تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
آذر - دی
۱۳۸۹
شماره ۶۹

هموفیلوس آنفلونزا،

روش های تشخیص، پیشگیری و درمان

ولید ابراهیمی زاده
* دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه شاهد

زیبا ویسی ملکشاهی
* دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه شاهد

پیش گفتار:

هموفیلوس شامل گروه کوچکی از باکتری های گرم منفی میله ای شکل می باشد، که بیشتر در دستگاه تنفس فوقانی مهره داران دیده می شود. انتخاب نام این جنس به دلیل نیازمندی آنها به فاکتور «همین۱»موجود در خون است. اعضای این جنس فلور طبیعی دستگاه تنفس انسان و سایر مهره داران می باشند. در شرایط مناسب نیز می توانند سبب ایجاد بیماری شوند. در هر میزبان گونه مشخصی از این باکتری بیماری زا بوده و در انسان هموفیلوس آنفلوتزا ۲ گونه بیماری زای غالب می باشد.

هموفیلوس آنفلوتزا اولین بار توسط فیفر۳ ، در سال ۱۸۹۲ کشف شد. عامل اصلی بیماری آنفلوانزا، ویروس می باشد و این باکتری، مهاجم ثانویه بشمار می آید. دیرتر کشف دیگری توسط پیتمن۴ انجام گرفت. وی مشخص کرد در سوش های عامل بیماری حاد، کپسول نقش مهمی در عفونت دارد.این باکتری عامل اصلی ایجاد مننژیت در کودکان و گاهی عامل عفونت های مجرای تنفسی در کودکان و بزرگسالان است [۱].

تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
آذر - دی
۱۳۸۹
شماره ۶۹

ریخت شناسی و فیزیولوژی

در کشت نخستین، مایع مغزی- نخاعی و مایع مفصلی به گونه ی کوکوباسیل به ابعاد ۳×۱/۵ میکرون دیده می شوند. با وجود اینکه این ارگانیزم گرم منفی می باشد، ولی رنگ سافرانین را به خوبی جذب نمی کند و برای رنگ آمیزی زمینه می توان از کربول فوشین استفاده کرد.

یکی از بهترین محیط ها برای رشد اعضاء این جنس محیط شکلات آگار است. برای تهیه محیط شکلات آگار بهتر است از خون خرگوش به میزان ۲۰-۱۰٪ استفاده شود. وجود Iso Vitale X در این محیط سبب تقویت رشد باکتری می شود.

چون بیشتر نمونه برداری بوسیله سواپ و از گلو انجام می یابد، احتمال آلودگی با سایر فلورطبیعی وجود دارد، بهتر است برای رشد از محیط شکلاتی حاوی باسیتراسین و پنی سیلین استفاده شود.

برای کشت گونه های این جنس از محیط شفافی به نام Levinthal agar نیز استفاده می شود. این محیط افزون بر فاکتورهای X و V، دارای ۱۰٪ عصاره خون خرگوش است.

سوش های بدون کپسول پس از ۲۴ ساعت بر روی محیط شکلات آگار کلنی های ریزی با قطر ۱/۵ - ۰/۵ mm ایجاد می کنند.

کلنی ها کوچک و گرد، محدب و با سطحی صاف و خاکستری کمرنگ تا شفاف می باشند. کلنی سوش های کپسول دار بزرگتربوده و قطری معادل ۴-۳ mm دارند. و به صورت درخشان و چسبناک هستند. خصوصیت بارز کلنی های هموفیلوس این است که اگر به صورت مورب به آن نور تابیده شود، درخشنده بوده و رنگ آبی از خود نشان می دهند.

هر چند باکتری بیهوازی اختیاری می باشد ولی در شرایط هوازی رشد بهتری از خود نشان می دهد.

برای رشد بهتر می‌توان از ۱۰ ٪Co۲٪استفاده کرد، دمای مناسب برای رشد ۳۷ درجه ،و pH مناسب ۷/۴ تا ۷/۸ می باشد.

