنومونی بسیار کاهش یافته و از آن به عنوان یک روش کنترلی موثر استفاده می کنند (۱۱). Borella و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی ۱۱۹ نمونه آب گرم هتل های ایتالیا نشان دادند که در ۸۵ درصد از نمونه ها لژیونلا وجود داشته و اینکه فراوانی لژیونلاها به دمای آب بستگی دارد (۷). این موضوع بر اساس نتایج مطالعه ما که بیش ترین موارد مثبت مربوط به بن ماری ها می باشد نیز تایید می گردد. در مطالعه ای که توسط اسلامی و همکارانش (۱۳۹۱) در سیستم آبرسانی بیمارستان طالقانی تهران صورت گرفت، ۳۴٪ نمونه ها که از نظر لژیونلا مثبت بودند که ۷۲٪ آن مربوط به سیستم آب گرم بیمارستان و ۲۸٪ مرتبط با نمونه های آب سرد بود که با نتایج حاصل از این مطالعه که بیش ترین موارد مثبت مربوط به بن ماری های ۳۷ درجه می باشد مطابقت داشت (۱). در مطالعه Campese و همکاران که طی سال های ۱۹۹۸-۲۰۰۸ در کشور فرانسه صورت گرفت، ۱۱۴۷ مورد از بیماری لژیونلوزیس را در طی ۱۰ سال شناسایی و برج های خنک کننده را محتمل ترین منبع عفونت تعیین کردند (۹). در مطالعه حاضر ۷/۳ در صد از برج های خنک کننده مورد بررسی از نظر حضور لژیونلا مثبت بوده است. البته ممکن است استفاده از آب ژاول در تانکرهای مخصوص مربوط به چیلرها و برج خنک کننده بر میزان کم جداسازی لژیونلا تاثیر گذاشته باشد (۲۲). در بررسی که توسط موسویان و همکاران (۲۰۱۱) بر روی ۱۵۰ نمونه آبی جدا شده از استخرهای پرورش ماهی، استخر های شنا و نیز برج های خنک کننده در اهواز صورت گرفت، نشان داده شد که از ۱۵۰ نمونه جمع آوری شده ۷/۳ درصد با کشت از نظر لژیونلا پنوموفیلا مثبت بودند که با نتایج مطالعه حاضر که از نمونه های محیطی جدا شده مطابقت دارد (۱۹).

در مطالعه میرمحمدلو و همکارانش (۱۳۹۲) که بر روی ۱۵۰ نمونه آب سه بیمارستان نظامی در تهران صورت گرفت، میزان وفور لژیونلا در ۵۶٪ نمونه ۳۷/۳٪ گزارش شده است (۳) و علت تفاوت نتایج میر محمدلو با مطالعه حاضر (۱۵٪)، ممکن است در نوع نمونه (تنوع نمونه ها) و استفاده از فیلتراسیون غشایی و پمپ خلا به جای سانتریفوژ باشد.

نتیجه گیری

مطالعات نشان داده اند که مقاومت این باکتری به مواد گندزدا، ضدعفونی کننده ها، کلر و حضور فاکتورهای ویروالانس به

باکتری امکان رشد و تکثیر را در شرایط مختلف و گوناگون می دهد (۲۵). به نظر می رسد که روش های رایج تصفیه شهری اهواز برای از بین بردن این میکروارگانیسم کافی نیست و از آنجایی که منابع ذخیره آب و شیرهای آبی بیش ترین مصرف را در زندگی روزانه مردم دارند به نظر می رسد که باید روش هایی مانند استفاده از ضدعفونی کننده های حرارتی، مونوکلرآمینونیتراسیون، هیپرکلریناسیون مس و نقره به عنوان روش های معمول تصفیه و به منظور حذف این میکروارگانیسم و سایر میکروارگانیسم های مشابه جایگزین گردد (۲۵،۸،۶). هم چنین توجه به pH آب هنگام تصفیه آن بسیار ضروری می باشد که معمولاً pH حدود ۵ تا ۵/۸ قابل قبول می باشد (۲۶). با توجه به مقاومت به طور نسبی بالای لژیونلا ها نسبت به حرارت، انتظار می رود که دمای بالای درجه حرارت در شهر اهواز بر تکثیر و انتشار این باکتری تاثیر بگذارد، بنابراین توصیه می شود که از دستگاه های تصفیه و فیلتر های آبی برای مصارف آب بیمارستانی و منازل استفاده گردد. هم چنین استفاده از روش های جدید و نوین جهت گندزدایی و تصفیه آب، تخلیه آب و تمیز کردن مرتب منابع و تانکرهای نگهداری آب، استفاده از فیلترهای باکتریولوژیک در مسیر گردش آب، بالا بردن میزان کلر، استفاده از آب مقطر جهت استفاده در تجهیزات درمانی تنفسی می تواند روش هایی برای کنترل و پیش گیری از انتشار این باکتری باشد (۷). با توجه به مطالعه ها صورت گرفته، در اغلب بخش های مهم بیمارستان ها نظیر آی سی یو و سی سی یو تراکم بالای لژیونلا نگران کننده می باشد و نیازمند مطالعه ها جامع تر و کامل تری می باشد. مطالعه ها تکمیلی با استفاده از تعیین توالی ژن های کاربردی می تواند به شناسایی دقیق گونه به خصوص گونه لژیونلا پنوموفیلا به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب انسانی کمک نماید.

