ORIGINAL ARTICLE

Prevalence of Fungal Peritonitis in Cancer Patients Admitted in Imam Khomeini Hospital, Tehran, 2012-2013

Samaneh Afshar[1],
Seyed Reza Aghili[2],
Tahereh Shokohi[3],
Iman Haghani[4],
Ghasem Janbabaei[5]

[1] MSc Student in Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD Student in Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Professor, Department of Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] MSc in Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Internal Medical, Molecular Cell-Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 31, 2014 ; Accepted December 8, 2014)

Abstract

Background and purpose: The prevalence of fungal peritonitis (FP) in cancer patients is rare and the information about it is limited. The aim of this study was to determine the prevalence of FP in patients with malignancy in a specific period.

Material and methods: In a cross sectional study, all cancer patients with symptoms of peritonitis admitted to Imam Khomeini Hospital, Tehran for treatment were studied to identify fungal peritonitis between October 2012 and September 2013. Ascites samples from 207 patients were cultured in biphasic brain heart infusion media in order to detect fungal causative agent based on morphological characteristics and sequencing of the ITS-r DNA region of yeasts. The role of effective factors was evaluated by X^2 and the t- test with 95% confidence level.

Results: FP was diagnosed in 8 (3.9%) of the patients. The association of fungi with bacteria was seen in 4 cases (1.9%). *Candida guilliermondii* was the most common agent of FP (37.5%). Other species of Candida such as *C. membranifaciens*, *C. carpophila*, *C. glabrata* and *C. deformans* were identified with the frequency 12.5% for each case. *Aspergilus fumigatus* was isolated and identified from one patient (12.5%). The most frequent FP was found in genitourinary cancer in women (62.5%) and in gastrointestinal cancer in men (37.5%).There was a significant relationship between having fever, use of antibiotics during the past 6 months and the history of bacterial peritonitis ($P<0.05$).

Conclusion: This study, like recent studies showed that *Non-albicans candida* species such as *C. guilliermondii* have an active role in nosocomial infection and FP in cancer patients. Genitourinary or gastrointestinal cancer and the outbreak of bacterial peritonitis and long-term usage of antibiotics can lead to FP. It increases the mortality in patients as well as additional complications. So, it is necessary to perform mycological diagnostic tests of ascites fluid sample in cancer patients with peritonitis sign.

Keywords: Fungal peritonitis, cancer, ascites fluid, *Non-albicans Candida*, *Aspergillus fumigatus*

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(118): 1-10 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۸ آبان سال ۱۳۹۳ (۱۰-۱)

بررسی شیوع پریتونیت قارچی در مبتلایان به سرطان بستری شده در بیمارستان امام خمینی تهران در سال۹۰-۹۲

سمانه افشار[۱]
سید رضا عقیلی[۲]
طاهره شکوهی[۳]
ایمان حقانی[۴]
قاسم جان بابایی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: بروز پریتونیت قارچی در بیماران مبتلا به سرطان نادر است و اطلاعات در مورد شیوع آن نیز محدود می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی شیوع آن در مبتلایان به بدخیمی در دوره زمانی مشخص می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه‌ای مقطعی طی دو سال، مایع آسیت جدا شده از ۲۰۷ بیمار سرطانی مبتلا به پریتونیت، بستری در بیمارستان امام خمینی تهران بر اساس روش کشت در محیط بی‌فازیک، از نظر وجود عناصر قارچی مورد بررسی قرار گرفت. پس از شناسایی قارچ با روش‌های مرفولوژیک و فیزیولوژیک با انجام واکنش PCR ناحیه ITS rDNA و سپس تعیین سکانس و مقایسه با اطلاعات موجود در NCBI GenBank، گونه قارچ تعیین شد. نقش فاکتورهای مداخله گر با آزمون‌های کای ۲ و t دانشجویی با فاصله اطمینان ۹۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۲۰۷ بیمار مورد بررسی در ۸ مورد (۳/۹ درصد) مشارکت عوامل قارچی در پریتونیت تشخیص داده شد. در ۴ مورد (۱/۹ درصد) از این بیماران همراهی ارگانیسم قارچی و باکتریایی در بروز پریتونیت دیده شد. کاندیدا گیلرموندی با فراوانی ۳۷/۵ درصد شایع‌ترین عامل مخمری شناسایی شده در بیماران بود. گونه‌های ک. ممبرانیفاسینس، ک. کارپوفیلا، ک. گلابراتا، ک. دفرمنس هر کدام با فراوانی ۱۲/۵ درصد شناسایی شدند. قارچ رشته‌ای آسپرژیلوس فومیگاتوس نیز در یک بیمار (۱۲/۵ درصد) از مایع آسیت جداسازی و شناسایی گردید. بیشترین موارد پریتونیت قارچی در مبتلایان به سرطان دستگاه تناسلی جنس مونث (۶۲/۵ درصد) و سرطان دستگاه گوارشی جنس مذکر (۳۷/۵ درصد) بود. از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین بروز پریتونیت قارچی و وجود تب، مصرف آنتی بیوتیک طی ۶ ماه گذشته و سابقه ابتلا به پریتونیت باکتریایی مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).

