مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
دوره چهاردهم ، شماره چهارم ، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۶۸-۶۴

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 درسال 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 پنومونیلا و یا وقوع بیماری لژیونر درایران، و نیز عدم پاسخ به درمان آنتی بیوتیکی مرسوم دربرخی پنومونی ها منتهی به تحقیق حاضر گردید. بیماری لژیونر ناشی از لژیونلا به ویژه لژیونلا پنوموفیلااست که به صورت اسپورادیک و اپیدمیک دیده می‌شود.این باکتری یکی از عوامل مهم ایجادکننده پنومونی آتیپیک 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 می‌شود.

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 MWY-agar) و فلورسنت آنتی بادی مستقیم (DFA)استفاده گردید. پس از گذشت ۵ -۳ روز درشرایط انکوباسیون 37^0C 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 گیمنز بوده و باکتری درگسترش به صورت کوکوباسیل های کوچک گرام 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 اریترومایسین، ریفامپین، جنتامایسین، داکسی سیلین و توبرومایسین و مقاومت به تتراسیکلین 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 منشاء لژیونلا پنوموفیلا ارتباطی با جنسیت بیماران مبتلا ندارد. با توجه به نتایج آزمون مک نمار می توان از روش DFA جهت تشخیص سریع لژیونلاپنوموفیلا 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[1]. لژیونلاها با سیل‌های گرام منفی، کوچک، هوازی، سخت رشد (Fastidious)، بدون کپسول و بدون اسپور، ،متحرک (فلاژل یک قطبی) و دارای پیلی و اندازه 2-20μm در 0.3-0.9μm می باشند[1,2,3].

* - 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 دریافت :۱۳۸۵/۵/۴ تاریخ پذیرش:۱۳۸۵/۹/۳۰

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 با شد. لژیونلوز به صورت اسپورادیک و نیز اپیدمیک روی می‌دهد 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 دردست نمی‌باشد.

از آنجا که اطلاعات در رابطه با شیوع موارد ابتلا با این باکتری در بیماران مبتلا به پنومونی در اصفهان در دست نمی‌باشد، برآن شدیم تا تحقیق حاضر را به منظور جداسازی و شناسایی لژیونلا پنوفیلا با استفاده از روش کشت و DFA (فلورسنت آنتی بادی مستقیم) درگروه بیماران مبتلا به پنومونی به ویژه آنهایی که پاسخ درمانی مناسبی به آنتی بیوتیک های آمینو گلیکوزیدی نمی‌دهند را مورد مطالعه قرارداده 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 آمینوگلیکوزیدی 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 درنمونه 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 پنومونیلا 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 درشیشه های استریل درب دار جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال داده می شد.

برای انجام کشت، بعد از تیمار نمونه ها با HCL-KCL (۰/۲نرمال) جهت کاهش آلودگی احتمالی محیط های BCYE و MWY آگار (ساخت شرکت – بیومارک) با فلورنرمال مجاری تنفسی، محیط کشت به مدت ۵ –۳ روز دردمای $37\ ^0C$ و رطوبت حدود ۹۵٪ نگهداری گردید. درصورت دیدن کلنی های ریز، محدب، گرد به رنگ آبی خاکستری تا سبز آبی از کلنی ها گسترش تهیه و با روش های گرام و گیمنز رنگ آمیزی شدند. برای تأیید گرام منفی بودن باکتری از پتاس ۳ ٪ استفاده می شد و نیز جهت تأیید لژیونلا پنوموفیلا و تفکیک از سایر باسیل های گرام منفی، از کلنی های به دست آمده بر روی محیط‌های انتخابی لژیونلا،مجدداً بر روی محیط های بلاد آگار و ائوزین متیلن بلو و محیط انتخابی لژیونلا کشت داده شده و مجددا مقایسه ای از نظر رشد درمحیط 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 بلادآگار و EMB رشد نکرده و تنها درمحیط انتخابی رشد کرده باشد. برای تأیید نهایی باکتری لژیونلا پنوموفیلا از تست های تشخیصی هیدرولیز هیپورات. کاتالاز و اکسیداز استفاده گردید. همچنین ازکیت 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 ومنفی)، کونژوگه (مشتمل 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. درمحیط کشت انتخابی ، علیرغم وجود آنتی بیوتیک ها رشد تعدادی باکتری غیراز لژیونلا پنومونیلا نشان داده شد. نتایج کشت نشان داد، تنها ۱۶ مورد (۱ /۱۵ ٪) باسیل گرام منفی از این نمونه ها جداگردید و ۹ /۸۴ ٪ باکتری های دیگری همچون دیپلوکک گرام منفی ،کوکسی گرام مثبت، مخمر و غیره جداگردید.

