جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۳ و ٤: از ۷۵-۸۳
پاییز و زمستان ۱۳۸٦

مقاله کوتاه

جداسازی لژیونلا از نمونه‌های BAL بیماران مبتلا به پنومونی لژیونلایی با کشت و PCR

شیوا میرکلانتری[1]، اشرف محبتی‌مبارز[2*]، سیدرضا حسینی‌دوست[3]، جعفر اصلانی[4]

۱- کارشناسی ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
۴- دانشیار، بخش داخلی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران

دریافت مقاله:۸۷/۱۱/۸ پذیرش مقاله: ۸۷/۶/۱۰

چکیده

هدف: لژیونلا پنوموفیلا عامل بیش از ۹۵ درصد پنومونی شدید لژیونلایی است. جداسازی عامل ایجادکننده پنومونی از نمونه‌های مایع برونکوآلوئولار با کشت یک فرایند حساس و زمانبر است. بعضی گونه‌های لژیونلا با وجود زنده بودن در نمونه بالینی، در محیط کشت رشد نمی‌کنند. هدف از این مطالعه جداسازی لژیونلا از نمونه‌های مایع برونکوآلوئولار با دو روش PCR و کشت است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۷۰ بیمار مشکوک به پنومونی لژیونلایی، نمونه مایع برونکوآلوئولار تهیه شد. نمونه‌ها روی محیط اختصاصی لژیونلا (BCYE) کشت داده شدند. تمامی نمونه‌ها نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (ژن *mip*) با روش PCR ارزیابی شدند.

نتایج: از ۷۰ نمونه مایع برونکوآلوئولار مورد بررسی، (٤/۲ درصد) ۳ نمونه با کشت و (۸/٤ درصد) ٦ نمونه با PCR مثبت شدند. تمامی نمونه‌های کشت مثبت با PCR هم مثبت بودند. از طرفی علایم بالینی بیماران نیز کاملاً با نتایج به‌دست آمده در آزمایشگاه مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری: تشخیص سریع و دقیق لژیونلا پنوموفیلا برای درمان عفونت‌های شدید ناشی از این باکتری بسیار مهم است. آنالیز نتایج ما نشان داد که حساسیت و سرعت روش PCR خیلی بیشتر از کشت در نمونه‌های مایع برونکوآلوئولار برای شناسایی لژیونلا پنوموفیلا است. بنابراین روش PCR می‌تواند روشی مناسب برای جداسازی و شناسایی لژیونلا پنوموفیلا از نمونه مایع برونکوآلوئولار در بیماران مبتلا به پنومونی شدید باشد.

کلیدواژگان: لژیونلا پنوموفیلا، ژن *mip*، PCR، مایع برونکوآلوئولار، پنومونی.

۱- مقدمه

پس از همه‌گیری ۱۹۷٦تا امروز بیماری لژیونر (Legionnaire) در مناطق مختلف دنیا گزارش شده و مواردی از جداسازی لژیونلا (Legionella) در پنومونی‌های (Pneumonia) اکتسابی از جامعه و بیمارستان وجود داشته است [۱]. به‌طوری که تا سال ۲۰۰۷، موارد زیادی از سراسر دنیا گزارش شده و تا به حال ٤۹ گونه و ۷۰ سروگروه در این جنس تشخیص داده شده است [۲]. آلودگی با گونه‌های لژیونلا شامل طیفی از ناخوشی‌هایی می‌شود که یک سوی آن تب پونتیاک (Pontiac fever) یک بیماری شبه آنفولانزای خودمحدودشونده و در سوی دیگر بیماری سیستمیک و غالباً کشنده لژیونر است. پنومونی در این بیماران

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی، صندوق پستی ۱۱۱-۱٤۱۱۵
Email: mmmobarez@modares.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

به‌صورت تحت حاد، بسیار کشنده و شدید است [۳]. شیوع بیماری از ۱/۵ تا ٤/٥ درصد در کشورهای مختلف گزارش شده است [٤]. این در حالی است که لژیونلا پنوموفیلا (*Legionella pneumophila*) مسئول حدود ۲ تا ۱۵ درصد از موارد پنومونی اکتسابی از جامعه است [٥]. از طرفی عفونت همزمان لژیونلا با سایر بیماری‌زاهای تنفسی مانند استرپتوکک پنومونیه (*Streptococcus pneumoniae*)، هموفیلوس آنفولانزا (*Haemophilus influenzae*) و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*) گزارش شده است [٦].