استنتاج: مطالعه حاضر همسو با مطالعات اخیر دیگران نشان داد، گونه‌های کاندیدا غیرآلبیکنس همچون ک.گیلرموندی در بروز عفونت های بیمارستانی وپریتونیت قارچی در مبتلایان به سرطان نقش فزاینده دارند. سرطان دستگاه تناسلی یا گوارشی و بروز پریتونیت باکتریایی و مصرف طولانی مدت آنتی بیوتیک در این بیماران زمینه ساز پریتونیت قارچی بوده، علاوه بر بروز عوارض مضاعف، میزان مرگ ومیر بیماران را افزایش می دهد. لذا انجام آزمایشات تشخیصی قارچ شناسی برای نمونه مایع آسیت در بیماران سرطانی با علامت پریتونیت امری ضروری است.

واژه های کلیدی: پریتونیت قارچی، سرطان، مایع آسیت، کاندیدا غیر آلبیکنس، آسپرژیلوس فومیگاتوس

مقدمه

سرطان اصطلاحی برای اطلاق به گروهی از بیماری‌ها است که در آن سلول‌های غیرطبیعی بدون کنترل تقسیم می‌شوند و می‌توانند به سایر بافت‌ها تهاجم کنند. سلول‌های سرطانی می‌توانند از طریق خون و

مولفین مسئول: سید رضا عقیلی و طاهره شکوهی- ساری:کیلومتر۱۸ جاده فرح آباد ، مجتمع پیامبر اعظم، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
E-mail: aghili70@yahoo.com , shokohi.tahereh@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مربی و دانشجوی دکتری قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد، گروه قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. کارشناسی ارشد قارچ شناسی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشیار، گروه داخلی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۳/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۴/۱۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۹/۱۷

دستگاه لنفاوی به سایر نقاط بدن گسترش پیدا کنند. جراحی‌های متعدد و عفونت ناحیه گوارشی و تناسلی در بیماران سرطانی اغلب همراه با التهاب حفره صفاقی (پریتونیت) است(۳-۱). عفونت‌های داخل صفاقی معمولاً هنگامی ایجاد می‌شود که سدهای آناتومیکی طبیعی از هم گسیخته و میکروارگانیسم‌ها به حفره صفاقی که در حالت عادی استریل است وارد شوند. سرطان یکی از عوامل زمینه ساز ایجاد عفونت‌های داخل صفاقی هستند(۱). پریتونیت قارچی هر چند بیماری نادری است، اما به دلیل عوارض حاد تهدیدکننده زندگی بیماران می‌باشد. در صورت عدم تشخیص به موقع و درمان صحیح با داروهای ضد قارچی موثر، عفونت‌های قارچی توسعه می‌یابد. لذا با ورود عوامل قارچی به حفره صفاقی و ایجاد التهاب شدید مرگ و میر بالای این بیماران را در پی خواهدداشت(۴،۲). پریتونیت قارچی با علائم اتساع شکم، تجمع مایع، درد فراگیر در شکم یا در بخشی از آن، تب، لرز، تهوع و استفراغ، تشنگی، کاهش برون ده ادرار، ناتوانی در دفع مدفوع و گاهی شوک همراه است(۵،۱) این درد معمولاً به طور ناگهانی آغاز شده و به طور پیشرونده تشدید یافته یا ممکن است در ابتدا حالت متناوب و سپس حالت ثابت داشته باشد(۶). بیمار دچار این درد، اغلب ترجیح می‌دهد که به پشت بخوابد و هیچ‌گونه حرکتی نکند، زیرا حرکت یا فشار به شکم باعث افزایش این درد می‌شود(۵،۲،۱). گاه عفونت ممکن است بدون تورم و درد نیز همراه باشد، چرا که دردهای عمقی اغلب محدوده مشخص و واضحی ندارند(۲). این بیماری نسبتاً نادر اما به شدت جدی و خطرناک است. در بزرگسالان میزان فراوانی پریتونیت قارچی ۱۵-۱ درصد و در کودکان ۶-۳ درصد(۸،۷،۴) می‌باشد، که عوامل زمینه‌ای می‌تواند بر فراوانی آن بیافزاید. میزان مرگ و میر به دنبال آن در حدود ۵۰-۱۵ درصد می‌باشد(۹،۴). عامل اصلی بیماری گونه‌های کاندیدا ۹۰-۷۰ درصد و قارچ‌های رشته‌ای در حدود ۳۰-۱۰ درصد هستند(۱۱،۱۰،۴).

وضعیت سیستم ایمنی، وضعیت تغذیه‌ای بیمار، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف از عواملی است که در تشدید بیماری و هم‌چنین بهبودی بیمار نقش مهمی دارند(۱۳،۱۲،۲). پریتونیت قارچی به سختی قابل تشخیص است و در اکثر موارد بیمار قبل از تشخیص بر اثر شدت بیماری فوت می‌کند(۴) اما با تشخیص به موقع و درمان ضد قارچی مناسب مانند آمفوتریسین B و فلوکونازول و یا داروهای جدید از جمله وریکونازول و کسپوفانژین که بسیار موثرند، از عوارض خطرناک آن جلوگیری می‌شود(۱۵،۱۴،۹،۴). در ایران بیش تر مطالعات در زمینه پریتونیت قارچی بر روی بیماران با دیالیز صفاقی صورت پذیرفته و بیماران سرطانی از نظر دور مانده‌اند. اطلاعات بسیار کمی در ارتباط با شیوع پریتونیت قارچی و علائم کلینیکی آن در ایران در دست است. لذا با توجه به عوارض خطرناک و مهلک پریتونیت قارچی و عدم وجود اطلاعات خصوصا در بیماران سرطانی، این تحقیق با هدف تعیین شیوع پریتونیت قارچی در مبتلایان به سرطان بستری شده در بیمارستان امام خمینی تهران در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۰ به اجرا در آمد. نتایج این بررسی می‌تواند ما را در شناسایی بیش‌تر و سریع تر بیماری و درمان این بیماران و جلوگیری از مرگ و میر آنان یاری نماید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی که طی یک دوره زمانی دو ساله (پاییز ۹۰ تا تابستان ۹۲) صورت گرفت. طی این بررسی، از ۲۰۷ بیمار مبتلا به سرطان دچار پریتونیت بستری در انستیتو سرطان بیمارستان امام خمینی تهران نمونه‌برداری به‌عمل آمد. نمونه مایع آسیت (به میزان ۵۰-۱۰ میلی‌لیتر) از بیماران مبتلا به پریتونیت توسط پزشک متخصص تحت شرایط استریل در اتاق عمل استخراج گردید. جهت انجام آزمایش مستقیم ابتدا نمونه به لوله استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس مقداری از مایع رویی را دور ریخته تا

