مجله تازه های زیست فناوری سلولی - مولکولی
دوره اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۹
Archive of SID

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

شناسایی عفونت های مایکوباکتریوم در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی در نمونه خون کامل و آسپیره مغز استخوان با روش کشت و PCR

صبا نصر[۱]، محمد کریم رحیمی[۲]، سعید ذاکر بستان آباد*[۳]، سید اسدا... موسوی[۴]، محمد وریانی[۴]،
پروانه عدیمی[۲]، شاهین پورآذر دیزجی[۵]

[۱] پزشک عمومی، گروه میکروب شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی، تهران- ایران
[۲] استاد یار، گروه میکروب شناسی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی، تهران- ایران
[۳] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران- ایران
[۴] استادیار، مرکز تحقیقات هماتولوژی- انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران- ایران
[۵] کارشناس ارشد، آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی، مجتمع آزمایشگاهی مسعود، تهران- ایران

چکیده

سابقه و هدف: در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی احتمال افزایش بروز بیماری های عفونی می باشد که ناشی از دو عامل عمده است؛ عامل نخست سرکوب ایمنی ناشی از مصرف داروهای کموتراپی و عامل دوم ضعف ایمنی ناشی از نقص عملکرد سلول های ایمنی می باشد. از جمله عفونت هایی که این بیماران، مستعد ابتلا به آن ها هستند، انواع مختلف عفونت های فرصت طلب به ویژه عونت های مایکوباکتریایی می باشند. بر همین اساس با توجه به اهمیت موضوع در این مطالعه به بررسی موارد عفونت های مایکوباکتریوم در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی با استفاده از کشت آسپیره مغز استخوان و تست PCR در نمونه خون کامل و آسپیره مغز استخوان پرداخته شد.

موا د و روش ها: این مطالعه به صورت یک بررسی مشاهده ای (Observational) توصیفی – تحلیلی (Descriptive-Analytical) مقطعی (Cross-Sectional) انجام شده است. حجم نمونه مورد بررسی شامل ۹۶ بیمار مبتلا به بدخیمی های با منشأ خونی بود که به بیمارستان شریعتی تهران مراجعه نموده بودند.

یافته ها: کشت مغز استخوان در ۱۰ نفر (۱۰/۴ درصد) از بیماران مثبت بود که هیچ یک مایکوباکتریوم نبودند و پنج مورد آلودگی، دو مورد آسپرژیلوس، یک مورد استرپتومایسس و دو مورد بروسلا مشاهده شد. البته در PCR ۳ بیمار (۳/۱ درصد) از نظر مایکوباکتریوم مثبت بودند. سن بیماران، جنسیت آن ها، نوع بدخیمی و نیز دریافت پیوند مغز استخوان در بیماران تأثیری در مثبت بودن نتایج PCR نداشتند ($P > 0.05$).

نتیجه گیری: در مجموع بر اساس یافته های حاصل از این مطالعه و مقایسه آن ها با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه چنین استنباط می شود که بررسی و غربالگری از نظر عفونت های مایکوباکتریایی در مبتلایان به بد خیمی های با منشأ خونی باید به صورت دوره ای انجام گردد.

کلمات کلیدی: عفونت های مایکوباکتریوم، بدخیمی های خونی، آسپیراسیون مغز استخوان، PCR، کشت

مقدمه

بدخیمی های با منشأ خونی گروه متنوعی از بدخیمی ها را تشکیل می دهند که همراه با اختلالات ژنتیکی سلول های خونساز می باشند (Adzic., 2004; Al -Anazi et al ., 2007). این بدخیمی ها شامل انواع مختلف لوکمی ها (CML، AML، ALL و CLL)، لنفوم ها (هوچکین و غیرهوچکین)، میلوم مولتیپل، سندرم های میلودیسپلاستیک و پلی سایتمی ورا می باشند. آنمی آپلاستیک جزء Disorder Stem Cell ها می باشد که در صورت عدم درمان یا پیوند بسیار کشنده است، در نتیجه می توان آن را جزء بد خیمی ها دسته بندی نمود (De la Roza et al., 2004; Feld et al., 1976). در این بین، لوسمی ها ۴۱ درصد از کل بدخیمی ها در سنین کمتر از ۱۵ سال را تشکیل می دهند و شیوع آن ها حدود ۴۰ نفر در هر یک موارد را لوسمی لنفوبلاستیک حاد تشکیل می دهد (Ebrahim et al., 1989; Kamboj et al., 2006). با وجود آن

