

تشخیص لژیونلا پنوموفیلا به روش کشت و فلورسنت آنتی بادی مستقیم (DFA) در نمونه های برونکوآلوئولار بیماران مبتلا به پنومونی مراجعه کننده به مراکز پزشکی اصفهان در سال ۱۳۸۲

*دکتر رحمت الله یزدانی

چکیده

مقدمه: انتشار گسترده و جهانی عوامل بیماری لژیونلایی و گزارشات فراوانی که از شیوع بیماری لژیونر و تب پونتیاک از کشورهای مختلف ارایه می گردد و نیز عدم گزارش از حضور یا جداسازی لژیونلا پنوموفیلا و یا وقوع بیماری لژیونر در ایران، و نیز عدم پاسخ به درمان آنتی بیوتیکی مرسوم در برخی پنومونی ها منتهی به تحقیق حاضر گردید. بیماری لژیونر ناشی از لژیونلا به ویژه لژیونلا پنوموفیلاست که به صورت اسپورادیک و اپیدمیک دیده می شود. این باکتری یکی از عوامل مهم ایجادکننده پنومونی آتیبیک بوده و بیشتر در افراد در معرض خطر، بیماری شدید و کشنده ای به وجود می آورد (۸۰-۵۰ درصد) و از عوامل مرگ و میر عفونت های بیمارستانی محسوب می شود.

روش بررسی: جهت جداسازی و تشخیص لژیونلا پنوموفیلا از نمونه های برونکوآلوئولار بیماران مبتلا به پنومونی که به درمان آنتی بیوتیکی آمینوگلیکوزیدی پاسخ مناسبی را نشان نمی دادند. از دو روش کشت استاندارد (محیط کشت غیرانتخابی BCYE-agar و انتخابی MWC-agar) و فلورسنت آنتی بادی مستقیم (DFA) استفاده گردید. پس از گذشت ۵-۳ روز در شرایط انکوباسیون 37°C و رطوبت حدود ۹۵٪ کلنی های ریز، محدب، گرد، با رنگ آبی خاکستری تا سبز آبی بر روی محیط های فوق پدیدار گردید. رنگ آمیزی های مورد استفاده گرم و گیمز بوده و باکتری در گسترش به صورت کوکوباسیل های کوچک گرم منفی و پشت سرهم رویت شدند. آنالیز آماری نتایج با نرم افزار SPSS (v10) و با استفاده از تست دقیق فیشر (Fisher Exact test) و آزمون مک نمار (McNemar Test) انجام گردید.

نتایج: از کشت ۹۶ نمونه برونکوسکوپی، چهارسویه باکتری مشکوک جدا گردید که با انجام آزمایشات بیوشیمیایی و روش DFA مشخص گردید که باکتری های مشکوک جدا شده، لژیونلا پنوموفیلا بودند. آزمایش حساسیت لژیونلا پنوموفیلا به آنتی بیوتیک ها حاکی از حساسیت به اریتروماکسین، ریفاپین، جنتامایسین، داکسی سیلین و توبروماکسین و مقاومت به تراسیکلین و آمپی سیلین بوده است. همچنین مشخص شد که سرعت روش DFA در تشخیص لژیونلا پنوموفیلا نسبت به روش کشت افتراقی بیشتر است. آنالیز آماری با تست دقیق فیشر نشان داد که بین جنس بیماران و فراوانی لژیونلا پنوموفیلا رابطه معنی داری وجود ندارد (P value 0.72).

آزمون آماری مک نمار نیز نشان داد که بین نتایج کشت و روش DFA اختلاف معنی داری وجود ندارد. **نتیجه گیری:** در این مطالعه فراوانی پنومونی با منشأ لژیونلا پنوموفیلا ارتباطی با جنسیت بیماران مبتلا ندارد. با توجه به نتایج آزمون مک نمار می توان از روش DFA جهت تشخیص سریع لژیونلا پنوموفیلا استفاده کرد. البته جهت استنباط دقیق تر باید پروژه ای با حجم نمونه بیشتر انجام گیرد.