سوش های ایجاد کننده بیماری حاد کپسول دار بوده و می توان کپسول آن ها را به روش واکنش کوالانگ مشاهده نمود.

سوش های بدون کپسول از خلط یا گوش جدا می شوند، این دسته از ابعادی بزرگتر و حدت کمتری برخوردارند.

باکتری هموفیلوس آنفلونزا به سرعت کپسول خود را از دست داده و به فرم خشن۵ تبدیل می شود. با این تغییر کلنی های آن تیره می شود.

پیلی این باکتری می تواند سبب آگلوتیناسیون خون (خصوصا تیپ O) شود، و عاملی برای چسبندگی و تجمع میکروب در ناحیه حلق به شمار می آید. یکی از خصوصیات مهم این باکتری ها نیاز آن ها به یک یا دو فاکتور X و V موجود در خون است.

فاکتور X، پروتو پورفرین ۶۹ می باشد و نسبت به حرارت مقاوم بوده و می تواند دمای ۱۲۱ درجه را به مدت ۳۰ دقیقه تحمل کند.

این فاکتور پیش ساز «همین» است و در ساختمان هموگلوبین، سیتوکروم و آنزیم کاتالاز وجود دارد.

در محیطی که گلبول های قرمز آن لیز شده باشد، این فاکتور به فراوانی وجود دارد. برخی از گونه های این باکتری قادر به تولید این فاکتور می باشد.

فاکتور V دومین فاکتور مورد نیاز این جنس است، این فاکتور NAD و یا NADP می باشد و به حرارت حساس است.

هموفیلوس آنفلونزا به هر دو فاکتور نیازمند است. گونه هایی از هموفیلوس که نام آنها با پیشوند Para شروع می شود، تنها به فاکتور V برای رشد نیاز دارد. با استفاده از نیازمندی اعضای این جنس به فاکتورهای X و V ، می توان گونه های مختلف آن را از یکدیگر جدا نمود.

بدین منظور دیسک هایی همانند دیسک آنتی بیوگرام تهیه شده است و در صورت رشد میکروارگانیسم در اطراف یک یا هر دو دیسک احتیاج آن ها به این دو ماده مشخص می شود.

یکی از راه های مناسب برای مشخص نمودن نیاز یک گونه به فاکتور X، کشت میکروب هموفیلوس در محیط حاوی القا آمینولولنیک اسید۷ است، در صورت عدم نیاز هموفیلوس به فاکتور X، باکتری می تواند از این ماده پروتوپورفرین ۱ ، پورفرین و یا پورفوبیلینوژن ۸ سنتز کند.

مشاهده رنگ قرمز فلورسنسی پس از تاباندن اشعه UV با طول موج ۳۶۰ نانومتر، نشانه وجود پورفیرین ها در محیط است، وگویای این است که باکتری مورد نظر توانایی ساخت فاکتور X را دارا است.

در صورت رشد کلنی هموفیلوس آنفلونزا در نزدیکی کلنی استافیلوکوکوس اورئوس، به دلیل لیز شدن گلبول قرمز و ترشح فاکتور V، توانایی

رشد خواهند داشت. به این پدیده، پدیده اقماری۹ می گویند. هموفیلوس آنفلونزا بدون اسپور، بدون حرکت، اکسیداز و کاتالاز مثبت است.

این باکتری قادر به استفاده از قندهای لاکتوز، سوکروز و مانیتول نیست. ولی گلوکز و گالاکتوز را بدون تولید گاز مصرف می کند. هموفیلوس آنفلونزا دارای ۸ بیوتیپ می باشد که با ۳ تست OD، اوره آز، اندول تفکیک می شوند.(جدول ۲)

هموفیلوس آنفلونزا در دمای ۵۵ درجه به مدت نیم ساعت و در محیط خشک ظرف ۴۸ ساعت از بین می رود. وجود آنزیم های اتولیز باکتری را پس از چند روز از بین می برد. باکتری حتی در دمای ۴ درجه سریع تر نابود می شود.

