

The prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in patients with ventilator-associated pneumonia hospitalized in intensive care unit

Shirin Mafi¹, Fatemeh Sakhaee², Mohsen Zargar³, Farzam Vaziri², Masoud Zarei⁴, Fatemeh Rahimi Jamnani², Seyed Davar Siadat², Abolfazl Fateh²

¹Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Microbiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

⁴Molecular Laboratory of Erfan Niyayesh Hospital, Tehran, Iran

Abstract

Background: Ventilator-associated pneumonia (VAP) is a type of hospital acquired pneumonia with the mortality rate between 27% and 76% that develops more than 48–72 h after endotracheal intubation. Possible causes leading to this infection can be *Mycoplasma pneumoniae*. The objective of this study was to determine the presence of *Mycoplasma pneumoniae* in bronchoalveolar samples of patients with VAP who admitted in the intensive care unit (ICU).

Materials and methods: In this cross-sectional study, 103 bronchoalveolar lavage samples were collected from VAP patients who admitted to ICU in Loghman, Erfan Niyayesh and Erfan Hospitals. Then, samples were investigated for presence of *Mycoplasma pneumoniae* using nested-PCR method with 16S rRNA gene.

Results: 4 (3.9%) patients were positive for *Mycoplasma pneumoniae*. There was a significant relationship between the positive infectious agents with clinical signs ($P=0.017$) and the duration of using ventilator ($P=0.043$).

Conclusion: The results of this study, as a first study in Iran, showed that *Mycoplasma pneumoniae* can be considered as true pathogens of the respiratory tract in patients with VAP and should be given more attention. To confirm the results of this study, further research is needed to reveal the association of this bacterium with VAP.

Keywords: Ventilator-associated pneumonia, *Mycoplasma pneumoniae*, 16S rRNA gene.

Cited as: Mafi SH, Sakhaee F, Zargar M, Vaziri F, Zarei M, Rahimi Jamnani F, et al. The prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in patients with ventilator-associated pneumonia hospitalized in intensive care unit. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(4): 313-321.

Correspondence to: Abolfazl Fateh

Tel: +9821 64112823

E-mail: afateh2@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-2043-8523

Received: 20 May 2018; **Accepted:** 3 Sep 2018

شیوع عفونت مایکوپلازما پنومونیه در بیماران مبتلا به پنومونی مرتبط با ونتیلاتور بستری در بخش مراقبت های ویژه

شیرین مافی^۱، فاطمه سخایی^۲، محسن زرگر^۳، فرزاد وزیری^۲، مسعود زارعی^۴، فاطمه رحیمی جمنانی^۲،
سید داور سیادت^۲، ابوالفضل فاتح^۲

^۱گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲گروه میکروب شناسی، بخش سل و تحقیقات ریوی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۳گروه میکروب شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

^۴کارشناسی ارشد، آزمایشگاه مولکولی بیمارستان عرفان نیایش، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پنومونی مرتبط با ونتیلاتور (VAP) نوعی پنومونی بیمارستانی با میزان مرگ و میر ۷۶-۲۷ درصد است که بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از لوله گذاری تراشه ایجاد می شود. از عوامل ایجادکننده این عفونت می توان به مایکوپلازما پنومونیه اشاره کرد. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی مایکوپلازما پنومونیه در نمونه های شستشوی برونش بیماران مبتلا به VAP بستری در بخش مراقبت های ویژه (ICU) بود. **روش بررسی:** در این مطالعه مقطعی، ۱۰۳ نمونه شستشوی برونش مبتلایان به VAP بستری در ICU بیمارستان های لقمان، عرفان و عرفان نبایش جمع آوری شد و از لحاظ وجود باکتری مایکوپلازما پنومونیه به روش nested-PCR با استفاده از ژن هدف 16S rRNA ارزیابی شدند. **یافته ها:** تعداد ۴ (۳/۹٪) بیمار مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه مثبت گزارش شدند. ارتباط معنی داری میان مثبت بودن عامل عفونی با علائم بالینی ($P=0/017$) و مدت زمان استفاده از ونتیلاتور ($P=0/043$) مشاهده شد. **نتیجه گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه برای اولین بار در ایران نشان داد که مایکوپلازما پنومونیه می تواند به عنوان پاتوژن واقعی دستگاه تنفسی در بیماران مبتلا به VAP مطرح باشد و باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد. برای تأیید نتایج حاصل از این مطالعه لازم است تحقیقات بیشتری صورت گیرد تا ارتباط این باکتری با VAP نشان داده شود.

واژگان کلیدی: پنومونی مرتبط با ونتیلاتور، مایکوپلازما پنومونیه، ژن 16S rRNA.

مقدمه

بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه (ICU) نه تنها از بیماری اصلی خود، بلکه معمولاً توسط عوارض ثانویه مانند عفونت های بیمارستانی نیز در معرض خطر مرگ و میر هستند. پنومونی بیمارستانی یک عفونت رایج در بیماران

بستری در ICU است که ۲۷٪ از بیماران را تحت تأثیر قرار می دهد و عامل ۸۶٪ از این موارد، پنومونی مرتبط با ونتیلاتور است (۱).