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، دانشکده ی علوم -زیستی گروه میکروبیولوژی
Email:saeedzaker20@yahoo.com,
تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۸/۱۰
تاریخ پذیرش شده:۸۹/۱۰/۲۳
www.SID.ir

Archive of SID

که اتیولوژی واقعی بدخیمی های با منشأ خونی مشخص نمی باشد، مبتلایان به این گروه از بیماری ها هم خود و هم خانواده های آن ها کیفیت زندگی کاهش یافته ای را تجربه می نمایند و نیز طول عمر آن ها به میزان معنا داری کوتاه تر از سایر کودکان است. به علاوه درمان این بیماری هزینه های بهداشتی سنگینی را به خانواده های کودکان مبتلا از یک سو و به سیستم بهداشتی کشور از سوی دیگر وارد می نماید. لذا تشخیص و درمان بدخیمی های با منشأ خونی از اهمیت به سزایی برخور دار است و بدون درمان موثر بیماری اغلب کشنده خواهد بود. بنابر این انتخاب درمان مناسب نقش مهمی در پیش آگهی بیماران خواهد داشت و می توان با انتخاب یک درمان مناسب بهبودی را در حدود ۸۰ درصد از بیماران انتظار داشت. با این وجود عواملی مانند وقوع عوارض دارویی و عدم کامپلیانس بیماران می تواند سبب کاهش میزان موفقیت درمانی گردد (Ishitsuka et al., 2003; Jin et al., 2008). یکی از عوارض مورد مشاهده در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی افزایش احتمال بروز بیماری های عفونی می باشد که ناشی از دو عامل عمده است، عامل نخست سرکوب ایمنی ناشی از مصرف داروهای کموتراپی و عامل دوم ضعف ایمنی ناشی از نقص عمل کرد سلول های ایمنی می باشد. از جمله عفونت هایی که این بیماران مستعد ابتلا به آن ها هستند، انواع مختلف عفونت های فرصت طلب به ویژه عفونت های مایکوباکتریایی می باشند (Khan et al., 2005). بر همین اساس با توجه به اهمیت موضوع در این مطالعه به بررسی موارد عفونت های مایکوباکتریوم در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی با استفاده از کشت آسپیره مغز استخوان و تست PCR در نمونه خون کامل و آسپیره مغز استخوان پرداختیم. هدف اصلی این مطالعه تعیین فراوانی موارد عفونت های مایکوباکتریوم در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی با استفاده از کشت آسپیره مغز استخوان و تست PCR در نمونه خون کامل و آسپیره مغز استخوان بود.

مواد و روش ها

این مطالعه به صورت یک بررسی مشاهده ای (Observational) توصیفی - تحلیلی (Descriptive-Analytical) مقطعی (Cross-Sectional) انجام شده است. حجم نمونه مورد بررسی شامل ۹۶ بیمار مبتلا به بدخیمی های با منشأ خونی بود که به بیمارستان شریعتی تهران مراجعه نموده بودند که این افراد از بین جمعیتی بزرگتر به صورت در دسترس (Convenient) انتخاب شدند. سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس *H37Rv* به عنوان کنترل برای انجام تست های بیوشیمیایی و کارهای مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. از هر یک از بیماران یک نمونه مغز استخوان به میزان ۰/۵ سی سی گرفته شد و در ظروف استریل یکبار مصرف جمع آوری گردید. نمونه مغز استخوان در لوله های مخصوص خون حاوی هپارین به صورت آسپتیک جمع آوری شد. جهت تشخیص مایکوباکتریوم از آزمون های PCR و نیز کشت (بر روی آسپیره مغز استخوان) استفاده گردید که کلیه آزمایشات به روش استاندارد انجام شد.

