ORIGINAL ARTICLE

Rapid Detection of Fungal Pathogens in Blood Cultures of Severely Burned Patients Using Panfungal PCR Assay

Akram Abdollahi[1],
Tahereh Shokohi[2],
Mohamad Taghi Hedayati[2],
Mojtaba Nabili[3,4],
Nazanin Lotfi[5]

[1] MSc Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Department of Medical Mycology and Parasitology, Invasive Fungal Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PhD Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Iranian Social Security Organization, Mazandaran, Iran
[5] MSc in Microbiology, Invasive Fungal Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 1, 2015 Accepted November 9, 2015)

Abstract

Background and purpose: Fungemia is a significant cause of morbidity and mortality among immunocompromised patients such as severe burns. Due to low sensitivity and long turnaround time of the traditional biphasic BHI blood culture to detect fungemia we aimed to detect fungal elements in blood culture of these patients suspected with invasive fungal disease (IFDs) using panfungal PCR assay.

Materials and methods: Four hundred blood cultures were obtained from 112 severely burned patients suspected with IFDs. DNA was extracted and a pair of fungal universal primers was used to amplify the 18SrRNA gene. The PCR product was sequenced and identified using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Results: 44(39.2%) Blood culture of 112 patients (mean age: 31.9±14.7 years) were positive. In PCR positive patients, mean burn size was 42.6±19 % of total body surface area and average hospital length of stay was 21.8 ±10.3 days. In three patients, same species of fungi were determined in both sequencing of PCR products and the classical procedures of blood culture. Randomly sequencing of 20 PCR products revealed *Aspergillus fumigatus* (n=11; 55%), *Candida tropicalis* (n=5; 25%), *C. albicans* (n=1; 5%), *C. parapsilosis* (n=1; 5%), *Agaricomycotina* (n=1; 5%), and *Penicillium* (n=1; 5%) as causative agents.

Conclusion: Panfungal PCR assay on blood culture seems to be a promising method for rapid detection of fungi in blood culture of patients at risk for IFDs.

Keywords: invasive fungal disease, burn, fungemia, *Candida, Aspergillus*

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(132): 219-228 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۲ دی سال ۱۳۹۴ (۲۲۸-۲۱۹)

شناسایی سریع پاتوژن‌های قارچی در نمونه‌های کشت خون بیماران سوختگی شدید با روش Panfungal PCR

اکرم عبداللهی[۱]
طاهره شکوهی[۲]
محمد تقی هدایتی[۲]
مجتبی نبیلی[۳و۴]
نازنین لطفی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: عفونت قارچی خون یکی از علل مرگ و میر بیماران دچار ضعف ایمنی از جمله بیماران دچار سوختگی وسیع محسوب می‌شود. از آن‌جا که روش‌های کشت خون و شناسایی عوامل قارچی عفونت‌های خون حساسیت پایینی داشته و به زمان زیادی نیز احتیاج دارند، این تحقیق با هدف شناسایی پاتوژن‌های قارچی در نمونه‌های کشت بیماران سوختگی شدید مشکوک به بیماری‌های قارچی تهاجمی با روش Panfungal PCR طراحی گردید.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۰۰ نمونه کشت خون مربوط به ۱۱۲ بیمار سوختگی شدید مشکوک به بیماری قارچی تهاجمی وارد مطالعه شد. پس از استخراج DNA ناحیه ژنی 18SrRNA با واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر گردید. محصول PCR با استفاده از برنامه مرکز اطلاعات بین‌المللی بیو تکنولوژی تعیین توالی و شناسایی شدند.

یافته‌ها: تعداد ۴۴ (۳۹/۲ درصد) نمونه کشت خون ۱۱۲بیمار مثبت گردید.) میانگین سنی بیماران PCR مثبت ۱۴/۷± ۳۱/۹ سال و طول مدت بستری ۱۰/۳± ۲۱/۸ روز وکل سوختگی ۱۹± ۴۲/۶ درصد بود. محصول PCR ۲۰ بیمار PCR مثبت، به‌طور تصادفی تعیین توالی گردید و گونه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس (۱۱ مورد؛ ۵۵ درصد)، کاندیدا تروپیکالیس (۵ مورد؛ ۲۵ درصد)، کاندیدا آلبیکنس (۱ مورد؛ ۵ درصد)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (۱ مورد؛ ۵ درصد)، آگاریکومایکوتینا (۱ مورد؛ ۵ درصد) و پنیسیلیوم (۱ مورد؛ ۵ درصد) شناسایی شدند. در سه بیمار گونه‌های شناسایی شده از کشت خون مثبت با روش روتین وروش مولکولی تطابق داشتند.