حجم رسوب حاصله حدود ۲ میلی‌لیتر شود. جهت آزمایش مستقیم نمونه‌ها ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون در سطح لام میکروسکوپی با لاکتوفنل رنگ‌آمیزی گردید. نتایج رنگ‌آمیزی گیمسا در بخش بافت شناسی نیز اخذ گردید. جهت کشت نمونه و جداسازی احتمالی قارچ‌ها ۳-۱/۵ میلی‌لیتر از مایع آسیت استخراج شده از بیمار به بطری کشت بی فازیک (آگار/براث) برین هارت اینفیوژن تلقیح و محیط کشت در حرارت ۳۷ درجه انکوبه گردید. علاوه براین ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون پس از سانتریفوژ به محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار حاوی کلرامفنیکل (BHI-C) تلقیح و در حرارت ۲۵ درجه انکوبه و محیط‌های کشت انکوبه شده هر روزه تا ۲ هفته از نظر رشد کلنی‌های قارچی مورد بازبینی قرارگرفت.

جهت اطمینان از منفی بودن رشد و یا تایید رشد قارچ در محیط بی فازیک، پس از گذشت ۷ روز از زمان تلقیح، ۱ میلی‌لیتر از فاز مایع بطری در محیط کشت BHI-C تلقیح و روزانه جهت رشد کلنی‌های قارچی مورد بازبینی قرارگرفت.

عدم مشاهده عناصر قارچی در آزمایش مستقیم همراه با عدم رشد کلنی و کدورت در محیط بی‌فازیک، عدم رشد کلنی در محیط کشت BHI-C و همچنین عدم رشد قارچ در پاساژ محیط بی فازیک در سطح پلیت بعنوان منفی و رشد کلنی قارچی یکسان در محیط‌های کشت متنوع به عنوان پریتونیت قارچی تلقی گردید. در صورت مثبت بودن نتایج بررسی مستقیم میکروسکوپی و کشت، در اسرع وقت به اطلاع پزشک معالج بیمار رسانده تا راهکار مناسب درمانی اتخاذ گردد. کلنی‌های قارچی رشد یافته در محیط‌های کشت بی‌فازیک و یا محیط‌های کشت BHI-C به محیط کشت سابورو دکستروز آگار انتقال یافته و کلنی‌های قارچی با روش‌های استاندارد قارچ شناسی مبتنی بر خصوصیات مرفولوژیک و فیزیولوژیک مورد شناسایی قرار گرفت.

جداسازی DNA: ابتدا از کشت خالص ایزوله‌های قارچی، DNA با استفاده از روش فروپاشی با گلس بید و فنل-کلروفرم استخراج شد(۱۷،۱۶). نمونه DNA سپس در ۲۰µl بافر TE (۱۰mM Tris-HCL، 1mM EDTA pH:8) در ۲۰°C- تا زمان استفاده نگهداری شد. غلظت DNA و نسبت جذب در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. ژنومیک DNA جداسازی شده در ۲۰°C- تا زمان استفاده نگهداری می‌شد.

روش انجام PCR: جفت پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی 5′- TCC GTA GGT GAA CCT GCG -3′) (forward) ITS1:<G> و (reverse) ITS4)؛ (5′- TCC TCC GCT TAT TGA TAT G<C>-3′ به منظور تقویت قطعه حدود ۳۰۰-۸۰۰ (bp) در ناحیه ژنی ITS1-5.8S-ITS2 rDNA)، استفاده شد. PCR در یک حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری با سیکل‌های گرمایی انجام شد. به منظور آگاهی از اندازه محصول PCR، ۵ میکرولیتر از هر یک از محصولات به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۰ الی ۱۰۰ ولت در ژل آگارز ۱ درصد و بافر 1X TBE (Tris base، Boric acid، EDTA PH:8) الکتروفورز شد. تعیین اندازه باندها برای گونه‌های مخمری باتوجه به الگوی الکتروفورتیک حاصله و با مقایسه با یک DNA Marker (100 bp) (BIRON co.) به دست آمد.