تست های بیوشیمیایی: از نمونه ابتدا اسمیر تهیه گردید و با استفاده از روش رنگ آمیزی اسیدفست (زیل نلسون) مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. کلیه نمونه‌ها پس از آلودگی‌زدایی به روی محیط کشت لوین اشتاین جانسن (Lowen stein-Jensen) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. از کلنی‌های رشد یافته (طی بررسی ۵۶ روزه) به روی محیط کشت، پس از ۱۲-۱۰ روز جهت تست‌های بیوشیمیایی تفکیکی شامل بررسی تولید نیاسین (Niacin) در محیط کشت، احیاء نیترات (Nitrate) و کاتالاز (Catalase) (در دمای اتاق و در دمای ۶۸ درجه سا نتی گراد) استفاده گردید.

استخراج DNA : حداقل دو کلنی از هر سویه برای استخراج DNA از کیت شرکت روسی *DNA technology* استفاده شد، نمونه‌های استخراج شده توسط اسپکترو فتومتر با طول موج مخصوص (UV Shimatzo، آلمان) از لحاظ خلوص DNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند.

Polymerase Chain Riaction (PCR): توالی به طول 439bp از ژن hsp65 توسط دو پرایمر اختصاصی جنس

F-5´-TACGGTCGGCGAGCTGATCC3´ و

R- 5´- TACGGCGTTTCGATGAAC 3´

و Tb۱۲ از سویه‌های کلینیکی جدا شده تکثیر شد. برای انجام PCR از کیت شرکت روسی *DNA technology* استفاده گردید. :

ترکیب PCR mix به حجم۵۰µl برای هر واکنش از KCl با غلظت ۵۰mM و Tris-HCl با غلظت ۱۰mM، (pH=۴/۸) هـر داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفاته ۲۰۰µM، و Mgcl۲ با غلظت ۱,۵µM، از هر پرایمر ۰,۵µM و ۱/۲۵ واحد از آنزیم Taq -DNA Polymerase، ۲۰۰ -۷۵ نانوگرم از DNA ژنومی هـــر سویه جدا شده و ۱,۲۸µl آب مقطر استریل دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendrof، آلمان) به شـــر ح زیر انجـام شـد: ۵ دقیقه در

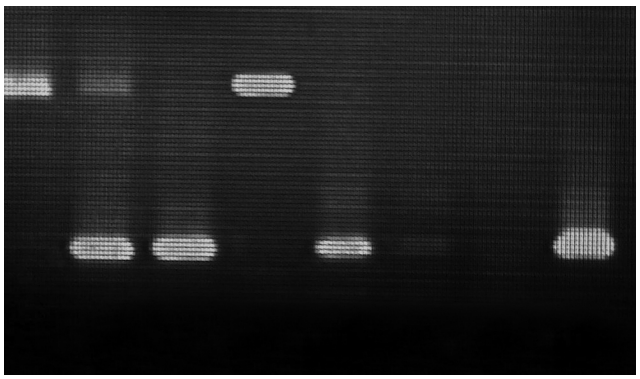
www.SID.ir

Archive of SID

حرارت ۹۰C° سپس ۴۰ سیکل حرارتی شامل ۹۷C° یک دقیقه، ۵۶C° یک دقیقه، ۷۲C° یک دقیقه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲C° به مدت ۱۰ دقیقه، که اتمام دوره آمپلیفیکاسیون بود. از ژنوم باکتری اشریشیاکلی که به روش جوشاندن استخراج شده بود نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. بعد از انجام واکنش PCR، ۵µl از نمونه‌های PCR شده در ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید در کنار مارکر ΦX ۱۷۴ (Fermentas-Canada) با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردیدند. حضور باند قوی در منطقهٔ ۴۲۰-۴۵۰bp این مارکر مؤید تکثیر شدن قطعه مورد بررسی بود.

