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

NCMBJ
Case Report
گزارش موردی

جداسازی مایکوباکتریوم چلونی در خلط از بیمار مبتلا به سرطان سینه متاستاتیک

سعید ذاکر بستان آباد[۱]، پیروز صالحیان*[۲]، مصطفی قلمی[۳]، شاهین پور آذر دیزجی[۳]

[۱] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران- ایران
[۲] متخصص پاتولوژی، آزمایشگاه مسعود، تهران- ایران
[۳] کارشناس ارشد مایکوباکتریولوژی، آزمایشگاه مسعود، تهران- ایران

چکیده

سابقه و هدف: مایکوباکتریوم چلونی در گروه مایکوباکتریوم های غیر سلی طبقه بندی می گردد که جزو گروه بزرگی از مایکوباکتری ها می باشند که جدا از گروه مایکو باکتریوم توبرکلوزیس که عامل بیماری سل می باشد، قرار می گیرند. این باکتری علل سندرم های مختلف بالینی، از جمله بیماری های ریوی، بیماری های پوستی محلی، استئومیلیت، عفونت مفاصل و باعث عفونت های ریوی در افرادی که نقص سیتم ایمنی (به هردلیل) دارند، می شوند و هم چنین در عفونت های زخم بعد از عمل جراحی جدا شده است. مایکوباکتریوم چلونی در ورم غده های خلطی که بیماری نادری است، جدا شده است. اندوکاردیت نیز توسط این باکتری مستند شده است. اختلالات مری را افزایش و خطر بیماری های ریوی به دلیل این عامل به سرعت در حال رشد است. انتقال بیماری از انسان به انسان ثبت شده است.

مواد و روش ها: خلط از بیمار مشکوک به سل از یک خانم ۴۸ ساله جمع آوری شد و ثبت معاینات بالینی انجام گردید. برای بیمار تست توبرکولین انجام شد و نمونه خلط روی محیط جامد لون اشتاین جانسون انجام شد. همه تست ها از قبیل حساسیت دارویی و افتراق مایکوباکتری ها بر اساس روش استاندارد CDC انجام شد. روش PCR با چند پرایمر مختلف جهت شناسایی مایکو باکتریوم توبرکلوزیس از غیر توبرکلوزیس انجام شد.

یافته ها: در رنگ آمیزی لام به روش زیل نلسون و اورامین باسیل رویت گردید. تست توبرکولین بیمار منفی بود. PCR در تمام موارد انجام شده منفی بدست آمد. کشت پس از ۷ روز افزایش یافته است و کلنی های باسیل رویت گردید و هم چنین رشد در روی محیط ۲- تیوفن اسید کربوکسیلیک مثبت شد و کلنی باکتری نیز از نوع نان فوتوکروموژن مشخص گردید. تست کاتالاز در دو درجه حرارت ۲۲ و ۶۸ مثبت شد. آزمایشات تست نیاسین و نیترات منفی مشخص شد.

نتیجه گیری: در این مطالعه، نمونه مورد نظر جدا شده مایکوباکتریوم چلونی بود که از بیمار مبتلا به سرطان سینه متاستاتیک جدا شده است. این باکتری معمولا در انسان با مشکل دیگر شامل سرطان، ایمنی، آلرژی، استئومیلیت و غیره یافت می گردد.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم چلونی، سرطان سینه متاستاتیک

مقدمه

عفونت مایکوباکتریایی غیر سلی که به طور افزاینده ای (Non Tuberculosis of Mycobacteria–NTM) در حال افزایش می باشد که از میان آن ها، عفونت های مرتبط با مایکوباکتریوم آبسس، چلونی و فورتیتوم به سرعت در حال رشد در بین موجودات زنده هستند، که این مایکوباکتری ها در طبیعت و در محیط های بیمارستان پراکنده اند (Ingrid et al., 2005; Nathan et al., 2000). به طور کلی این گروه علاوه بر بیماری در دستگاه تنفس، از قدرت بیماری زایی در غدد لنفاوی، پوست، بافت نرم، استخوان ها و غیره بر خوردار است. همچنین بسیاری ازگونه های محیطی (مایکوباکتریوم های آتیپیک) بالقوه مولد بیماری در انسان و سایر حیوانات می باشند (Ingrid et al., 2005). این گروه همچنین به شدت در برابر آنتی بیوتیک ها، آنتی سپتیک ها و ضد عفونی کننده مقاوم بوده و از این رو پاتوژن بیمارستانی هم تلقی