کلید واژه ها: لژیونلا پنوموفیلا، آنتی بادی فلورسنت مستقیم (DFA)، آنتی بیوگرام، پنومونی

مقدمه

مهمترین عامل بیماری زای خانواده لژیونلاسه در انسان،

لژیونلا پنوموفیلا می باشد^(۱). لژیونلاها با سیل های گرام منفی،

کوچک، هوازی، سخت رشد (Fastidious)، بدون کپسول و

بدون اسپور، متحرک (فلاژل یک قطبی) و دارای پیلی و اندازه

$0.3-0.9\mu\text{m}$ در $2-20\mu\text{m}$ می باشند^(۱،۲،۳).

*-استادیار گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی - دانشکده پزشکی

تلفن همراه: ۰۹۱۳۳۱۴۵۸۹۹، تلفن: ۰۳۱۱۷۹۲۲۴۶۹، نمابر: ۰۳۱۱۶۶۸۸۵۹۷

Email: R_Yazdani@med.mui.ac.ir

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۵/۹/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۵/۴

رنگ پذیری این باکتری ها ضعیف بوده و در رنگ آمیزی گرم به طور ضعیفی رنگ می گیرند. باکتری کاتالاز مثبت ضعیف، اکسیداز متغیر، اکثراً مولد ژلاتیناز و بتالاکتاماز بوده و هیچگونه قندی را تخمیر نمی کنند^(۴).

محیط کشت مناسب برای رشد لژیونلاها، BCYE می باشد. لژیونلوز به صورت اسپورادیک و نیز اپیدمیک روی می دهد و ممکن است از چند روز تا چند هفته طول بکشد^(۵،۶). تاکنون این بیماری از کشورهای آمریکا، انگلستان، ایتالیا، سنگاپور و برزیل گزارش گردیده است^(۷،۸،۹،۱۰) تاکنون گزارش مستندی از بیماری لژیونلا همراه با جداسازی باکتری در ایران در دست نمی باشد.

از آنجا که اطلاعات در رابطه با شیوع موارد ابتلا با این باکتری در بیماران مبتلا به پنومونی در اصفهان در دست نمی باشد، بر آن شدیم تا تحقیق حاضر را به منظور جداسازی و شناسایی لژیونلا پنوفیلا با استفاده از روش کشت و DFA (فلورسنت آنتی بادی مستقیم) در گروه بیماران مبتلا به پنومونی به ویژه آنهایی که پاسخ درمانی مناسبی به آنتی بیوتیک های آمینو گلیکوزیدی نمی دهند را مورد مطالعه قرار داده و در پایان روش کشت و DFA را مورد مقایسه قرار دهیم.

با توجه به سخت رشد بودن این باکتری و وضعیت بالینی بیماران، تشخیص سریع لژیونلا پنوموفیلا بسیار ضروری بوده و دستیابی به یک روش تشخیصی سریع درعین داشتن دقت و حساسیت نسبت به کشت افتراقی می تواند کمک مؤثری در درمان سریع بیماران مبتلا به پنومونی لژیونلایی باشد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی بوده و بر اساس روش نمونه گیری آسان (Convenient) جمعیتی از بیماران مبتلا به پنومونی مراجعه کننده به مراکز پزشکی شهر اصفهان که به درمان مرسوم آنتی بیوتیکی آمینو گلیکوزیدی پاسخ مناسبی نشان نمی دادند پس از قطع دارو به مدت سه روز، نمونه گیری از آنها به عمل آمد.

