روش های تشخیصی پنوموسیستیس کارینی

دکترمحمدجوادغروی،استادانگل شناسی،رئیس آزمایشگاه مرکزی فردیس

موناروزبهانی،علوم آزمایشگاهی، کارشناس آزمایشگاه مرکزی فردیس

مقدمه:

پنوموسیستوز(پنومونی بینابینی باپلاسماسل plasma cell pneumonia Interstitial) توسط یک تک یاخته خارج سلولی بنام پنوموسیستیس کارینی ایجاد می گردد که درآلوئولهای ریه انسان و برخی ازحیوانات به کندی رشد می کند. عفونت های ناشی ازاین تک یاخته معمولاً بدون نشانه بالینی است، اما دربیمارانی که اختلال سیستم ایمنی دارند تکثیربیش ازمعمول ارگانیسم سبب تراکم درآلوئولها شده وموجب تنگی نفس وگاهی اوقات مرگ می گردد. بدین جهت بروزپنومونی ناشی ازپنوموسیستیس کارینی(PCP)در بیمارنشانگر نقص درسیستم دفاعی میزبان می باشد. با توجه به اینکه این ارگانیسم یکی ازمهمترین و متداولترین علل مرگ ومیر درافرادی که دارای اختلال یا ضعف سیستم ایمنی مانند مبتلایان به ایدز می باشد ودرکشورما هیچ روش تشخیصی خاصی برای این ارگانیسم وجود ندارد، لذا در این مقاله سعی می شود به تعدادی از روش های تشخیصی این ارگانیسم بپردازیم.

چرخه زندگی :

برطبق نظریه دانشمندان ژاپنی که درسال ۱۹۸۴ ارائه گشته، دو مرحله در سیرتکاملی این ارگانیسم دربدن میزبان وجود دارد:

۱- مرحله تکثیر جنسی (اسپوروگونی)

۲- مرحله تکثیر غیرجنسی که شامل تقسیم دوتایی ساده و اندودیوژنی (جوانه زدن) می باشد.

بیماریزایی:

این ارگانیسم نیز مانند سایرفرصت طلبان در ابتدا ایجاد عفونت بدون علامت نموده، سپس به صورت نهفته در بدن باقی مانده و هر زمان که سیستم ایمنی تضعیف شود بیماری بروز می کند. اتصال تروفوزوئیت هابه پنوموسایت های تایپ I نقش اصلی در بیماریزایی این ارگانیسم دارد.انگل وارد فضای کوچک آلوئولی می شود و سلولهای پنوموسایت تایپ I را مورد تغذیه و حمله خود قرارمی دهد. به تدریج دیواره این سلولها خشک و پاره می شود و سلولهای ریه تخریب و ریه الاستیسیته خود را به تدریج ازدست می دهد. در نتیجه ریه ها بزرگ و سنگین می شوند. پنوموسیستیس کارینی پنوموسیت های تایپ II را به ندرت تخریب نموده و سورفکتانت ریه را تجزیه می کند. انگل، از مایع بین آلوئولی تغذیه می کند و معمولا پیکر آن توسط مایع بین آلوئولی پوشانیده شده و ارتباطی با گازهای تنفسی ندارد. علائم در سه مرحله مشاهده می گردد؛

مرحله اول: مرحله سبک بیماری است که در مراحل اولیه دیده می شود. بیماردر این مرحله احساس ناراحتی تنفسی می کندو سرفه های خلط آور دارد، ولی؛ هنوز به سیستم تنفسی آسیب آنچنانی وارد نشده است.

در ***مرحله دوم؛*** به تدریج با تخریب دیواره سلولی، تنفسی خشک تر شده و خلط وجود ندارد.

در ***مرحله سوم؛*** خونریزی داخل ریوی (Hemoptysis)، سرفه های خشک شدید و یک پنومونی بینابینی قطعی دیده می شود. در این مرحله احتمال مرگ وجود دارد.

تشخیص:

برای تشخیص آزمایشگاهی روش های متعددی وجود دارد.

الف- روش های انگل شناسی که خودشامل ،روش های تهاجمی وغیرتهاجمی است.

ب-رنگ آمیزی های هیستوشیمیایی و ایمو نو هیستوشیمیایی

ج- روش های سرولوژی

د- روش های مولکولی

الف- روش های انگل شناسی

الف-۱- روش های غیرتهاجمی (non- invasive procedures)

الف-۱-۱- رادیوگرافی قفسه سینه(Chest Radioghraphy):

که دراین حالت درتمام قسمت های ریه یک انفیلتراسیون بینابینی دیده می شود

الف-۱- ۲- اسکن ریه(lung scan):

اسکن ریه جهت بررسی پنوموسیستیس کارینی با ارزش و مناسب اما غیراختصاصی است.