آدرس نویسنده مسئول: آزمایشگاه مسعود، بخش پاتولوژی.
Email:Piroozsalehian@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۹/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۲۷
www.SID.ir

Archive of SID

می گردند و باعث عفونت های بافت نرم، تاندون ها، استخوان ها و مفاصل می شود. اعمال جراحی، تروما یا تزریق تصادفی نیز به عنوان عوامل خطر برای عفونت های مربوط به این گروه از مایکوباکتری های غیر سلی (Nathan et al., 2000; Doucette et al., 2004) در نظر گرفته می شود. مکانیزم های ایمنی ناشی از تماس با مایکوباکتریوم های محیطی می توانند نسبت به محافظت در برابر بیماری مایکوباکتریایی مفید یا مضر باشند. همچنین تاثیرات آن ها ممکن است انسان را مستعد برخی از بیماری های ناشی از خود ایمنی یا ضعف ایمنی سازد. مایکو باکتریوم چلونی علل سندرم های مختلف بالینی، از جمله بیماری های ریوی، بیماری های پوستی محلی، عفونت منتشر پوست، ضایعات بافت نرم استئومیلیت، عفونت مفاصل، عفونت های ریه در افراد با نقص سیستم ایمنی افت سیستم ایمنی، عفونت ریه در افراد با سرطان های مختلف، عفونت های مختلف در افراد که بیماری ایدز دارند و بیماری های چشمی می باشد (Wallace et al., 1993; Vemulapalli et al., 2001) و اولین بار در شرایط محیط آب های سرد از لاک پشت جداگردیده است. در این مطالعه نمونه مایکوباکتریوم چلونی از یک خانم ۴۸ ساله که با ارائه شکایت از عفونت ریه به همراه سرطان سینه مراجعه داشته است، جدا گردیده و رابطه عفونت غیر سلی ریه در افراد با سرطان سینه را روشن می سازد.

مواد و روش ها

آزمایشات میکروبیولوژی و جداسازی گونه. باکتری اسید فست از خلط خانم ۴۸ ساله مبتلا به سل ریوی فعال جمع آوری شده از تهران به همراه التهاب غدد لنفاوی که به آزمایشگاه مسعود در آبان ماه مراجعه نموده بود، جدا گردید. سابقه بیمار به لحاظ وجود سل، جنس، علایم بالینی، رادیو گرافی، تست توبرکولین پوست (TST) و غیره ثبت شد. نمونه خلط بیمار در محیط کشت جامد لون اشتاین جانسون (LJ) با روش های استاندارد کشت داده شد و همچنین به جهت تفاوت رشد گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و غیر توبرکلوزیس در محیط تیوفن، کلنی باکتری در روی این محیط نیز کشت داده شد. برای بیمار تست های مرتبط با بیماری تب مالت، ایدز و مالاریا انجام شد. برای بررسی مقاومت و حساسیت دارویی باسیل مایکوباکتریوم جدا شده، باکتری مذکور بر روی محیط های دارویی که دارو در محیط لون اشتاین حل شده است با روش های استاندارد کشت داده شد (ریفامپین با ۴۰ میکرو گرم در میلی لیتر، ایزونیازید ۲ میکرو گرم در میلی لیتر، اتامبوتول ۲ میکرو گرم در میلی لیتر، اتیونامید ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر، استرپتومایسین ۴ میکرو گرم در میلی لیتر و کانامایسین ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفت). با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و افتراقی که شامل نیاسین –احیاء نیترات – آریل سولفاتاز (۳ و۱۴ روزه) - پیرازین آمیداز- احیاء تلوریت- کاتالاز (۶۸-۲۲ درجه) - جذب آهن – تحمل نمک، اوره آز، تولید رنگ دانه و منبع کربن می باشد، مورد افتراق و شناسایی قرار گرفت. روش شناسایی و افتراق مایکوباکتریوم با تست مولکولی **PCR (Polymerase Chain Reaction)**. استخراج اسید نوکلوئیک توسط کیت فناوری (شرکت روسی) انجام شد. DNA از مجموعه ای از مایکو باکتریوم جدا شده و مایکوباکتریوم گونه H37Rv به عنوان شاهد منفی استفاده شده است. قطعه ۴۱۱ بازی از ژن rpoB توسط PCR با استفاده از پرایمر های