استنتاج: روش مولکولی Panfungal PCR در تشخیص سریع قارچ‌های پاتوژن در کشت خون بیماران در معرض خطر بیماری‌های قارچی تهاجمی سودمند و نویدبخش است.

واژه های کلیدی: بیماری قارچی تهاجمی، سوختگی، فونجمی، کاندیدا، آسپرژیلوس

مقدمه

عفونت‌های خون در بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه همواره از معضلات مهم بهداشتی درمانی بوده که علاوه بر افزایش مرگ و میر بیماران هزینه زیادی بر سیستم درمانی تحمیل می‌کند. حضور قارچ‌ها به‌عنوان

مولف مسئول: طاهره شکوهی– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: Shokohi.tahereh@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکتری قارچ شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. سازمان تامین اجتماعی، مازندران، ایران
۵. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۵/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۷/۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۸/۱۸

Archive of SID
www.SID.ir

عوامل ایجادکننده عفونت‌های خون در بیمارانی که به علت بیماری زمینه‌ای و یا درمان‌های تهاجمی و تضعیف‌کننده سیستم ایمنی با اختلال در عملکرد سیستم ایمنی مواجه شده‌اند، افزایش یافته به طوری‌که مسئول ۱ تا ۳ درصد عفونت‌های خون هستند(۱). گونه‌های کاندیدا به‌عنوان چهارمین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی در آمریکا(۲) و هشتمین عامل در اروپا و استرالیا گزارش شده‌اند(۴،۳). بیماران با سوختگی وسیع یکی از گروه‌های بیماران در معرض خطر عفونت‌های قارچی هستند. معمولاً سوختگی‌ها بر اساس ضخامت نسوج آسیب دیده (full-thickness surface area: FTSA) به سه درجه تقسیم می‌شود : ۱) ضخامت ناکامل سطحی (درجه یک) که فقط اپیدرم و قسمتی از درم درگیر است. ۲) ضخامت ناکامل عمقی (درجه دو) که اپیدرم و قسمت بالایی و پایینی درم درگیر است. ۳) ضخامت کامل (درجه سه) که اپیدرم و تمامی درم و گاهی بافت‌های زیرجلدی، بافت همبند، ماهیچه و استخوان درگیر است. در این بیماران شیوع عفونت‌های قارچی تهاجمی با افزایش درصد سطح کل سوختگی(Total burn surface area: TBSA) افزایش یافته و میزان مرگ و میر با افزایش TBSA و ضخامت یا درجات سوختگی (FTSA) و آسیب تنفسی و سن بیماران افزایش می‌یابد(۵).

از آن‌جاکه عفونت‌های قارچی خون از علل مهم مرگ و میر این بیماران محسوب می‌شود، تشخیص سریع و به موقع و شروع درمان مناسب در این بیماران از اهمیت حیاتی برخوردارنبوده و موجب کاهش مرگ و میر و جلوگیری از ایجاد مقاومت‌های دارویی به علت مصرف نادرست داروهای ضد قارچی می‌شود(۹-۶). کشت خون روش استاندارد طلایی برای تشخیص عفونت‌های خون می‌باشد اما به‌دلیل محدودیت‌های متعدد در اکثر موارد خصوصاً در عفونت‌های قارچی خون با شکست مواجه می‌شود به طوری‌که در ۶۵ درصد موارد در تشخیص مخمرها و در ۸۰ درصد موارد در تشخیص قارچ‌های رشته‌ای از جمله آسپرژیلوس ناموفق است(۱۰).

در سال‌های اخیر برای حل این معضل تکنیک‌های مختلفی بر پایه تکثیر قطعات ژنی اختصاصی قارچ‌ها در طی واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) طراحی و در مطالعات متعدد مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی‌های مختلفی با بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی بر روی نمونه‌های بطری‌های کشت خون در راستای تشخیص قارچ در خون انجام شده است. Gebert و همکاران در سال ۲۰۰۸، طی بررسی ۸۳ بطری کشت خون منفی با بهره‌گیری تکنیک Real time PCR و استخراج DNA با روش MolYsis شش نمونه مثبت به دست آوردند(۱۱). در مطالعه Maaroufi و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از تکنیک Real time PCR و پروب‌های اختصاصی گونه‌های کاندیدای بهینه‌سازی شده با آلبومین گاوی بر روی نمونه‌های خون بطری‌های کشت خون سیستم BACTEC، ابزار مناسبی برای تشخیص سریع کاندیدمی‌های با غلظت پایین ارائه نمودند(۱۲).

