مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۵۹، شماره ۶
بهمن-اسفند ۹۵، صفحه ۲۷۲-۳۸۲

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 59, No. 6 P: 272-382
Nov-Dec 2016

مقاله اصلی

جدا سازی نوموسیستیس جیرووسی ازبیماران ریوی با یا بدون نقص ایمنی

(یک مطالعه مولکولی)

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۹/۰۱- تاریخ پذیرش:۹۵/۱۱/۱۰

بهاره عبداللهی۱
*فریبا رضائی طلب۲**
*عبدالمجید فتی۳**
داوود عطاران۴
محمد جواد نجف زاده۵ ویدا وکیلی۶
محمود پریان۱

۱ -کارشناس ارشد انگل شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

*۲-دانشیار گروه داخلی، بیمارستان امام رضا (ع) دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.(*معادل نویسنده اول)*

۳-استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۴- استاد گروه داخلی، بیمارستان قائم، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۵-دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۶-استاد یار گروه پزشکی اجتماعی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

** مرکز تحقیقات سالک جلدی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.*
تلفن: ۰۰۲۴۰۱-۳۸۰۰۲۴۰۱-۵۱-۹۸+

Email: FataA@mums.ac.ir

خلاصه

مقدمه :ذات الریه نوموسیستیکی ازجدی ترین عفونت های تهدید کننده زندگی در بیماران دارای ویروس نقص ایمنی اکتسابی می باشد.هم چنین می تواند در بیماران دچار سرکوب ایمنی که تحت درمان با داروهای کاهش دهنده ایمنی هستند رخ دهد. افراد با ایمنی سالم نیز می توانند ناقل نوموسیستیس جیرووسی باشند. هدف از این مطالعه بررسی وجود و فراوانی نوموسیستیس جیرووسی در بیماران ریوی بود.

روش کار:در این مطالعه توصیفی مقطعی از شهریور ۱۳۹۳ تا اردیبهشت ۱۳۹۴، ۱۳۸ نمونهBAL از بیماران تحت برونکوسکوپی مراجعه کننده به بخش های مختلف بیمارستان های دانشگاهی مشهد جمع آوری شد.رنگ آمیزی گیمسا و روش مولکولی برای هر نمونه انجام شد.پس از استخراج DNA ، تکثیر قطعه ژنیRNA ریبوزومی زیر واحد بزرگ میتوکندریایی(mtLSU-rRNA)مربوط به نوموسیستیس جیرووسیبا روشNested-PCR انجام شد. نتایج PCR جهت تایید قطعی تعیین توالی شدند.تحلیل داده ها با نرم افزار SPSS و آزمونهای کای اسکوئر[1] و تی[2]انجام شد.

نتایج :نوموسیستیس جیرووسی به وسیله آزمایش میکروسکوپی در ۳ نمونه (۲,۲٪) و به وسیله روش Nested-PCR در ۱۷ نمونه (۱۲,۳٪)یافت شد. در۱۰ (۲۵٪) بیماردچار نقص ایمنی و ۷ (۷,۱٪) بیمار دارای ایمنی کامل نوموسیستیس جیرووسی جداسازی شد.تب ، تنگی نفس و سرفه خشک شایع ترین علامتهای بالینی در بین بیماران دارای نوموسیستیس بودند.

نتیجه گیری:نوموسیستیس جیرووسی در بیماران ریوی دچار نقص ایمنی در مقایسه با افراد دارای ایمنی کامل شایع تر بود. بیماران با ایمنی کامل می توانند مخزن نوموسیستیس جیرووسی باشند و یک منبع مهم عفونت برای بیماران ریوی محسوب شوند.

کلمات کلیدی: نوموسیستیس جیرووسی ، مایع حاصل از شستشوی برونش (BAL) ، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ، ذات الریه نوموسیستی(PCP)