بر طبق دستورالعمل انجمن بیماری های عفونی و بیماری های قفسه سینه آمریکا (IDSA/ATS: Infectious Diseases Society of America /American Thoracic Society)، پنومونی مرتبط با ونتیلاتور (VAP) یک نوع پنومونی بیمارستانی است که بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از لوله گذاری تراشه ایجاد می شود (۲). عموماً، VAP در ۲۸٪ از بیمارانی که متصل به ونتیلاتور هستند رخ می دهد، درحالی که میزان بروز

آدرس نویسنده مسئول: انستیتو پاستور ایران، بخش سل و تحقیقات ریوی، گروه میکروب شناسی،

ابوالفضل فاتح (email: afateh2@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-2043-8523

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۲/۲۱

عفونی تنفسی مانند کلامیدیا پنومونیه ندارد، تشخیص به موقع این گروه از عفونت‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). به خاطر اینکه کشت مایکوپلازما پنومونیه دشوار است و در بیشتر آزمایشگاه‌های بالینی به ۳ تا ۴ هفته نیاز دارد و با توجه به محدودیت‌های سرولوژی به دلیل وجود نتایج مثبت کاذب (۱۲)، در نتیجه تشخیص مستقیم و سریع این باکتری در نمونه‌های بالینی با استفاده از روش‌های مولکولی انجام می‌شود. در حال حاضر روش‌های مبتنی بر PCR روش انتخابی برای تشخیص این باکتری است (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از ژن کد کننده rRNA (rDNA) برای شناسایی این باکتری مناسب به نظر می‌رسند. به همین منظور، برای تشخیص مایکوپلازما پنومونیه، از *16S rRNA* به عنوان منطقه مخصوص شناسایی کننده گونه در روش PCR استفاده می‌شود (۱۴، ۱۵). مزیت استفاده از توالی‌های *16S rRNA* سطح بالای مناطق حفاظت‌شده و همچنین وجود مناطق بسیار متغیر متعلق به گونه است. به همین علت، به منظور تعیین تصمیمات مناسب و پیگیری‌های درمانی، به ویژه در کشورهایی که فراوانی بالای گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را دارند، شناسایی نشانگرهای مناسب برای تمایز بین عوامل ایجادکننده پنومونی باکتریایی و ویروسی از ارزش زیادی برخوردار خواهد بود (۱۶). همچنین به دلیل مقادیر کم این عوامل عفونی، استفاده از روش‌های مولکولی با حساسیت بالا مانند nested-PCR ضروری است (۱۷). از آنجایی که تاکنون در ایران مطالعه‌ای به بررسی مایکوپلازما پنومونیه در بیماران VAP نپرداخته است و با توجه به اهمیت باکتری‌های ایجادکننده پنومونی غیر شایع در بروز پنومونی، این مطالعه بر آن شد تا به بررسی وجود مایکوپلازما پنومونیه در بیماران مبتلا به VAP بستری در ICU سه بیمارستان لقمان، عرفان و عرفان نیایش را در تهران بپردازد.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه

مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی است که در آن تعداد ۱۰۳ بیمار مبتلا به VAP بستری در بیمارستان لقمان (۴۱ بیمار) به عنوان بیمارستان دولتی و بیمارستان‌های خصوصی عرفان (۳۰ بیمار) و عرفان نیایش (۳۲ بیمار) از شهریورماه ۹۵۱۳ تا آذرماه ۱۳۹۶ بر اساس معیارهای ورود

آن با مدت زمان استفاده با ونتیلاتور متغیر است. میزان بروز VAP برای ۵ روز اول ۰.۳٪، برای روزهای ۶ تا ۱۰ به میزان ۰.۲٪ و برای بعد از روز دهم ۱٪ تخمین زده شده است (۳). میزان مرگ و میر VAP بین ۲۷ تا ۷۶ درصد است. میزان مرگ و میر در بیماران مبتلا به VAP بیشتر در عفونت با سودموناسها و همچنین اسنتیتوپاکتر بومانی دیده می‌شود (۴). از آنجایی که بستری در ICU مستلزم هزینه بالای بیمارستانی است و به دلیل اینکه VAP باعث اقامت طولانی مدت در ICU می‌شود، بنابراین پیشگیری از VAP می‌تواند مدت زمان بستری در ICU و همچنین مصرف منابع و هزینه‌های بعدی را کاهش دهد (۵).

علاوه بر باکتری‌های شایع در ایجاد VAP، باکتری‌های غیرمعمول دیگری ممکن است در ایجاد این عفونت نقش داشته باشند. از جمله باکتری‌های غیر شایع می‌توان به مایکوپلازما پنومونیه، لژیونلا پنوموفیلا و کلامیدیا پنومونیه اشاره داشت (۶).

مایکوپلازماها کوچک‌ترین باکتری‌های عفونی شناخته شده در انسان هستند. طول تقریبی آنها ۱-۲ میکرومتر و عرض ۰/۱-۰/۲ میکرومتر است. عدم وجود دیواره سلولی، این ارگانیسم‌ها را چندشکلی نشان می‌دهد و باعث مقاوم شدن این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر دیواره سلولی مانند پنی‌سیلین‌ها می‌شود (۷). علت بسیاری از ویژگی‌های بیولوژیک و همچنین نیاز این باکتری به مکمل‌های محیطی پیچیده که برای کشت این ارگانیسم در شرایط آزمایشگاهی لازم است، ژنوم کوچک مایکوپلازما و قابلیت‌های بیوسنتزی محدود آن است (۸).

