رضا بهلولی خیاوی، کارشناس ارشد میکروب شناسی،
شبکه بهداشت و درمان مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

نگاهی گذرا بر فناوری های تشخیصی نوین در میکروب شناسی بالینی

شناسایی سریع میکروارگانیسم ها در آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی نه تنها می تواند ارزش زیادی برای انتخاب راهکارهای موثر در مراقبت بیمار در برابر عفونت های حاصله از باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها، مایکوباکتری ها و انگل ها داشته باشد، بلکه ریشه کنی میکروارگانیسم را با آنتی بیوتیک های با طیف گسترده را امکان پذیر می سازد. در این میان عفونت های خونی (Septicaemia) و یا به عبارت دیگر آلودگی های جریان خون،(bloodstream infection (BSI به راستی نیاز از حساسیت ویژه ای برخوردار است، زیرا نسبت مرگ و میر در سپتیسمی بالا است ، به گونه ای که خطر مرگ در اثر شوک سپتیک بیش از ۷٪ در هر ساعت از آغاز شوک تا آغاز تیمار درمانی برنامه ریزی شده ی استاندارد، افزایش می یابد.

تمرکز این مقاله بر روی روش های آزمایشگاهی تازه و در حال ظهور، به ویژه شناسایی عفونت های جریان خون (BSIs) است.

اهمیت استفاده از روش های تشخیصی جدید در میکروب شناسی بالینی

به علت اینکه روش های آزمایشگاهی کنونی برای شناسایی پاتوژن ها تنها بر کشت نمونه و روش های فنوتیپی سنتی تکیه دارند، پزشکان مجبورند وجود BSI را بر اساس نشانگان بالینی تشخیص دهند، که چندان اختصاصی نیست. پس از تشخیص بیماری درمان آنتی بیوتیکی نیز به جای نتیجه ی آزمایشگاهی بر اساس پروفایل های بالینی و اپیدمیولوژی آغاز می شود. انجام آزمایش های کشت، تعیین باکتری، قارچ و انجام آزمایش های افتراقی برای تعیین باکتری و آنتی بیوگرام، دست کم نیاز به ۳ تا ۵ روز است. در برخی نمونه ها نیز زمان نگه داری تا چند هفته به درازا می کشد. روشن است، درازای زمان های انجام آزمایش برای کشت، می تواند پیامدهای ناگواری برای بیمار داشته باشد. بدین روی کلینیسین ها بی نتیجه ی آزمایشگاه، ناگزیر به آغاز درمان می شوند. چه بسا در این کار موفقیتی بدست نمی آید. این شکست درمانی یکی از دلایل مرگ و میر بالا و ظهور میکروب های درگیر مقاوم به دارو است و حتی برای ارگانیسم های مشکل پسند، رشد آهسته، غیرقابل کشت یا ارگانیسم هایی که بخشی از عفونت چند میکروبی اند بسیار وسیع تر هم است. وقتی که نتیجه واکنش رنگ آمیزی گرم سویه جدا شده از کشت مثبت خون در کمتر از ۱ساعت گزارش می شود مرگ و میر ۱۷٪ کاهش می یابد، علاوه بر این تفسیر به موقع داده های آزمایش حساسیت ضد میکروبی (AST) می تواند تاثیر زیادی بر پیامدهای بیمار داشته باشد. با وجود این که تجویز سریع آنتی بیوتیک موثر، سبب نجات زندگی فرد بیمار می شود همچنان نیاز مبرم برای روش های جدید تشخیصی جدید در میکروبیولوژی جهت کاستن پیامد تاخیر در گزارش مثبت از کشت های خون و دیگر کشت ها وجود دارد. ابزار های تشخیصی سریع در میکروبیولوژی بالینی اساسا" مبتنی بر تکنیک هایی است که از ۳۰ تا ۴۰ سال پیش گسترش‌یافته اند.

