

بررسی آلودگی با مایکوباکتریوم ها در ضایعات گرانولوم

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۶

خلاصه

مقدمه

گرانولوم آنولر یک ضایعه آماسی گرانولوماتوز با اتیولوژی نامشخص می باشد، ارتباط اتیولوژیک این بیماری با مایکوباکتریومها هنوز مورد بحث است، در این مطالعه توصیفی-مقطعی نمونه های گرانولوم آنولر از نظر آلودگی با مایکوباکتریومها بررسی شده اند.

روش کار

این مطالعه توصیفی - مقطعی به صورت گذشته نگر در بیمارستان امام رضا (ع) طی سالهای ۱۳۸۰-۸۴ انجام شده است. نمونه های پارافینه گرانولوم آنولر موجود در بایگانی بخش آسیب شناسی بیمارستان امام رضا (ع) جمع آوری و پروش PCR مولتی پلکس با پرایمرهای ۱۶۲ bp و ۱۲۳ bp به ترتیب برای مایکوباکتریوم به طور عمومی و توبرکولوزیس جستجو شدند، بر روی این نمونه ها رنگ آمیزی زیل نلسون انجام شد. اطلاعات بالینی از پرونده بیماران استخراج شد.

نتایج

۳۸ نمونه از بیماران (۳۱ زن و ۷ مرد) با متوسط سن ۴۲ سال مورد ارزیابی قرار گرفتند. شایعترین محل ضایعات فوقانی و شایعترین نمای آسیب شناسی آماس گرانولوماتوز لنفو هیستوسیتی با طرح اترستیسیل (فرم ناکامل) بود. در رنگ آمیزی زیل نلسون تمام نمونه ها از نظر باسیل اسید فاست منفی بود. با PCR در یک نمونه آمپلیفیکاسیون قطعه ۱۲۶ bp به همراه ۱۲۳ bp حاصل شد که بیانگر عفونت با مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بود. در این مورد ضایعات وسیع در تمام اندام فوقانی و خلف تنه وجود داشت و در آسیب شناسی دارای سلولهای ژانت فراوان (بر خلاف اشکال رایج بیماری) بود.

نتیجه گیری

عفونت با مایکوباکتریومها ممکن است همراه با برخی از انواع گرانولوم آنولر دیده شود.

کلمات کلیدی: گرانولوم آنولر، توبرکولوز، مایکوباکتریومها

- ۱ وحید مشایخی قویونلو*
- ۲ ناصر طیبی میبدی
- ۳ محمود محمودی
- ۴ کیارش قزوینی
- ۵ مهدی موزونی

۱- استادیار پوست، بیمارستان امام رضا (ع)، مشهد، ایران

۲- دانشیار آسیب شناسی، بیمارستان امام رضا (ع)، مشهد، ایران

۳- دانشیار ایمنولوژی دانشکده پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- استادیار میکروب شناسی بیمارستان قائم (عج)، مشهد، ایران

۵- دستیار آسیب شناسی، بیمارستان امام رضا (ع)، مشهد، ایران

*مشهد - بیمارستان امام رضا (ع)، گروه

پوست، مشهد، ایران

تلفن: ۸۰۲۲۴۹۰-۵۱۱-۹۸+

فاکس: ۸۵۲۵۰۰۸-۵۱۱-۹۸+

mashayekhiv@mums.ac.iremail:

مقدمه

گرانولوم آنولر^۱ یک ضایعه التهابی پوستی با اتیولوژی نامشخص است که اولین بار در سال ۱۸۹۵ شرح داده شد و سپس به عنوان یک بیماری جداگانه (مجزا) به وسیله رادکلیف - کروکر در ۱۹۰۲ تعریف شد (۱).