تعیین توالی محصولات PCR:

محصولات با روش (Column based purification Kit (millipore) using vacuum for filtering) با همکاری شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) تخلیص گردیده و ناحیه ژنی ITS1-5.8S-ITS2 rDNA با پرایمر ITS1 تعیین توالی گردید. تعیین توالی DNA به کمک دستگاه DNA Sequencing (ABI 3730.XL) و با روش استاندارد سنگر(Dideoxy nucleotide chain termination) صورت پذیرفت، تعیین گونه یا استرین قارچ با

مقایسه توالی‌های DNA به دست آمده با اطلاعات بانک ژنی، با استفاده از نرم‌افزار آنلاین BLAST به‌وسیله جستجوی اطلاعات در سایت http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST با بالاترین میزان تشابه (Identification) و میزان همپوشانی (Query cover) و ارزیابی بیش‌ترین گزارشات (Hit) انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و انجام آزمون X^2 جهت داده‌های کیفی و t test جهت داده‌های کمی با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بررسی شد.

یافته ها

در این مطالعه ۲۰۷ بیمار مبتلا به سرطان دچار پریتونیت بستری در بخش انستیتو سرطان بیمارستان امام خمینی تهران در طی مدت مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سنی بیماران ۱۶± ۴۵/۸ با دامنه ۱۳-۸۹ سال بود. بیشترین گروه سنی بیماران مبتلا به پریتونیت در گروه سنی ۶۰-۴۰ سال بودند. نسبت بیماران مرد به زن ۱ به ۳/۹ بود. تنها در ۸ مورد (۳/۹ درصد) مشارکت عوامل قارچی در بروز پریتونیت تشخیص داده شد که ۵ (۶۲/۵ درصد) مورد در زنان و ۳ (۳۷/۵ درصد) مورد در مردان بود. ارتباط معنی‌داری بین جنسیت و پریتونیت قارچی یافت نشد. ۳ (۳۷/۵ درصد) مورد از ۸ بیمار مبتلا به پریتونیت قارچی طی ۶ ماه گذشته آنتی بیوتیک مصرف داشته‌اند. ۳ (۳۷/۵ درصد) بیمار نیز سابقه جراحی و شیمی درمانی طی یک سال گذشته داشته‌اند. میانگین تعداد روزهای بستری در بیمارستان در کل بیماران مورد مطالعه ۶±۹/۱۲ روز بود. این میانگین در افراد مبتلا به پریتونیت قارچی کمی بیش‌تر (۷±۱۰روز) بود (p=۰/۱). بیش‌ترین موارد پریتونیت قارچی در مبتلایان به بدخیمی دستگاه تناسلی جنس مونث (۶۲/۵ درصد) و بدخیمی دستگاه گوارشی جنس مذکر (۳۷/۵ درصد) بود (جدول شماره۱). در ۴ (۱/۹ درصد) مورد از این بیماران همراهی ارگانیسم قارچی و باکتریایی در بروز پریتونیت شناسایی شد. در مطالعه حاضر، سن، جنس، عامل بیماریزا، سابقه جراحی و شیمی درمانی، مصرف کورتیکواستروئید، درد و تورم شکم، یبوست و تهوع و نوع سرطان ارتباط معناداری از نظر آماری با پریتونیت قارچی نشان ندادند (p>۰/۰۵). اما وجود تب، مصرف آنتی‌بیوتیک طی ۶ ماه گذشته و ابتلا به پریتونیت باکتریایی با پریتونیت قارچی ارتباط معنی‌داری را نشان داد(p<۰/۰۵) (جدول شماره۲). از نظر آماری درد در ناحیه زیر شکم، تب و یبوست شایع‌ترین تظاهرات کلینیکی بیماران مورد مطالعه بود. در مقایسه بیماران مبتلا به پریتونیت با عامل قارچی- باکتریایی با بیماران مبتلا که تنها عامل قارچی از آن‌ها جدا گردید، مصرف آنتی‌بیوتیک ضد باکتریایی در ۶ ماه گذشته و وجود سابقه شیمی درمانی و جراحی در یک سال گذشته نسبت بالاتری را نشان داده است. از ۸ مورد بیمار مبتلا به پریتونیت قارچی، در ۷ مورد مخمر کاندیدا غیرآلبیکنس و ۱ مورد قارچ رشته‌ای آسپرژیلوس فومیگاتوس شناسایی گردید. به جهت آن‌که تنها در ۱ مورد از مخمرها در کشت در محیط کروم آگار رنگ ارغوانی آشکار گردید و در ۶ مورد دیگر کلنی سفید متمایل به کرم رنگ تظاهر نمود و همچنین در روش کشت در محیط کورن میل آگار + توئین ۸۰ تنها در یک مورد فقط بلاستوکونیدی را نشان داد و در ۶ مورد دیگر کلنی مخمری، بلاستوکونیدی به همراه میسلیوم کاذب مشاهده گردید، تشخیص گونه قارچ با استفاده از روشهای مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی به جز یک مورد (ک. گلابراتا) در سایر موارد میسر نشد (جدول شماره ۳). لذا شناسایی گونه بر اساس روش مولکولی و تعیین توالی ناحیه ژنی ITS-rDNA صورت پذیرفت.

تمامی (۱۰۰ درصد) انواع گونه‌های کاندیدا جدا شده از مایع آسیت بیماران مبتلا به پریتونیت قارچی کاندیدا غیرآلبیکنس بودند. کاندیدا گیلر موندی و گونه‌های نزدیک به آن (ک. ممبرانیفاسینس و ک.کارپوفیلا) شایع‌ترین عوامل مخمری عامل پریتونیت در بیماران بودند (نمودار شماره ۱).