بیش از ۲۰۰ گونه مایکوپلازما در انسان، حیوانات، گیاهان و بندپایان شناسایی شده است، اما تنها تعداد کمی از آنها برای انسان بیماری‌زا هستند که از شناخته‌شده‌ترین آن‌ها می‌توان به مایکوپلازما پنومونیه اشاره داشت (۹). این باکتری اولین بار در سال ۱۹۴۴ از کشت خلط یک بیمار مبتلا به پنومونی جدا شد و در ابتدا عامل ایتون (Eaton) نامیده شد و در سال ۱۹۶۰ مشخص شد که عامل این پنومونی مایکوپلازما پنومونیه است (۱۰). پنومونی ناشی از مایکوپلازما پنومونیه عموماً خفیف است و می‌تواند بدون علامت باشد و یا اینکه فرد مبتلا دارای پنومونی شدید، کم‌خونی، گرفتار شدن سیستم عصبی و یا ضایعات پوستی باشد (۸).

از آنجایی که علایم بالینی بیماران مبتلا مایکوپلازما پنومونیه تفاوت چندانی با بیماران مبتلا به سایر عوامل

مواد مصرفی استفاده شده در مرحله اول صورت گرفت، با این تفاوت که دمای اتصال پرایمر این مرحله ۶۰ درجه سانتی-گراد بود. در این مطالعه از سویه استاندارد مایکوپلازما پنومونیه ATCC 15531 استفاده شد. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ با ولتاژ ۹۰ آمپر به مدت ۴۵ دقیقه صورت پذیرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز با استفاده از نور ماورا بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت.

تحلیل داده‌ها

تحلیل آماری توسط نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۲۲ انجام شد. از آزمون کولموگروف اسمیرنوف برای تعیین نرمال بودن توزیع داده‌های کمی استفاده شد. جهت تحلیل متغیرهای پیوسته و متغیرهای طبقه‌بندی شده و کیفی، به ترتیب از آزمون‌های غیر پارامتری من ویتنی و آزمون کای اسکور یا فیشر استفاده شد. داده‌های با $P \leq 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

از ۱۰۳ بیمار مورد بررسی، تعداد ۴۱ (۳۹/۸٪) بیمار در بیمارستان دولتی لقمان بستری بودند و ۳۲ (۳۱/۱٪) و ۳۰ (۲۹/۱٪) بیمار به ترتیب در بیمارستان‌های خصوصی عرفان نیایش و عرفان بستری بودند. میانگین سنی ($\pm$) انحراف معیار) بیماران بستری در بیمارستان لقمان، عرفان نیایش و عرفان به ترتیب برابر با $16/2 \pm 63/9$ سال، $17/1 \pm 58/8$ سال و $17/8 \pm 58/9$ سال بود. در هر سه بیمارستان بیشتر بیماران مرد بودند و بیشترین بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان لقمان، بیماری قلبی (۳۴/۱٪)، در بیمارستان عرفان نیایش بیماری ریوی (۲۱/۸٪) و داخلی (۲۱/۸٪) و در بیمارستان عرفان عامل بستری بیماری مغزی (۲۶/۷٪) بود. اکثریت بیماران در هر سه بیمارستان کمتر از ۳۰ روز در بخش مراقبت‌های ویژه بستری بودند. در هر سه بیمارستان، سرفه و خس‌خس کردن، درد قفسه سینه و تنگی نفس، التهاب ریه و خلط و تب و لرز و التهاب گلو عمده علائم بالینی در بیماران بودند (جدول ۱).

(بیماران بستری در بخش ICU که متصل به دستگاه تهویه مکانیکی بودند و پنومونی را در مدت‌زمان بیش از ۴۸ ساعت نشان داده بودند) و معیارهای خروج (شامل بیماران مبتلا به پنومونی قبل از اتصال به دستگاه تهویه مکانیکی و افرادی که پنومونی را در حین ۴۸ ساعت نشان داده بودند) انتخاب شدند. پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه از بیماران، نمونه‌های شستشوی برونش بیماران گرفته شد و پس از انتقال به ظروف استریل به انستیتو پاستور ایران منتقل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. همچنین مطالعه فوق در کمیته اخلاق انستیتو پاستور با شماره IR.PH.REC.1394.54 به تصویب رسید. تمامی اطلاعات دموگرافیک از قبیل سن، جنس و علائم بالینی از پرونده بیماران استخراج شدند.