زمانی معتقد بودند که گرانولوم آنولر در ارتباط با توبرکلوزیس می باشد و حتی توبرکلوز را علت گرانولوم آنولر می دانستند، در ۵۰ سال گذشته این عقیده به نظر می رسد کم رنگ تر شد. مواردی از همراهی گرانولوم آنولر و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس گزارش شده است (۲). اخیراً دو مورد عفونت مایکوباکتریوم ها با نمای آسیب شناسی مشابه به گرانولوم آنولر و یک مورد گرانولوم آنولر منتشر همراه با لنفادنیت سلی گزارش شده است (۳). به طور معمول نمونه های پوستی گرانولوم آنولر برای عفونت با مایکوباکتریوم ها بررسی نمی شود. از آنجا که عفونت با مایکوباکتریوم ها (شامل مایکوباکتریومهای آتپیک) نماهای بالینی و آسیب شناسی بسیار متنوعی دارد و از طرفی همانند گرانولوم آنولر نمای اصلی تغییرات آسیب شناسی در این عفونتها آماس گرانولوماتوز می باشد، در این مطالعه برای روشن شدن نقش عفونتهای مایکوباکتریال در بیماران مبتلا به گرانولوم آنولر در منطقه ما نمونه های گرانولوم آنولر موجود در بایگانی بخش آسیب شناسی برای جستجو از نظر آلودگی با عفونتهای مایکوباکترال (توبرکلوز و آتپیک) با استفاده از روش PCR^۲ که روش با حساسیت قابل اعتمادی برای اغلب عفونتها است، انتخاب شدند.

روش کار

این مطالعه توصیفی - مقطعی به صورت گذشته نگر بر نمونه های گرانولوم آنولر موجود در دفاتر بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان امام رضا (ع) از سال ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۴ انجام گردید. تمام موارد بیوپسی پوست با تشخیص گرانولوم آنولر که طی مدت مذکور به بخش آسیب شناسی فرستاده شده بودند انتخاب گردیدند و بلوک پارافینی این موارد از آرشیو بخش جمع آوری شد. مشخصات بیمار شامل جنس، سن، محل ضایعه، محل

بیوپسی و شماره پرونده یادداشت گردید. پس از بازبینی اسلاید های موجود و تایید مجدد تشخیص بر اساس نمای بالینی و آسیب شناسی و تعیین نوع مورفولوژیک گرانولوم آنولر، برش ۵ میکرونی جهت رنگ آمیزی زیل نلسون و همچنین ۵ برش ۵ میکرونی برای PCR در شرایط استریل تهیه و در میکروتیوپ های استریل قرار داده شد. پس از پارافین زدایی و استخراج DNA^۳ از نمونه ها، PCR با استفاده از دو پرایمر ۱۶۲ و ۱۲۳ pb که اولی پرایمر عمومی مایکوباکتریومهاست و دومی مختص به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده به روش مولتی پکس PCR انجام گردید. سپس محصولات به دست آمده الکتروفورز گردید و نتایج PCR تفسیر شد. کنترل مثبت از نمونه بیوپسی پلور بیماری که کشت مایع پلور آن جهت مایکوباکتریوم توبرکلوز مثبت بود استفاده شد. به منظور کنترل آلودگی در مرحله استخراج DNA، برای هر ۶ نمونه بالینی یک کنترل منفی در مرحله استخراج DNA در نظر گرفته شد که فقط حاوی بافر TBE مورد استفاده در این مرحله بود، و همانند نمونه های کلینیکی، کلیه مراحل استخراج DNA، بر کنترل منفی نیز انجام می گرفت. در مرحله آزمایش PCR نیز برای هر ۶ نمونه کلینیکی یک کنترل منفی جهت کنترل و یک کنترل مثبت تعبیه شد. بنابراین در این پژوهش، اولاً در هر مرحله آزمایش PCR فقط ۶ نمونه کلینیکی مورد بررسی قرار می گرفت، و ثانیاً برای هر ۶ نمونه یک کنترل مثبت و دو کنترل منفی، که یکی از آنها از مرحله استخراج DNA همراه با نمونه ها بود، در نظر گرفته شد.

نتایج

دو مورد از بلوکها به علت عدم وجود بافت کافی از مطالعه حذف گردید، از ۳۸ نمونه باقیمانده ۳۱ مورد زن و ۷ مورد مرد و سن بیماران بین ۱۱-۷۰ سال، متوسط سن ۴۲ سال بود. محل ضایعات پوستی، به ترتیب شیوع در اندام فوقانی (۶۸/۴٪)، اندام تحتانی (۱۸/۴٪) و تنه (۱۳/۲٪) قرار داشت (جدول ۱). شایعترین نوع میکروسکوپی گرانولوم آنولر در این مطالعه فرم ناکامل یا انترستیسسیل (۷۶/۳٪) بود. دیگر اشکال میکروسکوپی نوع کامل (۸۵/۷٪)، نوع عمقی (۵/۲٪) و نوع توبرکلوئید (۲/۵٪) بودند (جدول ۲). در رنگ آمیزی زیل نلسون تمام نمونه ها از نظر باسیل اسیدفاست منفی بود.