جدول شماره۱: توزیع فراوانی ۲۰۷ بیمار سرطانی دچار پریتونیت بستری در مجتمع بیمارستانی امام خمینی تهران (۹۲-۹۰) برحسب جنسیت و انواع سرطان

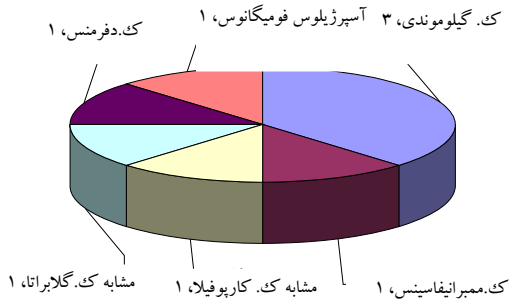
نوع سرطان	جنسیت				جمع
	زن		مرد		
	مبتلا به پریتونیت قارچی تعداد (درصد)	عدم ابتلا به پریتونیت قارچی تعداد (درصد)	مبتلا به پریتونیت قارچی تعداد (درصد)	عدم ابتلا به پریتونیت قارچی تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
کانسر تخمدان	۴ (۴/۵)	۸۵ (۹۵/۵)	۰ (۰)	۰ (۰)	۸۹ (۴۳)
کانسر رحم	۱ (۱/۹)	۵۱ (۹۸/۱)	۰ (۰)	۰ (۰)	۵۲ (۲۵/۱)
کانسر معده	۰ (۰)	۵ (۲۱/۷)	۱ (۴/۳)	۱۷ (۷۴)	۲۳ (۱۱/۱)
کانسر روده	۰ (۰)	۸ (۴۰)	۱ (۵)	۱۱ (۵۵)	۲۰ (۹/۷)
کانسر پانکراس	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۲ (۱)
کانسر خون	۰ (۰)		۰ (۰)	۴ (۱۰۰)	۴ (۱/۹)
کانسر کبد	۰ (۰)	۳ (۳۰)	۱ (۱۰)	۶ (۶۰)	۱۰ (۴/۸)
کانسر سینه	۰ (۰)	۴ (۱۰۰)	۰ (۰)		۴ (۱/۹)
کانسر مری	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)	۰ (۰)		۲ (۱)
کانسر ریه	۰ (۰)	۱ (۱۰۰)	۰ (۰)		۱ (۰/۵)
جمع (درصد)	۵ (۲/۴)	۱۶۰ (۷۷/۳)	۳ (۱/۵)	۳۹ (۱۸/۸)	۲۰۷ (۱۰۰)

جدول شماره ۲ : مقایسه مشخصات بیماران مبتلا به پریتونیت قارچی و قارچی- باکتریایی همزمان

متغیر		پریتونیت قارچی	قارچی و باکتریایی همزمان	سطح معنی داری
سن	میانگین ± انحراف	۱۱/۰۵±۵۵/۵ سال	۷/۶±۶۳/۳ سال	۰/۲
نسبت مرد/زن		۱:۱/۶	۴:۰	۰/۲
مصرف آنتی بیوتیک در۶ ماه گذشته	تعداد (درصد)	۳ (۳۷/۵)	۲ (۵۰)	۰/۰۴
از معیار طول دوره بستری	میانگین ± انحراف	۷±۱۰ روز	۳/۶± ۹/۲۵ روز	۰/۱
بیمار با علامت تب	تعداد (درصد)	۳ (۳۷/۵)	۱ (۲۵)	۰/۰۴
بیمار با علامت درد در ناحیه شکم	تعداد (درصد)	۸ (۱۰۰)	۴ (۱۰۰)	۰/۶
بیمار با علامت یبوست و بی اشتهایی	تعداد (درصد)	۲ (۲۵)	۰(۰)	۰/۷
سابقه جراحی و شیمی درمانی در ۱ سال گذشته	تعداد (درصد)	۳ (۳۷/۵)	۳ (۷۵)	۰/۱
مرگ و میر	تعداد (درصد)	۳(۳۷/۵)	۱ (۲۵)	۰/۱

جدول شماره ۳ : مشخصات مرفولوژیکی مخمرهای جدا شده از موارد پریتونیت قارچی

کشت در محیط کورن میل آگار	رنگ کلنی در محیط کروم آگار	ارگانیسم قارچی شناسایی شده با تعیین سکانس ناحیه ITS-rDNA
بلاستوکونیدی	ارغوانی	کاندیدا گلابراتا
بلاستوکونیدی و میسلیوم کاذب	سفید متمایل به کرم	کاندیدا گیلرموندی
بلاستوکونیدی و میسلیوم کاذب	سفید متمایل به کرم	کاندیدا ممبرانیفاسینس
بلاستوکونیدی و میسلیوم کاذب	سفید	کاندیدا کارپوفیلا
بلاستوکونیدی و میسلیوم کاذب	سفید	کاندیدا دفرمنس



نمودار شماره ۲: فراوانی انواع گونه های قارچی عامل پریتونیت در بیماران بستری در بیمارستان امام خمینی تهران (۹۰-۹۲)

بحث

به‌طور کلی پریتونیت قارچی بیماری خطرناکی است که هرچند شیوع نسبتا پایینی دارد، اما اگر به موقع تشخیص داده نشده و درمان نشود، عوارض شدید و خطرناک و مرگ و میر نسبتا بالایی را به دنبال خواهد داشت. مطالعات سال‌های ۱۹۸۰ به بعد نشان می‌دهد عفونت‌های ناشی از قارچ‌های فرصت طلب به خصوص گونه‌های کاندیدایی در افراد دچار نقص سیستم ایمنی به‌طور چشمگیری روبه افزایش است(۱۸). درگذشته بیش‌ترگونه‌کاندیدا آلبیکنس عامل عفونت‌های کاندیدایی

