انجمن علمی قارچ شناسی پزشکی ایران

Iranian Society of Medical Mycology

مجموعه خلاصه پایان نامه های رشته قارچ شناسی پزشکی – مقطع PhD

نام دانشگاه:	**علوم پزشکی تهران**
عنوان پایان نامه:	**ردیابی آسپرژیلوس ها در نمونه های BAL با استفاده از روش های قارچ شناختی (آزمایش مستقیم و کشت) و روش های مولکولی (Nested-PCR و Real-time PCR) به منظور تشخیص سریع و دقیق آسپرژیلوزیس ریوی در بیماران مستعد**
نام استاد/ مشاور:	**دکتر سید حسین میرهندی** **دکتر پریوش کردبچه دکتر عبدالمجید فتی، دکتر ساسان صابر، دکتر Koichi Makimura**
نام دانشجو:	**حسین زرین فر**
تاریخ دفاع:	**۹۱/۴/۲۵**
مقطع تحصیلی:	**دکترای تخصصی (Ph.D.)**
پست الکترونیکی:	zarrinfarh@mums.ac.ir ; h.zarrin@gmail.com
شماره تماس:	**۰۵۱۱۸۴۰۳۱۴۱**

مقدمه:

عفونت های مهاجم قارچی ریوی به علت استفاده وسیع از آنتی بیوتیک ها و کورتیکو استروئیدها بخصوص در بیماران دارای بدخیمی های خونی، گیرندگان پیوند مغز استخوان، بیماران اتوایمیون و مصرف کنندگان کورتیکو استروئیدها، گیرندگان پیوند بافت سخت، بیماران بستری در بخش ICU و نیز دارای سرطان بافت سخت و به نسبت کمتر در بیماران دارای اختلالات ریوی تنفسی در حال افزایش است. از جمله این عفونت ها آسپرژیلوزیس ریوی مهاجم (IPA) است که توسط گونه های مختلف آسپرژیلوس به ویژه آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس ایجاد می گردد. اهداف این مطالعه عبارت بود از: بررسی امکان پایه ریزی تشخیص سریع، حساس و ویژه آسپرژیلوزیس ریوی (PA) در بیماران مستعد با استفاده از روش های قارچ شناختی (آزمایش مستقیم و کشت) و مولکولی (Nested-PCR و Real-time PCR) و نیز بررسی بروز عفونت های آسپرژیلوسی در گروه های مختلف بیماران مستعد. در این مطالعه برای پایه ریزی روش های مولکولی برای تشخیص آسپرژیلوزیس ریوی در ایران، چهار روش آزمایش مستقیم، کشت، Nested-PCR و Real-time PCR بر روی نمونه های لاواژ برونش ریوی (BAL) مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش ها:

۴۲۸ نمونه BAL در طی یک دوره ۱۶ ماهه از بیمارانی که برای برونکوسکوپی به بخش ریه بیمارستان شریعتی مراجعه کردند و نیز نمونه بیمارانی که به آزمایشگاه دانشکده بهداشت ارسال شده بودند، جمع آوری گردید. بعد از آماده سازی نمونه های BAL، ۱۵۰ میکرولیتر آن با افزودن پتاس ۲۰٪ مورد آزمایش مستقیم میکروسکوپی قرار گرفته و ۱۵۰ میکرولیتر نیز با تلقیح در محیط های کشت سابورودکستروز آگار ۴٪ و عصاره مغز و قلب آگار (BHI) جهت رشد قارچ ها بررسی شدند. برای ردیابی DNA آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس پس از هموژن کردن نمونه های BAL، ابتدا ۴ بار فریز-ذوب و خرد شده و سپس به روش فنل کلروفرم و تعداد معدودی هم با کیت NucliSENS، DNA استخراج و تخلیص گردید. در روش Nested-PCR از ژن هدف ITS1 در rDNA و در روش Real-time PCR با تکنیک TaqManاز ژن β-tubulin استفاده گردید. برای تهیه پلاسمیدها بعنوان استاندارد و بررسی کمی واکنش Real-time PCR از کلونینگ (TA cloning) استفاده گردید. برای اطمینان از صحت نتایج بدست آمده در روش های مولکولی، برخی از نتایج Nested-PCR و پلاسمیدها نیز تعیین توالی (Sequencing) شدند. حساسیت و ویژگی تست های PCR با استفاده از رقت های سریالی تهیه شده با اسپور و میسلیوم و نیز سوش های استاندارد تعیین گردید. برای شناسایی برخی مخمرهای رشد کرده در محیط کشت، DNA با استفاده از فیلتر FTA از کشت تازه استخراج شد و ناحیه ITS مخمرها با پرایمرهای عمومی ITS1 و ITS4 تقویت و پس از برش با آنزیم محدود الاثر MspI و بر حسب الگوی الکتروفورتیک محصولات RFLP، گونه مخمرها تعیین شد.