(5´- TACGGTCGGCGAGCTGATCC -3´)

و

(5´- TACGGCGTTTCGATGAACC -3´)

قطعه، ISS6110 تکثیر شد. همچنین قطعه ۷۵۰ جفت باز از ژن ۲۷۵ بازی برای تشخیص مایکوباکتریوم آویوم و قطعه ۵۲۰ بازی برای تشخیص مایکو باکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از پرایمرهای استاندارد توسط روش تکثیر DNA تکثیر شد PCR در ۵۰ میکرولیتر لوله حاوی دو میکرولیتر KCl ، دو میکرولیتر Tris با (pH =8.0)، یک و نیم میکرولیتر MgCl۲ و ۵ dNTP میکرولیتر ، U1Tap پلیمراز، ۲۷ میکرولیتر آب (درجه DDW مولکولی) 20 pmol از هر آغازگر و ۱۰-۶ میکرو لیتر از DNA جداشده، انجام شد. دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، در ۳۶ دوره از دناتوراسیون در ۹۴C° برای ۱ دقیقه؛ شروع عمل آغازگر در ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، فرمت در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و سیکل حرارتی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه درجه سانتی گراد به کار گرفته شد و محصول بدست آمده روی ژل آگاروز ۱,۵ درصد به همراه اتیدیوم برماید مورد ارزیابی و شناسایی قرار گرفت.

یافته ها و بحث

تست توبرکولین و اندازه گیری تورم ایجاد شده حاکی از منفی بودن تست بود و بیمار هم چنین عفونت ادرای نداشت. بیمار در این شرایط با توجه به تورم غدد لنفاوی تحت درمان با سیپروفلوکساسین (۵۰۰ میلی گرم) و توبرامایسین (۸۰ میلی گرم) برای مدت ۷ روز قرار داشت. و بیمار بعد از این دوره هنوز ترشحات از غدد لنفاوی داشته و تب به روز کرد. به همین دلیل نمونه بیمار با روش های تخصصی مورد آزمایشات قرار گرفت. تست های هورمون های کبدی، عمل کرد

www.SID.ir

Archive of SID

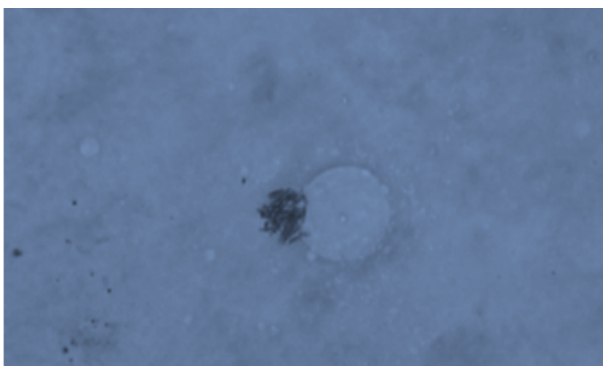
کلیه و ESR همگی نرمال بود. تمامی تست های مرتبط با بیماری تب مالت، مالاریا و ایدز (تست Widal, HIV, Weil Felix Dengue). عکس رادیوگرافی تقریبا نرمال و ضایعه خیلی کوچکی که قابل اقتباس نبود، رویت گردید. هم چنین کشت خون برای بیمار بعد از یک هفته بررسی منفی بود و هیچ باکتری از نمونه بیوپسی شده در محیط های کشت در بین ۷۲-۴۸ ساعت رشد نکرد. درسونوگرافی لگن و شکم هم هیچ گونه ضایعه ای رویت نگردید. بیمار در ادامه و برای کنترل وضعیت تب و حال وی با آنتی بیوتیک Amoxy-clavulinic acid برای هفت روز دیگر درمان شد که احساس بهتر و درد کمتری را تحمل نمود. با این حال، تب در بیمار روشن و خاموش بود و بعد از آن درد شدید در ناحیه کشاله ران راست، منطقه ناحیه تناسلی و راست منطقه paravertebral توسعه یافت. MRI و سی تی اسکن کشاله ران راست برای بیمار توصیه شد. هم چنین نمونه خون برای بررسی IgG ضد سل و آنتی بادی IgM جمع آوری شد. برای گونه های مایکوباکتریوم (مایکوباکتریوم پیچیده سل). آنتی بادی ضد سل در نمونه سرم به شرح ذیل مثبت بود:

My IgG ABS POSITIVE > 1600 EIA units.

My IgM ABS POSITIVE 1.58 EIA units.

My IgA ABS POSITIVE 997 EIA units. s

بیمار در این شرایط شخصاً به آزمایشگاه مسعود تهران مراجعه نمود. بعد از گرفتن تاریخچه کامل و سؤال، نمونه خلط و نمونه بیوپسی غدد لنفاوی گردن محل زخم برداشته، آن را به انجام تست های آزمایشگاهی تخصصی به کار برد. رنگ آمیزی گرم نشان داد سلول های التهابی و گلبول های سفید در خلط زیاد است. کشت خلط در محیط های هوازی و بی هوازی معمول برای ارگانیسم های هوازی و بی هوازی انجام و رشد وجود نداشت. رنگ آمیزی اسید فست (زیل نلسون) حاکی از وجود باسل اسید فست مایکوباکتریومی بود (شکل۱).



شکل۱- باسیل اسد فست در نمونه خلط بیمار.

www.SID.ir

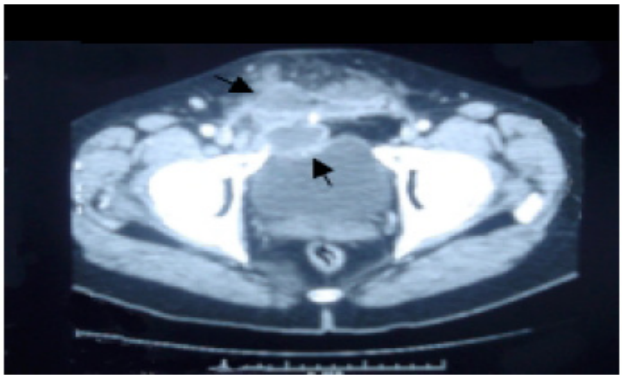
بر اساس گزارش مثبت بر روی نمونه اول خلط بیمار، وی در تحت درمان دارو های رده اول سلی (اتامبوتول ۸۰۰ میلی گرم، ایزونیازید ۳۰۰ میلی گرم، ۶۰۰ میلی گرم پیروزینامید و ۴۵۰ میلی گرم ریفامپیسین) در روز قرار گرفت، که تب فروکش کرد و ظاهراً درد افت داشت، به جز درد گاه به گاه در محل تر وکار با تداوم ترشح که همراه بیمار بود. باسیل اسد فست در نمونه خلط بیمار که در محیط لون اشتاین کشت داده شده بود بعد از گذشتن هفت روز مثبت شد و کلنی باسیل های مایکوباکتریوم در حرارت ۳۷-۲۵ درجه رویت گردید که حاکی از وجود مایکوباکتریوم های سریع الرشد در نمونه خلط بود (شکل۲).

شکل۲- رشد باسیل مایکوباکتریوم چلونی در روی محیط لون اشتاین جانسون.