تکثیر ژن *16S rRNA* جهت شناسایی مایکوپلازما پنومونیه

جهت استخراج DNA مایکوپلازما پنومونیه، از کیت DNG-Plus شرکت سینا کلون استفاده شد و با توجه به دستورالعمل کیت، DNA استخراج گردید. جهت شناسایی مایکوپلازما پنومونیه از روش nested-PCR بر طبق مطالعه Han و همکاران استفاده شد (۱۷). به‌طور خلاصه، واکنش مرحله اول توسط پرایمرهای (F:5'-AAGGACCTGCAAGGGTTCGT-3') و (R:5'-CTCTAGCCATTACCTGCTAA-3') طبق برنامه دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت پنج دقیقه و به دنبال آن دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ۶۱ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای ۴۰ بار و دمای بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. حجم نهایی واکنش PCR برابر با ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر ۱۰ پیکومول و ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول Master Mix 2x شرکت سینا کلون (شامل *Taq* DNA polymerase, 3 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP and 0.4 mM dTTP) استفاده شد و جهت به حجم رساندن، از آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. واکنش PCR مرحله دوم توسط پرایمرهای (F:5'-CTCTAGCCATTACCTGCTAA-3') و (R:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3') طبق برنامه و

جدول ۱. اطلاعات دموگرافیک بیماران مبتلا به پنومونی ناشی از ونتیلاتور براساس بیمارستان

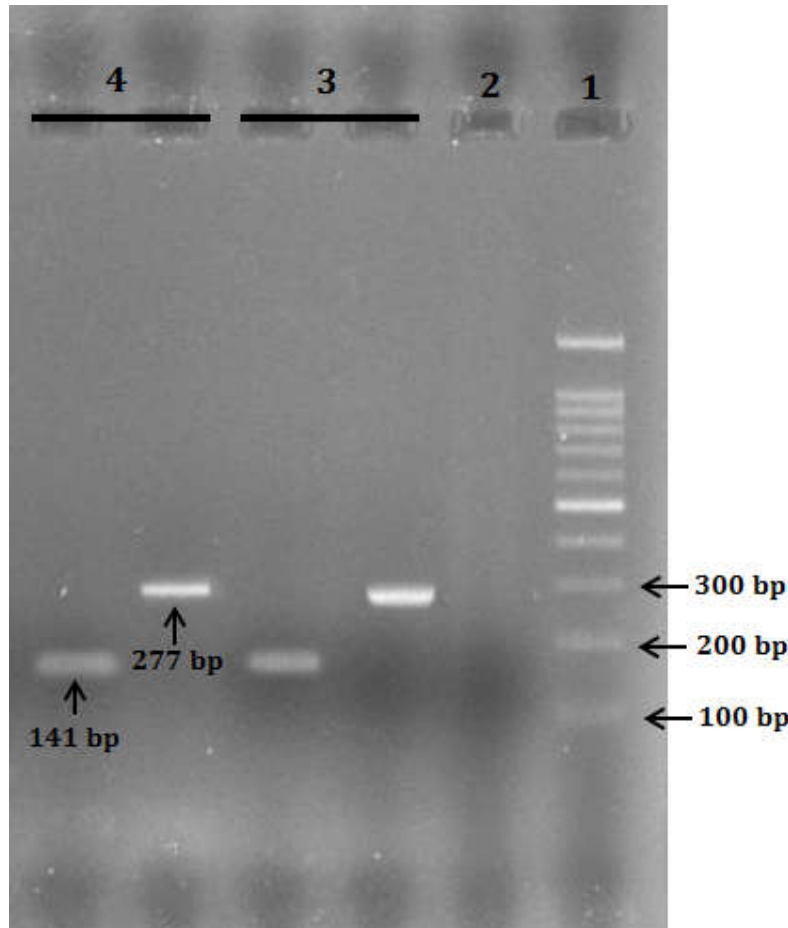
متغیر	دولتی			P-value
	بیمارستان لقمان (n = ۴۱)	بیمارستان عرفان نیایش (n = ۳۲)	بیمارستان عرفان (n = ۳۰)	
جنس				۰/۱۹۹
مرد	۳۰ (۷۳/۲٪)	۱۷ (۵۳/۱٪)	۲۰ (۶۶/۷٪)	
زن	۱۱ (۲۶/۸٪)	۱۵ (۴۶/۹٪)	۱۰ (۳۳/۳٪)	
میانگین سنی	۶۳/۹ ± ۱۶/۲	۵۸/۸ ± ۱۷/۱	۵۸/۹ ± ۱۷/۸	۰/۳۶۱
علت بستری در بخش ICU				۰/۴۹۷
بیماری داخلی	۷ (۱۷/۱٪)	۷ (۲۱/۸٪)	۴ (۱۳/۳٪)	
بیماری مغزی	۹ (۲۲٪)	۶ (۱۸/۸٪)	۸ (۲۶/۷٪)	
بیماری قلبی	۱۴ (۳۴/۱٪)	۶ (۱۸/۸٪)	۵ (۱۶/۷٪)	
بیماری ریوی	۳ (۷/۳٪)	۷ (۲۱/۸٪)	۷ (۲۳/۳٪)	
جراحی	۸ (۱۹/۵٪)	۶ (۱۸/۸٪)	۶ (۲۰٪)	
مدت زمان بستری در ICU				۰/۱۷۹
کمتر از ۳۰ روز	۲۱ (۵۱/۲٪)	۲۰ (۶۲/۵٪)	۲۱ (۷۰٪)	
بیشتر از ۳۰ روز	۲۰ (۴۸/۸٪)	۱۲ (۳۷/۵٪)	۹ (۳۰٪)	
مدت زمان استفاده از دستگاه ونتیلاتور				۰/۱۶۴
کمتر از ۳۰ روز	۳۲ (۷۸٪)	۳۰ (۹۳/۸٪)	۲۶ (۸۶/۷٪)	
بیشتر از ۳۰ روز	۹ (۲۲٪)	۲ (۶/۳٪)	۴ (۱۳/۳٪)	
علائم بالینی				۰/۶۵۱
سرفه و خس خس کردن	۴۰ (۹۷/۶٪)	۳۰ (۹۳/۸٪)	۲۸ (۹۳/۳٪)	
درد قفسه سینه و تنگی نفس	۳۸ (۹۲/۷٪)	۲۹ (۹۰/۶٪)	۲۵ (۸۳/۳٪)	
التهاب ریه و خلط	۳۷ (۹۰/۲٪)	۲۷ (۸۴/۴٪)	۲۳ (۷۶/۷٪)	
تب و لرز و هموپتزی	۳۴ (۸۲/۹٪)	۲۲ (۶۸/۸٪)	۲۱ (۷۰٪)	
عفونت مایکوپلازما پنومونیه				۰/۱۵۲
مثبت	۲ (۴/۹٪)	۱ (۳/۱٪)	۱ (۳/۳٪)	
منفی	۳۹ (۹۵/۱٪)	۳۱ (۹۶/۹٪)	۲۹ (۹۶/۷٪)	