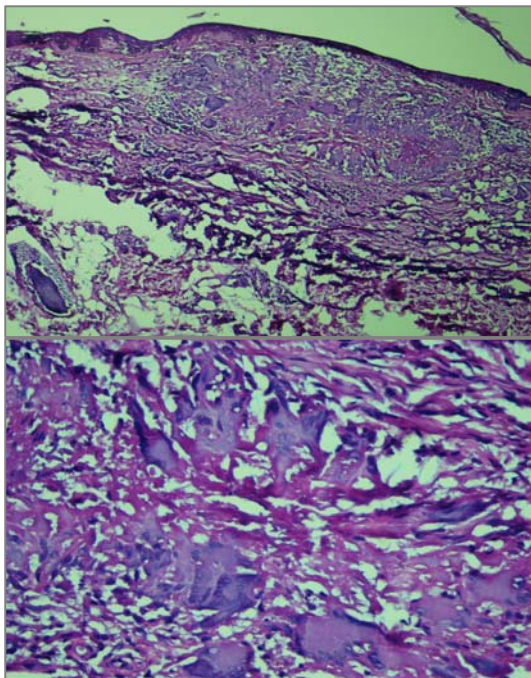
³ DeoxyriboNucleic Acid

¹ Granuloma annulare (GA)

² Polymerase chain reaction

نمونه مثبت مربوط به یک خانم ۴۷ ساله اهل روستای رحمت آباد تربت جام بود که بیمار مجدداً معاینه شد آزمایشات پاراکلینیکی و بیوپسی مجدد پوست برای انجام PCR و هیستولوژی روتین انجام شد. در معاینه بالینی پاپول و پلاکهای آنولار اریتماتو با حاشیه برجسته بر روی هر دو بازو و ساعد، پشت دستها و تمام خلف تنه وجود داشت (شکل ۲).

بیمار سابقه ای از سل نمی داد، گرافی ریه و سونوگرافی شکم طبیعی بود. اسمیر خلط و ادرار از نظر باسیل اسیدفست و نمونه برداری از پوست جهت بیماری قارچی منفی بود. ESR^۱ بیمار ۱۰ و تست PPD^۲ ۸ میلی متر بود و آزمایشات بیوشیمی طبیعی بودند و PCR مجدد از ضایعه پوستی باز هم وجود DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را اثبات کرد. آسیب شناسی نمونه پوستی آماس گرانوماتوز با کانونهای نسبتاً وسیع نکروبیوز در درم همراه با سلولهای ژانت فراوان نوع لانگهانس و جسم خارجی را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- نمای هیستولوژیک ضایعات بیمار مبتلا به گرانولوم آنولر که به وسیله PCR مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یافت شد. به وجود آماس گرانولوماتوز نکروبیوتیک با ژانت سلهای فراوان توجه فرمایید (هماتوکسیلین-ئوزین، درشت نمایی ۴۰ و ۴۰۰ برابر)

جدول ۱- فراوانی ضایعات گرانولوم آنولر

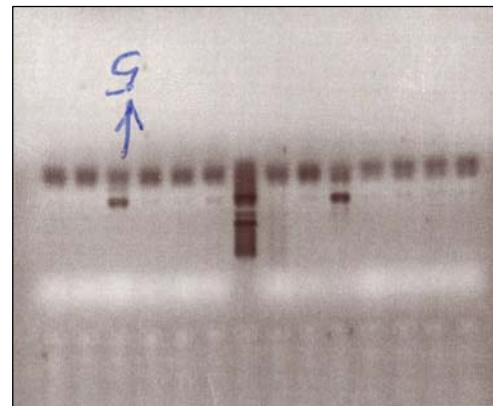
بر اساس محل ابتلا GA

محل ضایعه	تعداد	درصد
اندام فوقانی	۲۶	٪۶۸/۴۹
اندام تحتانی	۷	٪۱۸/۴۹
تنه	۵	٪۱۳/۲۹

جدول ۲- فراوانی انواع میکروسکوپی در ۳۸ مورد گرانولوم آنولر

نوع هیستوپاتولوژی آنولر	تعداد	درصد
کامل	۶	٪۱۵/۷
ناکامل یا انترستیسیل	۲۹	٪۷۶/۳۹
توبرکلونید	۲	٪۵/۲۹
	۱	٪۲/۶

