بررسی فراوانی لژیونلا نموفیلا در زنان باردار مبتلا به عفونت تنفسی به وسیله روش‌های Nested PCR-RFLP و ELISA بر روی نمونه ادرار

لیلی چمنی تبریز (M.D., M.P.H.)[1]، محمود جدی تهرانی (Ph.D.)[2]، سیده شیلا مطهری (M.Sc.)[3]، حجت زراعتی (Ph.D.)[4]، سهیلا عسگری (B.Sc.)[1]، محمد کارگر (Ph.D.)[3]، مهیار استاد کرم پور (M.Sc.)[2]

۱ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۲ـ مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۳ـ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران.

٤ـ گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: پنومونی در دوران بارداری می‌تواند عواقب بدی هم برای مادر و هم برای جنین داشته باشد. بنابراین تشخیص و درمان سریع بیماری از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. لژیونلا نموفیلا یکی از علل پنومونی آتیپیکال در جمعیت‌های مختلف می‌باشد. مطالعات در زمینه عفونت لژیونلایی به دوران بارداری محدود می‌باشد. بیماران مبتلا به عفونت لژیونلایی برای مدت نامحدودی LPS و DNA باکتری را در ادرار خود دفع می‌کنند، بنابراین بکارگیری توام PCR و ELISA (تشخیص آنتی‌ژن باکتریایی) بهترین ابزار تشخیص بیماری می‌باشد. این تحقیق به منظور تعیین فراوانی عفونت لژیونلا نموفیلا در زنان باردار مبتلا به عفونت تنفسی انجام گرفت.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی- تحلیلی روی ۹۵ مادر باردار ٤۱-۱۵ ساله مبتلا به عفونت تنفسی مراجعه‌کننده به درمانگاه‌های مامایی بیمارستان‌های وابسته به سازمان تأمین اجتماعی و دانشگاه علوم پزشکی تهران از زمستان ۸٤ تا تابستان ۸۵ انجام شد. وجود عفونت لژیونلایی به روش Nested PCR-RFLP و آزمون ELISA روی نمونه ادرار بیماران مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های پرسشنامه‌ها همراه با نتایج آزمایشات تحت برنامه SPSS (ویرایش ۱۳) و با استفاده از آزمون‌های آماری t مستقل، فیشر، χ^2، مدل لجستیک و مک نمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری ۵٪ درنظر گرفته شد.

نتایج: شیوع عفونت در نمونه مورد بررسی با استفاده از روش مولکولی ۲۲/۱٪ (۳۰/۱٪- ۱٤/۱٪=CI) و با استفاده از روش الایزا ٤/۲٪ (۸/۲٪-۲/۰٪=CI) بدست آمد؛ که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۵). شایع‌ترین علایم بیماری در بین شرکت‌کنندگان شامل تب ۲۲/۱٪، لرز ۳۵/۸٪، سرفه ۵٦/۸٪، سردرد ۵٤/۷٪، اسهال ۸/٤٪ و درد شکمی ۳۸/۹٪ بود. بررسیها نشان داد که شیوع علایم تب، لرز، درد شکمی و سابقه بیماریهای کبدی و کلیوی در افراد با PCR مثبت به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (به ترتیب p<۰/۰۰۱، p<۰/۰۵). همین ارتباط بین علایم لرز و تب با نتیجه تست ELISA نیز وجود داشت (p<۰/۰۵)، ولی بین سایر متغیرهای مورد بررسی با نتیجه تست ارتباط آماری معنی‌داری یافت نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع ۲۲/۱درصدی بیماری در این مطالعه می‌توان گفت که فراوانی این عفونت در زنان باردار مورد بررسی زیاد است و از آنجایی که تست‌های تشخیصی سریع مثل PCR در حال حاضر در دسترس می‌باشد؛ لذا جهت درمان مناسب و به‌موقع به‌منظور پیشگیری از عوارض مادری و جنینی پیشنهاد می‌شود این تست به‌عنوان یکی از آزمایشها در مبتلایان به عفونت‌های تنفسی خصوصاً در مادران باردار درخواست شود. انجام آزمایشات PCR و ELISA روی نمونه ادرار برای شناسایی گونه‌های لژیونلا مناسب بوده و می‌تواند نتایج را در کمتر از یک روز مشخص کند که کمک بسیار بزرگی در تشخیص و درمان به موقع پنومونی لژیونلا بویژه در دوران بارداری می‌باشد.

کلید واژگان: لژیونلا نموفیلا، بارداری، پنومونی، روش مولکولی، ELISA.

مسئول مکاتبه: دکتر لیلی چمنی تبریز، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی– ابن‌سینا، تهران، ایران.

پست الکترونیک: lchamani@avicenna.ac.ir

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

لژیونلا، باسیل گرم منفی، کوچک، هوازی، اجباری، گرمادوست، نیازمند به دمای $42-20\ ^oC$ و محیط رشد اختصاصی BCYEα[1] حاوی مواد ضروری (آهن، L-Cysteine، α-Ketoglutarate) و پروتئین است. می‌توان لژیونلا را از نمونه‌های بالینی در دمای $35\ ^oC$ و محیط مرطوب روی محیط کشت BCYEα پس از ۵-۲ روز انکوبه شدن به‌دست آورد که در مورد گونه‌های نامعمول این زمان تا ۱۴ روز افزایش می‌یابد.