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

[1] chi-square

[2] T-test

مقدمه

با افزایش طیف ارگانیسم های مسبب عفونت تعداد بیماران ریوی نیز افزایش یافته است(۱). نوموسیستیس جیرووسی که قبلا نوموسیستیس کارینی نامیده می شد در غبار های موجود در هوا یافت می شود و می تواند از طریق استنشاق به دیگر افراد منتقل گردد(۳،۲). بسیاری از مردم دارای شواهد سرولوژیکی آلودگی به آن در طی دوران کودکی می باشند(۴).نوموسیستیس جیرووسی یکی از علل شایع عفونت های تنفسی در افراد آلوده به ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV) است و می تواند منجر به ذات الریه نوموسیستوزی (PCP) گردد(۶،۵). در دسترس بودن درمان ضد رتروویروسی و پروفیلاکسی علیه این بیماری میزان مرگ ومیر بیماران +HIV دچار پنومونی نوموسیستیس را کاهش داده است(۷). ذات الریه نوموسیستی (PCP) می تواند در دیگر گروه های نقص سیستم ایمنی شامل بیماران دچار بدخیمی های خون و مصرف کنندگان داروهای سرکوب گر سیستم ایمنی رخ دهد(۸). PCP در افراد با ایمنی کامل نیز اتفاق می افتد (۹). کلونیزاسیون نوموسیستیس در افراد سالم و در بیمارانی با بیماریهای ریوی مختلف دیده می شود (۱۰, ۱۱). علاقه به کلونیزه شدن یک گام مهم در سیکل زندگی این ارگانیسم است(۱۲). مقدار کم نوموسیستیس در ریه زمینه التهاب را فراهم می کند و در توسعه و گسترش بیماری های ریوی نقش دارد(۱۳).

ارزیابی بیمار های ریوی نیازمند تشخیص افتراقی علل مختلف بیماری ها به خصوص در افراد دچار نقص ایمنی است و نیازمند تهیه مناسب ترین نمونه و بهترین روش آزمایش می باشد(۱۴). نمونه خلط ومایع حاصل از شستشوی برونش(BAL) بهترین نمونه ها جهت تشخیص نوموسیستیس جیرووسی می باشند(۱۲). واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) امکان تشخیص مقادیر کم DNA را فراهم می کند(۶).

در مطالعات مختلف انجام شده در سایر نقاط جهان نوموسیستیس در افراد با ایمنی سالم اما مبتلا به بیماریهای مختلف ریه وجود داشته است(۱۵). در ایران مطالعات محدودی در زمینه ارائه فراوانی نوموسیستیس جیرووسی در جامعه بیماران ریوی وجود دارد.هدف از این مطالعه جدا سازی نوموسیستیس جیرووسی از بیماران ریوی با یا بدون نقص ایمنی در بیمارستان های دانشگاهی مشهد طی سالهای ۱۳۹۴-۱۳۹۳ است.

روش کار

این مطالعه توصیفی مقطعی بر بیماران ریوی مراجعه کننده به بیمارستان های دانشگاهی مشهد شامل بیمارستان امام رضا (ع) و قائم(عج)مشهد انجام شد. در این پژوهش بیماران با اختلالات ریوی دارای اندیکاسیون برونکو آلوئولار لاواژ از شهریور ۱۳۹۳ تا اردیبهشت ۱۳۹۴ وارد مطالعه شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل نداشتن رضایت آگاهانه، استفاده از داروهای ضد میکروبی مانند تریمتوپریم سولفامتوکسازول ، پنتامیدین، آتوواکون، داپسون،پریمتامین و تری مترکسات در طی ۲ ماه گذشته که بر نوموسیستیس اثر کشندگی دارند. پرسشنامه برای تمامی بیماران تهیه شد. اطلاعاتی مانند سن،جنس، وضعیت بیمار (بستری- غیر بستری) ، استفاده از مواد مخدر، نوع بیماری زمینه ای ، وجود یا عدم وجود دیابت بررسی شد و نیز علایم بالینی و نوع داروی مصرفی به دست آمد.بر اساس این اطلاعات بیماران در دو گروه دچار نقص ایمنی و دارای ایمنی تقسیم شدند.بیماران پیوندی، +HIV، دچار بدخیمی، دریافت کنندگان داروهای کورتیکواستروئیدی در گروه بیماران دچار نقص یا کاهش ایمنی قرار گرفتند.۱۳۸ نمونه BAL از بیماران که توسط پزشک متخصص داخلی(ریه) برونکوسکوپی شده بودند جمع آوری شد.

برای هر بیمار۱۰ml-۱۵ نمونه BAL تهیه و به آزمایشگاه قارچ شناسی بیمارستان امام رضا (ع) ارسال شد.از رسوب نمونه های BAL اسمیر تهیه و رنگ امیزی گیمسا انجام شد. باقی مانده رسوب در۲۰°C- نگهداری گردید. جهت استخراج DNA ازکیت PrimePrep Genomic DNA Isolation Kit from Tissue(مارکGenet Bio ، ساخت کره) استفاده شد. ازکیت PrimePrep Genomic DNA Isolation Kit from Tissueاستفاده شد.

از پرایمرهای PaZ102-E و PaZ102-Hدر مرحله اول و از پرایمرهایPaZ102-X و PaZ102Yدر مرحله دوم تکثیر

استفاده شد.میکروتیوب های PCR در ترموسایکلر ۲۷۲۰ قرار داده شدند.