الف – ۱- ۳ - PET اسکن (برش نگاری با تابش پوزیترون)

PET:Poisitron Emission Tomography

این روش دقیق ذرات مولکولی غیر نرمال بدن را نشان می دهد. استفاده ازاین روش درایران هنوزوجود ندارد.

الف-۱ – ۴- خلط (Induce Sputum):

روش تشخیص سریع و بی ضرراست این نکته حائز اهمیت است که نمونه مورد آزمایش حاوی خلط بوده و بزاق نباشد که با مشاهده سلول های سنگ فرشی (دهان) و سلول های اپی تلیال(برونش) میتوان به این نکته پی برد. کیفیت ظاهری خلط ، رنگ، بو و وجود خون ممکن است اطلاعات با ارزشی فراهم نماید.

الف- ۲- روش های تهاجمی (Invasive Procedures)

الف-۲- ۱- ترشحات برونکوآلوئولار(BAL=Broncho Alveolar Lavage) :

این روش معمولاً باقراردادن یک برونکوسکوپ در راههای هوایی انتهایی به آهستگی انجام می شود.

الف-۲-۲- بیوپسی ترانس برونشیال ریه (Transbronchial lung Biopsy) این روش دارای خطراتی می باشد اما در بیمارانی که قادر به سرفه نیستند یا سرفه آنها خلط تولید نمی کند، استفاده می شود.

الف -۲- ۳ - بیوپسی ریه با سوزن (Needle Lung Biopsy):

دراین روش خطر خون ریزی وجود دارد به همین علت نسبت به روش های قبل کمتراستفاده می شود.

الف-۲ – ۴ - بیوپسی باز ریه (Open Lung Biopsy):

این روش در صورت مفید نبودن روش های قبلی بکار گرفته مـی شـود. مشـاهده مسـتقیم امکـان انتخـاب بهترین محل بیوپسی را فراهم می سازد ونمونه بدست آمده برای بررسی و تشـخیص بیمـاری دارای ارزش خاص می باشد.

ب - رنگ آمیزی های هیستوشیمیایی:

رنگ های متعددی جهت رنگ آمیزی پنوموسیستیس کارینی کاربرد دارد کـه ایـن رنگهـا شـامل: گومـوری متنامین سیلور، پاپانیکولا، پریودیک اسید شیف، تولوئیدن بلوo، کریزل ویوله، گرم ویگرت، اکریـدین اورنـج، متیلن بلو، گیمسا، رایت، گرم، پروپیدیوم ایداید، کالکوفلوروایت.

ب -۱- گوموری متنامین سیلور(GMS:Gomoris Methenamin Silver)

ومشتقات آن تولوئیدن بلوo ،کریزل ویوله، گرم ویگرت:

دیواره کیست واینتراکیستیک بادی کارینی را رنگ آمیزی می کند، اما محتویات درون کیست رارنگ نمـی کند. دررنگ آمیزی ها به طورمعمول ازGMS استفاده می شود.

ب -۲- رنگ گیمسا و متیلن بلو:

تروفوزوئیت واجسام داخل سیتوپلاسمی رنگ می گیرد گیمسا دیواره کیست را رنگ آمیزی نمی کند

▪ **رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی:**

بااستفاده ازآنتی سرم پلی کلونال برضد موش ورات مبتلا پنوموسیستیس کـارینی اسـتفاده مـی شـود. ایـن رنگ آمیزی بسیارحساس است و درمقابـل بـا رنـگ آمیـزی مرسـوم هیستوشـیمیایی GMS تروفوزوئیـت وکیست هردورنگ می گیرند

ج – روش های های سرولوژی :

ج-۱ - ایمونوفلورسا نس مستقیم (DFA) : با افزودن آنتی بادی منوکلونال به مایع حاوی پنومویسستیس کارینی می توان خاصیت فلورسا نس را به آنتی ژن القاء کرد ووجود آن را اثبات نمود.

ج-۲- ایمونوفلورسا نس غیرمستقیم (IFA): ایـن روش جهـت بررسـی آنتـی بـادی برعلیـه آنتـی ژن پنوموسیستیس کارینی درسرم بیمارمبتلا به پنوموسیستوز است. که این آنتـی بـادی ازنـوع IgM و IgG است

ج-۳ آزمایش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم(IHA) : دراین روش آنتـی ژن محلـول پنوموسیسـتیس کارینی به گلبول قرمزگوسفند متصل شده و وقتی سرم حاوی آنتی بـادی اختصاصـی ضـد پنوموسیسـتیس کارینی، با این سلول های حساس شده، تماس پیدا کنند، گلبول های قرمز آگلوتینه خواهند شد.