نتایج:

از بین ۴۲۸ نمونه مورد بررسی، ۲۱ مورد (۵٪) آزمایش مستقیم مثبت (۱۹ مورد میسلیوم با تیغه میانی و ۲ مورد میسلیوم بدون تیغه میانی)، ۶۱ مورد (۱۴/۲٪) کشت مثبت (۳۵ مورد آسپرژیلوس فلاووس، ۷ مورد آسپرژیلوس نایجر، ۶ مورد آسپرژیلوس فومیگاتوس، ۶ مورد آسپرژیلوس فلاووس/آسپرژیلوس نایجر (بصورت مخلوط)، ۱ مورد آسپرژیلوس ترئوس، ۳ مورد پنی سیلیوم، ۲ مورد رایزوپوس و ۱ مورد فوزاریوم)، ۷۳ مورد (۱۷٪) Real-time PCR مثبت و ۱۹۳ مورد (۴۵٪) Nested PCR مثبت شناسایی گردید. همچنین در آزمایش مستقیم ۸۱ مورد (۱۹٪) میسلیوم کاذب و در کشت ۶۶ مورد کاندیدا و ۹۰ مورد مخمر مشاهده گردید و در بررسی ۷۵ کلنی با روش PCR-RFLP، ۳۷ مورد (۴۹/۳٪) کاندیدا آلبیکنس، ۲۰ مورد (۲۶/۸٪) کاندیدا تروپیکالیس، ۱۲ مورد (۱۶٪) کاندیدا گلابراتا، ۴ مورد (۵/۳٪) کاندیدا کروزئی، ۱ مورد (۱/۳٪) کاندیدا پاراپسیلوزیس و ۱ مورد (۱/۳٪) کاندیدا پاراپسیلوزیس شناسایی گردید.

از بین ۲۲ نمونه (۱۹ نمونه BAL و ۳ نمونه بافت) دارای آزمایش مستقیم مثبت (میسلیوم با تیغه میانی)، در ۲۰ مورد کشت مثبت، ۱۷ مورد Nested-PCR مثبت و ۷ مورد Real-time PCR مثبت مشاهده گردید که با در نظر گرفتن موارد آزمایش مستقیم مثبت بعنوان استاندارد، حساسیت کشت ۹۱٪ ، Nested-PCR ۹۴٪ و Real-time PCR ۳۹٪ برآورد

گردید (بعلت در اختیار نداشتن DNA، بر روی ۴ نمونه تست های مولکولی انجام نشده). در این مطالعه میزان بروز آسپرژیلوزیس ریوی در دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان با انسیدانس ۲۷/۷٪ و بعد از آن در گیرندگان پیوند بافت سخت با انسیدانس ۲۵٪ نسبت به بقیه بیماران مستعد، بالاتر بود. شایع ترین عامل آسپرژیلوزیس ریوی یا کلنیزاسیون در بین گروه های مختلف بیماران آسپرژیلوس فلاووس تشخیص داده شد.

بحث:

در بین نمونه های دارای آزمایش مستقیم مثبت، ۱۱ مورد (۶۱٪) با هر دو روش کشت و Nested-PCR و ۶ مورد (۳۳٪) با هر سه روش کشت، Nested-PCR و Real-time PCR همخوانی داشتند. با توجه به حساسیت بیش از حد روش Nested-PCR و اینکه احتمالاً اسپورهای محیطی و کلنیزاسیون نیز موجب مثبت شدن شوند، این روش برای نمونه های BAL توصیه نمی شود هر چند ممکن است برای نمونه های استریل مثل سرم، خون و مایع مغزی نخاعی بسیار مفید باشد. از سویی دیگر با توجه به قابلیت بررسی کمی روش Real-time PCR، می توان با در نظر گرفتن موارد واقعاً مثبت (Proven) و نیز افراد سالم و با در نظر گرفتن وضعیت بالینی و زمینه ای بیماران آن را طوری اصلاح کرد که بتواند بصورت حساس تر و ویژه تری عمل نماید. با این حال، در یک بیمار با سرکوب ایمنی حتی نتیجه مثبت یک روش مولکولی با وجود منفی بودن دیگر روش های سنتی می تواند ارزشمند باشد. در این مطالعه بعد از آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر بعنوان دومین عامل در کشت شناسایی شد که بهتر است در تحقیقات آینده از روش های مولکولی نیز برای شناسایی آن استفاده کرد.

کلمات کلیدی: BAL، IPA، Nested-PCR، Real-time PCR، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس