مقاله اصلی

نفس سال ۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، صفحات ۲۳ تا ۲۸

بررسی حضور لژیونلا پنوموفیلا در افراد مبتلا به بیماری انسداد ریوی مزمن به روش مولکولی

سیاوش عبدی خواجه‌ایم[۱]، پروانه صفاریان[۲]، عبدالرضا محمدنیا[۳و۴*]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه سلولی و مولکولی، تهران، ایران
۲) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه علوم پایه، تهران، ایران
۳) مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری
۴) گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

لژیونلا به عنوان عامل مهمی در پنومونی‌های اکتسابی از بیمارستان و همچنین در بیماری مزمن انسدادی ریه مطرح می‌باشد هدف این مطالعه تشخیص مولکولی لژیونلا پنوموفیلا، در بیماران مبتلا به بیماری انسداد ریوی مزمن است.

تعداد ۱۰۰ نمونه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA ژنومی، شناسایی مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR و نیز با کیت شناسایی استاندارد لژیونلا پنوموفیلا به طور همزمان انجام شد.

تعداد موارد مثبت از نظر باکتری در مورد لژیونلا پنوموفیلا ۵ نفر از ۱۰۰ نفر با روش کیت و ۳ نفر از ۱۰۰ نفر با روش دوم PCR مثبت شدند.

مجموعا PCR به دلیل داشتن حساسیت، دقت بالا و صرفه جویی در زمان روش مناسبی جهت مقاصد تشخیصی باکتری لژیونلا پنوموفیلا در بیماران مبتلا به انسداد ریوی مزمن می‌باشد.

واژگان کلیدی: انسداد ریوی مزمن، لژیونلا پنوموفیلا، PCR

* **نویسنده مسئول:**

عبدالرضا محمدنیا، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیک: Mohamadnia.ar@gmail.com

مقدمه:

بیماری انسدادی مزمن ریوی[1] (COPD) بیماری است که عملکرد ریه ها مختل شده است. به عبارت دیگر ریه‌ها ملتهب شده، مجاری هوا تنگ می‌شوند و کیسه‌های هوایی (آلوئول‌ها) صدمه می‌بینند. گرچه آسیب وارد شده غیر قابل برگشت است اما داروهای امروزی می‌توانند به صورت قابل توجهی بر عملکرد ریه و کیفیت زندگی و التهاب و حتی مرگ ومیر تاثیر داشته باشند. امروزه اشتباه تشخیصی بین این بیماری و آسم رایج است. مهم‌ترین علت بیماری انسداد ریوی مزمن مصرف سیگار است و اکثر افراد سیگاری این بیماری را به صورت پنهان دارند. علائم بالینی آن عبارت‌اند از افزایش خلط، تنگی تنفس، سرفه، خستگی و عفونت‌های مکرر مجاری هوا می‌باشد [۱-۳]. گاهی عفونت‌ای مزمن مجاری تنفسی در بیماران COPD دیده شده است [۵,۴]. ازجمله عفونت‌هایی با استرتپوکوکوس پنومونیه[2]، مایکوپلاسما پنومونیه[3] و لژیونلا پنوموفیلا[4] ممکن است گزارش گردد [۷,۶].

لژیونلا پنوموفیلا در واقع جزء عوامل ایجاد کننده پنومونی بیمارستانی و جامعه می‌باشد. پنومونی ایجاد شده توسط لژیونلا می‌تواند بصورت اپیدمیک و آندمیک باشد [۸]. تاخیر در تشخیص این باکتری خطرناک بوده و می‌تواند باعث ایجاد مرگ و میر گردد. بنابراین تشخیص‌های آزمایشگاهی برای این باکتری اهمیت ویژه‌ای دارند [۹].

هدف این مطالعه استفاده از روش‌های مولکولی PCR جهت تشخیص باکتری لژیونلا پنوموفیلا در بیماران COPD می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه از نوع مقطعی- توصیفی می‌باشد که در بیمارستان مسیح دانشوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق (کد کمیته اخلاق: IR.SBMU.NRIILD.REC.1396.407) انجام شد. تعداد ۱۰۰ نمونه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD که مشکوک به عفونت با باکتری بودند با نظر پزشک متخصص ریه جمع آوری گردید.

در این مطالعه برای استخراج DNA از کیت GENET Bio استفاده شد و کیفیت و خلوص DNAها توسط روش اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۶۰ nm و 280 nm بررسی گردید.

نمونه‌ها به دو روش بررسی شدند. ابتدا بررسی مولکولی به روش PCR و با استفاده از کیت موسسه ایرانیان ژن فناور (Legionella pneumophila PCR Detection kit; Cat. No. IGF 116) انجام گردید. در مرحله بعدی، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده انجام شد. در مورد لژیونلا پنوموفیلا پرایمرهای اختصاصی برای ژن (mip) طراحی و جهت ساخت به شرکت پویاگسترژن سفارش داده شد (جدول ۱).

واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Master mix شرکت Amplicon، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام از پرایمر های F و R، ۵ میکرولیتر از DNA و مابقی آب مقطر، برای ۴۰ سیکل و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BOECO انجام گردید (جدول ۲) و نهایتا محصولات PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفوزر و نتایج بررسی شدند.

یافته‌ها:

در این مطالعه ۱۰۰ بیمار مبتلا به COPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. از این تعداد ۵۴ نفر مرد و ۴۶ نفر زن بودند. تفاوت معناداری از نظر جنسیت وجود نداشت (P-Vlue>۰/۰۵). میانگین سنی بیماران ۱۰/۲ ± ۶۰/۲ بود.

تعداد موارد مثبت از نظر باکتری در مورد لژیونلا پنوموفیلا ۵ نفر از ۱۰۰ نفر با روش کیت مثبت شدند و ۳ نفر از ۱۰۰ نفر با روش دوم PCR مثبت شدند. در شکل ۱ نمونه‌ای از الکتروفوزر ژل آگارز و باندهای تشکیل شده محصولات PCR برای باکتری لژیونلا پنوموفیلا با استفاده از کیت استاندارد نشان داده شده است.

در شکل ۲ نمونه‌ای از الکتروفوزر ژل آگارز و باندهای تشکیل شده محصولات PCR برای باکتری لژیونلا پنوموفیلا با استفاده از پرایمرهای طراحی مشاهده می‌گردد.

[1] Chronic Obstructive Pulmonary Disease
[2] Streptococcus pneumonia
[3] Mycoplasma pneumonia
[4] Legionella pneumophila

جدول ۱ - مشخصات پرایمر استفاده شده

Parameters	mip gene
Primer Forwartd	GGTGACTGCGGCTGTTATGG
Primer length	20
Primer Reverse	GGCCAATAGGTCCGCCAACG
Primer length	20
Product size	632

جدول ۲ - دماها و زمان‌های واکنش PRC

Initial denaturation	۵ دقیقه	۹۵^{oc}
۴۰ سیکل	۱ دقیقه	۹۵^{oc}
	۱ دقیقه	۵۳^{oc}
	۱ دقیقه	۷۲^{oc}
Final extension	۵ دقیقه	۷۲^{oc}

فراوانی نسبی (Relative frequency) برای لژیونلا پنوموفیلابا استفاده از روش کیت ۵٪ و همچنین با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ۳٪ محاسبه گردید.

حساسیت و ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی در مورد این باکتری با روش PCR در مقابل کیت‌های موجود به ترتیب ،۶۰٪،۱۰۰٪،۱۰۰٪ و ۹۸٪ بودند.

بحث:

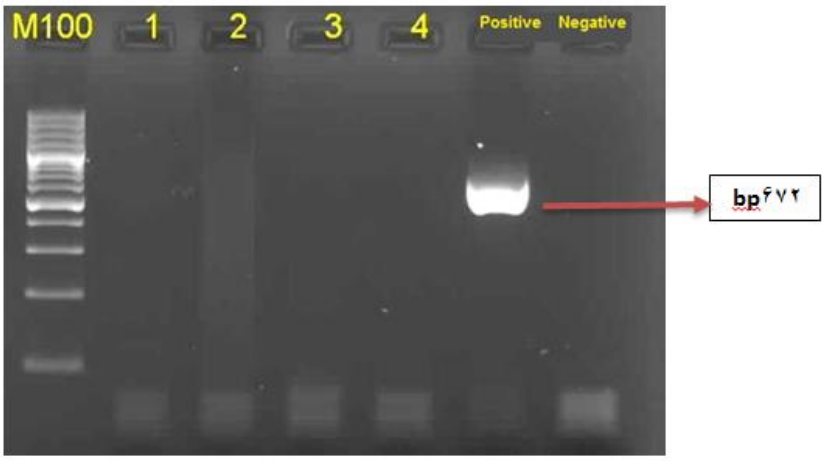
بیماری مزمن انسدادی ریه نوعی بیماری است که با مسدود بودن مسیر هوایی به صورت مزمن مشخص می‌شود و یکی از علل اصلی مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته است که میزان مرگ و میر ناشی از آن در حال افزایش می‌باشد. علائم این بیماری با افزایش سن تشدید می‌یابد. گرچه یکی از معمول‌ترین عوامل مسبب COPD استعمال دخانیات است اما عواملی دیگر از قبیل آلودگی هوا و وراثت نیز در ایجاد آن نقش دارند [۱۰].