بیش از ۴۹ گونه لژیونلا شناسایی شده‌اند که ۲۰ گونه آن برای انسان بیماریزا هستند. لژیونلانموفیلا خود دارای ۱۶ گونه سرمی متفاوت است که گونه یک آن عامل ۹۰-۷۰٪ اپیدمیها و موارد تک‌گیر می‌باشد. این باکتری از طریق استنشاق ذرات ریز آب حامل باکتری، در دستگاه تنفسی انسان جایگزین شده و منجر به آلودگی می‌شود. این باکتری در سراسر جهان به طور طبیعی در دریاچه‌ها، رودخانه‌ها، نهرها، چشمه‌های آب گرم، لجن‌های کف منابع آب و همچنین مخازن و شبکه‌های لوله‌کشی و برج‌های خنک کننده یافت می‌شود (۱). سویه‌های مختلف لژیونلا به عنوان عامل اپیدمی‌های متعدد و نیز موارد تک‌گیر پنومونی گزارش شده‌اند. شیوع بیماری لژیونر به میزان آلودگی منابع آبی و حساسیت افراد بستگی دارد.

لژیونلاها دو نوع بیماری مستقل کلینیکی را ایجاد می‌نمایند که یکی بیماری شدید با درگیری چند ارگان[2] شامل ذات‌الریه (بیماری لژیونر) بوده و دیگری تب پونتیاک است که نوعی بیماری خودبه‌خود محدود شونده شبیه آنفولانزا می‌باشد (۲).

مطالعات بیانگر این است که لژیونلا تا ۴۰٪ بوسیله کشت و ۸۰٪ از طریق PCR[3] در محیط‌های آب شیرین یافت می‌شود. شناسایی آنتی‌ژن‌های ادراری و PCR لژیونلا نسبت به سایر روش‌های تشخیصی سریعتر انجام می‌گیرد و این امر می‌تواند به درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب کمک کرده و از ایجاد عوارض بیماری لژیونر پیشگیری نماید (۳). آنتی‌ژن لژیونلا ۳ روز پس از شروع علایم بیماری در ادرار یافت می‌شود و می‌تواند برای مدتی بیش از ۳۰۰ روز باقی بماند (۳). DNA لژیونلا را می‌توان از نمونه‌های ادرار، سرم و لکوسیت‌های گرفته شده از مبتلایان به بیماری لژیونر تا حد حساسیت ۳۰ الی ۸۶٪ شناسایی کرد (۱).

حساسیت و ویژگی تست الیزا برای تشخیص آنتی‌ژن‌های ادراری به ترتیب ۸۸/۲٪ و ۹۵٪ است و می‌تواند به عنوان آزمایشی برای شناسایی نمونه‌ها و گروه سرمی نموفیلا و غیرنموفیلا در نظر گرفته شود که دقت تشخیصی آن را می‌توان با استفاده از نمونه‌های ادراری تغلیظ شده به ۱۰۰٪ افزایش داد (۴). PCR تست سریعی است که با حساسیت ۱۰۰-۸۰٪ و ویژگی بیش از ۹۰٪ نتیجه را مشخص می‌کند و همچنین از قابلیت آشکارسازی گونه‌های لژیونلا و گروه‌های سرمی آن برخوردار است و نتایج را طی زمان کوتاه و مناسبی برای کنترل بالینی بیماری فراهم می‌کند (۱).

ذات‌الریه در دوران بارداری می‌تواند نتایج وخیمی برای مادر و جنین به همراه داشته باشد و شایع‌ترین عامل پاتوژن باکتریایی آن استرپتوکوکوس نمونیا است؛ اما لژیونلا هم باید در موارد پنومونی همراه با درگیری چند ارگان در نظر گرفته شود. در موارد شدید بیماری احتمال زایمان زودرس (۵) و مرگ جنینی (۶) وجود دارد. در واقع ذات‌الریه باعث ایجاد اختلال در ۰/۱ درصد از بارداریها می‌شود (۵).

از آنجا که دوران بارداری دوران بسیار حساسی است و عفونت‌های ریوی می‌توانند باعث ایجاد مرگ ومیر و ناتوانی در مادر و جنین شوند و از طرفی نقش لژیونلا در عفونت‌های تنفسی در دوران بارداری در ایران

1- Buffer Charcoal Yeast Extract agar
2- Multisystem disease
3- Polymerase Chain Reaction

Downloaded from http://www.jri.ir

نامشخص است، این تحقیق به منظور تعیین نقش لژیونلا در ایجاد عفونت‌های تنفسی در زنان باردار و دستیابی به یک روش تشخیصی حساس و مناسب برای تشخیص عفونت‌های تنفسی ناشی از لژیونلا انجام شد تا اهمیت شناخت و درمان به موقع و مناسب بیماری به‌منظور پیشگیری از عوارض احتمالی بعدی آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش بررسی