با توجه به این که مطالعه ای در این زمینه در ایران انجام نشده حجم نمونه بر اساس مطالعه Bozzini و همکاران^(۱۱) ۹۰ مورد

برآورد شد، اما از ۹۶ نمونه جهت مطالعه استفاده گردید. نمونه مورد استفاده مایع حاصل از شستشوی ناحیه برونکوآلوئولار دستگاه تنفسی بیماران بوده و به منظور جداسازی و تشخیص لژیونلا پنوموفیلا در نمونه های برونکوآلوئولار از دو روش کشت (به عنوان استاندارد طلایی) و DFA (فلورسنت آنتی بادی مستقیم) استفاده شد. از آنجا که این باکتری بر روی محیط های کشت معمولی آزمایشگاهی رشد نمی نماید، از محیط های کشت غیرانتخابی BCYE-agar و محیط انتخابی MWY-agar^(۱۲) و نیز به عنوان کنترل مثبت در روش DFA از آنتی ژن لژیونلا پنوموفیلا و برای کنترل منفی از ترکیب فسفات با فرسالین استفاده گردید. جمعاً ۹۶ نمونه از بیماران مبتلا به پنومونی مراجعه کننده به مراکز پزشکی شهر اصفهان توسط متخصص ریه و با روش برونکوسکوپی گرفته شده در شیشه های استریل درب دار جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال داده می شد.

برای انجام کشت، بعد از تیمار نمونه ها با HCL-KCL (۲/۰ نرمال) جهت کاهش آلودگی احتمالی محیط های BCYE و MWY آگار (ساخت شرکت - بیومارک) با فلورنرمال مجاری تنفسی، محیط کشت به مدت ۵-۳ روز در دمای ۳۷°C و رطوبت حدود ۹۵٪ نگهداری گردید. در صورت دیدن کلنی های ریز، محدب، گرد به رنگ آبی خاکستری تا سبز آبی از کلنی ها گسترش تهیه و با روش های گرم و گیمنز رنگ آمیزی شدند. برای تأیید گرم منفی بودن باکتری از پتاس ۳٪ استفاده می شد و نیز جهت تأیید لژیونلا پنوموفیلا و تفکیک از سایر باسیل های گرم منفی، از کلنی های به دست آمده بر روی محیط های انتخابی لژیونلا، مجدداً بر روی محیط های بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو و محیط انتخابی لژیونلا کشت داده شده و مجدداً مقایسه ای از نظر رشد در محیط های کشت انتخابی لژیونلا و نتایج حاصل از کشت EMB,BA به عمل آورده می شد. کلنی مشکوک به لژیونلا کلنی ای بود که بر روی بلاد آگار و EMB رشد نکرده و تنها در محیط انتخابی رشد کرده باشد. برای تأیید نهایی باکتری لژیونلا پنوموفیلا از تست های تشخیصی هیدرولیز هیورات. کاتالاز و اکسیداز استفاده گردید. همچنین از کیت DFA (ساخت کارخانه منوکلونال آنتی بادی تکنولوژی) جهت آزمایش

کلنی های رشد کرده در مرحله اول کشت استفاده گردید.

کیت شامل اسلایدهای سه خانه ای، کنترل ها (شامل کنترل مثبت و منفی)، کوئز و گه (مشمتمل بر آنتی بادی منوکلونال اختصاصی نشان دار شده با فلورئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و حاوی Evans blue به عنوان رنگ زمینه و مرتیولات به عنوان نگهدارنده و فسفات بافرسالین به عنوان کنترل منفی تست و همچنین به عنوان محلول شستشو) تهیه شد.

نتایج

از مجموع ۹۶ نمونه، ۷۱ نمونه مربوط به مردان و ۲۵ نمونه مربوط به زنان بود. در محیط کشت انتخابی، علیرغم وجود آنتی بیوتیک ها رشد تعدادی باکتری غیر از لژیونلا پنوموفیلا نشان داده شد. نتایج کشت نشان داد، تنها ۱۶ مورد (۱/۱۵٪) باسیل گرم منفی از این نمونه ها جدا گردید و ۸۴/۹٪ باکتری های دیگری همچون دیپلوکک گرم منفی، کوکسی گرم مثبت، مخمر و غیره جدا گردید.