میانگین سنی بیماران ($\pm$ انحراف معیار) در بیماران مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه برابر با $۶۱/۵۰ \pm ۶/۱۳$ سال و در بیماران منفی برابر با $۶۰/۸۶ \pm ۱۷/۲۹$ سال بود. از لحاظ آماری ارتباطی بین این باکتری و سن بیماران دیده نشد ($p=۰/۶۲$).

میانگین مدت بستری ($\pm$ انحراف معیار) بیماران مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه بستری در ICU برابر با $۲۸/۷۵ \pm ۱۰/۶۸$ روز و در بیماران منفی برابر با $۲۳/۳۸ \pm ۱۱/۴۳$ روز بود. از لحاظ آماری بین این باکتری و مدت بستری در ICU ارتباط آماری معنی‌دار دیده نشد ($p=۰/۳۱$). همچنین، میانگین ($\pm$ انحراف معیار) مدت زمان استفاده از دستگاه ونتیلاتور در بیماران مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه برابر با $۲۸/۷۵ \pm ۵/۷۳$ روز و در بیماران منفی برابر با $۱۷/۸۶ \pm ۹/۲۸$ روز بود. بین باکتری و

جهت تأیید وجود مایکوپلازما پنومونیه در نمونه‌های بالینی از روش nested-PCR استفاده شد. طول محصول واکنش مرحله اول PCR برابر با ۲۷۷ جفت باز و مرحله دوم برابر با ۱۴۱ جفت باز بود (شکل ۱). از ۱۰۳ بیمار بررسی شده، ۴ (۳/۹٪) بیمار از لحاظ مایکوپلازما پنومونیه مثبت شدند. از ۴ بیمار مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه، ۲ (۴/۹٪) بیمار در بیمارستان لقمان، ۱ (۳/۳٪) بیمار در بیمارستان عرفان و ۱ (۳/۱٪) بیمار در بیمارستان عرفان نیایش بستری بودند. از لحاظ آماری ارتباطی بین بیمارستان و مثبت بودن باکتری دیده نشد ($p=۰/۱۵$).

از ۴ بیمار مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه، ۲ بیمار (۵۰٪) مرد و ۲ بیمار (۵۰٪) زن بودند. از لحاظ آماری بین جنس بیماران و مثبت بودن باکتری، ارتباط دیده شد ($p=۰/۰۳۵$).



شکل ۱. شناسایی مایکوپلازما پنومونیه با استفاده از روش nested-PCR: چاهک شماره ۱ مارکر، چاهک شماره ۲ کنترل منفی، چاهک شماره ۳ نمونه مثبت مایکوپلازما پنومونیه (باند ۲۷۷ جفت باز نشان دهنده محصول PCR مرحله اول و باند ۱۴۱ جفت باز نشان دهنده محصول PCR مرحله دوم است) و چاهک شماره ۴ نمونه کنترل مثبت از نظر مایکوپلازما پنومونیه ATCC 15531

بحث

بعد از عفونت ادراری، پنومونی بیمارستانی دومین عفونت شایع بیمارستانی است که عامل ۸۶٪ از این موارد به دلیل استفاده از ونتیلاتور است. خطر ابتلا به پنومونی در افرادی که در ICU متصل به دستگاه ونتیلاتور و متعاقب آن لوله گذاری هستند به طور معنی داری بالا می رود. مدت اقامت در ICU به دلیل بیماری VAP افزایش می یابد که مستلزم هزینه های درمانی بسیار بالا برای بیمار می شود، در نتیجه پیشگیری از این بیماری بیشتر اهمیت پیدا می کند. عوامل مهمی در ایجاد VAP نقش دارند که از جمله آن می توان به تجمع باکتری های مهاجم در قسمت فوقانی مسیر تنفسی و به دنبال آن آسپیراسیون و انتقال این باکتری ها به قسمت های تحتانی اشاره داشت و همچنین به دلیل آنکه هنگام استفاده از ونتیلاتور مکانیکی نیاز به لوله تراشه است، این لوله می تواند

مدت زمان استفاده از دستگاه ونتیلاتور ارتباط آماری دیده شد ($p=0/017$).