در مطالعه Iwen و همکاران در سال ۲۰۰۴ از تکنیک Panfungal PCR و پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعات ژنی ناحیه ITS1,ITS2 از کمپلکس ریبوزومال DNA استفاده و نشان دادند که روش‌های مولکولی روی بطری‌های کشت خون به عنوان یک روش معتبر و سریع برای تشخیص گونه‌های قارچی قابل استفاده هستند(۱۳). لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی نمونه‌های کشت خون منفی بیماران سوختگی وسیع مشکوک به عفونت قارچی تهاجمی از نظر احتمال وجود DNA قارچ با استفاده از پرایمرهای یونیورسال قارچی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تعیین کارایی روش مولکولی در تشخیص آن و مقایسه با نتایج کشت خون و اطلاعات بیماران از جمله سطح سوختگی، آسیب تنفسی، سن و وجود کاتتر ورید مرکزی و طول بستری، طراحی گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش ها

مطالعه حاضر روی ۴۰۰ نمونه کشت خون متعلق به ۱۱۲ بیمارسوختگی بخش سوختگی بیمارستان زارع ساری با هدف تعیین DNA عناصر قارچی بیماران انجام شده است. معیارهای ورود به مطالعه شامل سوختگی درجه ۲و۳ و بستری بیش از ده روز در بخش جراحی یا مراقبت‌های ویژه و تب بیش از ۹۶ ساعت بدون پاسخ به درمان آنتی‌بیوتیکی وسیع و درجه حرارت بیش‌تر از ۳۸ و یا کم‌تر از $36^{\circ}C$ بوده است. محتوی بطری کشت خون منفی بیماران پس از شستشو با بافر لیزگلبول قرمز (Tris-HCL 1.2gr, Sucrose 109.5gr, $MgCl_2$ 1.02gr, Triton×100 10 ml, DW 1000 ml, PH=8) در فریزر منهای ۸۰ درجه تا زمان اجرای تحقیق نگهداری گردید. جهت استخراج نمونه‌های DNA از روش برگرفته از مطالعات قبلی استفاده گردید(۱۴). به طور خلاصه رسوب حاصل از نمونه‌ها که تحت تاثیر بافر لیز گلبول‌های قرمز قرار گرفته با گلوله‌های شیشه‌ای (glass bead 425-600µm, Sigma-Aldrich Crop, St.Louis,USA) و ۱۸۰ واحد آنزیم لیتیکاز (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO USA) متلاشی و سپس DNA با استفاده از کیت تجاری QIAmp DNA Blood mini kit (Qiagen, Hilden Germany). مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. برای انجام PCR از مسترمیکس آماده سیناژن(سیناژن،تهران،ایران) استفاده شد و پرایمرهای Forward(5□-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG-3□) و Reverse(5□-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG-3□) مربوط به ناحیه ژنی 18SrRNA مطابق مطالعه قبلی(۱۵) از شرکت تکاپوزیست (تکاپوزیست، تهران، ایران) تهیه گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ µl شامل ۱۲/۵ µl مستر میکس و ۸/۱ µl آب مقطر استریل و ۰/۷ µl پرایمر رفت و ۰/۷ µl پرایمربرگشت و ۳µl از DNA استخراج شده، انجام شد. دمای واسرشت اولیه به میزان $94^{\circ}C$ و مدت ۳ دقیقه برای یک سیکل و سپس ۳۵ سیکل حرارتی به صورت دمای واسرشت به میزان $94^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه، دمای چسبیدن به میزان $52^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای گسترش به میزان $72^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه تعیین و با یک سیکل دمای گسترش نهایی به میزان $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