بوده‌اند، اما در سال‌های اخیر گونه‌های کاندیدا غیرآلبیکنس اعم از کاندیدا گلابراتا، گیلرموندی، پاراپسیلوزیس، تروپیکالیس، کروزه‌ای، دفرمنس، لوزیتانیا بیش‌ترین عوامل کاندیدایی جدا شده از بیماران دچار عفونت‌های کاندیدایی شناخته شده‌اند(۱۹). عوامل قارچی می‌توانند به دنبال دیالیز داخل صفاقی، سرطان و تروما وارد حفره صفاقی شوند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند عامل اصلی پریتونیت قارچی در این بیماران گونه‌های کاندیدا غیرآلبیکنس هستند (۱۲،۴-۱۰).

در مطالعات اخیر مشخص شده است که افرادی که دیالیز داخل صفاقی دارند و حدود ۳ ماه از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف استفاده کرده‌اند و بیماری زمینه ای همچون دیابت دارند، بیش‌تر در معرض خطر ابتلا به پریتونیت قارچی قرار دارند(۱۳،۱۲،۹،۶،۴،۲).

پریتونیت قارچی به سختی قابل تشخیص است و در اکثر موارد قبل از تشخیص بیمار بر اثر شدت بیماری فوت می‌کند(۴). در مطالعه حاضر میزان مرگ و میر به دنبال پریتونیت قارچی ۳۷/۵ درصد برآورد شده که با نتیجه مطالعات مختلف که این میزان را ۵۰-۱۵ درصد گزارش کردند، مطابقت دارد(۱۲،۹،۴). با تشخیص به موقع و درمان ضد قارچی موثر مانند آمفوتریسین B و فلوکونازول و یا داروهای جدید شامل وریکونازول و کسپوفانژین از عوارض خطرناک آن جلوگیری می‌شود(۲۱،۲۰،۱۵،۱۴،۹،۴،۲).

در بین گونه‌های کاندیدا، کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین گونه بیماریزا، مهم‌ترین عوامل عفونت‌های کاندیدایی و مسئول تقریباً ۴۰ درصد از موارد مرگ و میر می‌باشد. اما در سال‌های اخیر جداسازی گونه‌های کاندیدا غیر آلبیکنس از موارد این عفونت‌ها رو به فزونی گذاشته که اغلب مقاوم به داروهای ضد قارچی معمول همچون داروهای آزولی می‌باشند(۲۳-۲۰).

در مطالعه حاضر نیز مسبب ۸۷/۵ درصد موارد پریتونیت قارچی کاندیدا غیر آلبیکنس و ۱۲/۵ درصد موارد ناشی از آسپرژیلوس فومیگاتوس که با نتایج مطالعات Fahmy khan (۹) و Almoujahed(۲۴) که عامل شایع پریتونیت قارچی را گونه‌های کاندیدا غیرآلبیکنس گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد. هم‌چنین نتایج مطالعه حاضر با مطالعات Bren (۱۲) Tasic(۲۵) که کاندیدا را عامل اصلی و پس از آن جنس آسپرژیلوس را عامل مهم پریتونیت قارچی ذکر کرده‌اند، مطابقت دارد.

تکنیک‌های معمول تشخیصی قارچ شناسی حساسیت کافی را جهت تشخیص جنس و گونه عوامل قارچی به خصوص در مورد عوامل مخمری را نداشته و تشخیص قطعی فرایندی زمان بر و پر هزینه است. در مطالعه حاضر نیز تشخیص اولیه بر پایه مشخصات مورفولوژیک و فیزیولوژیک از ۷ کلنی مخمری مورد مطالعه به جز یک مورد که کاندیدا گلابراتا تشخیص داده شده بود، در بقیه موارد به دلیل ویژگی‌های مشترک تشخیص قطعی میسر نبود و همگی گونه‌ای از کاندیدا تشخیص داده شد. این مطالعه نشان داد که فرایند معمول تشخیصی قارچ شناسی تنها برای شناسایی گونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا ارزش تشخیصی دارد و در خصوص سایر گونه‌های کاندیدا کارآیی لازم را نخواهد داشت. در نتیجه استانداردسازی و تکنیک‌های تشخیصی مولکولی به صورت تجاری، که حساسیت بالاتری دارند، جهت شناسایی گونه‌های کاندیدا ضروری به نظر می‌رسد(۲۷،۲۶).

روش‌های مولکولی جهت شناسایی ارگانیسم بیماریزا با توجه به حساسیت و اختصاصیت بالای ۹۰ درصد، توانایی شناسایی گونه‌های کاندیدا را داراست و هم‌چنین بررسی وجود موتاسیون‌های مقاوم به داروهای ضد قارچی را امکان‌پذیر ساخته است(۲۶).

پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های تعیین ترادف ژنی DNA نه تنها توانایی جبران نقایص روش‌های معمول گذشته در تشخیص گونه را داراست، بلکه در بسیاری از موارد تشخیص گونه را با حساسیت و اختصاصیت بالا و سرعت و دقت بیش‌تر امکان‌پذیر می‌نماید. در این میان

روش بارکدگذاری و تعیین ترادف نواحی متغیر در ارگانیسم‌ها یک روش قابل اطمینان محسوب می‌گردد(۲۷).