نتایج PCR: در یک مورد DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش مولتی پلکس PCR که از دو پرایمر ۱۶۲ و ۱۲۳ bp استفاده گردید در نمونه بافتی بلوک پارانیه مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز نتیجه PCR از بلوک پارانیه نمونه شماره ۵ مثبت است



شکل ۲- نمای بالینی ضایعات در مورد گرانولوم آنولر که PCR از نظر DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مثبت شد

¹ Erythrocyte Sedimentation Rate

² Purified Protein Derivative (tuberculosis skin test)

از زمان شروع ضایعات تا نمونه گیری مجدد دو سال گذشته بود و بیمار پس از تشخیص اولیه گرانولوم آنولر تحت درمانهای رایج گرانولوم آنولر قرار گرفته بود ولی بیماری همچنان فعال باقیمانده و به تعداد ضایعات اضافه شده بود.

بحث

در این مطالعه برای ۳۸ مورد نمونه پوستی که با آسیب شناسی گرانولوم آنولر تشخیص داده شده بودند PCR به روش مولتی پلکس انجام شد و در یک مورد DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی گردید. در بقیه موارد نتایج رنگ آمیزی برای باسیلهای اسید فاست و PCR برای مایکوباکتریومهای آتپیک و توبرکلوزیس منفی بود.

ارتباط عفونتهای مایکوباکتریال با ضایعات گرانولوم آنولر و ضایعات پوستی با آسیب شناسی شبیه گرانولوم آنولر مکررا گزارش شده است. ولی جایگاه بررسی برای آلودگی با عفونتهای مایکوباکتریال در مبتلایان به گرانولوم آنولر هنوز روشن نیست. در سال ۲۰۰۱ فرارا^۱ و همکارانش یک زن ۴۵ ساله را معرفی کردند که دو سال پیش دچار ضایعات پاپولر بر روی صورت شده که به تدریج گسترش یافته و تمام صورت بیمار را درگیر کرده بود. تشخیص روزاسه^۲ در یک مرکز درمانی دیگر برای بیمار مطرح و براساس آن درمان شروع شده بود که نتیجه‌ای دربر نداشت. ضایعات متعدد پاپولر با قوام نسبتا سفت به رنگ قرمز تیره و در ناحیه پری اوربیتال به شکل پلاک در معاینه بیمار وجود داشته است. المان قارچی خاصی در بررسی پوسته‌های تراشیده از ضایعه مشاهده نگردیده بود. بیوپسی آماس گرانولوماتوز با نمای گرانولوم آنولر را نشان می داد، تست توبرکلین در این بیمار شدیداً مثبت بود. گرافی ریه و سونوگرافی شکم طبیعی گزارش شده و اسمیر و کشت خلط و ادرار بیمار از نظر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس منفی بود.

Nested-PCR بر بیوپسی بلوک پارافینی بیمار انجام شد که DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی گردید. ضایعات پوستی آن بیمار به داروهای ضد سل جواب داد (۴). در سال

۲۰۰۳ دکتر بار^۳ و همکارانش دو بیمار را معرفی کردند که دارای ضایعات پوستی با نمای هیستولوژی گرانولوم آنولر ناکامل بودند و در کشت از محل ضایعه مایکوباکتریوم مارینوم گزارش شده بود. یکی از این بیماران داروهای سرکوب کننده ایمنی به علت پیوند مغز استخوان مصرف می کرد و ضایعات پوستی به صورت ماکولو پاپولر قرمز رنگ در ناحیه حفره کوییتال راست داشت و دیگری بیماری بود که با آکواریوم سروکار داشت و دارای ضایعات پلاک مانند قرمز رنگ بر روی پشت دست راست بود (۵).