به منظور استاندارد و بهینه سازی مراحل استخراج و PCR با استفاده از محیط کشت خون بی فازیک (کوشا فرآور، کرج، ایران) و گونه استاندارد آسپرژیلوس فومیگاتوس (CBS 603.31) و نمونه خون یک داوطلب سالم نمونه‌های کنترل مثبت و منفی تهیه گردید. برای تهیه کنترل مثبت از کشت سه روزه آسپرژیلوس فومیگاتوس استاندارد استفاده شد(۱۴). ابتدا گونه قارچ استاندارد را بر روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل به مدت ۴ روز در ۲۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده سپس با سرم فیزیولوژی از کنیدی‌های سطح محیط کشت محلولی به کدورت استاندارد نیم مک فارلند (1×10^{5}-5×10^{6}) تهیه و به بطری کشت خون در شرایط استریل تلقیح شد. ۵ml خون فرد سالم نیزبه آن افزوده سپس کشت خون آلوده به آسپرژیلوس در دمای $27^{\circ}C$ قرار داده شد. پس از یک هفته مایع این بطری کشت خون، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و مراحل استخراج DNA و PCR روی آن انجام شد محصول PCR جهت تعیین توالی ارسال و آسپرژیلوس فومیگاتوس با Max Idendity ۱۰۰ درصد تایید شد. برای کنترل منفی از یک بطری کشت خون که فقط حاوی ۵ ml خون فرد سالم بود استفاده شد و همراه کنترل مثبت به مدت دو هفته انکوبه شد. در این نمونه پس از انجام مراحل استخراج DNA و PCR هیچ باندی مشاهده نشد و به عنوان کنترل منفی استفاده شد. کلیه مراحل تهیه نمونه مثبت و منفی با رعایت شرایط استریل انجام پذیرفت. با توجه به استفاده از پرایمرهای Panfungal جهت بررسی کارایی پرایمر، از DNA سایر گونه‌های قارچی استاندارد نظیر کاندیدا آلبیکنس (CBS 562)، آسپرژیلوس نیجر (CBS 513.88)، آسپرژیلوس ترئوس (CBS 116.46)، آسپرژیلوس فلاووس (CBS 120.49) که از عوامل مهم

Archive of SID

www.SID.ir

ایجاد فونجمی در بیماران در معرض خطرهستند، نیز استفاده گردید. پس از انجام PCR بروی نمونه‌ها و تعیین توالی آمپلیکون‌های به دست آمده، با استفاده از برنامه BLASTn مرکز اطلاعات بین المللی بیو تکنولوژی (National Center for Biotechnology Information :NCBI) توالی‌ها شناسایی شدند. نتایج حاصل با اطلاعات بیماران شامل درصد سوختگی، طول مدت بستری، آسیب تنفسی، داشتن کاتتر وریدی ، سن و جنس و نتایج کشت خون در تحقیق قبلی(۱۶) مقایسه شدند.

یافته ها

تعداد ۴۰۰ نمونه کشت خون از ۱۱۲ بیمار سوختگی بستری در بیمارستان زارع ساری در سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ جمع‌آوری شد. تعداد ۴۰ نفر (۳۵/۷ درصد) از بیماران زن بودند. میانگین سنی بیماران ۲۰/۷±۳۳/۶ (۸۸-۱)سال بود. در نمونه کشت خون (منفی یا باکتری رشد کرده) ۴۴ بیمار(۳۹/۲ درصد) PCR از نظر وجود DNA قارچ مثبت گزارش شد. از میان بیماران PCR مثبت، ۲۶ بیمار (۵۹/۱ درصد) مرد بودند. میانگین سنی ۱۴/۷±۳۱/۹ (۷۰-۲) سال، میانگین طول مدت بستری ۱۰/۳± ۲۱/۸ (۴۲-۳) روز و میانگین درصد سوختگی ۱۹± ۴۲/۶ (۹۳-۹) درصد بود. میزان مرگ و میر کل بیماران ۴۶ درصد و میزان مرگ و میر بیماران PCR مثبت۵۱/۳ درصد بود. میزان مرگ و میر بیماران در بیماران PCR مثبت با تعیین توالی آسپرژیلوس، ۵۰ درصد بود. میزان سوختگی در این بیماران ۵۱/۱ درصد بود که ۳۳/۳ درصد آن‌ها آسیب تنفسی به علت سوختگی نیز داشتند. میزان مرگ و میر در بیمارانی که نتیجه تعیین توالی آن‌ها کاندیدا مشخص شد، ۱۴/۲ درصد و درصد سوختگی۲۵/۷ و آسیب تنفسی ناشی از سوختگی در ۱۶/۶ درصد آن‌ها وجود داشت. در مطالعه حاضر بر اساس تعیین توالی ۲۰ نمونه به‌صورت تصادفی، (۱۱ مورد، ۵۵درصد) آسپرژیلوس فومیگاتوس، (۵ مورد؛ ۲۵ درصد) کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا پاراپسیلوزیس، آگاریکومایکوتینا، پنی‌سیلیوم هر کدام (۱ مورد؛ ۵ درصد) شناسایی شدند. در حالی‌که براساس نتایج تحقیق قبلی برروی همین بیماران(۱۶)، کشت خون بی فازیک فقط ۱۲درصد بیماران مثبت بوده است. در مقایسه با نتایج کشت خون بی فازیک در سه بیمار با نتیجه PCR نیز نتایج یکسانی حاصل شد اما در ۱۷ نمونه که کشت خون منفی بود، با PCR نتیجه مثبت به دست آمد (جدول شماره۱).