براساس مرفولوژی کلنی های به دست آمده ، بر روی محیط های کشت غیرانتخابی و انتخابی، رنگ آمیزی گرام و تست پتاس ۳ ٪ انجام گردید .کشت مجددی از کلنی های مشکوک به لژیونلا درمحیط 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 پنوموفیلای جدا شده از نمونه‌های بالینی در جدول ۲ مشخص گردیده است. ضمناً سویه استاندارد لژیونلا پنوموفیلا از مرکز ملی رفرانس لژیونلا در فرانسه National De Refference Center) تهیه گردید. در آزمایش آنتی بیوگرام تمام سویه ها به اریترومایسین، ریفامپین، جنتامایسین، داکسی سیلین و توبرامایسین حساس و نسبت به آمپلی سیلین و تتراسیکلین 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	موادمثبت جداسازی لژیونلا پنوموفیلا	موارد منفی جداسازی لژیونلاپنوموفیلا	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

جدول۲ : نتایج آزمایش حساسیت دارویی (آنتی بیوگرام) لژیونلا پنوموفیلاهای جدا شده از نمونه های بالینی

آنتی بیوتیک	توبرامایسین	آمپی سیلین	تتراسیکلین	داکسی سیلین	جنتامایسین	ریفامپیسین	اریترومایسین
علامت اختصاری	Tob	Am	TE	DO	GM	RD	E
قطر ناحیه / شماره سویه	زون۲۰mm	ــــــ	ــــــ	زون۲۸mm	زون۵۲mm	زون۲۸mm	زون۴۵mm
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 وکشت به تفکیک جنس.

جنس	درصد موارد مثبت کشت	تعداد موارد مثبت کشت	درصد موارد مثبت DFA	تعدادموارد مثبت DFA	تعداد (درصد) بیماران بررسی شده
مرد	٪ ۱/ ۱۳	۳	٪ ۱/ ۱۳	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 نیزجداسازی و تعیین هویت بیش از ۳۷گونه و ۵۴ سروگروپ حاکی از انتشار جهانی عوامل لژیونلایی است.

گرچه، لژیونلا پنوموفیلا به عنوان عامل معمولی پنومونی های اکتسابی درجوامع نبوده اما به عنوان عامل مهمی دربیماران مبتلا به پنومونی سخت، به خصوص درافرادی که عوامل خطری چون کهولت، استعمال دخانیات، بیماریهای مزمن و انسدادی دستگاه تنفسی یا آنهایی که سیستم ایمنی سرکوب شده دارند، تلقی می‌شود[۱۳].

اگرچه حدود، ۱۲ سال از شناسایی اولین لژیونلا پنوموفیلا، عامل اصلی شیوع پنومونی لژیونلایی (درسال ۱۹۷۶ فیلادلفیا آمریکا) می‌گذرد و تا این زمان گزارشات زیادی پیرامون جنبه های مختلف بیماری و یا گونه‌ها 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 ایرن به ثبت رسیده است[۲،۳].

در تحقیق حاضر، ازمجموع 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 ۸/۴۲٪ بوده است که به عنوان آزمایشهای مطمئنی جهت جداسازی لژیونلا پنوموفیلا می توان استفاده نمود[۱۴].

در تحقیق دیگری که توسط Fernandez و Lopez 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 درنتایج 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 زیراتنها نمونه خلط مجرای تنفسی جهت جداسازی واجد اهمیت است و همچنین درون سلولی اختیاری بودن لژیونلاپنوموفیلا که تنها پس از تکثیر در داخل ماکروفاژها و پاره شدن آنها به تعدد زیاد درفضای آلوئولی و ترشحات تنفسی تحتانی یافت خواهند شد، از عوامل مؤثر دراختلاف 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 لژیونلاپنوموفیلا استفاده کرد. البته جهت استنباط دقیق تر باید پروژه ای با حجم نمونه بیشتر انجام گیرد.

نتیجه گیری

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

مبتلا به پنومونی در این تحقیق که اغلب بـه درمـان آنتـی بیـوتیکی گروه آمینو گلیکوزیدی پاسـخ مناسـبی را نـشان نمـی دادنـد، بـه نظـر می‌رسد این عدم تطابق درمانی بـه پاسـخ آنتـی بیـوتیکی و تـست حساسیت می تواند در رابطه با درون سلول بودن باکتری و عوامل ایجاد کننده ضعف سیستم ایمنی چـون کهولـت و بیمـاری مـزمن انسدادی دستگاه تنفسی باشد.

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 (Legionaires 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 outbrtreak 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.