بر اساس مرفولوژی کلنی های به دست آمده، بر روی محیط های کشت غیرانتخابی و انتخابی، رنگ آمیزی گرم و تست پتاس ۳٪ انجام گردید. کشت مجددی از کلنی های مشکوک به لژیونلا در محیط های انتخابی لژیونلا و محیط های غیرانتخابی بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو انجام گردید. نتایج حاصله از محیط های کشت و انجام تست های بیوشیمیایی مربوط به لژیونلا پنوموفیلا تنها به تشخیص قطعی ۴ مورد لژیونلا پنوموفیلا از ۱۶ مورد

مشکوک به لژیونلا گردید (جدول ۱). آنالیز آماری با تست دقیق فیشر نشان داد که بین جنس بیماران و فراوانی لژیونلا پنوموفیلا رابطه معنی داری وجود ندارد (P value= 0.72).

همچنین نتایج آزمایشات حساسیت دارویی انجام شده بر روی ۴ سویه لژیونلا پنوموفیلا جدا شده از نمونه های بالینی در جدول ۲ مشخص گردیده است. ضمناً سویه استاندارد لژیونلا پنوموفیلا از مرکز ملی رفرانس لژیونلا در فرانسه (National De Reference Center) تهیه گردید. در آزمایش آنتی بیوگرام تمام سویه ها به اریترومايسين، ریفامپین، جنتامایسین، داکسی سیلین و توبرامایسین حساس و نسبت به آمپلی سیلین و تراسیکلین مقاوم بودند (جدول ۳).

آزمون آماری مک نمار نیز نشان داد که بین نتایج کشت و روش DFA اختلاف معنی داری وجود ندارد (Pvalue= 1).

جدول (۱): فراوانی نسبی موارد جداسازی لژیونلا پنوموفیلا در افراد مبتلا به پنومونی به تفکیک جنس.

جنس	مواد مثبت جداسازی لژیونلا پنوموفیلا	موارد منفی جداسازی لژیونلا پنوموفیلا	جمع کل
مرد	۳ (۴/۲٪)	۶۸ (۹۵/۸٪)	۷۱
زن	۱ (۴٪)	۲۴ (۹۶٪)	۲۵
جمع کل	۴ (۴/۱٪)	۹۲ (۹۵/۹٪)	۹۶

Pvalue = 0.72

جدول ۲: نتایج آزمایش حساسیت دارویی (آنتی بیوگرام) لژیونلا پنوموفیلاهای جدا شده از نمونه های بالینی

آنتی بیوتیک	توبرامایسین	آمپی سیلین	تراسیکلین	داکسی سیلین	جنتامایسین	ریفامپین	اریترومايسین
علامت اختصاری قطر ناحیه شماره سویه	Tob	Am	TE	DO	GM	RD	E
زون ۲۰mm	زون ۲۸mm	زون ۵۲mm	زون ۲۸mm	زون ۴۵mm	زون ۲۸mm	زون ۲۸mm	زون ۴۵mm
۷	S	R	R	S	S	S	S
۲۹	S	R	R	S	S	S	S
۶۳	S	R	R	S	S	S	S
۷۹	S	R	R	S	S	S	S

جدول ۳: مقایسه توزیع فراوانی نسبی موارد مثبت با روشهای DFA و کشت به تفکیک جنس.

جنس	درصد موارد مثبت کشت	تعداد موارد مثبت کشت	درصد موارد مثبت DFA	تعداد موارد مثبت DFA	تعداد (درصد) بیماران بررسی شده
مرد	۱۳ / ۱٪	۳	۱۳ / ۱٪	۳	۷۱ (۷۴٪)
زن	۱ / ۰۴٪	۱	۱ / ۰۴٪	۱	۲۵ (۲۶٪)
جمع کل	۴ / ۱۷٪	۴	۴ / ۱۷٪	۴	۹۶

Pvalue = 1

بحث

دامنه گسترده و رو به افزایش گزارشات حاصل از مطالعات بر روی عوامل لژیونلایی و نیز جداسازی و تعیین هویت بیش از ۳۷ گونه و ۵۴ سروگروپ حاکی از انتشار جهانی عوامل لژیونلایی است.