جدول شماره ۱: مقایسه نتایج کشت خون، PCR و گونه با روش تعیین توالی

گونه با روش تعیین توالی	نتیجه PCR	نتیجه کشت خون	تعداد بیمار
C. tropicalis	+	-	۴
A. fumigatus	+	–	۱۱
Penicillium.spp	+	–	۱
Agaricomycotina	+	–	۱
C. albicans	+	*C. albicans*	۱
C. tropicalis	+	*C. tropicalis*	۱
C. parapsilosis	+	*C. parapsilosis*	۱

بحث

درسه دهه اخیر شیوع عفونت‌های قارچی تهاجمی خصوصاً دربیماران دچار ضعف ایمنی و بخش مراقبت‌های ویژه رو به افزایش است. به دنبال اختلال و ضعف در سیستم ایمنی، قارچ‌های ساکن در پوست، مخاط و دستگاه گوارش افزایش یافته و کاتترهای وریدی و جراحی و آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف امکان نفوذ این قارچ‌ها به گردش‌خون و ایجاد فونجمی را فراهم می‌آورند(۱۷). گونه‌های کاندیدا مسئول اکثر این عفونت‌ها هستند اما گونه‌های آسپرژیلوس نیز نقش مهمی داشته و باعث عفونت‌های جدی با تهاجم بیش‌تر می‌شوند(۱۸). در بیماران سوختگی عوامل قارچی می‌توانند از طریق کلنیزاسیون زخم‌های سوختگی و یا تهاجم قارچ‌ها به زخم‌های سوختگی به سیستم عروقی دست می‌یابند. در مطالعه‌ای در ۲۸ درصد موارد بیوپسی زخم‌های سوختگی، تهاجم قارچ گزارش گردید(۱۹) و در مطالعه دیگر از کشت بیوپسی زخم ۱۲ درصد بیماران سوختگی عوامل

Archive of SID
www.SID.ir

قارچی جدا شده است(۲۰). علاوه بر امکان تهاجم قارچ‌های ساپروفیت به سیستم عروقی از طریق زخم‌های سوختگی که با این عوامل کلنیزه می‌شوند، مخمرها (در راس آن‌ها کاندیدا) که در پوست و قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش به صورت فلور نرمال حضور دارند نقش مهمی در ایجاد سپتی سمی دارند. آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف با از بین بردن باکتری‌ها باعث افزایش رشد کاندیدا شده و به دنبال ایجاد آسیب‌های مخاطی که یا از قبل وجود دارند و یا در اثر به‌کار بردن وسایل تشخیصی درمانی تهاجمی (انواع لوله‌گذاری‌های گوارشی، تنفسی و کاتترهای ورید مرکزی و تغذیه وریدی) به سیستم عروقی راه یافته و منجر به سپتی سمی و تهاجم به بافت‌های عمقی‌تر می‌شود. سپتی سمی با کاندیدا به عنوان یکی از علل مهم مرگ و میر بیماران سوختگی خصوصا در بیمارانی که کلنیزاسیون کاندیدایی در چند ناحیه داشته باشند، مطرح است(۲۲).

در مطالعه‌ای در بخش سوختگی کودکان ۲۱درصد عفونت‌های قارچی گزارش شده که میانگین سطح سوختگی ۴۰ درصد و میانگین زمان ایجاد عفونت قارچی ۱۳ روز بعد از وقوع سوختگی بود. در ۹۳ درصد موارد قارچ از محل زخم سوختگی و در۷ درصد موارد از کشت خون بیماران جدا شده و بیش‌ترین قارچ جدا شده به ترتیب کاندیدا (۴۹ درصد) و آسپرژیلوس (۱۵ درصد) بوده‌اند(۲۳). در مقایسه با مطالعات مختلفی که روش‌های مولکولی را برای تشخیص فونجمی در موارد مشکوک به عفونت‌های قارچی مهاجم به کار بردند، نتایج مشابهی که نشانگر توانمندی این روش‌ها جهت شناسایی حضور قارچ درخون است، حاصل شده است(۲۴-۲۸). در دو مطالعه که با هدف شناسایی آسپرژیلوزیس مهاجم(۲۹) وکاندیدیازیس مهاجم(۳۰) بروی نمونه خون کامل بیماران بدخیمی خونی و گیرندگان پیوند مغز استخوان با روش Real time PCR/FRET انجام شد به ترتیب ۱۹/۳ درصد از نظر DNAآسپرژیلوس و ۱۵/۲درصد از نظر DNA کاندیدا مثبت شد این درحالی بود که تنها در یک مورد ازکشت‌خون کاندیدا آلبیکنس جدا شده بود(۳۰).