در ترشحات خشک در عرض ۴۸-۱ ساعت از بین می رود. نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مانند سولفانامیدها حساس می باشد، هرچند که امروزه نسبت به بتالاکتام ها مقاومت پیدا کرده اند. واین مقاومت به دلیل وجود ترانسپوزونی به نام TnA می باشد که از نظر ترادف همانند ترانسپوزون Tn۳ انتروباکتریاسه است و در تولید آنزیم بتالاکتاماز نقش مهمی دارد.[۲]

ساختمان آنتی ژنی:

در این جنس سه گروه آنتی ژنی دیده می شود. پلی ساکارید کپسولی، مهم ترین و شاخص اصلی آنتی ژنی این میکروب است. بر پایه این آنتی ژن میکروب را به شش تیپ f.e.d.c.b.a تقسیم می کنند (جدول ۱). کپسول تیپ b که بیشترین مورد بیماری زایی مربوط به آن است از جنس پلی ریبوز-ریبیتول فسفات (PRP) می باشد.

برای تشخیص آنتی ژن کپسولی از روش تست تورم کپسولی و ایمونوفلورسنس می توان استفاده کرد. گونه های غیر بیماری زایی موجود در بخش فوقانی دستگاه تنفس فاقد کپسول می باشند.

گروه دوم آنتی ژنی لیپو الیگو ساکارید (LOS) است. زنجیره ی خارجی آن فاقد تنوع بوده و در تعیین سوش های مختلف تفاوتی در LOS دیده نمی شود.

پروتئین هایی غشای خارجی گروه سوم آنتی ژنی است ،و در تمام سوش ها یکسان می باشد. گرچه برخی پروتئین ها فقط در سوش های کپسول دار دیده می شود.

بر اساس این پروتئین ها ۱۳ گروه آنتی ژن تشخیص داده شده است. [۱-۲] این باکتری فاقد اگزوتوکسین می باشد. اولین عامل حدت، آنتی ژن کپسولی است. به خصوص در تیپ b که کپسول عامل مهم برای تهاجم میکروب به شمار می آید.

کپسول سبب ایجاد عفونت های عمومی می شود و در بدن بر علیه آن پادتن تولید می شود. LOS و پروتئین های غشای خارجی نیز در بیماری زایی این باکتری نقش دارند.

در عفونت های مزمن ریوی LOS سبب فلج شدن حرکت مژکی اپی تلیوم سیستم تنفسی می شود و سبب تمرکز میکروب ها در برونش ها و نای می گردد.

قدرت چسبندگی نیز تا اندازه ای مهم است. بیش از ۹۰٪ سوش هایی که کپسول ندارند به سطح دهان می چسبند و تنها ۵٪ از سوش های تیپ d قدرت چسبندگی دارند.

سوش های فاقد کپسول در عفونت های موضعی نقش دارد ، در حالی که سوش های کپسول دار در عفونت های عمومی نقش دارند.

عامل دیگر، پروتئاز IgA می باشد که سبب تجزیه IgA می شود. سه نوع پروتئاز توسط این جنس تولید می شود که هر سوش تنها یک نوع آن را تولید می کند [۳].

بیماری زایی:

تنها میزبان هموفیلوس آنفلونزا انسان است. گونه های بدون کپسول این باکتری در ناحیه نازوفارنکس افراد سالم بصورت فلورطبیعی دیده می شوند.

عفونت در آخرهای زمستان و بهار رایج تر است. در ابتدا عفونت از طریق آلودگی سیستم تنفسی آغاز شده وباکتری در ناحیه نازوفارنکس تجمع می کند، این مرحله گاه بدون نشانه است.