از ۴ بیمار مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه، ۱ مورد از بیماران به دلیل جراحی، ۱ مورد به دلیل آسیب های مغزی، ۱ مورد به دلیل عفونت های ریوی و ۱ مورد به دلیل جراحی قلب بستری شده بودند. بین مایکوپلازما پنومونیه و علت بستری در بخش ICU از لحاظ آماری ارتباطی دیده نشد ($p=0/55$).

در ۴ بیمار مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه، علایم بالینی همچون سرفه و خس خس کردن، درد قفسه سینه و تنگی نفس گزارش شد. بین مایکوپلازما پنومونیه و علایم بالینی ارتباط آماری معنی داری دیده شد ($P=0/043$).

یکی از راه‌های اصلی انتقال باکتری‌ها به قسمت تحتانی دستگاه تنفسی باشد (۱، ۱۸).

علاوه بر باکتری‌های شایع ایجادکننده VAP مانند سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس، چندین مطالعه شیوع باکتری‌های غیر شایع از قبیل لژیونلا پنوموفیلا، کلامیدیا پنومونیه و مایکوپلازما پنومونیه را در ایجاد این بیماری مورد ارزیابی قرار داده‌اند (۶، ۱۹).

تا آنجا که ما بررسی کرده‌ایم، مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران میزان فراوانی باکتری مایکوپلازما پنومونیه را در بیماران VAP با استفاده از روش nested-PCR و پرایمرهای طراحی‌شده از ناحیه ژن *16S rRNA* مورد ارزیابی قرار داده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از ۱۰۳ بیمار مورد بررسی تعداد ۴ نمونه (۳/۹٪) از لحاظ مایکوپلازما پنومونیه مثبت تشخیص داده شدند. میزان شیوع این باکتری در مطالعه ما نسبت به مطالعات دیگر متفاوت بود، اما با شیوع این باکتری در بیماران مختلف در ایران مشابه بود. در مطالعه‌ای که موسویان و همکارانش انجام دادند، ۱۰۰ نمونه متعلق به بیمارانی که به بیمارستان امام خمینی اهواز مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد و از لحاظ مایکوپلازما پنومونیه مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، میزان شیوع این باکتری ۲/۸٪ گزارش شد و در بین انواع گونه‌های مایکوپلازما که در این بیماران جدا شد، وجود مایکوپلازما پنومونیه به‌عنوان یک پاتوژن واقعی دستگاه تنفسی مطرح شد (۲۰).

در مطالعه Mokhless و همکارانش، نقش بالقوه باکتری‌های با شیوع کم‌تر از قبیل لژیونلا پنوموفیلا و مایکوپلازما پنومونیه در ایجاد پنومونی مرتبط با ونتیلاتور مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور تعداد ۶۰ نمونه شستشوی برونش از بیماران بستری در بخش ICU فراهم و با استفاده از روش PCR به حضور این باکتری‌ها را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ۹ (۱۵٪) بیمار مبتلا به مایکوپلازما پنومونیه بودند (۶). در مطالعه Nolan و همکارانش، میزان شیوع مایکوپلازماها در ۱۵۹ نمونه شستشوی برونش بیمار مشکوک به پنومونی مرتبط با ونتیلاتور بررسی شد. نمونه‌ها با استفاده از PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. این مطالعه میزان شیوع ۴۹٪ را از گونه‌های مختلف مایکوپلازما گزارش کرد (۲۱). علت این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در سطح بهداشت جامعه باشد. مطالعات نشان داده‌اند که در کشور مصر شیوع این باکتری در بیماران مختلف بستری در بیمارستان در همین محدوده است

(۲۲). در مطالعه Apfalter و همکارانش با استفاده از روش real time-PCR میزان شیوع باکتری را ۳٪ گزارش کردند. نتیجه‌ای که حاصل شد این بود که این باکتری باید به‌عنوان عوامل ایجادکننده پنومونی مرتبط با بیماری‌های داخلی بیمارستانی در نظر گرفته شود؛ بنابراین، رژیم‌های ضد میکروبی برای درمان پنومونی بیمارستانی باید شامل مایکوپلازما پنومونیه نیز باشد. شایان ذکر است که آگاهی از علل بالقوه میکروبی در ایجاد پنومونی مرتبط با ونتیلاتور و تأیید علت خاص آن در یک بیمار، برای درمان آنتی‌بیوتیکی امری ضروری است (۲۳).