در مطالعه دیگری که با هدف تشخیص عفونت‌های قارچی مهاجم دربیماران دچار ضعف ایمنی ناشی از پیوند سلول‌های خونی و نوتروپنی حاصل از شیمی درمانی بدخیمی‌های خونی با روش panfungal PCR انجام شد، ۱۷/۷ درصد موارد با PCR نتیجه مثبت در مقابل ۱۰/۶درصد موارد نتیجه کشت خون مثبت حاصل شد(۳۱). در مطالعه حاضر با استفاده از روش های مولکولی روی نمونه‌های کشت خون بیماران سوختگی ۳۹/۲ درصد بیماران از نظر وجود DNA قارچ مثبت بودند درحالی‌که در تحقیق انجام شده روی همین بیماران نتیجه کشت خون بای فازیک با استفاده از روش های کلاسیک فقط ۱۲ درصد بیماران مثبت گزارش شده بود. این نتایج موید کارایی بالاتر روش مولکولی در مقایسه با روش‌های آزمایشگاهی کلاسیک در تشخیص فونجمی می‌باشد.

درمطالعه ما میزان مرگ ومیر کل بیماران ۴۶درصد و میزان مرگ و میر بیماران PCR مثبت ۵۱/۳ درصد (آسپرژیلوس۵۰ درصد و کاندیدا ۱۴/۲درصد) و درصد سوختگی کل بیماران ۴۶/۵ درصد و در بیماران PCR مثبت (آسپرژیلوس ۵۱/۱ درصد و کاندیدا ۲۵/۷ درصد) به دست آمد. در مطالعه حاضر درصد سوختگی بیمارانی PCR مثبت آسپرژیلوس بیش‌تر از درصد سوختگی کل بیماران است. اما از نظر میانگین سنی (۲۰/۷±۳۳/۶ سال)، طول مدت بستری (۲۵/۳ روز) کل بیماران تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر میانگین سنی (۱۴/۷±۳۱/۹ سال) و طول مدت بستری (۱۰/۳±۲۱/۸ روز) با بیمارا نPCR مثبت مشاهده نشد. در مطالعات مختلف به ارتباط بین افزایش عفونت‌های قارچی تهاجمی و درصد سوختگی (۳۰ تا ۶۰ درصد)(۳۱،۵) اشاره شده و بالاترین میزان مرگ و میر در بیماران مسن با سطح سوختگی وسیع‌تر، دارای آسیب تنفسی وتحت درمان سیستمیک و دارای کشت‌های مثبت متعدد گزارش شده است(۳۲). در