لژیونلا پنوموفیلا را باید جزء عوامل ایجادکننده پنومونی بیمارستانی و کسب شده از جامعه در نظر گرفت [۷]. پنومونی‌ای که توسط لژیونلا ایجاد می‌شود، می‌تواند به‌صورت اپیدمیک یا اندمیک باشد [۸]. با توجه به این‌که تأخیر در تشخیص بیماری موجب افزایش میزان مرگ‌ومیر می‌شود [۹]، بنابراین آزمایشگاه و کلینیک نقش بسیار مهمی در تشخیص بیماری بر عهده دارند [۱۰]. مشخص شده که پیشرفت در زمینه تشخیص آزمایشگاهی، منجر به افزایش جداسازی لژیونلا می‌شود [۱۱].

در صورتی که لژیونر در مراحل ابتدایی و اولیه تشخیص داده و با آنتی‌بیوتیک مناسب درمان گردد، پیش‌آگهی بدی نخواهد داشت [۱۰]. در صورت تشخیص سریع، ارگانیسم در مدت ۳ تا ٥ روز به درمان جواب می‌دهد [۱۲]. تشخیص عفونت لژیونلا روی انواع مختلفی از نمونه‌ها انجام می‌شود [۱۳]. نمونه‌گیری باید از دستگاه تنفس تحتانی صورت گیرد. روش‌های متعددی برای نمونه‌گیری از دستگاه تنفس تحتانی در دسترس هستند که جمع‌آوری نمونه خلط از همه رایج‌تر، است. ولی روش‌های پیچیده‌تر مثل آسپیراسیون (Aspiration) ترشحات برونش و نای، لاواژ آلوئولار (Alveolar Lavage)، بیوپسی بافت ریه و بیوپسی باز ریه در موارد لزوم استفاده می‌شود. استفاده از خلط و کشت آن برای تشخیص پنومونی باکتریایی، به‌دلیل آلوده شدن خلط با ترشحات ناحیه دهان و حلق مانع از رشد باکتری بیماری‌زا شده و جواب منفی کاذب ایجاد می‌شود [١٤]. البته ناتوانی نیمی از بیماران برای دادن خلط هم یکی دیگر از مشکلات جمع‌آوری درست این نمونه است [۱۵].

برای تشخیص لژیونلا از نمونه‌های بالینی از روش‌های کشت، رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی فلورسنت مستقیم (Direct Fluorescent Antibody: DFA) و ردیابی آنتی‌ژن لژیونلا در نمونه‌های ادراری استفاده می‌شود. کشت به‌عنوان روش استاندارد طلایی تشخیص لژیونلا، ارزش بسیار بالایی دارد. اما طولانی بودن زمان انکوباسیون برای مشاهده کلونی (۲ تا ٥ روز)، نیاز به محیط‌های کشت انتخابی و غیرانتخابی برای رشد و تأثیر درمان آنتی‌بیوتیکی در نتیجه کشت از معایب این روش است. در مقابل روش PCR در صورتی که به طور مناسب طراحی و اجرا شود، دارای سرعت و حساسیت بسیار بالاتر بوده و می‌تواند برای تشخیص سریع لژیونلا در نمونه‌های بالینی و محیطی مورد استفاده قرار گیرد. این روش‌ها علاوه بر حساسیت و ویژگی بالاتر در مقایسه با سایر روش‌های معمول آزمایشگاهی، دارای مزیت‌هایی مانند توانایی تشخیص بیماری در مراحل اولیه، تعیین عفونت‌های مزمن در شرایطی که آزمون‌های سرولوژیکی از توانایی مناسبی برخوردار نیستند، تعیین بیمارانی که فاقد علایم بیماری هستند، ارزیابی ثمربخش بودن درمان، ردیابی حذف شدن میکروارگانیسم از بدن، توانایی تشخیص DNA در نمونه‌هایی که میکروارگانیسم‌های موجود در آن از بین رفته‌اند و عدم نیاز به تأمین شرایط برای نگهداری و انتقال میکروارگانیسم‌های خطرناک در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و تشخیص طبی است. این روش در مورد ارزیابی نمونه‌هایی که واجد میکروارگانیسم مورد نظر بوده ولی نتیجه کشت آن‌ها منفی است، نیز با حساسیت و اطمینان بسیار بالایی قابل استفاده است [١٦].