این مطالعه از زمستان۸٤ تا تابستان ۸۵ روی ۹۵ زن باردار مبتلا به عفونت تنفسی با انتخاب تصادفی از میان مراجعین به درمانگاه‌های مامایی بیمارستان‌های وابسته به سازمان تأمین اجتماعی و دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. این زنان رضایت خود را جهت شرکت در مطالعه ابراز نمودند. معیارهای ورود به مطالعه شامل بارداری، عدم مصرف آنتی‌بیوتیک طی ۳ هفته قبل از زمان انجام نمونه‌گیری و دارا بودن دو یا چند مورد از علایم عفونت شامل تب، سرفه، خلط چرکی، آبریزش بینی و گرفتگی بینی همراه یا بدون سردرد و اسهال بود. ابزار تحقیق پرسشنامه و نمونه مورد استفاده، نمونه ادراری بود که شرکت‌کننده طی حداقل ۲ ساعت قبل از نمونه‌گیری، دفع ادرار نداشتند (FCU)[1]. از مزایای انتخاب ادرار به عنوان نمونه مورد بررسی می‌توان به غیرتهاجمی بودن نمونه‌گیری و امکان جمع آوری نمونه توسط خود فرد اشاره نمود؛ ولی چون معمولاً کشت لژیونلا سخت و بسیار حساس می‌باشد و امکان آلودگی شدید دارد، نمونه ادرار برای کشت مناسب نبوده و فقط از آن برای تست‌های مولکولی و ELISA[2] استفاده می‌شود. به‌طور کلی نمونه‌های حاصل از اندام‌های غیرتنفسی به نمونه‌های تنفسی ارجحیت دارند؛ چرا که با استفاده از این نمونه‌ها تشخیص بیماران مبتلا به ذات‌الریه خشک و بدون خلط امکانپذیر می‌باشد (۱).

در پرسشنامه، اطلاعات شخصی از جمله سن، سطح تحصیلات، شغل، علایم عفونت شامل تب بالای ۴۰ ℃، لرز مکرر، سرفه خشک، خلط، درد شکمی و سابقه اعتیاد، بیماری‌های کبدی و کلیوی، دیابت، بیماری‌های قلبی و ریوی و واکسیناسیون مورد پرسش قرار گرفت. پس از مصاحبه وتوضیح مراحل نمونه‌گیری و اهداف مطالعه، ابتدا رضایتنامه کتبی توسط افراد تکمیل و پرسشنامه طرح از طریق مصاحبه تکمیل گردید. پرسشگر قبل از شروع کار توسط مجری طرح (متخصص بیماری‌های عفونی وگرمسیری) تحت آموزش قرار گرفت.

پس از تکمیل پرسشنامه ۱۵-۱۰mlنمونه اول ادرار اخذ و بلافاصله تحت شرایط استاندارد (دمای ۸-۲ ℃) به آزمایشگاه میکروب‌شناسی پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا انتقال یافت تا استخراج DNA از نمونه‌ها در همان روز انجام گیرد. استخراج DNA با استفاده از روش پروتئیناز K و رسوب با نمک[3] (۷) طبق مراحل ذیل صورت گرفت:

۱۵-۱۰ml ادرار به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰g سانتریفیوژ شده و مایع رویی[4] تخلیه شد. سپس ۱ml بافر PBS[5] به رسوب نمونه ادراری اضافه و پس از یکنواخت شدن رسوب آنرا به داخل میکروتیوب منتقل کرده و میکروتیوبها به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه مایع رویی این مرحله مجدداً تکرار شد. سپس ۳۰۰μl بافر TES[6]، به‌همراه ۷۵μl از SDS[7] ۱۰٪ و ۲۵μl پروتئیناز K (۱۰۰mg/ml) به رسوب اضافه شد و به‌دنبال آن پس از یکنواخت کردن رسوب در محلول، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در

1- First Catch Urine
2- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
3- Proteinease K and salt precipitation
4- Supernatant
5- Phasphate Buffer Solution
6- Tris-EDTA-salt
7- Sodium Dodecyl Sulfate

Downloaded from http://www.jri.ir

دمای C° ۶۵-۵۵ انکوبه شدند. در مرحله بعد μl ۱۵۰ محلول NaCl اشباع به آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد و μl ۳۰۰ ایزوپروپانول به آن افزوده و به آرامی مخلوط شد تا رشته‌های DNA ظاهر گردد. مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و محلول رویی تخلیه و سپس رسوب حاصل در هر میکروتیوب با ml ۱ اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. پس از سانتریفیوژ محلول با دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه محلول رویی به‌صورت کامل خارج و نهایتاً مقدار μl ۲۰۰-۱۵ بافر TE[1] به DNA افزوده شد. DNA استخراج شده تا زمان انجام PCR در دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری گردید.