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعه ما میزان مرگ و میر بالا (۵۰ درصد) در بیمارانی که DNA آسپرژیلوس از کشت خون آن‌ها جدا شده تامل برانگیز است. با توجه به شیوع آسپرژیلوس در محیط، امکان کلنیزه شدن آن در محل زخم و حتی ایجاد عفونت تهاجمی در آن و ژرمیناسیون و تولید هایف وجود دارد و بدین ترتیب امکان ورود DNA قارچ به گردش خون از محل این زخم‌ها بعید نمی‌باشد. با توجه به این‌که سه بیمار ما که در کشت خون آن‌ها آسپرژیلوس شناسایی شد، دچار آسیب تنفسی بودند و تنفس مصنوعی از طریق ونتیلاتور داشتند، امکان ورود اسپورهای آسپرژیلوس به مجاری هوایی آسیب دیده و قرار گرفتن و تولید هایف در آلوئولها وجود دارد و می‌تواند باعث حضور DNA آن به گردش خون شده باشد. ضمن این‌که زخم‌های سوختگی خصوصاً زخم‌های باز در معرض اسپورهای آسپرژیلوس موجود در هوا هستند و امکان کلنیزاسیون مهیا است. در عفونت‌های قارچی تهاجمی در سوختگی‌ها شیفت ارگانیسم‌های کومنسال مثل کاندیدا آلیکنس به سمت پاتوژن فرصت طلب مثل کاندیداهای غیر آلبیکنس گزارش شده است(۳۴) در مطالعه حاضر نیز ۵ کاندیدا تروپیکالیس، یک کاندیدا آلبیکنس و یک کاندیدا پاراپسیلوزیس ازPCR کشت خون به دست آمد که از این ۷ بیمار، در چهار بیمار نتیجه کشت خون منفی بود. در سه بیمار نتیجه کشت خون با نتیجه PCR مشابه بود. میانگین درصد سوختگی بیمارانی که کاندیدا از کشت خون آن‌ها حاصل شد، ۲۵/۷ درصد و میزان مرگ و میر ۱۴/۲ درصد که از بیمارانی که آسپرژیلوس از کشت خون آنها به دست آمده بود، کم‌تر است. در مطالعه حاضر در بین ۲۰ نمونه‌ای که تعیین توالی شدند، ارگانیسم جدا شده از کشت خون ۳ بیمار با نتایج به دست آماده از تعیین توالی محصول PCR یکسان بود درحالی‌که در تمامی ۱۷ نمونه کشت خون منفی تنها با PCR نتیجه مثبت به دست آمد (جدول شماره ۱). توجیهی که برای منفی بودن کشت خون در موارد مثبت PCR می‌توان ارائه کرد، وقوع فونجمی موقتی و گذرا ست که در این موارد قارچ به سرعت توسط سلول‌ها و ارگان‌های دفاعی از خون پاک می‌شوند. به همین دلیل ممکن است با انجام یک کشت خون فونجمی قابل ردیابی نباشد. هم‌چنین در صورتی‌که بار قارچی کم و یا قارچ زنده نباشد و یا درصورت استفاده داروهای ضد قارچی به صورت پروفیلاکسی در بیماران در معرض خطر عفونت‌های قارچی تهاجمی، کشت‌خون قادر به شناسایی فونجمی نخواهد بود. در این موارد با به‌کارگیری روش‌های مولکولی برای تشخیص DNA قارچ در خون، و قطعات غیر زنده قارچ و DNA آزاد شده ناشی ازعمل پاکسازی فاگوسیترها وهم‌چنین بار قارچی کم قابل ردیابی و شناسایی می‌شوند. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر که نمایانگر کارایی روش‌های مولکولی در شناسایی DNA قارچ در نمونه خون بیماران در معرض خطر فونجمی است، استفاده از این روش‌ها به همراه سایر روش‌های تشخیص بالینی، میکروبیولوژی و رادیولوژی و هیستوپاتولوژی کاملا سودمند بوده و در نجات جان این بیماران می‌تواند نقش مهمی ایفا نماید. این روش‌ها هم در نمونه خون کامل و هم در کشت‌خون بیماران مشکوک به فونجمی قبل از مثبت شدن کشت خون برای تشخیص DNA قارچ و یا پس از مثبت شدن کشت خون برای تعیین گونه سریع قارچ قابل استفاده‌اند.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات قارچ‌های تهاجمی به انجام رسیده است که بدین وسیله مراتب قدردانی خود را ازاین موضوع اعلام می‌داریم. مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، خانم دکتر اکرم عبداللهی می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. Lancet 2005; 365(9453): 63-78.
2. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis 1999; 29(2): 239-244.
3. Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, Ellis D, et al. Active Surveillance of Candidemia, Australia. Emerg Infect Dis 2006; 12(10): 1508-1516.
4. Fluit AC, Jones ME, Schmitz F-J, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. Clin Infect Dis 2000; 30(3): 454-460.
5. Horvath EE, Murray CK, Vaughan GM, Chung KK, Hospenthal DR, Wade CE, et al. Fungal wound infection (not colonization) is independently associated with mortality in burn patients. Ann Surg 2007; 245(6): 978-985.
6. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. Am J Med 2003; 115(7): 529-535.
7. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(2): 760-766.
8. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 2006; 34(6): 1589-1596.
9. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(4): 1306-1311.
10. Borst A, Leverstein-Van Hall MA, Verhoef J, Fluit AC. Detection of Candida spp. in blood cultures using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 39(3): 155-160.
11. Gebert S, Siegel D, Wellinghausen N. Rapid detection of pathogens in blood culture bottles by real-time PCR in conjunction with the pre-analytic tool MolYsis. J Infect 2008; 57(4): 307-316.