محصولات PCRپس از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱,۲٪ حاوی ماده رنگ زای روبوس جهت مشاهده قطعه ۲۶۰bpمربوط به ژن mtLSU-rRNA نوموسیستیس جیرووسی با استفاده از UV ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند.

محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران در تهران ارسال گردید.

تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارspss و آزمون های کای اسکوئر و تی صورت گرفت. سطح معناداری کمتر از ۰,۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه ۱۳۸ بیمار شامل ۶۷ مرد (۴۸,۶٪)و ۷۱ زن(۵۱,۴٪)، در بازه سنی ۱۶-۹۵ سال و میانگین سن ۱۶,۵۸±۵۷,۰۶ تحت برونکوسکوپی قرار گرفتند (جدول شماره۱).

جدول شماره۱-توزیع فراوانی گروه های سنی به تفکیک جنس در کل بیماران ریوی و بیماران دارای نوموسیستیس در بیمارستان های قائم و امام رضا(ع)-۱۳۹۳-۹۴

گروه های سنی (سال)	کل بیماران			بیماران دارای نوموسیستیس		
	مرد	زن	مجموع	مرد	زن	مجموع
۱۶-۳۰	۲	۵	۷	۱	۱	۲
۳۱-۴۵	۱۹	۷	۲۶	۳	۰	۳
۴۶-۶۰	۲۵	۲۳	۴۸	۲	۲	۴
۶۱-۷۵	۱۴	۲۲	۳۶	۳	۱	۴
۷۵-۹۰	۷	۱۲	۱۹	۱	۳	۴
>۹۱	۰	۲	۲	۰	۰	۰

تعداد ۱۰۹ نفر (٪۷۹) مراجعه کنندگان به بخش برونکوسکوپی بستری و۲۹ نفر(٪۲۱) آنها مراجعه سرپایی داشتند.

در(جدول شماره ۲)بخش های بستری بیماران نشان داده شده است.

تعداد ۴۰ نفر (۲۸,۹٪) از بیماران ریوی دارای نوعی نقص ایمنی بودند.

جدول شماره ۲-توزیع فراوانی بیماران ریوی و بیماران دارای نوموسیستیس

بخش بستری	کل بیماران		بیماران دارای نوموسیستیس	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
ریه	۳۱	۲۸,٤	۳	۲۱,۵
ICU	۲۳	۲۱,۱	۳	۲۱,۵
جنرال	۱۳	۱۱,۹	۲	۱٤,۳
عفونی	۱۰	۹,۲	۳	۲۱,۵
اورژانس	۸	۷,۳	۱	۷,۱
نفرولوژی	۸	۷,۳	۱	۷,۱
روماتولوژی	٦	۵,۵	۱	۷,۱
گوارش	٤	۳,۷	۰	۰
هماتولوژی	۲	۱,۸	۰	۰
سایر بخش ها	٤	۳,۷	۰	۰

با روش رنگ آمیزی گیمسا در ۳ بیمار (۲,۲٪) و به وسیله روش Nested-PCR در ۱۷ بیمار (۱۲,۳٪) نوموسیستیس یافت شد. نتایج به دست آمده از تعیین توالی قطعه ژنیmtLSU-rRNA ، مربوط به نوموسیستیس جیرووسی بود.

ارتباط معنی داری بین سن (PV=۰,۵)، جنس(PV=۰,۳)،وضعیت بستری یا غیر بستری بودن(PV=۰,۷) و بخش بستری(PV=۰,۸) با وجود نوموسیستیس جیرووسی مشاهده نشد.

در بین علایم بالینی سرفه، تنگی نفس، تب از شایع ترین علایم بودند .در بین علایم بیماری تفاوت بارز در نوع سرفه در گروه بیماران عادی ریوی و بیماران با آلودگی به نوموسیستیس وجود داشت ، به گونه ای که ۷ نفر (۴۱,۱٪) از ۱۷ بیمار دارای نوموسیستیس سرفه های خشک داشتندکه این تفاوت از نظر آماری معنادار بود (PV=۰,۰۲). علایم بالینی درکل بیماران و بیماران دارای نوموسیستیس در جدول شماره۳ نشان داده شده است.