گاهی اوقات بیماران COPD ممکن است دچار عفونت‌های مجاری تنفسی شوند که پیشرفت این عفونت‌ها باعث تشدید علائم بیماری می‌گردد [۱۲,۱۱,۴].

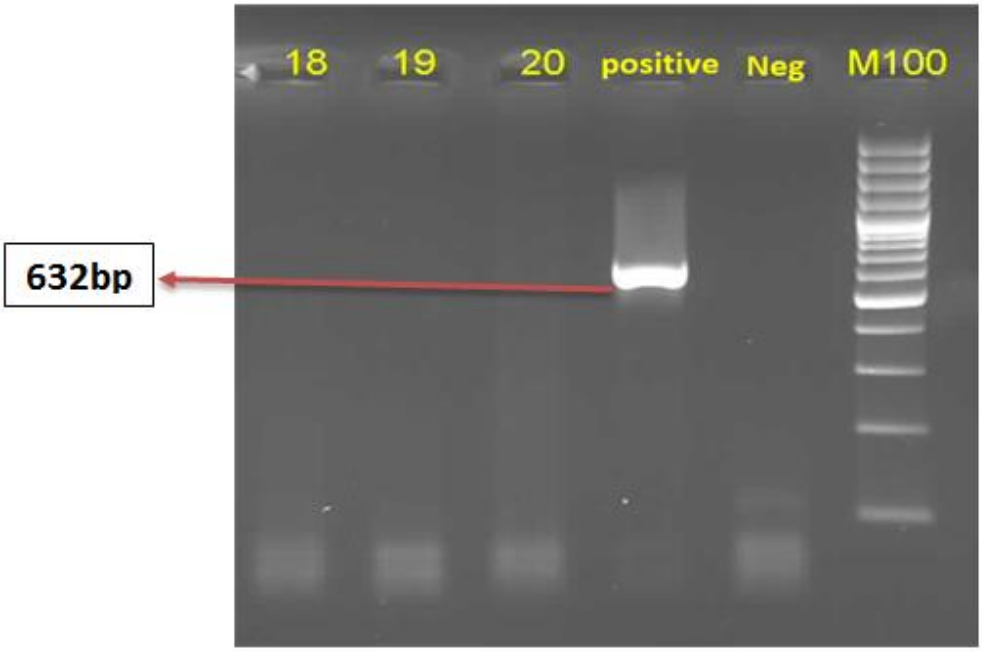
به همین دلیل تشخیص به موقع و سریع باکتری‌های ایجاد کننده این عفونت‌ها می‌تواند در بهبود وضعیت بیمار نقش مهمی را ایفا کند. در سال‌های اخیر پیشرفت زیاد روش‌های مولکولی کمک شایانی به تشخیص عوامل عفونی در بیماری‌ها کرده است [۱۴,۱۳]

نومانپور و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطالعه‌ای را در ۷ بیمارستان شهر تهران بر روی نمونه‌های خلط ۲۱۸ بیمار با تشخیص پنومونی اکتسابی انجام دادند. در این بررسی حساسیت و ویژگی خوبی برای واکنش PCR در تشخیص باکتری‌های استرپتوکوک پنومونیه، لژیونلا پنوموفیلا، کلامیدیا پنومونیه و مایکوپلاسما پنومونیه به دست آمد. در مطالعه حاضر نیز حساسیت و ویژگی خوبی برای تشخیص استرپتوکک پنومونیه و لژیونلا پنوموفیلا حاصل گردید [۱۵].

Ketel و همکاران در سال ۱۹۹۰ برای تعیین میزان حساسیت روش PCR، ابتدا از DNA ژنومیک هموفیلوس آنفلوانزا رقت تهیه نمودند و سپس با انجام PCR بر روی این رقت‌ها، حد تشخیص این روش را محاسبه کردند که این میزان برابر با ۵ کلونی باکتری بود [۱۶].



شکل ۱ – الکتروفورز ژل آگارز با استفاده از کیت استاندارد



شکل ۲ – الکتروفورز ژل آگارز با استفاده از پرایمرهای طراحی شده

در یک بررسی دیگر اقداماتی توسط Cloud و همکاران به منظور شناسایی لژیونلا پنوموفیلا در نمونه‌های تنفسی انجام شد. تمامی نمونه‌های مثبت توسط کشت، با روش PCR هم مثبت شدند. همچنین ۴ نمونه که با روش کشت منفی شده بودند با روش PCR مثبت گزارش گردیدند. این یافته اهمیت روش PCR در تشخیص مقادیر کم را نشان داد [۱۷].