12. Maaroufi Y, De Bruyne J-M, Duchateau V, Georgala A, Crokaert F. Early detection and identification of commonly encountered Candida species from simulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. J Mol Diagn 2004; 6(2): 108-114.
13. Iwen PC, Freifeld AG, Bruening TA, Hinrichs SH. Use of a panfungal PCR assay for detection of fungal pathogens in a commercial blood culture system. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 2292-2293.
14. Nabili M, Shokohi T, Hashemi Soteh M, Jan Babaie G, Âghili S, Hoseinikhah Z. Quantification and optimization of detection Aspergillus fumigatus DNA in blood sample using Real Time PCR. J Mazandaran Univ Med Sci 2011; 20(80): 34-43.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Ramírez M, Castro C, Palomares JC, Torres MJ, Aller AI, Ruiz M, et al. Molecular detection and identification of Aspergillus spp. from clinical samples using real-time PCR. Clin Microbiol Infect. 2009;52(2):129-134 (Persian).
16. Lotfi N, Shokohi T, Nouranibaladezaei SZ, Nasrollahi Omran A, Kondori N. High recovery rate of non-*albicans Candida* species isolated from burn patients with candidemia in Iran. Jundishapour J Microbiol 2015; 8(10): e22929 (Persian).
17. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond Candida albicans and Aspergillus fumigatus. J Clin Microbiol 2004; 42(10): 4419-4431.
18. Andres LA, Ford RD, Wilcox RM. Necrotizing colitis caused by systemic aspergillosis in a burn patient. J Burn Care Res 2007; 28(6): 918-921.
19. Sarabahi S, Bajaj S. Step by step management of burns. 1st ed. New Delhi: Jaypee Import; 2009.
20. Capoor MR, Sarabahi S, Tiwari VK, Narayanan RP. Fungal infections in burns: Diagnosis and management. Indian J plast Surg 2010; 43(Suppl): S37-S42.
21. Bruck HM, Nash G, Foley D, Pruitt BA. Opportunistic fungal infection of the burn wound with phycomycetes and aspergillus: a clinical-pathologic review. Arch Surg 1971; 102(5): 476-482.
22. Moore EC, Padiglione AA, Wasiak J, Paul E, Cleland H. Candida in burns: risk factors and outcomes. J Burn Care Res 2010; 31(2): 257-263.
23. Rosanova MT, Basilico H, Villasboas M, Finquelievich J, Monaco A, Pérez G, et al. [Fungal infections in a pediatric burn care]. Arch Argent Pediatr. 2011;109(5):441-444.
24. Taira CL, Okay TS, Delgado AF, Ceccon ME, de Almeida MT, Del Negro GM. A multiplex nested PCR for the detection and identification of Candida species in blood samples of critically ill paediatric patients. BMC Infect Dis. 2014;14:406.
25. Sabeeh S, Al-Attraqhchi AA, Al-Aswad E. PCR in Comparison with Culture Methods for The Diagnosis of Candida albicans Responsible for Candidemia in Leukemic Patients. Doyala Journal of Medicine 2013; 5(2): 29-35.
26. Lamoth F, Jaton K, Prod'hom G, Senn L, Bille J, Calandra T, et al. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. J Clin Microbiol 2010; 48(10): 3510-3516.
27. von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, et al. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. J Clin Microbiol 2009; 47(8): 2405-2410.
28. El-Sayed ZA, Hasan ZE, Nasr RA. Real-Time PCR in the early detection of invasive fungal infection in immunodeficient infants and children. Egyptian J Pediatr Allergy and Immunol 2014; 10(2): 67-74.
29. Nabili M, Shokohi T, Jan Babaei G, Hashemi Soteh MB, Ali Moghaddam K, Aghili R. Detection of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancy and bone marrow transplant recipients using Real-Time PCR 2009-10. J Global infect Dise. 2013;5(2):33-40.

Archive of SID
www.SID.ir

30. Ashrafi M, Nabili M, Shokohi T, Janbabaie G, Hedayati T, Ali-Moghaddam K. A real time PCR assay for diagnosis of invasive Candidiasis in immunocompromised patient. Current Medical Mycology 2015; 1(1): 35-41.
31. Badiee P, Kordbacheh P, Alborzi A, Zakernia M, Haddadi P. Early detection of systemic candidiasis in the whole blood of patients with hematologic malignancies. Jpn J Infect Dis 2009; 62(1): 1-5.
32. Ballard J, Edelman L, Saffle J, Sheridan R, Kagan R, Bracco D, et al. Positive fungal cultures in burn patients: a multicenter review. J Burn Care Res 2008; 29(1): 213-221.
33. Sarabahi S, Tiwari V, Arora S, Capoor MR, Pandey A. Changing pattern of fungal infection in burn patients. Burns 2012; 38(4): 520-528.
34. Capoor MR, Gupta S, Sarabahi S, Mishra A, Tiwari VK, Aggarwal P. Epidemiological and clinico-mycological profile of fungal wound infection from largest burn centre in Asia. Mycoses 2012; 55(2): 181-188.

Archive of SID

www.SID.ir