اهداف ژنی متنوعی در روش PCR برای شناسایی مایکوپلازما پنومونیه مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله اهداف پرکاربرد و مناسب برای تشخیص باکتری می‌توان به ژن *PI* و *16S rRNA* اشاره داشت. در مطالعات مختلف ژن *PI* را یک هدف مناسب برای PCR معرفی کرده‌اند. از آنجایی که این ناحیه از ژنوم چندین بار در مایکوپلازما پنومونیه تکرار می‌شود باعث افزایش حساسیت PCR جهت شناسایی این باکتری می‌شود (۱۴، ۲۴)؛ اما در مطالعات زیادی ناحیه *16S rRNA* را به‌عنوان هدفی مناسب جهت شناسایی باکتری مایکوپلازما پنومونیه معرفی کرده‌اند. در مطالعه Zhou و همکاران پیشنهاد کردند که ژن *PI* ممکن است حساس‌تر از *16S rRNA* باشد، اما نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد به دلیل اینکه تعداد موارد مثبت هنگام استفاده از پرایمرهای *16S rRNA* بیشتر از *PI* بود، تکثیر ژن *16S rRNA* حساسیت بیشتری برای تشخیص مایکوپلازما پنومونیه دارد (۱۴).

در مطالعه Akter و همکارانش نشان داده شد که علاوه بر باکتری‌های معمول، باکتری‌های غیرمعمول هم می‌توانند از عوامل ایجادکننده VAP باشند. در مطالعه آن‌ها ۱۳/۸۴ درصد موارد VAP با عفونت باکتری‌های غیر شایع مانند مایکوپلازما پنومونیه و لژیونلا پنوموفیلا ارتباط داشتند و از این تعداد ۷/۷٪ از لحاظ مایکوپلازما پنومونیه مثبت بودند. مطالعات دیگر در سایر کشورها، حضور چنین باکتری‌های غیرمعمول را در VAP گزارش داده است. میزان گزارش عفونت در مطالعات مختلف، از ۶/۶ درصد تا ۱۵ درصد با استفاده از روش‌های مولکولی بوده است (۱۹، ۲۷).

در مطالعه‌ای که Muir و همکارانش جهت شناسایی مایکوپلازما پنومونیه انجام دادند، در ۴۰٪ موارد این باکتری می‌تواند باعث پنومونی شود، اما به دلیل مشکل بودن جداسازی این باکتری در بیماران مبتلا به پنومونی مرتبط با ونتیلاتور، عموماً این باکتری مورد ارزیابی قرار نمی‌گیرد (۲۵).

در این مطالعه از لحاظ آماری بین مثبت بودن نمونه ها و علائم بالینی ارتباط دیده شد. نمونه های مثبت متعلق به بیمارانی بودند که علائم بالینی همچون تب، تراکئوبرونشیت، علائم مجاری تنفسی فوقانی، سردرد، بی حالی، گلودرد، درد عضلانی، سرفه خشک و ناگهانی که با خلط (خلط زرد رنگ و در بعضی مواقع بارگه های خون) همراه می شد را داشتند که با مطالعات دیگر کاملاً همخوانی دارد (۲۶، ۲۷).

پنومونی حاصل از مایکوپلازما پنومونیه یک بیماری ملایم، شبه آنفولانزا و خود محدود شونده است و به علت بهبودی در یک دوره نسبتاً کوتاه ۲-۳ هفته ای، بیمار کمتر به پزشک مراجعه می کند و همچنین پزشکان با تجویز داروی اریترومیسین و یا آزیترومایسین بیمار را به راحتی درمان می نمایند، در نتیجه پزشک جهت شناسایی این باکتری بیمار را کمتر به آزمایشگاه ارجاع می دهد. باین حال، پایین بودن میزان جداسازی مایکوپلازما پنومونیه در این بررسی در مقایسه با بعضی تحقیقات در ایران و یا در امریکا، می تواند به دلیل اختلاف در روش شناسایی باشد، زیرا که با استفاده از روش های سرولولژیکی در موارد یاد شده توانسته اند درصد بالاتری از مایکوپلازما پنومونیه را شناسایی کنند (۲۴).

به نظر می رسد جهت مدیریت عفونت VAP، علاوه بر درمان اختصاصی باکتری های شایع باید باکتری های غیر شایع نیز مدنظر قرار گیرند. شناسایی دقیق باکتری های ایجادکننده VAP بسیار حائز اهمیت است؛ زیرا باعث کاهش مصرف آنتی بیوتیک های غیرضروری می شود و در نهایت کاهش هزینه های بهداشتی و درمانی می شود (۱۹).

نتایج حاصل از این مطالعه برای اولین بار در ایران شیوع و فراوانی پایین مایکوپلازما پنومونیه در بیماران مبتلا به VAP را نشان داد و ارتباطی بین عفونت با این باکتری با این دسته از بیماران دیده نشد. سایر پژوهش های انجام شده در این زمینه، نشان داد مایکوپلازما پنومونیه می تواند به عنوان پاتوژن واقعی دستگاه تنفسی، به خصوص در بیماران ریوی، مطرح باشد؛ اما برای اثبات ارتباط بین مایکوپلازما پنومونیه با بیماری VAP لازم است مطالعات جامع تر با تعداد نمونه بیشتری صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از تمامی کارکنان بیمارستان های عرفان، عرفان نیایش و لقمان که در جمع آوری نمونه ما را برای انجام این طرح تحقیقاتی یاری کرده اند، کمال تشکر را دارد.