در این مطالعه نمونه‌های برونکوآلوئلار (Bronchalveolar) بیماران مشکوک به لژیونلا مراجعه‌کننده به بیمارستان بقیه‌ا... با استفاده از روش کشت استاندارد و PCR بررسی شدند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه نمونه

در این تحقیق طی ٦ ماه، ۷۰ نمونه لاواژ برونکوآلوئولار (Bronchalveolar Lavage: BAL) از بیماران مشکوک به پنومونی لژیونلایی، با استفاده از روش برونکوسکوپی (Brochoscopy) توسط پزشک متخصص ریه تهیه شد. در

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

حدود ۵ میلی‌لیتر از مایع گرفته شده، بلافاصله در لوله فالکون درپیچ‌دار استریل جمع‌آوری و در فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها پس از انتقال در دو لوله تقسیم شدند. یکی از نمونه‌ها، برای انجام کشت بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت و دیگری تا زمان انجام PCR، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲-کشت نمونه‌ها

نمونه‌های تهیه شده برای کشت، در حرارت ٥٦ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۲ دقیقه در بن‌ماری ٦٠ درجه سانتی‌گراد تیمار حرارتی شدند. ۰/۱ سی‌سی از نمونه تیمار شده با حرارت، بر محیط اختصاصی BCYE (محیط انتخابی لژیونلا حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پلی میکسین B (Polymyxin B)، ونکومایسین (Vancomycin) و سیکلوهگزامایاد (Cycloheximide) به روش خطی کشت داده شدند. تمام پلیت‌های تلقیح شده در جار شمع‌دار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ تا ۹۰ درصد انکوبه شدند. این پلیت‌ها بعد از ۳ روز مورد بازدید قرار گرفته و در صورت عدم مشاهده کلونی، با توجه به کند رشد بودن لژیونلاها، انکوباسیون به مدت ١٤ روز ادامه می‌یافت. از کلونی‌های رشد یافته در محیط‌های اختصاصی لژیونلا بعد از بررسی ریخت‌شناختی و رنگ‌آمیزی گرم، از آزمون‌های بیوشیمیایی مانند آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز و هیدرولیز هیپورات برای بررسی‌های بیوشیمیایی و تعیین گونه استفاده شد. کلونی‌های مشکوک به لژیونلا روی محیط بلاد آگار (Blood agar) که لژیونلاها قادر به رشد نیستند، کشت داده شدند.

۲-۳- PCR نمونه‌ها

۲-۳-۱- آماده کردن نمونه‌ها

برای انجام PCR، ابتدا برای کم کردن و زدودن مهارکننده‌ها، نمونه‌های BAL را با بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS)، سه بار شستشو داده و با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از شستشوی سوم، محتویات باقی‌مانده لوله اپندرف (Eppendorf) برای ادامه آزمایش به خوبی مخلوط شدند.

۲-۳-۲- استخراج DNA از نمونه‌ها

۱۰۰ میکرولیتر از مایع BAL یکنواخت شده، در میکرولوله ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در مورد نمونه‌هایی که محتویات پروتئینی بالایی داشتند، برای یکنواخت کردن نمونه بعد از اضافه کردن حدود ۵ میکرولیتر پروتئاز، به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در داخل دستگاه Hot Plate در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. برای کنترل مواد از کنترل مثبت که سرم فیزیولوژی حاوی ۱۰ تا ۱۰۰ باکتری لژیونلا پنوموفیلا ATCC33152 بود استفاده شد و برای کنترل منفی نمونه BALی که از نظر لژیونلا پنوموفیلا با روش‌های PCR و کشت منفی بود استفاده شد.

بخشی از کروموزم باکتری که mip را کد می‌کردند به‌عنوان آغازگر (Primer) برای انجام PCR استفاده شدند که دارای توالی زیر بودند:

توالی آغازگر جلویی:

5'-GGTGACTGCGGCTGTTATGG-3'

توالی آغازگر برگشتی:

5'-GGCCAATAGGTCCGCCAACG-3'.

۲-۳-۳- انجام PCR

۵ میکرولیتر از DNA الگوی استخراج شده در ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل بافر PCR (۱x)، مخلوط dNTPs، $Mgcl_2$، آغازگرها، Taq پلی‌مراز و آب مقطر دیونیزه به‌کار برده شد. سپس مخلوط فوق در ٤٠ چرخه شامل ٩٤ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ٦٤ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱/۵ دقیقه و به‌دنبال آن‌ها ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه PCR شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

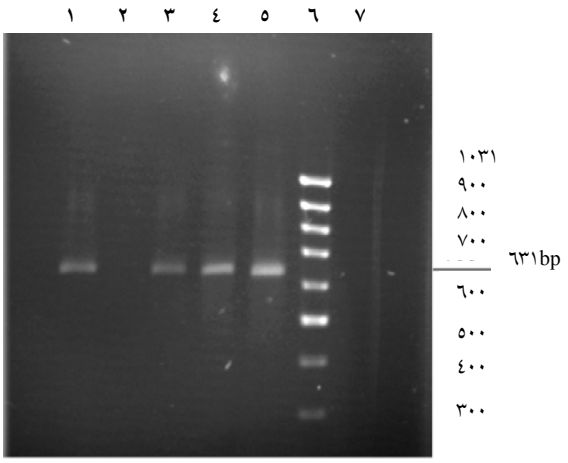
۳- نتایج

در این تحقیق، ۷۰ نمونه BAL از بیمارستان بقیه ا...(عج) جمع‌آوری و ارزیابی شدند که از این تعداد ۳٦ مورد (٥١/٤ درصد) از بیماران بستری در بیمارستان بودند و برای آن‌ها پرونده پزشکی موجود بود. از ۳٦ بیمار بستری ۲۵ بیمار