PCR اختصاصی برای لژیونلا پس از بهینه‌سازی در مخلوط واکنشی به حجم μl ۵۰ شامل بافر PCR ۱۰X (Roche, Germany) به مقدار μl ۵، $MgCl_2$ (۲۵mM) به مقدار μl ۳، dNTP (۱۰mM) به مقدار μl ۱/۵، پرایمرهای forward و reverse (rpoB) با غلظت mM ۱۰ هر کدام به‌مقدار μl ۱، Tag DNA Polymerase ($u/\mu l$ ۵) (Roche, Germany) به مقدار μl ۰/۲، μl ۳۷/۳ آب مقطر دیونیزه و μl ۱ از نمونه DNA انجام گردید. سپس برنامه PCR به صورت دناتوره کردن اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ^{o}C ۹۴ و به‌دنبال آن برنامه اصلی در ۳۷ سیکل شامل ^{o}C ۹۴ به مدت سی‌ثانیه، ^{o}C ۵۸ به مدت سی‌ثانیه و ^{o}C ۷۲ به مدت سی‌ثانیه و در انتها پس از اتمام سیکلها تکثیر نهایی در ^{o}C ۷۲ به مدت ده دقیقه بهینه‌سازی شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. در صورت مشاهده باند ۲۹۷bp محصول PCR مثبت تلقی شد. در مرحله بعد با استفاده از یک جفت پرایمر داخلی (nes rpoB) مجدداً Nested PCR مشابه با شرایط PCR اول روی نمونه‌های مثبت و منفی PCR اول انجام گرفت. در Nested PCR اگر باند ۲۱۶bp مشاهده می‌شد نمونه مثبت تلقی می‌شد؛ ولی اگر باندی مشاهده نشد نتیجه با قاطعیت منفی گزارش می‌گردید.

از آنجایی که توالی حفظ شده rpoB در تمام گونه‌های لژیونلا وجود دارد و تنها سویه مورد نظر این طرح، سویه نموفیلا بود در مرحله بعد جهت تشخیص سویه نموفیلا روی محصولاتی که دارای PCR مثبت بودند RFLP[2] انجام شد. در RFLP محصولات مثبت PCR ابتدایی و Nested PCR با استفاده از آنزیم محدودکننده[3] Bam HI (Canada, Invitrogen) مورد برش و هضم آنزیمی قرار گرفتند. در صورتی که هریک از نمونه‌های PCR اول پس از هضم آنزیمی دارای باندهای ۱۵۸ bp و ۱۳۹ bp و نمونه‌های Nested PCR پس از هضم آنزیمی دارای باندهای ۱۳۴ bp و ۸۲bp نبودند احتمالاً DNA موجود در محصولات PCR آنها تا زمان انجام RFLP، دچار تغییر ماهیت[4] شده یا گونه دیگری غیر از لژیونلا نموفیلا می‌باشد ولی در صورتیکه هریک از نمونه‌های مورد بررسی با کنترل مثبت تست (نمونه DNA استخراج شده از کلنی‌های لژیونلا نموفیلا استاندارد ATCC33152) مطابقت داشت و دارای باندهای فوق الذکر بود. تمامی مراحل RFLP به‌درستی انجام شده، نمونه قطعاً مثبت است و آلودگی با لژیونلا نموفیلا وجود دارد (شکل ۱).

پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژنوم باکتری در PCR اول دارای توالی زیر بودند (۸):

rpoB-f: 5' AAGTGTTGGCGAAATGACC 3'
rpoB-r: 5' GTTGTATGTACGTCACGGA 3'

پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژنوم باکتری در Nested PCR دارای توالی زیر بودند (۸):

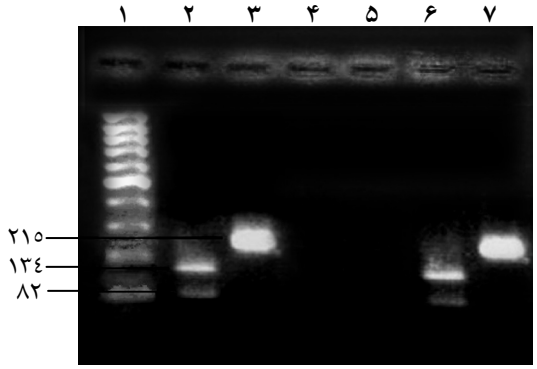
Nes rpoB-f:5' TCAGTTTAGAGTAGGTCTTG 3'
Nes rpoB-r: 5' CCAAGAGCTGATACACGT 3'

برای انجام تست ELISA به روش ساندویچ از کیت تشخیصی لژیونلا (DRG, Germany) استفاده شد.

1- Tris-EDTA

2- Restriction Fragment Length Polymorphism (DNA analysis)
3- Restriction Enzyme
4- Denaturation

Downloaded from http://www.jri.ir



شکل ۱- نمایش محصولات Nested PCR- RFLP نمونه‌های ادرار زنان باردار مبتلا به عفونت تنفسی مراجعه کننده به درمانگاه‌های مامایی تأمین اجتماعی و دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۸۵-۱۳۸٤ (۱- Molecular weight marker Roche VIII، ۲- نمونه digest شده حاصل از Nested PCR مربوط به کنترل مثبت، ۳- نمونه کنترل مثبت پس از Nested PCR، ٤- نمونه فرد نرمال پس از digestion، ٥- نمونه فرد نرمال پس از Nested PCR ، ٦- نمونه فرد بیمار پس از digestion و ۷- نمونه فرد بیمار پس از Nested PCR)