آزمایشات بیوشیمیایی مختلف به افتراق گونه های مایکوباکتریوم انجام شد. تست آریل سولفاتاز، تحمل نمک ۵ درصد و کاتالاز در ۶۸ درجه مثبت گزارش شد. تست هیدرولیز Tween ۸۰، جذب آهن، نیاسین و احیای نیترات برای کلنی و باسیل مایکوباکتریوم منفی بود. بعد از قرار دادن کلنی باسیل در برابر نور هیچ گونه تغییر رنگی در کلنی رویت نگردید که حاکی از کلنی بدون رنگ برای باسیل بود. تمام تست های کشت باکتری و بیوشیمیایی برای افتراق گونه مایکوباکتریوم توسط مرکز سل بیمارستان مسیح دانشوری- آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی که مرکز رفرانس می باشد، تایید گردید. تمام روش های تکثیر DNA مایکوباکتریوم جدا شده با تمام پرایمر های استاندارد برای جدا سازی ژن های مرتبط با گروه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و آویوم نیز منفی شد و حتی تکثیر ژن RNA پلی مراز که مربوط به ژن rpoB بود منفی گزارش شد. گزارش آسیب شناسی از نمونه غدد لنفاوی بیمار تشخیص سرطان متاستاتیک داکتال پستان که به غدد لنفاوی گردن رحم رسد، تایید شد، و توسط IHC (ایمونوهیستوشیمی) با استفاده از روش هدف خاصی برای سرطان پستان از جمله BRST - 1 ، BRST - 2 ، گیرنده استروژن و پروژسترون به گیرنده تایید شد، که

Archive of SID

تمام گزارشات آسیب شناسی توسط متخصصین آسیب شناسی آزمایشگاه مسعود و همچنین بیمارستان مسیح دانشوری تایید گردید. پس از دو ماه متاستاز تومور مربوطه به سرطان پستان در مغز ظاهر شد و با تمام تلاش ها بعد از دو ماه فوت نمود (شکل۳).



شکل۳- متاساژتومور مربوط به سرطان پستان در مغز.

نتیجه گرفته شد که گونه های مایکوباکتریوم سریع الرشد که در طبیعت وجود دارند در افراد عادی باعث ایجاد بیماری و گرفتاری نمی شوند و در افراد با وجود نقص سیستم ایمنی، آلرژی های مزمن، استئومیلیت، سرطان ها، ایدز و افت سیستم ایمنی توسط داروهای مشخص، می تواند ایجاد عفونت های مشکل زا داشته باشد. نمونه مورد نظر جدا شده در این مطالعه مایکوباکتریوم چلونی بود که با وجود سرطان سینه در بیمار باعث عفونت ریه گردید و نهایتا به همراه سرطان باعث فوت بیمار گردید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدر دانی خود را از مدیریت آزمایشگاه های مسعود اعلام داشته و از تمام پرسنل آن مجموعه تشکر می نمایند. ضمنا از جناب آقای پروفسور تیتوف از مرکز تحقیقات بیماری های عفونی روسیه سفید برای مشاوره و آنالیز داه های بالینی کمال تشکر را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

Refrences

1- Doucette K and Fishman JA. Nontuberculous mycobacterial infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. Clin Infect Dis, 2004; 38:1428–39.

2- Ingrid S, Karin MD, Silke W, Robert Z, Paul H, and Bonatti H. Mycobacterium chelonae skin infection in kidney- pancreas recipiant. Emergine Infectious Diseases, Letter to editor, 2005; 11.

3- Nathan DL, Singh SS, Kestenbaum TM, Casparian JM. Cutaneous Mycobacterium chelonae in a liver transplant patient. JAm Acad Dermatol, 2000; 43: 333–6.

4- Vemulapalli RK, Cantey JR, Steed LL, Knapp TL, Thielmann NM. Emergence of resistance to arithromycin during treatm ent of eminated cutaneous Mycobacterium chelonae infection: case report and literature review. J Infect, 2001; 43: 163–8.

5 -Wallace RJ, Tanner D, Brennan PJ, Brown BA. Clinical trial of clarithromycin for cutaneous (disseminated) infection due to sycobacterium chelonae. Ann Intern Med, 1993; 119: 482–6.

www.SID.ir