فناوری های تشخیصی نوین

در چند سال گذشته، روش های تشخیصی تازه ای با بهره وری از روش های مولکولی، ابداع و گسترش یافته است. بهره وری هزینه را به ویژه در تکنیک هایی مثل هیبریدیزاسیون درجا، فلورسنت با پپتید نوکلئیک اسید (PNA-FISH) و PCR در زمان واقعی مثل آزمایش GeneXpert نشان می دهند.

۱- PNA-FISH

یک روش تشخیصی است که از نظر همکاری بین مداخلات پزشکی و دارویی، بیشتر بررسی شده است. PNA-FISH را می توان برای تمایز بین گونه های استافیلوکوکوس اورئوس از استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی استفاده کرد. دراین پژوهش، بر روی هزینه های بیمارستانی، مدت زمان اقامت بیمار و استفاده از وانکومایسین بررسی انجام شده است. اجرای این راهکار با هزینه های بیمارستانی پایین، کاهش مدت زمان اقامت بیمار و کاهش استفاده از وانکومایسین همراه است. این سودمندی ها بر اثرات مثبت آزمایش سریع مولکولی در آزمایشگاه بالینی تاکید می کنند. این روش به سهولت انجام می شوند و می توان آن را به آسانی با آزمایشگاه عادی انطباق داد.این تکنیک می تواند به منظور مراقبت بهتر بیمار، مکمل روش های موجود مثل گزارش سریع نتایج رنگ آمیزی گرم باشد. با این وجود هر روش به جمع آوری اطلاعات تکمیلی مثل نتایج رنگ آمیزی گرم جهت امکان انتخاب نوع آزمایش یا کیت مقرون به صرفه، نیاز دارد.

۲- PCR در زمان واقعی

این روش برای آزمایش سریع بطری کشت خون در دسترس است. سودمندی آزمایش Xpert MRSA/SA BC برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به درمان یا آزمایش کشت خون برای استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی‌شده است. هزاران پاتوژن اسانی وجود دارند وآزمایش PCR استاندارد جهت شناسایی پاتوژن های بسیار شایع توسعه یافته است.

۳- روش توالی یابی

ارزیابی و مقایسه توالی ها، با وجود دقیق بودن، نیاز به زمان زیادی دارد. هزینه این ابزار نسبتا بالا است اما کارایی آن گزارش شده است. استفاده از این روش تشخصی تا حد زیادی محدود به شناسایی ایزوله های میکروبی و تحقیق برای شناسایی پاتوژن های بطری کشت خون است.

٤- سیستم مولکولی روش Light Cycler SeptiFast در دسترس است و برای تشخیص سریع ارگانیسم های ویژه در بطری های کشت خون ارزیابی‌شده اند. کارایی SeptiFast برای کشت های مثبت خون در حال توسعه است. تکنیک های نوید بخش جدیدی براساس توانایی تشخیص میکروارگانیسم های سخت رشد یا سویه های جدید در حال ظهور و ردگیری انتقال بیماری، در حال توسعه هستند.

۵- تکنیک های مرتبط با روش تشخیصی طیف سنجی جرمی (MS)

- **PCR combined with electrospray ionization-mass spectrometry (PCR/ESI-MS)**

ابزارهای PCR/ESI-MS، نسبت جرم/بار (m/z) آمپلیکون های تولید شده توسط PCR چند گانه را اندازه گیری می کنند که چندین جایگاه را در داخل ژنوم باکتریایی یا قارچی هدف قرار می دهد. اهداف این روش تشخیصی، نواحی ژنتیکی خاص و حفاظت شده گونه ها، هستند که میکروب ها را با مقایسه ترکیبات مبتنی بر آمپلیکون با پایگاه داده میکروارگانیسم های شناخته شده، شناسایی می کند. ابزارهای Abbott PLEX-ID یا Ibis T500، PCR/ESI-MS قادر به تشخیص مستقیم باکتری‌ها و ژن های مرتبط با مقاومت آنتی بیوتیکی، ویروس ها، قارچ ها و مایکوباکتری ها از نمونه های بالینی و از ایزوله ها هستند. به تازگی این روش تشخیصی، در جهت شناسایی مستقیم پاتوژن ها از بطری های کشت خون نتایج بسیار دقیقی ارائه کرده و تشخیص ژنتیکی افتراقی نوع سویه و شناسایی ژن های مقاومت ضد میکروبی را امکان‌پذیر ساخته است. با استفاده از پرایمرهای مشترک متعدد، این روش می تواند توالی های ژن هدف را با وجود جهش های خاموش یا باز آرایی ژنتیکی مثلا در ویروس آنفلوانزا شناسایی کند.