جدول شماره۳-توزیع فراوانی علایم بالینی در بیماران ریوی و بیماران دارای نوموسیستیس در بیمارستان های قائم و امام رضا(ع)-۱۳۹۳-۹۴

علایم بالینی	کل بیماران		بیماران دارای نوموسیستیس	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
سرفه خلط دار	۷۴	۵۳,۶	۵	۲۹,۴
سرفه خشک	۲۵	۱۸,۱	۷	۴۱,۲
تنگی نفس	۹۸	۷۱,۱	۹	۵۲,۹
تب	۶۶	۴۷,۸	۱۰	۵۸,۸
کاهش وزن	۴۳	۳۱,۲	۴	۲۳,۵
تعریق شبانه	۲۵	۱۸,۱	۵	۲۹,۴
جمع بیماران	۱۳۸	۱۰۰	۱۷	۱۰۰

در میان بیماران پنج نفر غیر ایرانی (۳,۶٪) حضور داشتند که دو نفر (۴۰٪) آنها دارای نوموسیستیس بودند.این ارتباط از نظر آماری معنادار بود (PV=۰,۰۵).

از ۴۰ بیمار دچار نقص یا کاهش ایمنی ۱۰ نفر (۲۵٪) و از ۹۸ بیمار فاقد نقص ایمنی۷ نفر (۷,۱ ٪) دارای قارچ نوموسیستیس در ریه بودند.ارتباط معنی داری بین گروه بیماران دارای نقص ایمنی با وجود نوموسیستیس یافت شد(PV=۰,۰۰۱).در جدول شماره ۴ توزیع بیماران از نظر نوع نقص ایمنی نشان داده شده است.

جدول شماره ۴- توزیع فراوانی نقص یا کاهش ایمنی در بیماران ریوی و بیماران دارای نوموسیستیس

در بیمارستان های قائم و امام رضا(ع)-۱۳۹۳-۹۴

	بیماران بانقص ایمنی		کل بیماران		بیماران دارای نوموسیستیس
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
مصرفداروهایکورتیکواستروئیدی	۱۳	۹,٤	۵	۲۹,٤	
بدخیمی	۱۹	۱۳,۷	۱	۵,۸	
پیوند عضو	۷	۵,۲	۳	۱۷,٦	
مثبتHIV	۱	۰,۷	۱	۵,۹	

نوموسیستیس جیرووسی در ۳ نفر (٪۴۳) از افراد پیوندی مورد مطالعه، ۱ نفر بیمار+HIV (۱۰۰٪)، ۱ نفر(۵,۲٪) از بیماران دارای بدخیمی و ۵ نفر (۳۸٪) از بیماران مصرف کننده کورتیکواستروئیدها در گروه بیماران نقص ایمنی یافت شد. ارتباط معنی داری در گروه پیوندشدگان عضو(PV=۰,۰۱) و مصرف کنندگان داروهای کورتیکواستروئیدی(PV=۰,۰۰۳) با وجود نوموسیستیس یافت شد.در گروه بیماران دارای بدخیمی این ارتباط از نظر آماری معنادار نبود (PV=۰,۵).

در میان ۱۳۸ بیمارریوی ۳۲ نفر (۲۳,۲٪) دیابتی بودند که نوموسیستیس در شش نفر آنها (٪۱۸,۸) یافت شد. این ارتباط از نظر آماری معنادار نبود (PV=۰,۲). تعداد ۵۱ بیمار(٪۳۷,۸) از مواد تدخینی و مخدر استفاده می کردند که پنج نفر (۲۹,۴٪) آنها دارای نوموسیستیس بودند.این ارتباط از نظر آماری معنادار نبود (PV=۰,۴).

بحث:

این تحقیق بر۱۳۸ بیمار ریوی که همگی اندیکاسیون شستشوی برونش را داشتندو اکثر آن ها در بخش های مختلف بیمارستان بستری و تعدادی نیز بیمار سر پایی بودند صورت گرفت.

روش استاندارد تشخیص ذات الریه نوموسیستوزی (PCP) بر اساس مشاهده میکروسکوپی قارچ در نمونه های ریوی بنا شده است. از رنگ هایی مانند گیمسا ،گوموری ،تولوئیدن بلو جهت رنگ آمیزی اسمیر تهیه شده از نمونه ها استفاده می شود(۶).روش های مولکولی جدیدی مانند واکنش زنجیره ای پلیمراز توسعه یافته است(۱۶).درمطالعه انجام شده ، به وسیله