(٦٩/٤٤ درصد) به علت تنگی نفس بستری شده بودند. پس از انجام آزمایش‌ها روی ٧٠ نمونه، ٦ مورد (٨/٧٥ درصد) از نظر لژیونلا مثبت تشخیص داده شدند که در ٤ مورد (٥/٧ درصد)، علت بیماری در آن‌ها مشخص نشده بود. یک مورد (١/٤ درصد) از آن‌ها پنوموکوک و یک مورد (١/٤ درصد) مایکوباکتریوم تشخیص داده شده بود که در این مورد همزمانی آلودگی قابل تأمل است.

از ٧٠ نمونهٔ BAL که کشت داده شدند٣ نمونه (٤/٢ درصد) با کشت مثبت بودندکه هر سه نمونه مربوط به بیماران بستری در بیمارستان بود که یک هفته از اقامت آن‌ها از بیمارستان می‌گذشت بنابراین میزان آلودگی به لژیونلا با روش کشت در بین کل نمونه‌ها ٤ درصد و در بین بیماران بستری شده ٩ درصد بود. علاوه بر این در یک مورد لژیونلا به‌طور همزمان با مایکوباکتریوم و در یک مورد به‌طور همزمان با پنوموکک تشخیص داده شد.

از ٧٠ نمونه BAL، تعداد ٦ نمونه (٨/٥٧ درصد) از آن‌ها، از نظر لژیونلا و به‌عبارتی ژن *mip* مثبت بودند (نمودار ١ و شکل ١). شکل ١ نتایج محصول PCR را بعد از انجام الکتروفورز نشان می‌دهد.

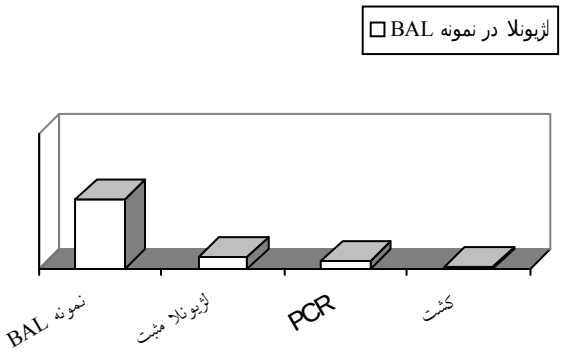


شکل ١ چاهک ١: کنترل مثبت، لژیونلا پنوموفیلا ATCC33152؛ **چاهک ٢**: نمونه BAL منفی؛ **چاهک ٣**: نمونه BAL جدا شده از جانباز شیمیایی که PCR مثبت و کشت منفی بود؛ **چاهک‌های ٤ و ٥**: نمونه BAL جدا شده از بیمار که کشت و PCR آن مثبت بود؛ **چاهک ٦**: نشانگر(Marker) ١٠٠ جفت بازی.

در این شکل داشتن باند ٦٣١ جفت باز نشان‌دهنده وجود ژن *mip* در نمونه و مثبت بودن نتیجه PCR برای شناسایی و جداسازی لژیونلا پنوموفیلا است.

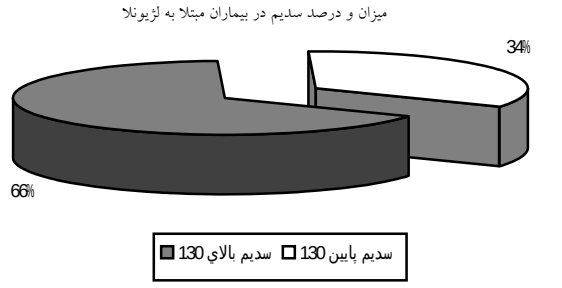
در جدول ١ به تفکیک بیماران مبتلا به لژیونر از جنبه علایم بالینی، سن جنس، علت بستری در بیمارستان و سایر علایم زمینه‌ای بررسی شده‌اند.

همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود ١٠٠ درصد بیماران با تنگی نفس و سرفه و تب بستری شده‌اند. ٦٦/٦ درصد سدیم مساوی یا پایین‌تر از ١٣٠ میلی‌اکی‌والان در لیتر داشتند (نمودار٢). ٦٦/٦ درصد سن ٣٥ تا ٤٥ سال و ٣٣/٣ سن ٧٠ تا ٨٠ سال داشتند. از بیمارانی که در طیف سنی ٣٥ تا ٤٥ سال بودند ٥٠ درصد از جانبازان شیمیایی، ٢٥ درصد مبتلا به دیابت و مایکوباکتریوم و ٢٥ درصد اعتیاد به مواد مخدر داشتند.