همچنین در یک بررسی که بر ۲۸ بیمار با عفونت پوستی با مایکوباکتریومهای غیر توبرکلوز انجام گردید، از ۱۸ مورد بیمار که سیستم ایمنی آنها سالم بود، ۱۵ مورد ضایعات پوستی گرانولوماتوز داشتند که ۱۰ مورد سارکوئیدال گرانولوما، ۳ مورد پالسادینگ گرانولوما^۴، یک مورد توبرکلوزید گرانولوما^۵ و ۱ مورد نمای مطابق گرانولوم آنولر داشت (۶).

در این مطالعه، نمونه ای که PCR آن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را نشان داد، مربوط به خانمی ۴۷ ساله دارای ضایعات پاپولر پراکنده در روی اندام فوقانی و پشت دست با طرح آنولر بود تشخیص های مطرح بالینی به ترتیب گرانولوم آنولر، لیکن پلان و درماتیت بودند. در بیوپسی گرانولوم نکروبیوتیک مشاهده گردیده بود و بیمار با تشخیص گرانولوم آنولر تحت درمان قرار گرفته بود ولی ضایعات پوستی بهبودی نداشتند. اگرچه نمای بالینی و هیستولوژیک این مورد بیش از تمام تشخیصهای افتراقی مطرح برای آن، با همان تشخیص گرانولوم آنولر مطابقت بیشتری دارد ولی در مقایسه با انواع معمول و رایج گرانولوم آنولر خصوصیات زیر در مورد این بیمار قابل توجه و متمایز است:

(۱) گسترش وسیعتر از معمول ضایعات

(۲) سیر طولانی و عدم پسرقت خودبخودی و یا با درمان بیماری

(۳) وجود تعداد زیادی ژانت سل در میان سلولهای آماسی

مرور گزارشهای دیگر از همراهی گرانولوم آنولر با عفونتهای مایکوباکتریال نشان می دهد که در بسیاری از این موارد یافته ای متمایز از انواع تیبیک گرانولوم آنولر وجود دارد. دو موردی که

³ Barr

⁴ Palisading granuloma

⁵ Tuberculoïd Granuloama

¹ Ferrara

² Rosacea

انجام گرفت. از طرفی از دو پرایمر bp ۱۶۲ و bp ۱۲۳ به روش مولتی پلکس استفاده شد که پرایمر bp ۱۶۲ برای تمام مایکوپلازماها و پرایمر bp ۱۲۳ مختص مایکوپلازما توبرکلوزیس بودند و مثبت شدن هر دو پرایمر احتمال مثبت حقیقی را افزایش می دهد. به علاوه نتایج به روی دو نمونه جداگانه از بیمار که با فاصله زمانی بیش از دو سال برداشته شد یکسان بود و این مسئله به اعتبار نتایج حاصله می افزاید.

وجود فقط یک مورد نتیجه مثبت برای عفونتهای مایکوپلازما در بین ۴۰ نمونه مورد ارزیابی تفسیر نتایج و ارائه یک نتیجه گیری قطعی را مشکل می کند. ولی با توجه به وجود خصوصیات ویژه بالینی و آسیب شناسی مذکور در این بیمار و موارد مشابه گزارش شده قبلی، به نظر می رسد جستجوی بیشتر برای یک عامل عفونی مانند مایکوپلازماها در مواردی از گرانولوم آنولر که نمای بالینی، سیر بالینی و یا آسیب شناسی ضایعات آن غیر معمول باشد، اندیکاسیون دارد.

نتیجه گیری

اگرچه آلودگی نمونه های گرانولوم آنولر با مایکوپلازماها بسیار نادر است ولی این ارگانیزم ها می توانند یکی از علل اشکال غیر معمول گرانولوم آنولر باشند.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که هزینه های انجام این طرح تحقیقاتی را متقبل شده است و همچنین از کارکنان آزمایشگاههای آسیب شناسی بیمارستان امام رضا و میکروشناسی بیمارستان قائم که در انجام آزمایشات ما را یاری نموده اند سپاسگذاری می گردد.

دکتر بار و همکارانش گزارش کردند یکی در زمینه نقص ایمنی بود و دیگری شرح حال تماس با آکواریوم داشت (۵). مورد دیگری که توسط هرون^۱ و همکارانش در سال ۲۰۰۴ گزارش گردید با علائم عمومی بشکل ضعف و خستگی، لنف آدنوپاتی گردنی و ضایعات وسیع در تنه و اندام فوقانی همراه بود (۳). از طرف دیگر موارد گرانولوم آنولر تیپیک همراه با توبرکلوز یا به دنبال واکنش با BCG نیز گزارش شده است که جستجوی DNA مایکوپلازماها در آنها منفی بوده است (۷، ۸). در این موارد گرانولوم آنولر را میتوان یک واکنش ایمنی سلولار به عفونت با مایکوپلازما توبرکلوزیس تلقی کرد و پاتوژنزی مشابه موارد معمول گرانولوم آنولر برای آن در نظر گرفت.