ناحیه ITS (internal transcribed spacer) در DNA ریبوزومی معمول‌ترین ناحیه برای تعیین فیلوژنی در بسیاری از ارگانیسم‌های قارچی به ویژه مخمرها است و جهت تعیین گونه و بررسی وجود موتاسیون‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. مطالعات متعددی بهره‌گیری از آن جهت تعیین گونه قارچ‌های پاتوژن به‌ویژه کاندیداها را جهت تایید روش‌های معمول، سنتی و یا حتی به صورت اولیه قابل استناد ذکر نموده‌اند(۲۹-۲۷). ایجاد بانک های اطلاعات ژنی ابزار کاربردی مناسب جهت مقایسه نمونه های جدید با نمونه‌های ثبت شده گذشته می‌باشد(۳۰).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ابزار جستجوی هم ردیفی منطقه‌ای از ژنوم، ابزار قابل دسترس و مناسبی است که در صورت ثبت قطعات ژنی در آن برای تمامی ارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. خوشبختانه در این تکنیک در خصوص انواع گونه‌های کاندیدا نواحی ژنی متفاوت براساس تحقیقات محققین ثبت شده و امکان مقایسه نمونه‌های جدید با آن‌ها برای هرمحققی امکان‌پذیر می‌باشد.

دربررسی حاضر درکنار روش‌های معمول، برای تشخیص ایزوله‌های جدا شده از تکنیک آنالیز توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 واقع DNA ریبوزومی استفاده گردید و تعیین گونه براساس مطابقت توالی این ناحیه در ایزوله‌های مورد آزمایش با توالی استرین‌های مرجع موجود در بانک ژنی انجام پذیرفت. در این مطالعه سن، جنس، عامل بیماریزا، سابقه جراحی و شیمی درمانی، مصرف کورتیکواستروئید، درد و تورم شکم، یبوست و تهوع، نوع سرطان ارتباط معناداری از نظر آماری با پریتونیت قارچی نشان ندادند اما وجود تب، مصرف آنتی بیوتیک طی ۶ ماه گذشته و سابقه ابتلا به پریتونیت باکتریایی(۷) ارتباط معنی‌داری از نظر آماری با پریتونیت قارچی داشتند که این یافته با نتایج مطالعات(۷،۹،۳۳-۳۱) که ابتلا مکرر پریتونیت باکتریایی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف در افزایش ریسک ابتلا به پریتونیت قارچی را دخیل دانستند، هماهنگ است.

اغلب موارد پریتونیت قارچی در بیماران با سیستم ایمنی تضعیف شده دیده می‌شوند و سرطان‌ها یکی از عوامل مستعدکننده آن می‌باشند و همان‌طور که از نتایج این بررسی مشاهده می‌شود، سرطان‌ها به ویژه در ناحیه تناسلی و گوارشی یکی از عوامل زمینه‌ساز پریتونیت قارچی می‌تواند باشد(۳۵،۳۴).

این مطالعه نشان داد سرطان ناحیه تناسلی وگوارشی و جراحی‌های متعاقب آن در این ناحیه می‌تواند زمینه ساز ابتلا به پریتونیت قارچی گردد. ازسویی ابتلا مکرر به پریتونیت باکتریایی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف می‌تواند در بروز پریتونیت قارچی نقش ایفا نماید. در صورتی‌که پریتونیت قارچی بموقع تشخیص داده نشده و درمان ضد قارچی صورت نگیرد مرگ و میر بالایی به دنبال خواهد داشت.گونه‌های کاندیدا غیرآلبیکنس مهمترین عوامل مسبب پریتونیت قارچی هستند. شناسایی سریع و دقیق گونه عامل بیماری می‌تواند امکان درمان به موقع و استفاده از داروی ضد قارچی موثرتر را فراهم سازد. امروزه روش‌های مولکولی از جمله تعیین ترادف ناحیه ژنی ITS واقع در DNA ریبوزومی به این امر کمک شایانی می‌کند.

References

1. Basturk, T, Koc Y, Unsal A, Ahbap E, Sakaci T, Yildiz I, et al. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis: a 10 year retrospective analysis in a single center. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2012; 16(12): 1696-1700.
2. Matuszkiewicz–Rowinska J. Update on fungal peritonitis and its treatment. Perit Dial Inter 2009; 29(Suppl2): S161-165.
3. Abdel Ghaffar MK, Hassan MS, Mostafa MY. Value of implantable peritoneal ports in

managing recurrent malignant ascites. The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine 2014; 45(2): 417-422.