نمودار ١ لژیونلا در نمونه BAL. از ٧٠ نمونه BAL در بیماران مشکوک به لژیونلا ٣ نمونه با کشت و ٦ نمونه با PCR تشخیص داده شد.

از ٦ بیمار مبتلا به لژیونر ٥٠ درصد توسط کشت و ١٠٠ درصد توسط PCR و ٥٠ درصد توسط کشت و PCR تشخیص داده شد (شکل ١ و نمودار ١). همچنین میزان تشخیص در جنس زن و مرد به‌طور مساوی است. حدود ٧٠ درصد از بیماران تنها از تنگی نفس شکایت داشتند و تقریباً همگی آن‌ها در کنار سایر علایم مشکل تنگی نفس هم داشتند.



نمودار ٢ میزان سدیم بیماران مبتلا به لژیونلا. در ٣٣/٦ درصد بیماران مبتلا به لژیونلا، سدیم بالای ١٣٠ و در ٦/٦٦ بیماران درصد سدیم پایین ١٣٠ بود.

جدول ۱ مشخصات بالینی بیماران مبتلا به لژیونر

ردیف	علت بستری	علایم بالینی	میزان سدیم	سن	وضعیت بدن	جنسیت	تشخیص نهایی	کشت	PCR
۱	تنگی نفس، برونشکتازی (Bronchiectasis)، فیبروزیس (Fibrosis)، عفونت ریوی	تب و لرز، کاهش وزن بدن، سرفه و خلط	۱۳۰	۷۱	سن بالا	زن	لژیونلا	منفی	مثبت
۲	تنگی نفس، درد قفسه سینه	تب، سرفه خشک، کاهش اشتها، کاهش وزن	۱۲۶	٤٥	ابتلا به دیابت	زن	لژیونلا، مایکوباکتریوم	مثبت	مثبت
۳	تنگی نفس، درد قفسه سینه، همو پتزی (Hemoptysis)	تب و لرز، پلی‌آرتریت (Arthritis)، سرفه خشک، درد شکم	۱۳۳	٤٥	اعتیاد به مواد مخدر	مرد	لژیونلا	مثبت	مثبت
٤	تنگی نفس	سرفه خلط‌دار	۱٤۳	۸۱	سن بالا	زن	لژیونلا	منفی	مثبت
٥	تنگی نفس	سرفه خشک	۱۳۰	۳۹	جانباز شیمیایی	مرد	لژیونلا	مثبت	مثبت
٦	تنگی نفس	سرفه خشک	۱۳۰	٤٥	جانباز شیمیایی	مرد	لژیونلا	منفی	مثبت

٤- بحث

در این تحقیق نمونه BAL از ۷۰ بیمار مبتلا به پنومونی از نظر حضور لژیونلا بررسی شد.

لژیونلا در نمونه BAL (۵/ ۸ درصد) ٦ بیمار تشخیص داده شد. پیگیری‌های بعدی وقوع مرگ‌ومیر را در هیچ‌یک از این بیماران نشان نمی‌داد. نیمی از نمونه‌ها مربوط به بیماران سراپایی (۳۵ نفر) بود که به‌علت ابتلا به پنومونی مراجعه کرده بودند و به همین دلیل تحت برونکوسکوپی قرار گرفته بودند. لژیونلا در نمونه هیچ‌یک از این بیماران تشخیص داده نشد. به‌عبارت دیگر تمامی ٦ مورد (۸/۵ درصد) بیماری لژیونر در گروهی تشخیص داده شد که حداقل یک هفته قبل از نمونه‌گیری در بیمارستان بستری شده بودند. بیماری لژیونر پنومونی آتیپیک (Atypical pneumonia) و فرم حاد لژیونر است که به‌صورت نوزوکومیال (Nosocomial) و اساساً توسط لژیونلا پنوموفیلا به‌وجود می‌آید. نکته درخور توجه آن‌که عامل بیماری لژیونر (لژیونلا پنوموفیلا) در نمونه‌های آب همین بیمارستان تشخیص داده شد [۱۷]. در این پروژه دو روش تشخیصی مکمل هم یعنی کشت استاندارد و روش PCR بهینه‌سازی و آزمایش شد.