REFERENCES

1. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. Clin Infect Dis 2016;63: 61-111.
2. Othman AA, Abdelazim MS. Ventilator-associated pneumonia in adult intensive care unit prevalence and complications. The Egyptian Journal of Critical Care Medicine 2017;5:61-3.
3. Gadani H, Vyas A, Kar AK. A study of ventilator-associated pneumonia: Incidence, outcome, risk factors and measures to be taken for prevention. Indian J Anaesth 2010;54:535-40.
4. Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. Critical care 2014;18:208.
5. Muscedere JG, Day A, Heyland DK. Mortality, attributable mortality, and clinical events as end points for clinical trials of ventilator-associated pneumonia and hospital-acquired pneumonia. Clin Infect Dis 2010;51: 120-25.
6. Mokhless NA-S, El-Mofty MF, Hanafi NF, Muhammad A. Atypical bacteria in ventilator associated pneumonia; an Egyptian University Hospital experience. J Am Sci 2010;6:1074-79.
7. Saraya T. *Mycoplasma pneumoniae* infection: Basics. J Gen Fam Med 2017;18:118-25.
8. Meyer Sauter PM, Unger WW, Nadal D, Berger C, Vink C, van Rossum A. Infection with and Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in Children. Front Microbiol 2016; 23: 329.
9. Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. FEMS Microbiol Rev 2008;32:956-73.
10. Saraya T. The history of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Front Microbiol 2016;7:364.
11. Principi N, Esposito S, Blasi F, Allegra L, Group MS. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired lower respiratory tract infections. Clin Infect Dis 2001;32:1281-9.
12. Gardiner SJ, Gavranich JB, Chang AB. Antibiotics for community-acquired lower respiratory tract infections secondary to *Mycoplasma pneumoniae* in children. Cochrane Database Syst Rev 2015;1-CD004875.

13. Nour M, Trabelsi A, Maatouk N, Hammami M. Amplification of P1 and 16S rRNA genes by nested PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in paediatric patients. *Pathologie Biologie* 2005;53:9-14.
14. Zhou Z, Li X, Chen X, Yao L, Pan C, Huang H, et al. Comparison of P1 and 16S rRNA genes for detection of *Mycoplasma pneumoniae* by nested PCR in adults in Zhejiang, China. *J Infect Dev Ctries* 2015;9:244-53.
15. Bucholtz GA, Salzman SA, Bersalona FB, Boyle TR, Ejercito VS, Penno L, et al. PCR analysis of nasal polyps, chronic sinusitis, and hypertrophied turbinates for DNA encoding bacterial 16S rRNA. *Am J Rhinol* 2002;16:169-73.
16. Thumerelle C, Deschildre A, Bouquillon C, Santos C, Sardet A, Scalbert M, et al. Role of viruses and atypical bacteria in exacerbations of asthma in hospitalized children: a prospective study in the Nord-Pas de Calais region (France). *Pediatr Pulmonol* 2003;35:75-82.
17. Han X, Li S, Lu S, Liu L, Li S, Zhang J. Amplification of 16S rDNA by nested PCR for measurement of *Mycoplasma pneumoniae* DNA over time: clinical application. *J Med Microbiol* 2012;61:426-30.
18. Alp E, Voss A. Ventilator associated pneumonia and infection control. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006;5:7.
19. Akter S, Khatun R, Shamsuzzaman S. Molecular detection of atypical microorganisms in patients with ventilator associated pneumonia. *Ibrahim Med Coll J* 2015;9:22-5.
20. Moosavian S, Pordeli H. Survey of respiratory and urogenital infections due to *Mycoplasma* in the hospitalized patients in Ahwaz Imam Khomeini Hospital. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 2003;10:185-192. [In Persian]
21. Nolan T, Gadsby N, Hellyer T, Templeton K, McMullan R, McKenna J, et al. Low-pathogenicity *Mycoplasma* spp. alter human monocyte and macrophage function and are highly prevalent among patients with ventilator-acquired pneumonia. *Thorax* 2016;71:594-600.
22. El Seify MY, Fouda EM, Ibrahim HM, Fathy MM, Al Hussein Ahmed A, Khater WS, et al. Microbial etiology of community-acquired pneumonia among infants and children admitted to the pediatric hospital, Ain Shams University. *Eur J Microbiol Immunol* 2016; 6:206-214 .
23. Apfalter P, Stoiser B, Barousch W, Nehr M, Kramer L, Burgmann H. Community-acquired bacteria frequently detected by means of quantitative polymerase chain reaction in nosocomial early-onset ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 2005;33:1492-8.
24. Yamazaki T, Kenri T. Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan and therapeutic strategies for macrolide-resistant *M. pneumoniae*. *Front Microbiol* 2016;7:693.
25. Muir MT, Cohn SM, Loudon C, Kannan TR, Baseman JB. Novel toxin assays implicate *Mycoplasma pneumoniae* in prolonged ventilator course and hypoxemia. *Chest* 2011;139:305-10.
26. Izumikawa K. Clinical features of severe or fatal *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Front Microbiol* 2016;7:800.
27. Kashyap S, Sarkar M. *Mycoplasma pneumoniae*: Clinical features and management. *Lung India* 2010;27:75-85.