PCR/ESI-MS کارایی گسترده ای را برای دیده بانی اپیدمیولوژیکی و پایش آلودگی را بدست می دهد. آزمایش را می توان با ایزوله های باکتریایی یا به طور مستقیم با نمونه بالینی انجام داد. PCR/ESI-MS برای آزمایش نمونه حدود ٤ تا ٦ ساعت زمان نیاز دارد. این روش می تواند مخلوطی از حدود سه تا چهار میکروب را شناسایی کند. بااین وجود زمانی که ترکیب استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس یا استافیلوکوکوس و انتروکوکوس در یک نمونه مشاهده شوند، خطا در تفسیر می تواند رخ دهد. در این شرایط، یکی از ارگانیسم ها به طور ترجیحی تکثیر شده و شناسایی می‌شود و در نتیجه فقط یکی از دو میکرو ارگانیسم شناسایی می شود. همچنین خطا در عفونت های مخلوط رخ می دهد.

- **matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)**

آنالیز سلول کامل اولین بار در سال ۱۹۷۵ جهت مطالعه پروفایل بیومارکر گونه های مختلف باکتریایی به دنبال طیف سنجی جرمی- پیرولیز برای فرآورده های با وزن مولکولی پایین پیشنهاد شد. در سال ۱۹۹٦ اولین آزمایش MALDI-TOF MS در شناسایی مستقیم باکتری ها از کلونی های کامل بر پایه مارکرهای پروتئینی موفقیت آمیز بود. تعداد زیادی

از پیشرفت ها در طی دهه گذشته بر پایه MALDI-TOF MS ارگانیسم کامل، ساخته شده‌اند. بیومارکرهای پروتئینی که در طیف سنجی جرمی میکرو ارگانیسم ها اندازه گیری می شوند، پروتئین های با بیان بالا هستند که مسئول فعالیت های روزمره سلول مثل ریبوزومی، چاپرون و پروتئین های فاکتور رونویسی یا ترجمه می باشند. این روش برخلاف PCR/ESI-MS، بر شناسایی پروفایل های پروتئینی مشتق از پروتئین های بسیار حفاظت شده تکیه دارد و امروزه میکروب ها، باکتری ها، قارچ ها و مایکوباکتری ها را در سطح گونه ها شناسایی می کند. در روش MALDI-TOF MS پروفایل بیماران از یونیزاسیون مستقیم کلونی سالم یا پروتئین باکتریایی استخراج شده با دستورالعمل های استخراج، ایجاد می شود. پس از این که الگوی طیفی پروتئین با پایگاه داده طیف جمع آوری‌شده با سویه های مرجع ارتباط داده شدند تشخیص پاتوژن انجام می گیرد. MALDI-TOF MS به طور وسیعی استفاده می شود زیرا دارای دقت بالا، هزینه مصرفی کم و سرعت آنالیز بالا است. یک آزمایش معمول شامل رشد باکتریایی، انتخاب و قرار دادن کلونی بر روی هدف، افزودن ماتریکس و آنالیز با طیف سنجی MALDI-TOF است. شناسایی با طیف سنجی جرمی دارای گستره وسیعی است به طوری که این روش می تواند چندین آنالیت را همزمان اندازه‌گیری کند، به دانش قبلی درباره ارگانیسم نیاز ندارد و حساس و سریع بوده و به مرحله جداسازی اجزا پیش از انجام روش، نیازی نیست. در حالت کلی این روش تمام نسبت جرم به بار در محدوده بین ۲ و ۲۰ کیلو دالتون را اندازه‌گیری می کند.