سپس باکتری به برونش ها، سینوس ها و گوش میانی حمله کرده و در این مناطق مستقر می شود. اگر میکروب دارای حدت کافی باشد می تواند از این مناطق وارد خون شود و در اثر باکترمی، مننژیت و تورم عفونی مفاصل را بوجود آورد.

به علت درگیری سیستم تنفسی، قطرات خروجی آلوده کننده می باشند.
پادتن تولید شده بر علیه پلی ساکارید کپسولی محافظت کننده است و با تزریق پلی ساکارید کپسولی می توان باعث افزایش میزان آنتی بادی شد.
فاگوسیتوزباکتری در حضور سیستم کمپلمان بیشتر می شود با این وجود حضور پادتن، عفونت پنهان و حالت ناقل را تغییر نمی دهد و با وجود حضورپادتن در بدن ممکن است میکروب در ناحیه نازوفارنکس حضور داشته باشد.
علاوه بر کپسول، پادتن تولید شده بر علیه سایر قسمت های باکتری نیز در بوجود آمدن ایمنی نقش دارند. در صورت عدم وجود پادتن های ضد کپسولی، پادتن تولید شده برعلیه دیگر آنتی ژن های سوماتیک نیز محافظت کننده است [۴].
هموفیلوس آنفلوانزا یکی از شایع ترین عوامل ایجاد کننده مننژیت در کودکان ۵ ماهه تا ۵ ساله به شمار می آید. پیش از ابتلا به مننژیت، در آغاز نشانه های تنفسی شروع می شود. درمان سبب بهبودی ۹۷-۹۰٪ بیماران می شود. اما در ۱/۳ افراد عوارضی مانند ناشنوایی ، اشکال در گفتار و نقص در رشد و ناهماهنگی در حرکات وهمچنین حرکات غیر طبیعی ایجاد می شود (این بیماری بیشتر در کودکان کمتر از ۲ سال دیده می شود).
در اثر شدت عفونت توسط این باکتری، راه گلو مسدود می شود و درشخص احساس خفگی رخ می دهد، در این حالت تنها راه درمان ، جراحی ناحیه گلو است.
Cellulitis یا عفونت بافت های نرم نیز از دیگر بیماری های ایجاد شده توسط این باکتری می باشد، این عارضه بیشتر در کودکان کمتر از ۲ سال دیده می شود و بیشترین علائم بالینی را نیز بر روی گونه و بر روی دست به جا می گذارد.
ابتدا پوست تیره شده و حالت ادم و درد ایجاد می شود و در صورت عدم درمان مناسب باکترمی ایجاد می شود. تب ملایم، آب ریزش بینی و تورم گوش میانی از دیگر علائم این بیماری می باشند.
درصد زیادی از افراد بیمار ابتدا به سپتی سمی و مننژیت مبتلا می شوند.
ذات الریه همراه با تجمع مایع در ناحیه سینه از عفونت های غالب این باکتری می باشد، در اثر گسترش عفونت ممکن است پرده قلب نیز درگیر عفونت شود.
این باکتری نیز باعث باکترمی می شودبا تکثیر سریع هموفیلوس آنفلوانزا در خون شوک ایجاد می شود که در بیشتر موارد سبب مرگ می شود.
تورم گوش میانی، تب و درد موضعی، سرفه، ترشحات بینی و عفونت های مجرای ادراری-تناسلی نیز توسط درگیری با این میکروب بوجود می آیند.