در مرحله بعد اطلاعات پرسشنامه‌ها همراه با نتایج تست‌های Nested PCR-RFLP و ELISA وارد نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۳) شد و با استفاده از آزمون‌های آماری t مستقل، فیشر، χ^2، مدل لجستیک یک متغیره و مک نمار مود تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. سطح معنی‌داری، ٥٪ در نظر گرفته شد. همچنین جهت بررسی اثر همزمان متغیرها بر نتیجه تست از مدل لجستیک چندگانه استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه ۹٥ خانم ٤۱- ۱٥ ساله باردار دارای علایم عفونت تنفسی مورد بررسی قرار گرفتند که متوسط سن آنها ٥/۰۸±۲٥/۸۹ سال بود. در سابقه شخصی افراد، ٤۱/۱٪ شرکت‌کنندگان دارای تحصیلات متوسطه و ۸۲/۲٪ خانه‌دار بودند. شایع‌ترین علایم بیماری در بین شرکت‌کنندگان شامل تب در ۲۱ نفر (۲۲/۱٪)، لرز ۳٤ نفر (۳٥/۸٪)، سرفه خشک ٥٤ نفر (٥٦/۸٪)، سردرد ٥۲ نفر (٥٤/۷٪)، اسهال ۸ نفر (۸/٤٪) و درد شکمی ۳۷ نفر (۳۸/۹٪) بود. هیچ یک از بیماران طی سال قبل از آزمایش واکسن نزده و طی ۱۰ روز قبل از نمونه‌گیری دارویی مصرف نکرده بودند.

از ۹٥ خانم شرکت‌کننده در تحقیق، ۲۱ نفر (۲۲/۱٪) (CI=٪۱٤/۱ -٪۳۰/۱) تست مثبت PCR و ٤ نفر (٤/۲٪) (CI=٪۲/۰ -٪۸/۲) تست مثبت ELISA داشتند. براساس آزمون مک نمار (جدول ۱) مشخص شد که تفاوت تشخیص موارد مثبت عفونت با استفاده از این دو تست از نظر آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۰۱).

بیشترین شیوع بیماری برحسب PCR در فصول زمستان و تابستان به میزان ٤۷/٦٪، در گروه سنی ۲٤-۲۰ ساله به میزان ٥۷/۱٪، در افراد دارای تحصیلات متوسطه به میزان ۳۳/۳٪ و در افراد خانه‌دار ۷۱/٤٪ دیده شد.

در بین افراد PCR مثبت ۱٥ نفر (۷۱/٤٪) تب، ۱٥ نفر (۷۱/٤٪) لرز، ۱۳ نفر (٦۱/۹٪) سرفه خشک، ۱۱ نفر (٥۲/٤٪) سردرد، ۱۳ نفر (٦۱/۹٪) خلط، ۸ نفر (۳۸/۱٪) درد قفسه سینه در موقع تنفس، ٤ نفر (۱۹/۰٪) درد شکمی، ۸ نفر (۳۸/۱٪) درد عضلانی، ٥ نفر (۲۳/۸٪) تهوع و استفراغ، ۱۱ نفر (٥۲/٤٪) بی‌حالی و کسالت و ۷ نفر (۳۳/۳٪) بی‌اشتهایی داشتند؛ ولی هیچ موردی از اسهال، اعتیاد و یا مصرف الکل مشاهده نشد. همچنین ٤ نفر (۱٥٪) ابتلای به بیماری‌های کبدی و کلیوی، ۱ نفر (٤/۸٪) دیابت و ۱ نفر (٤/۸٪) بیماری قلبی و ریوی را ذکر نمودند.

در افراد PCR مثبت، شیوع علایم تب (p<۰/۰۰۱)، لرز (p<۰/۰۰۱)، درد شکمی (p<۰/۰٥) و سابقه بیماری‌های کبدی و کلیوی (p<۰/۰٥) به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد PCR منفی بود. همین ارتباط بین نتیجه تست ELISA و علایم لرز (p<۰/۰٥) و تب (p<۰/۰٥) نیز وجود داشت، ولی بین سایر متغیرهای مورد بررسی با

جدول ۱- نتایج تستهای PCR وELISA برروی نمونه‌های ادرار زنان باردار مبتلا به عفونت تنفسی مراجعه کننده به درمانگاه‌های مامایی تأمین اجتماعی و دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۸۵-۱۳۸٤

PCR	ELISA			
	مثبت		منفی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
مثبت	٤	٪۱۹	۱۷	٪۸۱
منفی	۰	٪۰	۷٤	٪۱۰۰

p<۰/۰۰۱

Downloaded from http://www.jri.ir

نتایج تست ارتباط معنی‌داری یافت نشد. با استفاده از مدل لجستیک یک‌متغیره نیز اثر متغیرهای مختلف برشانس ابتلا به این بیماری مورد بررسی قرار گرفت که نتایج تاییدکننده آزمون‌های قبلی بود. به‌علاوه بررسی‌های بیشتر با استفاده از مدل لجستیک چندگانه نیز همان نتایج را نشان می‌داد.