در این تحقیق از نمونه BAL بیمارانی که با علایم تنفسی به بیمارستان بقیه‌ا... مراجعه کرده بودند، برای جداسازی لژیونلا استفاده شد. برای جدا کردن لژیونلا از نمونه‌های بالینی توسط کشت، محدودیت‌هایی وجود دارد؛ از جمله دوره انکوباسیون طولانی و این‌که رشد لژیونلا توسط ارگانیسم‌های سریع‌الرشد تحت‌الشعاع قرار می‌گیرد [۱۸] و همچنین حضور لژیونلاهای زنده‌ای که قدرت رشد روی محیط کشت را ندارند. ناتوانی روش‌هایی که هم‌اکنون برای تشخیص لژیونلا در دسترس است؛ موجب شده تا عفونت لژیونلایی به طور کامل تشخیص داده نشده و درمان آن هم با مشکل مواجه شود [۱۹].

ردیابی مولکولی، موجب تشخیص مطمئن و سریع بیماری لژیونر می‌شود. آمپلی‌فیکاسیون (Amplification) اسیدنوکلئیک برای تشخیص لژیونلا بسیار کارآمد است [۲۰،۱۹]. روش تشخیص لژیونلا در نمونه‌های مختلف توسط روش PCR اخیراً ابداع شده و محدودیت‌های کشت را ندارد [۲۱]. DNA لژیونلا در ترشحات تنفسی مثل BAL، سواپ فارنژیال (Pharyngeal)، سواپ نازوفارنژیال (Nasopharyngeal) و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون در ادرار و سرم تشخیص داده شده است [۲۲]. چندین مطالعه، حساسیت این روش را ۱۰۰ درصد گزارش کرده‌اند؛ به‌خصوص زمانی که روی نمونهٔ برونکوآلوئولار استفاده شده است. 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 ژن‌هایی که زیر واحد ۱٦S rRNA و ٥S rRNA ریبوزومی را کد می‌کنند و ژن *mip* استفاده شده است [۲۳]. به دلیل

این‌که لژیونلا پنوموفیلا در بین گونه‌های دیگر لژیونلا، ۸۵ درصد از موارد بیماری را به خود اختصاص می‌دهد؛ بنابراین در این تحقیق نیز با استفاده از ژن *mip* که برای لژیونلا پنوموفیلا اختصاصی‌تر است اقدام به شناسایی لژیونلا در نمونه‌های BAL شد. این ژن برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا در نمونه‌های بالینی و محیطی توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. در این تحقیق با انجام بررسی روی مقالات، آغازگرهایی برای آمپلی‌فیکاسیون ژن *mip* با اندازهٔ ٦٣١ جفت باز که مختص لژیونلا پنوموفیلا بود، برای انجام PCR انتخاب شد. توالی این ژن، اولین بار در سال۱۹۸۹ تعیین شد [٢٤]. گونه‌های فاقد این پروتئین، کاهش ۸۰ برابری را در میزان بیماری‌زایی از خود نشان می‌دهند.

ژن *mip* در بین گونه‌های لژیونلا به قدر کافی تنوع دارد که به‌صورت اختصاصی برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا به روش PCR بتوان از آن بهره گرفت [٢٥، ٢٦]. هدف این تحقیق، راه‌اندازی روش PCR براساس ژن *mip* لژیونلا پنوموفیلا در نمونه‌های BAL بیماران مبتلا به پنومونی و تشخیص موارد مثبت توسط PCR و مقایسه آن با روش کشت که استاندارد طلایی برای تشخیص این باکتری به حساب می‌آید، بود.

در مطالعه حاضر تعداد موارد مثبت لژیونلای تشخیص داده شده توسط PCR تقریباً دو برابر موارد جدا شده توسط روش کشت بود که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر PCR نسبت به کشت است. لژیونلاهای جدا شده با روش کشت، نیز علاوه بر تأیید توسط آزمون‌های بیوشیمیایی با روش PCR و ژن *mip* نیز تأیید شدند و مشخص شد که همگی آن‌ها از نظر ژن *mip* مثبت و احتمالاً لژیونلا پنوموفیلا هستند. تمام نمونه‌های مثبت با روش کشت، با PCR هم مثبت بودند. ولی نیمی از نمونه‌های که با روش PCR، مثبت ارزیابی شدند، نتایج کشت‌شان منفی بود. از آنجا که تمامی موارد مثبت از نظر کشت در این تحقیق با روش PCR هم مثبت تشخیص داده شدند، بنابراین حساسیت روش PCR در بررسی حاضر ۱۰۰ درصد است. در این بررسی، نتایج PCR صحت موارد جدا شده با کشت را کاملاً تأیید می‌کند؛ بنابراین هیچ موردی از منفی کاذب (یعنی مواردی که با کشت مثبت و با PCR منفی گزارش شده باشد) مشاهده نمی‌شود. با این حال مواردی که نتایج PCR آن‌ها مثبت ولی نتایج کشت آن‌ها منفی بود، به‌عنوان مثبت کاذب در نظر گرفته شدند. به این ترتیب اختصاصیت PCR در بررسی حاضر ٩٤ درصد ارزیابی شد. محبوبانی (Mahbubani) و همکارانش در سال ۱۹۹۰، با استفاده از قطعه ٦٥٠ جفت بازی از ژن *mip* با حساسیت ۱۰ فیکوگرم لژیونلا پنوموفیلا را تشخیص دادند [٢٧].