یافته ها

۹۶ نمونه کلینیکی مایکو باکتریوم توبر کلوزیس بر اساس کند رشد بودن، اسید فست بودن مورد بررسی قرار گرفت و هیچ مورد مثبتی از مایکوباکتریوم بدست نیامد. کشت مغز استخوان در ۱۰ نفر (۱۰/۴ درصد) از بیماران در سایر موارد مرتبط با میکروارگانیزم ها، مثبت بود که هیچ یک مایکوباکتریوم نبودند و ۵ مورد آلودگی، دو مورد آسپرژیلوس، یک مورد استرپتومایسس و دو مورد بروسلا مشاهده



شکل ۱- نتایج الکتروفورز PCR تائیدی از نمونه هایی که باند ۹۰۰ بازی و یا دو باند ۹۰۰ و ۳۳۰ بازی دریافت شد، نمونه های منفی گزارش گردید و نمونه های با قطعه ۳۳۰ بازی مثبت بود

شد. البته در PCR سه بیمار (۳/۱ درصد) از نظر مایکوباکتریوم مثبت بودن (شکل ۱). سن بیماران، جنسیت آن ها، نوع بدخیمی و نیز دریافت پیوند مغز استخوان در بیماران تأثیری در مثبت بودن نتایج PCR نداشتند ($P > 0.05$). میانگین سنی بیماران مورد بررسی ۳۹/۴۹ سال با انحراف معیار ۱۹/۲۲ سال بود که محدوده ای از ۶ تا ۸۱ سال داشت. ۶۲ نفر (۶۴/۶ درصد) مذکر و ۳۴ نفر (۳۵/۴ درصد) مونث بودند انواع مختلف بیماری های مورد مشاهده به این ترتیب بودند؛ AML (۲۳/۳ درصد)، ALL (۱۹/۲ درصد)، CML (۱۳/۷ درصد)، CLL (۱/۴ درصد) ، لنفوم هوچکین (۸/۲ درصد)، میلوم مولتیپل (۱۷/۸ درصد)، لنفوم غیرهوچکین (۵/۵ درصد)، پلی سایتمی ورا (۲/۷ درصد)، آنمی آپلاستیک (۶/۸) و سندرم میلودیسپلاستیک (۱/۴ درصد) (جدول ۱و۲).

جدول۱- تعداد و درصد بیماران با بدخیمی با منشاء خونی در مطالعه

	Frequency	Percent
AML	17	23.3
ALL	14	19.2
CML	10	13.7
CLL	1	1.4
MM	13	17.8
NHL	4	5.5
HD	6	8.2
PV	2	2.7
Aplastic Anemia	5	6.8
MDS	1	1.4
Total	73	100.0

جدول۲- نتایج PCR بدست آمده از نمونه های بیماران بدخیمی با منشاءخونی

Pos		BMA PCR		Total
		Neg		
Bone Marrow Cytology	AML	0 (.0%)	17 (100.0%)	17
	ALL	2 (14.3%)	12 (85.7%)	14
	CML	0 (.0%)	10 (100.0%)	10
	CLL	0 (.0%)	1 (100.0%)	1
	MM	1 (7.7%)	12 (92.3%)	13
	NHL	0 (.0%)	4 (100.0%)	4
	HD	0 (.0%)	6 (100.0%)	6
	PV	0 (.0%)	2 (100.0%)	2
	Aplastic Anemia	0 (.0%)	5 (100.0%)	5
	MDS	0 (.0%)	1 (100.0%)	1
	Total	3 (4.1%)	70 (95.9%)	73

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

در مجموع همان گونه که در قسمت نتایج ملاحظه شد، میزان شیوع عفونت های مایکو باکتریایی در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی بر اساس آزمون PCR در حدود ۳ درصد است که البته ابتلا به عفونت مذکور تحت تأثیر سن، جنسیت، نوع بدخیمی و نیز دریافت پیوند مغز استخوان در بیماران نمی باشد. آقایان، افراد با سن کمتر، مبتلایان به ALL و میلوم مولتیپل و نیز افراد دارای سابقه پیوند مغز استخوان میزان بالاتری از نتایج مثبت PCR را نشان دادند (جدول ۲). در مطالعه ای که توسط خان و همکاران در پاکستان انجام شد و نتایج آن در سال ۲۰۰۵ منتشر شد، میزان شیوع عفونت مایکوباکتریال در مبتلایان به بدخیمی های خونی ۱۶ درصد گزارش شد که بیش از رقم به دست آمده در مطالعه ما می باشد (Kim et al., 2008).