سیاسگزاری

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۹۳۱۲۰ می باشد. لذا بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز بخاطر تصویب و حمایت های مالی از این طرح تشکر و سپاس گزاری می نمائیم.

منابع

۱. اسلامى آ، ممیزی م ح ، اسماعیلی د، جوشنی غ . بررسی حضور باکتری لژیونلا پنوموفیلا و عوامل محیطی مؤثر بر رشد آن. مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۹۱ سال هفدهم، شماره ۱ (۳۷-۳۲)
۲. احمدی جلالی مقدم م، هنرمند ح، اسفرم مشکین شهر س، سلطانی تهرانی ب، نوجوان م. فراوانی لژیونلا پنوموفیلا در شیر آب سرد و گرم و مخزن آب انکوباتورهای بخش نوزادان بیمارستان های گیلان. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۳۹۱ دوره بیست و دوم: شماره ۹۸: (۳۱۲-۳۲۱)
۳. میرمحمدلو ع، غنی زاده ق، اسماعیلی د، سپندی م، آوخ پ، آلودگی آب مصرفی در سه بیمارستان نظامی تهران به لژیونلا پنوموفیلا در سال ۱۳۹۲. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ۱۳۹۳ سال هیجدهم، شماره ۷: (۴۰۸-۳۹۸)
4. Allegra S, Grattard F, Girardot F, Riffard S, Pozzetto B, Berthelot P. Longitudinal evaluation of the efficacy of heat treatment procedures against *Legionella* spp. in hospital water systems by using a flow cytometric assay. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(4):1268-75.
5. Bargellini A, Marchesi I, Righi E, Ferrari A, Cencetti S, Borella P. Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Res.* 2011;45(6):2315-21.
6. Berry D, Xi C, Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;17(3):297-302.
7. Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(10):5805-13
8. Callizo EP, Sierra JD, Pombo JS, Baquedano CE, Huerta BP. Evaluation of the effectiveness of the Pastormaster method for disinfection of legionella in a hospital water distribution system. *J Hosp Infect.* 2005;60(2):150-8.
9. Campese C, Bitar D, Jarraud S, Maine C, Forey F, Etienne J. Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France, 1998–2008. *Int J Infect Dis.* 2011;15(1):e30-e7.
10. Carratala J, Garcia-Vidal C. An update on *Legionella*. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(2):152-7.
11. Darelid J, Löfgren S, Malmvall B-E. Control of nosocomial Legionnaires' disease by keeping the circulating hot water temperature above 55 C: experience from a 10-year surveillance programme in a district general hospital. *J Hosp Infect.* 2002;50(3):213-9.
12. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Gentile M, Zotti C. Antibody detection and cross-reactivity among species and serogroups of *Legionella* by indirect immunofluorescence test. *J Microbiol meth.* 2008;75(2):350-3.
13. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews.* 2002;15(3):506-26.
14. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology.* 12th ed. USA, Mosby-Elsevier, 2007; 424-9.
15. Gerald L, Mandell John E, Bennett Raphael D. *Infectious diseases.* 5th ed, Churchill Livingstone, 2000, 2424-40.
16. Harrison T, Doshi N, Fry N, Joseph C. Comparison of clinical and environmental isolates of

- Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. Clin Microbiol Infect. 2007;13(1):78-85.
17. Lau HY, Ashbolt NJ. The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: implications for drinking water. J Appl Microbiol. 2009;107(2):368-78.
18. Legnani P, Leoni E, Corradini N. Legionella contamination of hospital water supplies: monitoring of private healthcare facilities in Bologna, Italy. J Hos Infect. 2002;50(3):220-3.
19. Moosavian M, Dashti A. Isolation and identification of Legionellosis agents from fishponds, swimming pools and cooling towers in Khuzeestan province, Iran. Jundishpur J. Microbiol. 2011; 4(4): 209-215
20. Moosavian M, Khosroshahi N. : Survey of Legionnaires' disease agents in therapeutic equipments and drinking water sources in Ahwaz ,Iran. J. Med. Faculty, Guilan Univ. Med. Sci. (In Persian), 2004, 13(51): 38-44.
21. Rafiee M, Jahangiri-rad M, Hajjaran H, Mesdaghinia A, Hajaghazadeh M. Detection and identification of Legionella species in hospital water supplies through Polymerase Chain Reaction (16S rRNA). JEHSE. 2014;12(1):83
22. RUTALA WA, WEBER DJ Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4): . 597–610
23. Tai J, Benchekroun MN, Ennaji MM, Mekour M, Cohen N. Nosocomial Legionnaires' disease: Risque and prevention. Front Sci. 2012;2(4):62-75.
24. Ulleryd P, Hugosson A, Allestam G, Bernander S, Claesson BE, Eilertz I. Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden-epidemiological, environmental and microbiological investigation supported by meteorological modelling. BMC Infect. Dis. 2012;12(1):313.
25. Vonberg R-P, Eckmanns T, Bruderek J, Rüden H, Gastmeier P. Use of terminal tap water filter systems for prevention of nosocomial legionellosis. J Hosp Infect. 2005;60(2):159-62.
26. Yu-sen EL, Vidic RD, Stout JE, Victor LY. Negative effect of high pH on biocidal efficacy of copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*. Applied and environmental microbiology. 2002;68(6):2711-5.