درمان:

درمان، به خصوص در صورت بروز مننژیت باید به سرعت انجام پذیرد.
تاخیردر درمان می تواند سبب مرگ شود. مهم ترین عارضه بروز مننژیت توسط این باکتری تجمع مایع در زیر سخت شامه است با جراحی قابل تخلیه است.
در صورت عدم وجود مقاومت دارویی، درمان انتخابی آمپی سیلین می باشد. در حال حاضر بدلیل تولید آنزیم بتالاکتاماز، ۲۵٪ سویه های این باکتری نسبت به آمپی سیلین مقاوم شده اند. در این حالت پس از تست آنتی بیوگرام از کلرامفنیکل و یا سفالوسپورین استفاده می شود.
در صورت وجود حساسیت به این دارو ها می توان از کوتری موکسازول، سولفانامید و یا اریترومایسین به همراه سولفانامید استفاده کرد. البته در کنار مصرف آنتی بیوتیک تزریق ایمونوگلوبولین نیز می تواند موثر می باشد. تزریق پادتن اختصاصی بر علیه تیپ b کپسولی در درمان سریع بیماری موثر است[۵].

پیشگیری :

تیپ b از طریق تنفس از انسان به انسان قابل انتقال است. افراد در معرض خطرمی توانند برای پیشگیری از ریفامپین استفاده کنند.
اولین واکسن در سال ۱۹۸۵ از پلی ساکارید خالص تیپ b تولید شد. یک دوره واکسن می تواند تا ۴ سال برای افراد بالای ۲ سال مصونیت ایجاد می کند.

در سال ۱۹۸۸ واکسنی که ترکیبی از پلی ساکارید خالص تیپ b و پروتئین های هموفیلوس آنفلونزا بود ساخته شد.
در حال حاضر از دو نوع واکسن ترکیبی استفاده می شود. واکسن حاوی هموفیلوس انفلوازا تیپ b به همراه باکتری جهش یافته کوریته باکتریوم (HbOC) و واکسن حاوی هموفیلوس انفلوازا تیپ b به همراه کمپلکس غشاء خارجی باکتری نایسریا متنژیتیدیس (CRM۱۹۷) استفاده می شود[۶].

انواع دیگر هموفیلوس:

امروزه حدود ۱۷ گونه هموفیلوس تشخیص داده شده است. برخی از آن ها جزء میکروفلور دهان است ، عده ای در حیوانات یافت می شود و برخی دیگر نیز در انسان بیماریزا می باشند و با عفونت های فرصت طلب در ارتباط هستند.
در هنگام ضعف سیستم ایمنی وارد خون شده و باعث عفونت های متنوعی همچون اندوکاردیت، آبسه مغز یا دهان و عفونت فک می شوند. از مهمترین این گونه ها می توان به H.parainfluenzae,H.parahaemolyticus, H.paraphrohaemolyticus,H.aphrophilus, H.paraphrophils اشاره کرد.

جدول ۱: تیپ های کپسولی هموفیلوس آنفلوآنزا

Type	sugar	PO4	Acetyl
a	Glucose	+	-
b	Ribose and ribitol	+	-
c	Galactose	+	-
d	hexose	-	-
e	hexosamine	-	+
f	Galactosamine	+	+

Biotype	1	2	3	4	5	6	7	8
Indole	+	+	-	-	+	-	+	-
Urease	+	+	+	+	-	-	-	-
OD	+	-	-	+	+	+	-	-

جدول۲: بیوتیپ های هموفیلوس آنفلوآنزا

References

1.Pickering L, B.C., Long S, McMillan J, eds, Report of the Committee on Infectious Diseases, in Haemophilus influenzae infections, A.A.o. Pediatrics, Editor. 2006 Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics. p. 310-8.
2. services, H.i.b.c.v.a.i.n.i., Haemophilus influenzae b immunization. 2001, WHO: Geneva.
3. Groisman E, O.H., Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell 1996. 87: p. 791-794.
4. Atkinson W, W.C., Hamborsky J, McIntyre L, eds, Haemophilus influenzae type b, in Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. 2009, Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Washington DC. p. 157-176.
5. Chandran A, W.J., Santosham M, Haemophilus influenzae vaccines. Vaccines, 2008: p. 71-83.
6. Brotherton J, W.H., Scheffer A, et al, Vaccine preventable diseases and vaccination coverage in Australia, 2003 to 2005. Communicable Diseases Intelligence, 2007. 31: p. 152.