بحث

پنومونی یا عفونت‌های ریوی یکی از جدی‌ترین بیماری‌هایی است که هر ساله عده زیادی را در جهان آلوده کرده و یا به کام مرگ می‌کشد. یکی از عوامل ایجاد کننده پنومونی، لژیونلا می‌باشد که عامل بیماری لژیونلوسیس است. فراوانی لژیونلانموفیلا در بین پنومونی‌های اکتسابی از جامعه[1] (CAP) در جهان متغیر می‌باشد. مثلاً در بررسی CAP در اسپانیا در طول سال‌های ۱۹۹٤ تا ۱۹۹٦ از میان ۱۵۷ بیمار، تعداد ٤۸ مورد گونه لژیونلا نموفیلا گزارش شد (۹). همچنین پس از ۳ سال بررسی و جمع‌آوری اطلاعات بوسیله CAPNetz[2] در ۳۵۰۰ بیمار مبتلا به پنومونی اکتسابی از جامعه، فراوانی لژیونلا نموفیلا ۳ ٪ گزارش شد (۱۰). همچنین در بررسی‌های CAP در چین در سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۱ از تعداد ۳۸۹ بیمار، ۲ مورد به لژیونلا نموفیلا مبتلا بودند (۱۱). در بررسی بیماران پنومونی اکتسابی از جامعه در اردن فراوانی لژیونلا نموفیلا ٦٪ گزارش شد (۱۲). در کره نیز از ۱۲٦ بیمار CAP، ۳ بیمار (۲/٤٪) مبتلا به لژیونلا نموفیلا بودند (۱۳).

در سال ۲۰۰۵ در مطالعه CAP در ۱۲ مرکز در آسیا انجام گرفت از میان ۱۳۷٤ بیمار، فراوانی لژیونلا نموفیلا ٦/٦ ٪ به‌دست آمد (۱٤). مطالعه‌ای نیز در کویت در سال ۲۰۰۵ در طول یک سال بررسی در ۳ بیمارستان به‌وسیله تیم بررسی پنومونی صورت گرفت که از ۱۲٤ بیمار مبتلا (۸٪) آنها مبتلا به بیماری لژیونر بودند (۱۵).

مطالعات عفونت با لژیونلا نموفیلا در بارداری اغلب به‌صورت گزارش موردی[3] می‌باشد. در سال ۱۹۹۷ گزارشی مربوط به یک زن باردار که به مدت ۳ ماه علایم عفونت تنفسی لژیونلایی را داشت ارائه شد وی تحت درمان با اریترومایسین قرار گرفته بود. این اولین گزارش در مورد درمان موفقیت‌آمیز بیماری لژیونر در زمان بارداری که حاصل آن تولد نوزادی سالم بود را بیان می‌نمود (۵). گزارش دیگری در سال ۲۰۰٦ در مورد عفونت با لژیونلا در دوران بارداری مربوط به یک زن ۳٦ ساله ارائه شد که در هفته ۳٤ بارداری، لژیونلانموفیلا توسط کیت تشخیصی آنتی‌ژن ادراری الایزا تشخیص داده شد. این گزارش، یک بررسی موفقیت‌آمیز، تشخیص سریع و درمان مناسب بود (۱٦). گزارش دیگر در سال ۱۹۹۹ پس از تولد یک نوزاد و مرگ وی در ٤ هفته بعد از تولد ثبت شد که در سیستم وان حمام خانگی متولد شده بود. پس از ٤۲ هفته بارداری، کودک سالم متولد شد ولی در روز هفتم علایمی از تب و تهوع نشان داد که نشانه آلودگی به لژیونلا بود و در ظهر روز بعد در اثر ایست قلبی- ریوی از دنیا رفت (۱۷).

تشخیص آزمایشگاهی لژیونلا نموفیلا به روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد. مطالعه‌ای در لهستان با استفاده از اطلاعات جمع‌آوری شده از ۲۸ کشور انجام شد. با استفاده از روش جداسازی آنتی‌ژن ادراری و کشت، شیوع لژیونلوسیس ٤/۷٪ به‌دست آمد (۱۸). در بررسی دیگری درجنوب ایتالیا با استفاده از روش جداسازی آنتی‌ژن لژیونلا و تعیین تیتر آنتی‌بادی لژیونلا، فراوانی عفونت ۵/۹٪ گزارش شد (۱۹). تحقیقی در کره برای شناسایی و تشخیص لژیونلا نموفیلا انجام شد که تست‌های تشخیصی بکار رفته، ELISA و PCR

1- Community-Acquired Pneumonia
2- Community-Acquired Pneumonia Competence Network
3- Case report