رنگ آمیزی گیمسا در ۳ بیمار(٪۲,۲) نوموسیستیس یافت شد که مربوط به بیماران دچار نقص یا کاهش ایمنی بود و به وسیله متد Nested-PCR، ۱۷ بیمار(٪۱۲,۳) دارای آلودگی نوموسیستیس بودند. تیا[1] وهمکاران با مقایسه روشهای رنگ آمیزی معمول،روش متداول PCR و Nested-PCR به این نتیجه رسیدند که متد Nested-PCR می تواند DNAنوموسیستیس جیرووسی را به میزان بیشتری در افراد +HIV نسبت به افراد-HIV تشخیص دهد(۱۷).در پژوهش ژاربوی[2]و همکاران بر بیماران دچار نقص یا کاهش ایمنی با روش های رنگ آمیزی ، ایمنوفلورسانس (IFA) ،-Single PCR وNested-PCR متدهای PCR بسیار حساس معرفی شد و متد Nested-PCR به عنوان تکنیک قوی جهت تشخیص روتین نوموسیستیس جیرووسی در آزمایشگاه های بالینی معرفی شد(۱۸). متد Nested-PCRدر مطالعه اوزکوچ [3]و همکاران نسبت به متد های دیگر برتر اعلام شد(۱۰). ابوعلی قله داری و همکاران از این روش به عنوان روش قابل اعتماد برای تشخیص نوموسیستیس جیرووسی در بین بیماران یاد کردند در حالی که روش رنگ امیزی متنامین سیلور دارای حساسیت کمتری است (۱۹). در مطالعات دیگر Nested-PCR نسبت به متدهای رنگ آمیزی دارای حساسیت و اختصاصیت بیشتری می باشد(۲۰, ۲۱). اگرچه پیترز[4]و همکاران بیان کردند که تشخیص نوموسیستیس جیرووسی در بیماران سالم با روش متد PCR نسبت به سایر متدهای رنگ آمیزی دارای مزیت بیشتر نمی باشد(۲۲).

هر چند علایم بالینی بین بیماران ریوی معمول و بیمارانی که آلودگی به نوموسیستیس داشتند غالبا مشابه بود ولی تفاوت نوع سرفه خلط دار(پروداکتیو) و خشک در دو گروه کاملا مشخص و معنی دار بود.

در پژوهش انجام شده، نوموسیستیس جیرووسی در۱۰ بیمار(٪۲۵) ازمیان ۴۰ بیمار دچار نقص یا کاهش ایمنی یافت شد. اختلاف معنی داری بین این گروه از بیماران و وجود نوموسیستیس مشاهده شد.در این بیماران به دلیل نقص یا سرکوب ایمنی به وجود آمده در سیستم ایمنی شرایط جهت جایگزینی و تکثیر ارگانیسم فراهم می شود و در صورت فعال شدن، ذات الریه نوموسیستوزی (PCP) ایجاد می شود. در مطالعه نوز[5]و همکاران ۲۰٪ بیماران دچار سرکوب ایمنی متوسط تا شدید دارای نوموسیستیس جیرووسی بودند و هیچ کدام از بیماران PCP را نشان ندادند(۲۳).ویسکانتی[6] و همکاران در بررسی ۷۸ بیمار دچار سرکوب ایمنی نشان دادند که ۲,۵٪ بیماران دارای نوموسیستیس می باشند. لازم به ذکر است در این مطالعه استخراج DNA انجام نشد و تنها از پروتئیناز K استفاده شد(۲۴). با مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعات قبلی می توان گفت ضرورتا تمام افراد دارای نقص ایمنی به نوموسیستیس جیرووسی آلوده نمی شوند.

دراین بررسی یک بیمار +HIV دربین بیماران وجود داشت و دارای نوموسیستیس جیرووسی در ریه بود.لازم است به این گروه از بیماران توجه بیشتری گردد. در ۴۳٪ افراد پیوندی و ۳۸٪ افراد مصرف کننده داروهای کورتیکواستروئیدی این قارچ یافت شد.ارتباط معنی داری در گروه پیوندشدگان عضوو مصرف کنندگان داروهای کورتیکواستروئیدی با وجود نوموسیستیس یافت شد.بیماران دریافت کننده داروهای سرکوب گر ایمنی مانند پیوندشدگان عضو در معرض خطر کلونیزاسیون و عفونت توسط نوموسیستیس می باشند. کورتیکواستروئیدها با ایجاد تغییر در سورفکتانت سلول ها کلونیزاسیون را تسهیل می کنند(۱۳). در مطالعه ماسکل[7] و همکاران

[1] Tia

[2] Jarboui

[3] Özkoç

[4] Peters

[5] Nevez

[6] Visconti

[7] Maskell

۴۴٪ افراد دریافت کننده گلوکورتیکوئید دارای نوموسیستیس جیرووسی بودند در حالی که در بین افرادی که گلوکورتیکوئید دریافت نمی کردند ۱۲٪ دارای این قارچ بودند(۱۶).در تحقیق دیگری هل وگ[1] و همکاران خود نشان دادند که ۷۵٪ بیماران دارای آلودگی نوموسیستیس کسانی بودند که کورتیکواستروئید دریافت می کردند(۲۵).در مطالعه پیام طبرسی و همکاران با گزارش دو بیمار دچار PCP با سابقه مصرف کورتیکواستروئیدها به طور ناصحیح ، ضرورت استفاده صحیح و مناسب از استروئیدها را جهت جلوگیری از عفونت های ناخواسته راپیشنهاد نمودند(۲۶).مطالعات فوق با نتایج این تحقیق بسیار شبیه است . اگرچه در مطالعه خلیفه[2] و همکاران کورتیکوتراپی به عنوان ریسک فاکتور مطرح نشده است(۲۷).