4. García-Agudo R, García-Martos P. Clinical and microbiological aspects of fungal peritonitis in peritoneal dialysis. Nefrologia 2009; 29(6): 506-517.
5. Predari SC, de Paulis AN, Verón D, Zucchini A, Santoianni JE. Fungal peritonitis in patients on peritoneal dialysis:Twenty five years of experience in a teaching hospital in Argentina. Rev Argent Microbiol 2007; 39(4): 213-217.
6. Chavada R, Kok J, VanHal S, Chen Sc-A. Seeking Clarity within Cloudy Effluents: Differentiating Fungal from Bacterial Peritonitis in Peritoneal Dialysis Patients. PloS One 2011; 6(12): 28247.
7. Hooman N, Madani A, Sharifian Dorcheh M, Mahdavi A, Derakhshan A, Gheissari A, et al. Fungal peritonitis in Iranian children on continuous ambulatory peritoneal dialysis: a national experience. Iran J Kid Dis 2007; 1(1): 29-33.
8. Prasad N, Gupta A. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients. Perit Dial Int 2005; 25(3): 207-222.
9. Khan FY, Elsayed M, Anand D, Abu Khattab M, Sanjay D. Fungal peritonitis in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis in Qatar. J Infect Devel Ctries 2011; 5(9): 646-651.
10. Schattner A, Kagan A, Zimhony O. Aspergillus peritonitis in a lupus patient on chronic peritoneal dialysis. Rheumatol Int 2006; 26(8): 762-764.
11. Vachharajani T, Zaman F, Latif S, Penn R, Abreo KD. Curvularia geniculata fungal peritonitis: a case report with review of literature. Int Urol Nephrol 2005; 37(4): 781-784.
12. Bren A. Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17(12): 839-843.
13. Dupont H, Vael C, Muller-Serieys C, Chosidow D, Mantz J, Marmuse JP, et al. Prospective evaluation of virulence factors of enterococci isolated from patients with peritonitis: impact on outcome. Diag Microbiol Infect Dis 2008; 60(3): 247-253.
14. Carneiro HA, Mavrakis A, Mylonakis E. Candida peritonitis: an update on the latest research and treatments. World J Surg 2011; 35(12): 2650-2659.
15. Boer WH, Van Ampting JM, Vos P. Successful treatment of eight episodes of Candida peritonitis without catheter removal using intracatheter administration of amphotericin B. Perit Dial Int 2007; 27(2): 208-210.
16. Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Jpn J Infect Dis 2002; 55(4): 122-125.
17. Fatahi M, Shokohi T, Hashemi Sooteh MB, Hedayati MT, Okhovatian A, Tamaddoni A, et al. M Molecular Identification of Candida Albicans Isolated From the Oncology Patients at Four University Hospitals in Mazandaran Province (2005-6). J Mazandaran Univ Med Sci 2007; 17(61): 1-11
18. Richardson MD, Warnock DW. Fungal infection: diagnosis and management. 4th ed. New Jersey: Wiley –Blackwell; 2012.
19. Labbé A C, Pepin J, Partino C, Castonguay S, Restieri CH, Laverdiere M. A single-centre 10-year experience with Candida bloodstream infections. Can J Infect Dis Med Microbiol 2009; 20(2): 45-50.

20. Jalali A, Shamimi K, Abdollahi A. Concering peritonitis and peritoneal sepsis. Review Article. Iran J Surg 2009; 16(2): 1-10 (Persian).
21. Alinejad M, Omran AN, Hashemi SJ. Drug resistance of Candida species isolated from fungal peritonitis by method PCR-RFLP. JBUMS 2011; 14(5): 53-62 (Persian).
22. Krcmery V, Barnes A. Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hos Infect 2002; 50(4): 243-260.
23. Shokohi T, Nouraei SM, Afsarian MH, Najafi N, Mehdipour S. Fungal Prosthetic Valve Endocarditis by Candida parapsilosis: A Case Report. Jundishapur J Microbiol. Mar 2014; 7(3): e9428
24. Almoujahed MO, Riederer K, Baran Jjr. Fungal peritonitis at a tertiary care community teaching hospital: epidemiology, treatments, and outcome over a 3 year timespan. Mycoses 2004; 47(5-6): 200-202.
25. Tasic S, Miladinovic-Tasic N, Djordjevic J, Pesic S, Avramovic M. Ten-year prevalence of fungal peritonitis in the city of Nis, South Serbia. Cent Eurn J Med 2010;. 5(1): 49-52.
26. Lau SK, Woo PC, Chiu SK, Leung KW, Yung RW, Yuen KY. Early diagnosis of Exophiala CAPD peritonitisby 18s ribosomal RNA gene sequencing and its clinical significance. Diag Microbiol Infect Dis 2003; 46(2): 95-102.
27. Neppelenbroek KH, Campanha NH, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Seó RS, Pavarina AC. Molecular fingerprinting Methods for discrimination between C.albicans and C.dubliensis. Oral Dis 2006; 12(3): 242-253.
28. Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W.Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 87(1): 99-108.
29. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 693-699.
30. Koski LB, Golding GB. The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. J Mol Evol 2001; 52(6): 540-542.
31. Raaijmakers R, Schroder C, Monnens L, Cornelissen E, Warris A. Fungal peritonitis in children on peritoneal dialysis. Pediatr Nephrol 2007; 22(2): 288-293.
32. Indhumathi E, Chandrasekaran V, Jagadeswaran D, Varadarajan M, Abraham G, Soundararajan P, et al. The risk factors and outcome of fungal peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. Indian J Med Microbiol 2009; 27(1): 59-61.
33. Bulut C, Oztürk R, Yilmaz GR, Parpucu H, Irmak H, Kinikli S, et al. Evaluation of the epidemiological, clinical and laboratory findings in continuous ambulatory peritoneal dialysis related peritonitis attacks. Mikrobiyol Bul 2008; 42(2): 255-264.
34. DiNubile MJ, Hille D, Sable CA, Kartsonis NA. Invasive candidiasis in cancer patients: observations from a randomized clinical trial. J Infect 2005; 50(5): 443-449.
35. Body GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E. The epidemiology of Candida glabrata and Candida albicans fungemia in immunocompromised patients with cancer. Am J Med 2002; 112(5): 380-385.