Downloaded from http://www.jri.ir

بر روی نمونه ادرار بود و از ۱۲٦ بیمار مورد بررسی، ۳ بیمار (۲/٤٪) مثبت گزارش شدند (۱۳). در یک بررسی در نیوزلند از ۲۸ بیمار مبتلا به پنومونی ۱۸ نفر (٦٤٪) دارای DNA لژیونلا در ادرار بودند؛ ولی در ۲۸ بیمار با پنومونی غیرلژیونلایی، PCR منفی بود. نتیجه این گزارش نشان داد که جداسازی DNA از ادرار بیماران مبتلا به پنومونی ابزار با ارزشی برای تشخیص سریع بیماری لژیونلانمونیا (لژیونلوسیس) می‌باشد (۲۰). در یک بررسی در اسپانیا از ۲۹۵ بیمار مبتلا به لژیونلا نموفیلا ۱٤۱ نفر (٤۷/۸٪) PCR مثبت بودند که ۸۷/٥٪ دارای پنومونی حاد و ۳۷/۹٪ پنومونی خفیف داشتند (۲۱). اکنون بیان می‌شود که ELISA با حساسیت بیش از ۷۰٪ و اختصاصی بودن ۱۰۰-۹۹٪ و طی مدت زمانی معادل ۲ ساعت جزء بهترین روش‌های تشخیصی می‌باشد و اگر همراه به PCR باشد بهترین روش‌های تشخیصی محسوب می‌شوند (۳). PCR-RFLP ژن rpoB برای لژیونلا روشی سریع و در دسترس و آسان و راحت می‌باشد که هم برای جداسازی جنس و هم برای تشخیص سریع گونه‌های لژیونلا مورد استفاده قرار گیرد (۲۲).

تاکنون در ایران درباره لژیونلا مطالعات کمی صورت گرفته است. مطالعات، محدود به بررسی آب‌های مشکوک به لژیونلا در بخش‌های بیمارستانی مختلف و برج‌های خنک‌کننده بعضی کارخانجات و وزارتخانه‌ها می‌شود. به‌عنوان مثال در بررسی نمونه‌های آب سرد و گرم بخش‌های پیوند عضو از نظر آلودگی به لژیونلا بوسیله روش کشت بیش از ۲۲٪ از نمونه‌های آزمایش شده حداقل به یک نوع لژیونلا آلوده بودند (۲۳). تحقیقی نیز در سال ۱۳۸۲ توسط خسرو شاهی و همکاران برای جداسازی و تعیین هویت عوامل بیماری لژیونر از تجهیزات درمانی و منابع آب محیطی از بیمارستان‌های شهر اهواز صورت گرفت که میزان ٦/٦٪ از منابع آبی مورد بررسی آلوده به لژیونلا بودند (۲٤). ولی تاکنون فراوانی عفونت با لژیونلانموفیلا در خانم‌های باردار مبتلا به عفونت تنفسی در ایران مورد بررسی قرار نگرفته بود.

نتیجه‌گیری

شیوع عفونت در مطالعه حاضر ۲۲/۱٪ بوسیله PCR و ٤/۲٪ بوسیله ELISA گزارش شد که قابل مقایسه با مطالعات مشابه نمی‌باشد، ولی با مطالعات مختلفی که با هر یک از این روشها انجام شده است همخوانی دارد. اما تفاوت‌هایی بین شیوع به‌دست آمده با سایر جمعیت‌های مبتلا مشاهده شد که می‌تواند ناشی از بکارگیری روش‌های مختلف آزمایشگاهی با حساسیت و ویژگی‌های متفاوت و شرایط اپیدمیولوژیک منطقه از نظر دمای آب، وضعیت دستگاه‌های تهویه مطبوع و سایر عوامل موثر در رشد و تکثیر لژیونلا باشد. علیرغم اینکه بین عفونت با متغیرهای مورد بررسی در برخی موارد ارتباط آماری معنی‌دار بدست آمد؛ ولی می‌توان گفت که حجم نمونه جهت بررسی کلیه متغیرهای تاثیرگذار کفایت نمی‌نمود. به‌علاوه بررسی علایم عفونت براساس گزارشات بیماران و بدون انجام معاینه بالینی صورت گرفت که دقت کمتری نسبت به معاینه دارد.

در بسیاری از موارد عفونت‌های تنفسی، نقش لژیونلا به‌عنوان عامل ایجاد کننده، از نظر پنهان مانده و تأخیر در درمان مناسب منجر به ایجاد عوارض جدی در بیماران می‌شود. نتیجه مناسب با شروع به موقع درمان، مراقبت بیشتر از جنین در سه ماهه آخر بارداری و سایر اقدامات مراقبتی موثر برای جنین بدست می‌آید.

به‌علاوه با توجه به محدودیت‌های موجود در استفاده از برخی آنتی‌بیوتیکها و ممنوعیت رادیوگرافی در دوران بارداری، تشخیص سریع و صحیح عفونت در این دوران از اهمیت زیادی برخوردار است. باتوجه

Downloaded from http://www.jri.ir

به حساسیت و ویژگی بالای روش PCR در تشخیص این عفونت، انجام این تست جهت شروع هرچه سریعتر درمان به‌منظور پیشگیری از عواقب وخیم جنینی و مادری ازجمله سقط و زایمان زودرس توصیه شده و پیشنهاد می‌شود به‌عنوان یکی از آزمایشات در مبتلایان به عفونت تنفسی مخصوصاً در مادران باردار به منظور گردد.

تشکر وقدردانی

این مقاله با حمایت و پشتیبانی پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا انجام گرفت که بدینوسیله از زحمات ایشان تشکر و قدردانی می‌گردد. ضمناً از ریاست و پرسنل سازمان تأمین اجتماعی و دانشگاه علوم پزشکی تهران صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1- Murdoch D R. Diagnosis of legionella infection. Clin Infect Dis. 2003;36(1):64-9

2- Edelstein P H, Cianciotto N P. Legionella, Mandell G L, Dolin R, Bennette J E. 6th Editin, Published by Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia. 2005;p: 2239-51.