جالهاک (Jaulhac) و همکارانش در سال ۱۹۹۲ برای اولین بار، لژیونلا پنوموفیلا، لژیونلا بزمانی (*Legionella bozemanii*) و لژیونلا میکددی (*Legionella micdadei*) را در نمونه‌های BAL، با استفاده از قطعه ٦٣٠ جفت بازی از ژن *mip* تشخیص دادند که حساسیت روش آن‌ها، ٥٠ فیکوگرم گزارش شد. در این مطالعه از ٦٨ نمونه، پانزده نمونهٔ مثبت تشخیص داده شد [٢٨].

در سال ۱۳۸۲، حسینی‌دوست (Hosseini doust) و همکاران به بررسی وجود لژیونلا در بیمارستان اکباتان همدان پرداختند. در این مطالعه نیز از ژن *mip* و روش PCR برای تشخیص استفاده شد که از ٤٦ نمونه گرفته شده، یک مورد به روش کشت و ٤ مورد توسط PCR مثبت شناخته شدند؛ که این خود نشان‌دهنده حساسیت بالای روش PCR است [١٠].

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 [٢٩]. علت عدم جداسازی لژیونلا از ۳ مورد مثبت شده توسط روش PCR، می‌تواند به این دلیل باشد که لژیونلا یک باکتری درون سلولی اختیاری است و تنها پس از تکثیر درون ماکروفاژها و پاره کردن آن‌ها به تعداد زیاد در فضای آلوئولی و ترشحات تنفس تحتانی یافت خواهند شد. دلیل دیگر، می‌تواند حضور نرمال سالین باشد؛ این مایع موجب مهار رشد لژیونلا می‌شود. مصرف آنتی‌بیوتیک در بیماران، در عدم رشد باکتری تأثیر به‌سزایی داشته و می‌تواند در نتایج آزمایش‌های باکتری‌شناسی به منظور شناسایی عامل بیماری‌زا، اختلال ایجاد کند.

در سال ۲۰۰۳ ویلسون (Wilson) و همکارانش با روش Real-time PCR و با هدف ژن *mip*، به تشخیص لژیونلا پنوموفیلا اقدام کردند که در این بررسی، از ۲۷ ایزوله لژیونلا پنوموفیلا،

۲۰ ایزوله از ۱٤ گونه دیگر لژیونلا، ۱۰۳ ایزوله غیر از لژیونلا، ۸ نمونه بالینی که کشت آن‌ها از لحاظ لژیونلا مثبت شده بودند (۷ مورد لژیونلا پنوموفیلا و ۱ مورد لژیونلا بزمانی) و ٤۰ نمونه که کشت منفی شده بودند، استفاده شد. ۷ نمونه‌ای که کشت آن‌ها از نظر لژیونلا پنوموفیلا مثبت بود به‌وسیله روش PCR نیز مثبت شدند و نمونه محتوی لژیونلا بزمانی که کشت مثبت داشت و ٤۰ نمونه دیگری که کشت منفی بودند در روش تشخیصی PCR نیز منفی شدند. و تنها ۵ مورد از ۷ مورد مثبت توسط کشت و PCR در روش DFA برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا مثبت بودند [۳۰].

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روش‌های مولکولی، خصوصاً PCR، نسبت به کشت روش مناسب‌تری برای تشخیص لژیونلا پنوموفیلا به‌حساب آمده و به‌صورت موفقیت‌آمیزی می‌تواند لژیونلا پنوموفیلا را از نمونه‌های بالینی یا نمونه‌های آبی با حساسیت و سرعت بالاتر تشخیص دهد. حساسیت این روش، خصوصاً در روزهای اول بیماری، بسیار بالا است و سلول‌های مرده و زنده را از طریق PCR تشخیص می‌دهد. نتایج این روش، در کمتر از یک روز و ظرف ۱۵ ساعت به‌دست می‌آید. آمپلی‌فیکاسیون DNA از طریق PCR، سبب شناسایی DNA، حتی در تعداد بسیار کم باکتری در نمونه‌های مورد بررسی می‌شود. همچنین قادر به غربال‌گری گونه‌های لژیونلا و سروگروه‌های آن‌ها با یک آزمون می‌شود.

۵- تشکر و قدردانی

از دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل، امکانات آزمایشگاهی و تهیه نمونه بیوپسی تشکر می‌نمایم.

٦- منابع

[1] Horwitz MA, Silverstein SC. Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) multiplies intracellularly in human monocytes. J Clin Invest. 1980; 66(3): 441-50.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Ditommaso S, Giacomuzzi M, Biasin C, Gentile M, Maggiorotto G, Ruggenini Moiraghi A, Zotti CM; Legionellosis Collaborating Group. Incidence of legionellosis in hospitals contaminated by Legionella pneumophila other than serogroup 1.Infect Control Hosp Epidemiol 2007; 28(4): 509-11

[5] Nagelkerke NJ, Boshuizen HC, de Melker HE, Schellekens JF, Peeters MF, Conyn-van Spaendonck M. Estimating the incidence of subclinical infections with Legionella Pneumonia using data augmentation: analysis of an outbreak in The Netherlands. Stat Med 2003; 22(24): 3713-24.

[6] Metaxa-Mariatou V, Ikonomou A, Tzortzi A, Mihalatos M, Vakalis N, Nasioulas G. Documentation of Legionella pneumophila and Mycobacterium tuberculosis co-existence in a patient with acute respiratory distress syndrome. In Vivo 2003; 17(4): 365-7.

[7] Dominguez JA, Gali N, Pedroso P, Fargas A, Padilla E, Manterola JM, Matas L. Comparison

of the Binax Legionella urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest Legionella urin antigen EIA for detection of Legionella antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. J Clin Microbiol 1998; 36(9): 2718-22.

[8] Marston BJ, Plouffe JF, File TM, Hackman BA, Salstrom SJ, Lipman HB, Kolczak MS, Breiman RF. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio.The Co Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. Arch Intern Med 1997; 157(15): 1709-18.

[9] Murdoch DR. Diagnosis of Legionella infection. Clin Infect Dis 2003; 36(1): 64-9.

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

[11] Waterer GW, Baselski VS, Wunderink RG. Legionella and community-acquired pneumonia: A review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. Am J Med 2001; 110(1): 41-8.

[12] Dennis L. Clinical applications of PCR, London, Humana. Press 1998.

[13] Plouffe JF, File TM, Breiman RF. Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group. Clin Infect Dis 1995; 20(5): 1286-91.

[14] Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23(12): 871-8.

[15] Winn WC, legionella: In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (eds). Manual of clinical microbiology. Washington, ASM Press 1999; p: 572-85.

[16] 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.

[17] Mohabati Mobarez A, Hosseini Doust R, Esmaeili D. Detection of Legionella in the hospital water systems. J of Infectious Disease 2007; 12(36): 33- 7.

[18] Maiwald M, Helbig JH, Luck PC. Laboratory methods for the dignosis of Legionella infection. J Microbiol Methods 1998; 33: 59-79.

[19] Kessler HH, Reinthaler FF, Pschaid A, Pierer k, Kleinhappl B, Eber E, Marth E. Rapid detection of Legionella species in bronchoalveolar lavage fluids with the EnviroAmp Legionella PCR amplification and detection Kit. J Clin Microbiol 1993; 31(12): 3325-8.

[20] Koide M, Saito A. Diagnosis of Legionella pneumophila infection by polymerase chain reaction .Clin Infect Dis1995; 21(1): 199-201.

[21] Hayden T, Uhi JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper A, Lioyd RV, Cockerill FR. Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparision of light-cycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence Antigen Detection, and culture. J Clin Microbiol 2001; 2618-26.

[22] 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

[23] 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(4): 1263-70.

[24] Cianciotto NP, Bangsborg JM, Eisenstein BI, Engleberg NC. Identification of mip-like genes in the genus Legionella. Infect Immune 1990; 58(9): 2912-8.

[25] Maiwald M, Schill M, Stockinger C, Helbig JH, Luck PC, Witzleb W, Sonntag HG. Detection of Legionella DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14(1): 25-33.

[26] Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hilllyard DR. Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. J Clin Microbiol 2000; 38(5): 1709-12.

[27] Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, Atlas RM. Detection of Legionella with polymerase chain reaction test and gene probe methods. Mol Cell Probes 1990; 4(3): 175-87.

[28] 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): 920-4.

[29] Lindsay DS, Abraham WH, Fallon RJ. Detection of mip Gene by PCR for diagnosis of Legionnaires' disease. J Clinical Microbiol 1994; 32(12): 3068-9.

[30] Wilson DA, Liberman BY, Reishl U, Gordon SM, Procop GW. Detection of Legionella pneumophila by real time PCR for the mip gene. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 3327-30.