گرچه، لژیونلا پنوموفیلا به عنوان عامل معمولی پنومونی های اکتسابی در جوامع نبوده اما به عنوان عامل مهمی در بیماران مبتلا به پنومونی سخت، به خصوص در افرادی که عوامل خطری چون کهولت، استعمال دخانیات، بیماریهای مزمن و انسدادی دستگاه تنفسی یا آنهایی که سیستم ایمنی سرکوب شده دارند، تلقی می شود^(۱۳).

اگرچه حدود، ۱۲ سال از شناسایی اولین لژیونلا پنوموفیلا، عامل اصلی شیوع پنومونی لژیونلایی (در سال ۱۹۷۶ فیلادلفیا آمریکا) می گذرد و تا این زمان گزارشات زیادی پیرامون جنبه های مختلف بیماری و یا گونه ها و سروگروپ های متفاوت آن از کشورهای دیگر ارایه گردیده است، اما تاکنون فقط یک مورد گزارش مستند (دکتر موسویان، علوم پزشکی اهواز) از وقوع بیماری لژیونر و نیز جداسازی گونه هایی از انواع مختلف این باکتری در ایران به ثبت رسیده است^(۲،۳).

در تحقیق حاضر، از مجموع ۹۶ نمونه شستشوی برونش جمع آوری شده از بیماران مبتلا به پنومونی که به درمانی آنتی بیوتیکی مرسوم آمینوگلیکوزیدی پاسخ نداده بودند، تنها چهار مورد کشت مثبت و چهار مورد DFA مثبت گزارش گردید.

در تحقیقی که توسط Lindsay و Abraham بر روی ۱۰۷ نمونه و با روش های کشت، DFA، PCR و IFA انجام داده اند و در سال ۲۰۰۴ به چاپ رسیده است گزارش داده اند که با روش DFA به ۵ مورد مثبت و با روش کشت به ۱۰ مورد مثبت دست

یافتند که دارای ویژگی ۱۰۰٪ و اختصاصیت به ترتیب ۱۹٪ و ۴۲٪ بوده است که به عنوان آزمایشهای مطمئنی جهت جداسازی لژیونلا پنوموفیلا می توان استفاده نمود^(۱۴).

در تحقیق دیگری که توسط Lopez و Fernandez از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۰ در Alcoy اسپانیا و بر روی ۱۰۵ بیمار مبتلا به پنومونی اکتسابی با روش کشت و DFA انجام شد ۳۲ مورد لژیونلا پنوموفیلا و ۹۴ مورد سایر انواع باکتریها گزارش شد و از کشت خلط ۱۰۲ بیمار ۱۸ مورد لژیونلا پنوموفیلا مثبت و ۸۵ نمونه سایر باکتری ها گزارش شده است^(۱۵).

این اختلاف در نتایج فوق و تحقیق ما، ممکن است به واسطه فراوانی باکتری های فلوردستگاه تنفسی، مخلوط شدن با نمونه برونکوسکوپی، خطای تکنیکی نمونه گیری از عمق ریه بوده باشد زیرا تنها نمونه خلط مجرای تنفسی جهت جداسازی واجد اهمیت است و همچنین درون سلولی اختیاری بودن لژیونلا پنوموفیلا که تنها پس از تکثیر در داخل ماکروفاژها و پاره شدن آنها به تعدد زیاد در فضای آلئولی و ترشحات تنفسی تحتانی یافت خواهند شد، از عوامل مؤثر در اختلاف نتایج باشد.