3- Fields B S, Benson R F, Besset R E. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev. 2002;15(3):506-26.

4- Kim M J, Sohn J W, Park D W, Park S C, Chun B C. Characterization of a lipoprotein common to Legionella species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. J Clin Microbiol. 2003;41(7):2974-9.

5- Eisenberg V H, Eidelman L A, Arbel R, Ezra Y. Legionnaire's disease during pregnancy: a case presentation and review of the literature. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1997;72(1):15-8.

6- Vimercati A, Greco P, Bettocchi S, Resta L, Selvaggi L. Legionnaire's disease complicating pregnancy: a case report with intrauterine fetal demise. J Perinat Med. 2000;28(2):147-50.

7- Sambrook J, Russell DW. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001;pp:6.28-6.30.

8- Nielsen K, Hindersson P, Hoiby N, Bangsborg J M. Sequencing of the rpoB Gene in Legionella pneumophila and Characterization of Mutations Associated with Rifampin Resistance in the Legionellaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(10):2679-2683.

9- Sopena N, Pedro-botet M L, Sabria M, Garsia D. Comparative study of community-acquired pneumonia caused by streptococcus pneumoniae, legionella pneumophila or chlamydia pneumoniae. Scand J Infect Disease. 2004;36:330-334.

10- Welte T, Marre R, Suttorp N. What is new in the treatment of community-acquired pneumonia. Med Klin. 2006;101(4):313-20.

11- Huang H H, Zhang Y Y, Xiu Q Y, Zhou X, Huang S G, Lu Q, et al. Community-acquired pneumonia in Shanghai, China: microbial etiology and implications for empirical therapy in a prospective study of 389 patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006;25(6): 369-74.

12- Al-Ali M K, Batchoun R G, Al-Nour T M. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Jordan. Saudi Med J. 2006; 27(6):813-6.

13- Sohn J W, Park S C, Choi Y H, Woo H J, Cho Y K, Lee J S, et al. Atypical pathogens as etiologic agents in hospitalized patients with community-acquired pneumonia in Korea: a prospective multi-center study. J Korean Med Sci. 2006;21(4):602-7.

14- Ngeow Y F, Suwanjutha S, Chantarojanasriri T, Wang F, Saniel M, Alejandria M, et al. An Asian study on the prevalence of atypical respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. Int J Infect Dis. 2005; 9(3):144-53.

15- Behbehani N, Mahmood A, Mokaddas E M, Bittar Z, Jayakrishnan B, Khadadah M, et al. Significance of atypical pathogens among community-acquired pneumonia adult patients admitted to hospital in Kuwait. Med Princ Pract. 2005;14(4):235-40.

16- Gaillac N, Floccard B, Ould T, Benatir F, Levrat A, Meunier P, et al. Legionella pneumophila pneumonia during pregnancy: a case report, J Infect. 2006;52(6): 63-4.

17- Nagai T, Sobajima H, Iwasa M, Tsuzuki T, Kura F, Amemura-Maekawa J, et al. Neonatal sudden death due to legionella pneumophila associated with water birth in a domestic spa bath, J Clin Microbiol. 2003; 41(5):2227-9.

Downloaded from http://www.jri.ir

18- Su H P, Tseng L R, Chou C Y, Chung T C, Pan T M. Legionella pneumophila infection in the Taiwan area. J Infect Chemother. 2005;11(5):244-9.

19- Montagna M T, Napoli C, Tato D, Spilotros G, Barbuti G, Barbuti S. Clinical-environmental surveillance of legionellosis: an experience in southern Italy. Eur J Epidemiol. 2006;21(4):325-31.

20- Murdoch D R, Walford E J, Jennings L C, Light G j, Schouseboe M I, Chershsky AY, et al. Use the polymerase chain reaction to detect legionella DNA in urine and serum samples from patient with pneumonia. Clin Infect Dis. 1997;25(4):939.

21- Blazquez R M, Espinosa F J, Martinez-Toldos C M, Alemany L, Garcia-Orenes M C, Segovia M. Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large outbreak of Legionella pneumonia in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24(7): 488-91.

22- KO K S, Hong S K, Lee K H, Lee H K, Park M Y, Miyamoto H, et al. Detection and identification of legionella pneumophila by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). J Microbial Methods. 2003; 54:325-337.

۲۳- حسینی دوست سید رضا، سیل دیوید. جداسازی لژیونلا از سیستم آب بیمارستانها (بخشهای پیوند عضو). مجله پزشکی کوثر. سال سوم(۱۳۷۷)، شماره سوم، صفحات ۱۵۰-۱٤٥.

۲٤- خسرو شاهی نادر، موسویان مجتبی. جداسازی و تعیین هویت عوامل بیماری لژیونر از تجهیزات درمانی و منابع محیطی، مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی قزوین. ۱۳۸۲، شماره ۲۹، صفحات ۷٤-۷۰.

Downloaded from http://www.jri.ir