در مطالعه ای که آدزیچ در صربستان انجام داد و نتایج آن در سال ۲۰۰۴ منتشر شد، اعلام گردید که لنفوم غیرهوچکین و CLL شایع ترین انواع بدخیمی خونی همراه با عفونت مایکوباکتریال هستند که البته در مطالعه ما ALL و میلوم مولتیپل شایع ترین انواع بودند (Roa et al., 1999).

در مطالعه ای در لهستان توسط دانشمند لهستانی که نتایج آن در سال ۱۹۹۵ منتشر شد، میزان شیوع عفونت مایکوباکتریال در مبتلایان به بدخیمی های خونی ۲/۱ درصد گزارش شد که اندکی کمتر از رقم به دست آمده در مطالعه ما می باشد (Korzeniewska et al., 1995).

در مجموع بر اساس یافته های حاصل از این مطالعه و مقایسه آن ها با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه چنین استنباط می شود که بررسی و غربالگری از نظر عفونت های مایکو باکتریایی در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی باید به صورت دوره ای انجام گردد. در انتها پیشنهاد می شود مطالعات بیشتری به منظور بررسی سایر عوامل موثر بر ابتلا به عفونت های مایکوباکتریایی در مبتلایان به بدخیمی های با منشأ خونی به ویژه نوع رژیم درمانی انجام شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران محترم آزمایشگاه مسعود به جهت همیاری در انجام مراحل کشت باکتری و تست های مولکولی کمال تشکر دارند. ضمناً از کلیه همکاران بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی قدردانی می نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Adzić T. Pulmonary tuberculosis in patients with hematological malignancies. Med Pregl, 2004; 57 Suppl 1:65-8.

2- Al-Anazi KA, Al-Jasser AM, Evans DA. Infections caused by mycobacterium tuberculosis in patients with hematological disorders and in recipients of hematopoietic stem cell transplant, a twelve year retrospective study. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2007; 6:16.

3- De La Rosa GR, Jacobson KL, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP, Safdar A .Mycobacterium tuberculosis at a comprehensive cancer centre: active disease in patients with underlying malignancy during 1990–2000. Clin Microbiol Infect, 2004; 10: 749–752.

4- Feld R, Bodey GP, Groschel D. Mycobacteriosis in patients with malignant disease. Arch Intern Med, 1976; 136: 67–70.

5- Ibrahim EM, Uwaydah A, al-Mulhim FA, Ibrahim AM, El-Hassan AY. Tuberculosis in patients with lignant disease. Indian J Cancer, 1989; 26: 53–57.

6- Ishitsuka K, Ikeda S, Izumi Y, et al. Infection control for the treatment of hematological malignancies: a survey of the Kyushu Hematology Organization for Treatment Study Group (K-HOT). Rinsho Ketsueki, 2003; 44(7): 483-90.

7- Jin SM, Lee HJ, Park EA, et al. Frequency and predictors of miliary tuberculosis in patients with miliary pulmonary nodules in South Korea: A retrospective cohort study. BMC Infect Dis, 2008; 8: 160.

8- Kamboj M, Sepkowitz KA. The risk of tuberculosis in patients with cancer. Clin Infect Dis, 2006;2:1592 –1595. doi: 10.1086/503917.

9- Khan B, Ahmed P, Ullah K, Hussain CA, Hussain I, Raza S. Frequency of tuberculosis in haematolo gical malignancies and stem cell transplant recipients. J Coll Physicians Surg Pak, 2005;15:30–33.

10- Kim HR, Hwang SS, Ro YK, et al. Solid-organ malignancy as a risk factor for tuberculosis. Respiro logy, 008; 13: 413–419.

11- Korzeniewska-Koseła M, Wierzbicka M, Michałowska-Mitczuk D, Kuś J, Michalak K, Konopka L.Incidence of tuberculosis in patients with hematologic malignancies. Pneumonol Alergol Pol, 1995; 63(1-2): 32-5.

12- Rao VK, Iademarco EP, Fraser VJ, et al. Delays in the suspicion and treatment of tuberculosis among ospitalized patients. Ann Intern Med, 1999;130(5): 404-11.

13- World Health Organization Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing WHO report,2007, Geneva.

www.SID.ir