ج-٤- کانترایمونوالکتروفورز(Counter immunoelectrophoresis) : ایـن روش جهـت بررسی آنتی ژن های پنوموسیستیس کارینی درسرم بیماران مبتلا به پنوموسیستوز بکار می رود.

ج-۵- Enzyme Linked Immunosorbent Assay :ELISA

دراین روش ازآنتی ژن محلول استفاده مـی شـود و ماننـد روش IFA تیترآنتـی بـادی هـای IgM وIgG اندازه گیری می شود.

ج -۶- Enzyme Linked Fluorescent Assay : ELFA

این روش، براساس یک واکنش دو مرحله ای آنزیمی با متد ساندویچ می باشد که درپایان بـه جـای منتهـی شدن به یک محصول رنگی، یک فرآورده با خاصیت فلورسانس ایجـاد مـی گـردد حساسـیت و ویژگـی ایـن تست بسیاربالا می باشد.

ج-۷- ایمونوبلاتینگ (Immunoblotting)

تکنیک ایمونوبلاتینگ جهت تعیین آنتی ژن های محلول پنوموسیستیس کارینی است که واکنش بین یـک پلی پپتید محلول۶۷ کیلو دالتونی با یک مونوکلونال آنتی بـادی (2G2) کـه یـک آنتـی پنوموسیسـتیس کارینی می با شد، اتفاق می افتد.

ج-۸- وسترن بلات (western blot test):

در سال های اخیر با جداسازی آنتی ژنهای۴۰و۱۱۶ کیلودالتونی گونه انسانی (P.jiroveci) می تـوان بـا بکارگیری این تکنیک آنتی بادی های ضد این دوآنتی ژن را در سرم بیماران ارزیابی نمود.

معایب روش های سرولوژی:

- بالابودن میزان آنتی بادی پنوموسیستیس کارینی سرمی دراکثریت افـراد جامعـه ارزش ایـن روش های سرولوژی را درتشخیص محدود ساخته است.
- روش های سرولوژی، عفونت نهفته یا فعال را نشان نمی دهند.
- واکنش متقاطع با بعضی کوکسیدیا ها نیزگزارش شده است.
- یکی از بزرگترین مشکل ها ، مراحل پیچیده تهیه آنتی ژن اسـت، ضـمن اینکـه حجـم زیـادی از ارگانیسم برای این مو ضوع لازم است.

این نکته حائز اهمیت است که اعتبار روش های سرولوژی از روش های انگل شناسی کمتر است.

د- **روش های مولکولی:**

د- ۱- هیبریداسـیون RNA : گلیکـوپروتئین هـای فراوانـی چـون gpA ،gp120 ، بـرروی سـطح پنوموسیستیس کارینی وجود دارد. این گلیکوپروتئین ها دربیمـاریزایی ایـن ارگانیسـم درون میزبـان نقـش دارند. درتکنیک هیبریداسیون RNA با استفاده ازRNA جهت بیـان **A**mRN gpA. ، پنوموسیسـتیس کارینی در مخاط سلول های اپی تلیال آلوئولی متمرکز می شود و درآنجا شروع به رونویسی این ژن ها مـی کند.

د- ۲- PCR (Polymerase Chain Reaction): یک روش با حساسیت بسیاربالایی اسـت که جهت تشخیص DNA پنوموسیستیس کارینی درنمونه های BAL وخلط به کارمی رود. PCR روشی است که طی آن با کمک آنزیم

DNA پلیمراز، مقادیرناچیزی ازتوالی اختصاصی DNA را به حدی زیاد می کنیم تا بـه آسـتانه تشـخیص برسد. این روش حساس و دقیق کمترین میزان انگل رانشان می دهد. از طریق این روش، یک جفت پرایمـر اولیگونوکلئوتیدی بنـام PC1 وPC2 ازسـکانس ژن تیمیـدیلات سـنتتاز(TS) پنوموسیسـتیس کـارینی مشخص گردید.

د- ۳-Nested–PCR:

این تکنیک دردو مرحله برروی نمونه های BAL وخلط انجام می شود. مناطق نسخه بـرداری شـده درونـی (ITS) ازژن های rRNA پنوموسیستیس گونه انسانی (P.jirovecii) راتکثیرمی دهد. این روش درگونه

های حیوانی پنوموسیستیس کاربرد ندارد پرایمرهای خارجی برای PCR اول 18S و26S ژن های rRNA است که در۷۴ درجه سلسیوس حرارت داده می شوند. پرایمرهای داخلی ITS1 وITS2 هستندکه درPCR دوم دردمای ۵۶ – ۵۸ درجه سلسیوس حرارت داده می شود.