نتایج تست دقیق فیشر نشان داد که در این مطالعه فراوانی پنومونی با منشا لژیونلا پنوموفیلا ارتباطی با جنسیت بیماران مبتلا ندارد و با توجه به نتایج آزمون مک نمار می توان از روش DFA جهت تشخیص سریع لژیونلا پنوموفیلا استفاده کرد. البته جهت استنباط دقیق تر باید پروژه ای با حجم نمونه بیشتر انجام گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه لژیونلا پنوموفیلاهای جدا شده از نمونه های کلینیکی به اکثر آنتی بیوتیک های گروه آمینوگلیکوزیدی در شرایط In vitro حساسیت نشان داده و از سوی دیگر اکثر بیماران

حساسیت می تواند در رابطه با درون سلول بودن باکتری و عوامل ایجاد کننده ضعف سیستم ایمنی چون کهولت و بیماری مزمن انسدادی دستگاه تنفسی باشد.

مبتلا به پنومونی در این تحقیق که اغلب به درمان آنتی بیوتیکی گروه آمینو گلیکوزیدی پاسخ مناسبی را نشان نمی دادند، به نظر می رسد این عدم تطابق درمانی به پاسخ آنتی بیوتیکی و تست

References

- 1- Winn, W.C. *Legionella*. In: Murray, p. R. Baron. Manual of Clinical Microbiology: Washington DC, American society for Microbiobgy, 1995: 533-544.
- 2- Stout, J. E. yn, V. L. *Legionellosis*. N. Engl. J. Med. 1997; 337(10):482-7.
- 3- Yn,V.L. *Legionella Pneumophila* In: Mandell , Principles and practice of infectious diseases: NY, Churchill Livingstone, 2000. 2087-2097.
- 4- Bernstein MS. Locksley RM. *Legionella - infection*. In: Wilson JD. Harrison's Principles of internal medicind 12th ed .New York: Mc-Graw-Hill 1991:634-637.
- 5- Band JD, Fraser DW. *Legionellosis (Legionnaires disease and pontiac fever)*.In: Braude AI.Infections diseases and Medical Microbiology.2th ed. philadelphia: W B. Saunders. 1976:831-841.
- 6- Stout JE.Yu.VL.Muraca P. *Potable water as a cause of sporadic cases of community acquired Legionnaire's disease* .N Eng J Med. 1992; 326(3): 151-50.
- 7- Levin AS, Caiaffa-Fillho HH, Sinto SI. *An outbtreack of nosocomial Legionellosis diseases in a renal transport unit* .J. Hosp Infect. 1991; 18(3): 243-8.
- 8- Vijayasingam SSM Narendran K. Meers PD. *Community -acquired Legionellosis in Singapore* . 1991;29(6):81-20.
- 9- Mitchell E,O' Mahony M,Watson JM .*Two outbreaks of Legionellosis diseases in Bolton Health District* .Epidemiol Infect.1990;104-159-170.
- 10- Castellani -pastoris M. Benedetti P, Greco D. *10 years of Legionellosis in Italy*. Ann Ist Super Sanita. 1991;27(2):289-95.
- 11- Bozzoni M, Radice L, Frosi A, Vezzoli S, Cuboni A, Vezzoli F. *Prevalence of pneumonia due to Legionella pneumophila and Mycoplasma pneumoniae in a population admitted to a department of internal medicine* . Respiration 1995, Vol: 62, 331-335.
- 12- *Legionella selective medium* In: selective Micribiology for the chlinical (OXOLD)Unipath Limited Basibgistoke ,Hampshire ,UK. 1991:28-29.
- 13- Jorge Roig,Jordi Rello, Victor L. *Legionellosis diseases* :Aguide to diagnosis and therapy; most cases of this disease go undiagnosed. Journal of Respiratory Disease 2002;23(4):229-234 .
- 14- Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W,Christe p, Johnston F, Edwards GF. *Laboratory diagnosis of Legionaries diseases due to Legionella pneumophia serogroup 1:comparisaon of phenotypic and genotypic methods* .J Med Microbiol. 2004; 53 (pt3): 183-7.
- 15- Fernandez J. A, Lopez P, orozco and Merino. J. *Clinical study of an outbreak of Legionnaire's Disease in Alcoy, South eastern Spain*. European Journal of Clinical Microbioogy and Infectious Disease. 2002; 21(10): 729-735.