شناسایی DNA مایکوپلازما توبرکلوزیس توسط PCR ممکن است موارد مثبت و منفی کاذب داشته باشد. از جمله عواملی که ممکن است سبب نتایج منفی کاذب شود عدم نمونه برداری صحیح از ضایعه، تخریب مایکوپلازما توبرکلوزیس یا کم بودن تعداد مایکوپلازما توبرکلوزیس در ضایعه، عدم استخراج DNA از نمونه و وجود مهارکننده های بافتی و تغییرات ساختمان DNA به خصوص در بلوک های پارافینه می باشد (۹، ۱۰). در یک مطالعه حساسیت و اختصاصیت PCR برای تشخیص مایکوپلازما توبرکلوزیس در بافت تازه به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۳٪ بود (۱۱). از طرفی در مطالعه ای دیگر که بر بلوک های پارافینه انجام شده بود حساسیت PCR به روی بلوک های پارافینه ۵۳٪ گزارش شده است و در این مطالعه توصیه شده که برای انجام PCR بهتر است از بافت تازه جهت افزایش حساسیت این تست استفاده شود (۱۰).

در مطالعه حاضر برای هر پنج نمونه یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی در نظر گرفته شد و تا حد امکان تمام مراحل PCR و برش از بلوکهای پارافینی به صورت استریل جهت به حداقل رساندن آلودگی که ممکن است باعث نتیجه مثبت کاذب شود

¹ Herron

References:

- 1- Burns DA. Granuloma annulare. In: Burns T, Breathach, Cox N, Criffiths C. Rook's Textbook of dermatology. 7th ed . London: Blackwell science; 2004.p.57.109-119.
- 2- Winkelmann RK. The granuloma annulare phenotype and tuberculosis. J Am Acad dermatol 2002; 46:948-952.
- 3- Herron M, Florell S. Disseminated granuloma annulare accompanying mycobacterium tuberculosis lymphadenitis. Int J Dermatol 2004; 43: 961-963.
- 4- Ferrara G, Connone M, Scalvenzi M, Delfino M, Staibano S, De Rosa G, *et al.* Facial granulomatous diseases: a study of four cases tested for the presence of mycobacterium tuberculosis DNA using nested polymerase chain reaction. Am J Dermatopathol 2001; 23: 8-15.
- 5- Barr LK, Lowe L, Su LD, Lyndon D. mycobacterium marinum infection simulating interstitial granuloma annulare a report of two case annulare. Am J Dermatopathol 2003; 25:148-151.
- 6- Bartralot R, Pujol RM, Garcia-Patos V, Sitjas D, Martin-Casabona N, Coll P, *et al.* Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts. J Cutan Pathol 2000; 27:124-129.
- 7- Tsai T, Chen G-S, Lan L-H, Lan E. Cutaneous tuberculid clinically resembling generalized granuloma annulare. Clin Exp Dermatol 2007; 32:450-451.
- 8- Houcke-Bruge C, Delaporte E, Catteav B, Martin D, Lassoll E, Piette F. Granuloma annulare following BCG vaccination. Ann Dermatol Venereol 2001; 128:541-544.
- 9- Senturk N, Sahin S, Kocagoz T. Polymerase chain reaction in cutaneous tuberculosis: is it a reliable diagnostic method in paraffin - embedded tissues. Int J Dermatol 2002; 41: 863-866.
- 10- Park D, Kim J, Choi K, Lee J, Lee C, Sol M, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction with histopathologic features for diagnosis of tuberculosis in formalin - fixed, paraffin - embedded histologic specimens. Arch Pathol Lab Med 2003; 127:326-330.
- 11- Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Hossain MA, *et al.* Detection of mycobacterium tuberculosis in preserved tuberculous lymph nodes by polymerase chain reaction. Tohoku J Exp Med 1998; 184:123-131.