در مجموع می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که روش‌های مولکولی مورد استفاده در این مطالعه نسبت به روش‌های سنتی و موجود از حساسیت و دقت خوبی برخوردار هستند و می‌توانند باعث تشخیص‌های بهتر و دقیق‌تری

از این نوع عفونت‌ها شوند. البته مطالعات بیشتر با ژن‌های مشابه از این باکتری‌ها و با تعداد نمونه‌های بیشتری باید انجام گیرد تا بتوان به جواب‌های بهتر و مفیدتری دست یافت.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از زحمات اساتید محترم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

منابع:

1) Lieberman, D, et al., Serological evidence of Legionella species infection in acute exacerbation of COPD. European Respiratory Journal, 2002. 19(3): p. 392-397.
2) Celli, B.R., et al., Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. European Respiratory Journal, 2004. 23(6): p. 932-946.
3) Devereux, G., Definition, epidemiology, and risk factors. Bmj, 2006. 332(7550): p. 1142-1144.
4) Ghoshal, A., R. Dhar, and S. Kundu, Treatment of acute exacerbation of COPD. J Assoc Physicians India, 2012. 60: p. 38-43.
5) Martinez, F.J., Pathogen-directed therapy in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Proceedings of the American Thoracic Society, 2007. 4(8): p. 647-658.
6) Mohan, A ,.et al., Clinical presentation and predictors of outcome in patients with severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease requiring admission to intensive care unit. BMC pulmonary medicine, 2006. 6(1): p. 27.
7) Nagelkerke, N.J., et al ,.Estimating the incidence of subclinical infections with Legionella Pneumonia using data augmentation: analysis of an outbreak in The Netherlands. Statistics in medicine, 2003. 22(24): p. 3713-3724.
8) Reller, L.B., M.P. Weinstein, and D.R. Murdoch, Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. Clinical infectious diseases, 2003. 36(9): p. 1162-1170.
9) Khaledi, A., et al., Prevalence of Legionella species in water resources of Iran: a systematic review and meta-analysis. Iranian journal of medical sciences, 2018. 43(6): p. 571.
10) Bentham, R., Environmental factors affecting the colonization of cooling towers by Legionella spp. in South Australia. International biodeterioration & biodegradation, 1993. 31(1): p. 55-63.
11) Marin, A ,.et al., Effect of bronchial colonisation on airway and systemic inflammation in stable COPD. COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2012. 9(2): p. 121-130.
12) Simpson, J.L., et al., COPD is characterized by increased detection of H aemophilus influenzae, S treptococcus pneumoniae and a deficiency of B acillus species. Respirology, 2016. 21(4): p. 697-704.
13) Pitcher, D., et al., Real-time detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples with an internal processing control. Journal of medical microbiology, 2006. 55(2): p. 149-155.
14) Shimizu, K., et al., Pathogens in COPD exacerbations identified by comprehensive real-time PCR plus older methods. International journal of chronic obstructive pulmonary disease, 2015. 10: p. 2009.
15) Nomanpour, B., et al., Single tube real time PCR for detection of Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae and Legionella pneumophila from clinical samples of CAP. Acta microbiologica et immunologica Hungarica, 2012 :(۲)۵۹ .p. 171-184.
16) van Ketel, R., de, B. De Wever, and L. Van Alphen, Detection of Haemophilus influenzae in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. Journal of medical microbiology, 1990. 33(4): p. 271-276.
17) Cloud, J ,.et al., Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. Journal of clinical microbiology, 2000. 38(5): p. 1709-1712.

Nafas, Vol. 6, No. 1, Spring 2019, Pages: 23-28

Original Article

Molecular Method Detection of Legionella pneumophila in Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Siavash Abdi Khajeim[1], Parvaneh Saffarian[2], Abdolreza Mohamadnia[3,4*]

1) Department of Cellular and Molecular Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2) Department of Basic Sciences, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3) Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4) Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract:
Legionella is a major contributor to hospital acquired pneumonia as well as chronic obstructive pulmonary disease. The aim of this study is to molecular diagnosis of the Legionella pneumophila in patients with chronic obstructive pulmonary disease.
One hundred samples of respiratory secretion were collected in patients with COPD. Following of genomic DNA extraction and using specific primers, the molecular identification of Legionella pneumophila was performed by two methods of polymerase chain reaction and standard detection kits, simultaneously.
The number of positive bacteria in the case of Legionella pneumophila was 5 out of 100 patients by kit method, and 3 out of 100 by the second PCR method.
In general, PCR is a suitable method for detecting of Legionella pneumophila in patients with chronic pulmonary obstruction disease due to its sensitivity and high accuracy.
Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease, Legionella pneumophila, PCR

* **Corresponding Author:**
Abdolreza Mohamadnia, Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Email: Mohamadnia.ar@gmail.com