در پژوهش حاضر،DNA نوموسیستیس جیرووسی در ۷ بیمار (۷,۱٪) از ۹۸ بیمار دارای ایمنی سالم یافت شد. افراد با ایمنی سالم ممکن است به طور کوتاه مدت دچار عفونت شوند که می تواند به دیگر افراد سالم نیز منتقل شود و عفونت گذرا اتفاق بیفتد . به طور مثال نوزادان می توانند عفونت اولیه را توسعه دهند و افراد با نقص ایمنی ، افراد مستعد می توانند آلوده شوند و PCP را گسترش دهند. افراد سالم به عنوان یک مخزن بالقوه هستند و منبع عفونت انسانی برای گونه های نوموسیستیس می باشند(۱۵). این مطالعه نشان می دهد نوموسیستیس جیرووسی در افراد سالم دچار بیماریهای ریوی مختلف می تواند وجود داشته باشد و خطر توسعه PCP وجود دارد اما این میزان درصد ، درصد بالایی نمی باشد. در مطالعه اوز کوچ[3] و همکاران با بررسی ۲۷ بیمار با ایمنی سالم، نوموسیستیس در ۱۸,۵٪ بیماران سالم از نظر ایمنی یافت شد(۱۰).با بررسی ۲۲۵ بیمار با ایمنی سالم توسط دیمونت[4] و همکاران در ۲۱,۸٪ بیماران این قارچ مشخص شد.آنها در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که این ارگانیسم به طور مکرر در افراد با ایمنی سالم در جامعه دیده می شود(۲۸).در مطالعه مدرانو[5]وهمکاران DNA نوموسیستیس در ۱۲ مورد (۲۰٪) از ۵۰ نمونه شستشوی نازوفارنکس از افراد سالم بدون بیماری ریوی زمینه ای یا بدون سرکوب ایمنی شناسایی شد.این مطالعه نشان داد که حمعیت عمومی منبع و مخزن عفونت می توانند باشند(۱۵).

در مطالعه حاضر با بررسی ۳۲ بیمار دیابتی تحت برونکوسکوپی، نوموسیستیس جیرووسی در ۶ بیمار (۱۸,۸٪) با متد Nested-PCR تشخیص داده شد. بالا بودن قند خون باعث کاهش قدرت دفاعی بدن در مقابل عفونت ها می گردد. از طرف دیگر میزان قند بالاتر در خون زمینه برداشت و استفاده بیشتر از آن را توسط میکروارگانیسم های فرصت طلب فراهم می کند. بنابراین لازم است به این عامل زمینه ای توجهه بیشتری گردد.در مطالعه کن سانو[6] و همکاران در فردی ۷۶ ساله که در بیمارستان تحت درمان تیپ II دیابت ملیتوس بود نوموسیستیس جیرووسی را گزارش کردند(۲۹). در مطالعه فتی و همکاران با بررسی ۱۶ بیمار دیابتی تحت برونکوسکوپی، نوموسیستیس جیرووسی در ۳ بیمار (۱۸,۸٪) گزارش شد که نتایج آن با نتایج پژوهش فعلی منطبق است(۳۰). بنابراین لازم است بیماران دیابتی از نظر این ارگانیسم نیز مورد توجه قرار گیرند.

نتیجه گیری

نوموسیستیس جیرووسی ارگانیسمی با اهمیت بالینی بسیار زیاد می باشدکه از بیماران ریوی در مشهد جداسازی شده است.این قارچ در بیماران دچار نقص ایمنی در مقایسه با افراد دارای ایمنی کامل شایع تر است. بیماران پیوندی و مصرف کننده های داروهای کورتیکواستروئیدی در معرض خطر ذات الریه نوموسیستی می باشند. لازم است آلودگی به نوموسیستیس جیرووسی در بیماران ریوی مختلف مورد توجه قرار گیرد . بیماران با ایمنی کامل می توانند مخزن نوموسیستیس جیرووسی باشند و یک منبع مهم عفونت برای بیماران ریوی محسوب شوند.در بیماران با ایمنی مطلوب لازم است به دیگر

[1] Helweg

[2] Khalife

[3] Özkoç

[4] Dimonte

[5] Medrano

[6] Kensanno

عوامل زمینه ساز مانند دیابت توجهه بیشتری گردد. آزمایش مستقیم روش مناسبی برای تشخیص نوموسیستیس نمی باشد و آزمایش مولکولی دارای حساسیت بسیاربیشتری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل ازپایان نامه و طرح پژوهشی کد۹۳۰۸۰۱ با همکاری کمیته پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است.