د-۴-RT-PCR :

در طی بررسی های انجام شده مشخص گردید، یک کلون، بنام کلون B12.2 با تکرارپذیری وویژگی بالا درهیبریداسیون، فقط درژنوم پنوموسیستیس کارینی موجوداست. آنالیزسکانس نوکلئوتیدی نشان داد که ژنوم کلون B12.2 با یک گلیکوپروتئین سطحیMSG:(Major surface glycoprotein همولوگ است.آنالیزPCR با پرایمرهای MSG نشان داد که درتمام بافتهای خارج ریوی(مانند بافت های قلب، کبد، کلیه، مغزاستخوان، تیروئید، آدرنال، خون....) پنوموسیستیس کارینی قابل تشخیص است. توسط تکنیک RT-PCR مشخص گردید، ژن دهیدروفولات ردوکتاز(DHFR) پنوموسیستیس کارینی درتمام بافت های ریوی وخارج ریوی به طورفعالی نسخه برداری می شود. بنابراین پرایمرهای DHFR و MSGجهت تشخیص پنوموسیستیس کارینی دربافت های ریوی و خارج ریوی به کارمی رود.

▪ در بررسی های انجام شده، مشخص گردید، روش های مولکولی جهت تشخیص پنوموسیستیس کارینی ازحساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ برخوردارند.

نتیجه گیری:

پنوموسیستیس کارینی یکی از متداول ترین علل مرگ ومیردربیماران نقص سیستم ایمنی ومبتلایان به ایدزمی باشد. با وجود اهمیت بیماری و روش های تشخیص متعددی که برای این ارگانیسم ذکرشده است، اما متاسفانه هنوزروش تشخیص خاصی برای این ارگانیسم درکشورایران وجود ندارد.

References:

1- James R.stringer. Pneumocystis carinii: What Is It Exactly? Clinical.Microbiology Reviews, Vol. 9,No.4,Oct. 1996, p.489-498

2- Yi-wei Tang. Molecular diagnostics of atypical pneumonia. Tang YW et al/Acta Pharmacol Sin 2003 Dec, 24 (12), 1308-1313

3- Bandt D, Monecke S. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of pneumocystis jiroveci. Trandpl Infect Dis. 2007,(9): 196-202

4 -Lynne shore Garcia, M.S, F(AAM). Diagnostic Medical Parasitology. Printed in the united states of America. 2001

5- Craig L. Franklin and Lela K. Riley. Pneumocystis carinii. Department of Veterinary Pathology , University of Missouri, Columbia. Winter 1993.

6- Charles F.Thomas ,Jr,M.D. and Andrew H. Limper,M.D Pneumocystis pneumonia. N Engl J Med 2004,350-2487-98.

7- Wikipedia, the free encyclopedia. Pneumoeystis pneumonia. 15\04\2009

8- Mates Olsson, Kerstin Elvin , Sven Lofdahl, Ewert Linder. Detection of Pneumocystis carinii DNA in Sputum and Bronchoalveolar Lavage Samples by polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology,Feb.1993,p221-226

9- K . Sethi.Application of immunoblotting to detect soluble Pneumocystis carinii antigen in Bronchoalveolar Lavage of patients with Pneumocystis pneumonia and AIDS.J Clin Pathol 1990,43:584-586.

10- Saritha CHary-reddy and Don C.graves. Identification of Extrapulmonary Pneumocystis carinii in Immunocomprised Rats by PCR. Journal of Clinical Microbiology,July 1996,p.1660-1665.

11- Michael Weig, Hartwing KLINKER H. BOGNER,ANGELIKA MEILER.Usefulness of PCR for Diagnosis of Pneumocystis carinii Different Patient Groups. Journal of Clinical Microbiology,July 1997,p.1445-1449

12-HAIDARIS P.J.WRIGHT.W.GIGLIOTIF.FALLON M A.WHITBECK.In situ hybridization analysis of development stages of Pneumocystis carinii.7\8\2009

13- LEE CH,Tang X,Barlet MS,Smith jw,.A singe tube nested PCR for Pneumocystis carinii. American Society for Microbiology.06\06\2009

۱۴- دکتر غروی م.ج (۱۳۸۳)، تک یاخته شناسی پزشکی، چاپ سوم، تیمورزاده نشرطبیب.