نویسندگان بر خود لازم می دانند از کمیته پژوهشی جهت تصویب و حمایت مالی تشکرکنند. هم چنین نویسندگان ازهمکاری های ارزنده ی سرکار خانم دکتر مهناز امینی و سرکار خانم دکتر لیدا جراحی در این پژوهش سپاسگزارند.

References

1. Chazan R. Contemporary clinical diagnostics of respiratory tract infections. Pol Merkur Lekarski 2011; 30:316-9.
2. Cushion MT, Harmsen A, Matsumoto Y, Stringer JR, Wakefield AE, Yamada M. Recent advances in the biology of Pneumocystis carinii. J Med Vet Mycol 1994; 32:217-28.
3. Wakefield AE. DNA sequences identical to Pneumocystis carinii f. sp. carinii and Pneumocystis carinii f. sp. hominis in samples of air spora. J Clin Microbiol 1996; 34:1754-9.
4. Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, et al. High seroprevalence of Pneumocystis infection in Spanish children. Clin Microbiol Infect 2004; 10:1029-31.
5. Lowe DM, Rangaka MX, Gordon F, James CD, Miller RF. Pneumocystis jirovecii pneumonia in tropical and low and middle income countries: a systematic review and meta-regression. PloS One 2013; 8:e69969.
6. Wilson JW, Limper AH, Grys TE, Karre T, Wengenack NL, Binnicker MJ. Pneumocystis jirovecii testing by real-time polymerase chain reaction and direct examination among immunocompetent and immunosuppressed patient groups and correlation to disease specificity. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 69:145-52.
7. Thomas CF Jr, Limper AH. Pneumocystis pneumonia. N Engl J Med 2004; 350:2487-98.
8. Sowden E, Carmichael AJ. Autoimmune inflammatory disorders, systemic corticosteroids and pneumocystis pneumonia: a strategy for prevention. BMC Infect Dis 2004; 4:42.
9. Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H. New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of Pneumocystis carinii pneumonia. JAMA 2001; 286:2450-60.
10. Ozkoc S, Bayram Delibas S. Investigation of Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization in iatrogenically immunosuppressed and immunocompetent patients. Mikrobiyol Bul 2015; 49:221-30.
11. Khodadadi H, Mirhendi H, Mohebali M, Kordbacheh P, Zarrinfar H, Makimura K. Pneumocystis jirovecii colonization in non-HIV-infected patients based on nested-PCR detection in bronchoalveolar lavage samples. Iran J Public Health 2013; 42:298-305.
12. Morris A, Norris KA. Colonization by Pneumocystis jirovecii and its role in disease. Clin Microbiol Rev 2012; 25:297-317.
13. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of pneumocystis colonization. J Infect Dis 2008; 197:10-7.
14. Shelhamer JH, Gill VJ, Quinn TC, Crawford SW, Kovacs JA, Masur H, et al. The laboratory evaluation of opportunistic pulmonary infections. Ann Intern Med 1996; 124:585-99.
15. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. Pneumocystis jirovecii in general population. Emerg Infect Dis 2005; 11:245-50.
16. Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JC, Wakefield AE, Miller RF, et al. Asymptomatic carriage of Pneumocystis jiroveci in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. Thorax 2003; 58:594-7.
17. Tia T, Putaporntip C, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S. A highly sensitive novel PCR assay for detection of Pneumocystis jirovecii DNA in bronchoalveloar lavage specimens from immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect 2012; 18:598-603.
18. Jarboui MA, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, Ben Arab N, et al. Molecular diagnosis of Pneumocystis jiroveci pneumonia in immunocompromised patients. Mycoses 2010; 53:329-33.
19. Aboualigalehdari E, Zarei Mahmoudabadi A, Fatahinia M, Idani E. The prevalence of Pneumocystis jirovecii among patients with different chronic pulmonary disorders in Ahvaz, Iran. Iran J Microbiol 2015; 7:333-7.
20. Parian M, Fata A, Najafzadeh MJ, Rezaeitalab F. Molecular detection of Pneumocystis jirovecii using polymerase chain reaction in immunocompromised patients with pulmonary disorders in northeast of Iran. Curr Med Mycol 2015; 1:13-8.
21. Badiee P. Evaluation of pneumocystis jirovecii in normal population. Jundishapur J Microbiol 2013; 4:89588525.
22. Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for Pneumocystis carinii in post-mortem lungs by DNA amplification. J Pathol 1992; 166:195-8.

23. Nevez G, Jounieaux V, Linas MD, Guyot K, Leophonte P, Massip P, et al. High frequency of Pneumocystis carinii sp.f. hominis colonization in HIV-negative patients. J Eukaryot Microbiol 1997; 44:36S.
24. Visconti E, Marinaci S, Zolfo M, Mencarini P, Tamburrini E, Pagliari G, et al. Very low frequence of Pneumocystis carinii DNA detection by PCR in specimens from patients with lung damage. J Clin Microbiol 2000; 38:1307-8.
25. Helweg-Larsen J, Jensen JS, Dohn B, Benfield TL, Lundgren B. Detection of Pneumocystis DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia--a case-control study. BMC Infect Dis 2002; 2:28.
26. Tabarsi P, Mirsaeidi M, Amiri M, Karimi S, Masjedi MR, Mansouri D. Inappropriate use of steroid and pneumocystis jiroveci pneumonia: report of two cases. East Mediterr Health J 2008; 14:1217-21.
27. Khalife S, Aliouat EM, Aliouat-Denis CM, Gantois N, Devos P, Mallat H, et al. First data on Pneumocystis jirovecii colonization in patients with respiratory diseases in North Lebanon. New Microbes New Infect 2015; 6:11-4.
28. Dimonte S, Berrilli F, D'Orazi C, D'Alfonso R, Placco F, Bordi E, et al. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of Pneumocystis jirovecii from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. Infect Genet Evol 2013; 14:68-72.
29. Sanno K, Hatanaka N, Yamagishi T, Kamemura H, Hirano Y, Kodaka N, et al. Pneumocystis pneumonia in a patient with type 2 diabetes mellitus. Intern Med 2007; 46:1131-3.
30. Fata A, Parian M, Rezaeitalab F, Najafzadeh M. Molecular detection of Pneumocystis jirovecii in diabetic patients with respiratory disorder at Emam Reza Hospitals, Mashhad. Med J Mashhad Univ Med Sci 2015; 58:204-10.

Original Article

Isolation of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompetent and immunodeficient patients with pulmonary disorder (A molecular study)

Received:21/11/2016 - Accepted: 29/01/2017

Abollahi B[1]
Rezaeitalab F[2]*
Fata A1, [3*]
Attaran D[4]
Najafzadeh MJ[1]
Vakili V[5]
Parian M[1]

1-Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran.
2-Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran.
3-Cutaneous Leishmaniasis Research Center, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran.
4- Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran.
5- Department of community, Medicine, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran.

** Cutaneous Leishmaniasis Research Center, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran.*
Department of Parasitology & Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran.

Tel:+98-51-38002401
Email: FataA@mums.ac.ir

Abstract

Introduction: *Pneumocystis* pneumonia (PCP) is one of the most serious life threatening infections in patients with human immunodeficiency virus. It can also occur in immunosuppressed patients treated with immunosuppressive drugs.Immunocompetent adults can carry*Pneumocystis*.The aim of this study was to identify *Pneumocystis jirovecii* in patients with pulmonary disorder.

Materials and Methods: During 9 months (September 2014 - May 2015), 138 Bronchoalveolar Lavage (BAL) samples obtained from patients undergone bronchoscopy referred to different departments of University Hospitals of Mashhad.

Giemsa stained smear and molecular method performed for each sample. After DNA extraction, amplification of mitochondrial gene coding ribosomal large subunit (mtLSU-rRNA) of

P. jirovecii was performed by Nested-PCR. To reconfirm diagnosis and definite identification, gene sequencing was performed. For statistical analysis t-test and chi-square tests were used, by using SPSS version 16.

Results: By direct microscopy, *P.jirovecii* was diagnosed in only 3(2.2%) samples, but DNA was detected in 17 (12.3%) by nested PCR. *P. jirovecii* isolated from 10 (25%) immunosuppressed and 7 (7.1%) of immunocompetent individuals. Fever, dyspnea and dry cough were the most common symptoms among patients with *P.jirovecii*.

Conclusion: *P. jirovecii* is prevalent in immunodeficient patients compared to immunocompetent individuals. The latter group can act as reservoir of *P.jirovecii* and can be an important source of infection for patients with pulmonary disorders.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, Bronchoalveolar Lavage (BAL) , polymerase chain reaction (PCR) , *Pneumocystis* pneumonia (PCP).

Acknowledgement: There is no conflict of interest.