◂ سیستم سپتی تیپر(MALDI (Bruker Daltonics

روش تشخیصی نوید بخش تازه ای است که در روند ارزیابی است، و هدف آن شناسایی باکتری ها و مخمر به طور مستقیم از بطری های کشت خون مثبت است. اگر این روش موفقیت آمیز باشد کارایی زیادی جهت کاهش زمان تشخیصی بسیاری از گونه های باکتریایی، خواهد داشت. هم اکنون برخی از محدودیت ها وابسته با MALDI-TOF MS، در حال برسی است.

نتیجه گیری و پیشنهادات

♦ گرچه پیدایش فناوری های نوین تشخیصی، افق های تازه ای در شناسایی میکروب ها بار کرده است، روش های کشت همچنان پایدار و دربیشتر نمونه ها استاندارد طلایی به شمار می آیند. حتی حذف کلی آنها هم در آینده هم پیش بینی نمی شود. روش های شناسایی میکروبی، برپایه ی مولکول و پروتئین، نیاز بسیاری به پژوهش در زمینه ی ارزیابی حساسیت به ضد میکروب ها، جهش ومقاومت میکربی دارد. این زمینه توان کارهای پژوهشی تازه ی بسیاری دارد.

♦ بسیاری از روش های جدید تشخیصی گسترش یافته ی جهانی، فقط برای آزمایشگاه های مرجع بزرگ یا آزمایشگاه های وابسته به دانشگاهها مقرون به صرفه هستند.چرایی کار: هزینه بالا، پیچیدگی و محدودیت ظرفیت پذیرش و نیاز به دستگاه ها وتخصص های ویژه است.

♦ بی گمان در اینده نه چندان دور روش تشخیصی تازه، به ویژه در کشورهای صنعتی درهمه ی بیمارستان ها راه اندازی می شود، و آزمایش های مبتنی بر مولکول و پروتئین جایگزین روش های آزمایش بیوشیمیایی مرسوم خواهند شد و با سیستم های آزمایش حساسیت سنتی برای تبدیل شدن به روش شناسایی انتخابی مقابله خواهد کرد.

♦ گسترش افزارهای ضروری این روش ها برای بهره وری بهینه در خدمات گونه گون بهداشتی و آشنا یی کارشناسان وابسته به این روش ها، نیازی گریزناپذیرهمه ی کشورها است.

منابع:

1- M. Wolk Donna, W. Michael Dunne: New Technologies in Clinical Microbiology. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 49(95): S62–S67, 2011.

2. 5. Bauer, K. A., et al. 2010. An antimicrobial stewardship program's impact with rapid polymerase chain reaction methicillin-resistant Staphylococcus aureus/S. aureus blood culture test in patients with S. aureus bacteremia. Clin. Infect. Dis. 51:1074–1080.

3. . Forrest, G. N. 2007. PNA FISH: present and future impact on patient management. Expert. Rev. Mol. Diagn. 7:231–236. 22. Forrest, G. N., et al. 2006. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of Candida albicans and its impact on mortality and antifungal therapy costs. J. Clin. Microbiol. 44:3381–3383.

4. Jaeschke, R. Z., J. L. Brozek, and R. P. Dellinger. 2008. 2008 Update of international guidelines for the management of severe sepsis and septic shock: should we change our current clinical practice? Pol. Arch. Med. Wewn. 118:92–95

5. Angus, D. C., et al. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit. Care Med. 29:1303–1310.

6. Kaleta, E. J., et al. 2011. Use of polymerase chain reaction coupled to electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteria and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. J. Clin. Microbiol. 49:345–353.

7. Lay, J. O., Jr. 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass Spectrom Rev. 20:172–194.

8. Maier, T., and M. Kostrzewa. 2007. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. Chem. Today 25:68–71.

9. Valles, J., et al. 2008. Bloodstream infections in adults: importance of healthcare-associated infections. J. Infect. 56:27–34.

10. . Wolk, D. M., et al. 2009. Rapid detection of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. J. Clin. Microbiol. 47:823–826.

11. Forrest, G. N. 2007. PNA FISH: present and future impact on patient management. Expert. Rev. Mol. Diagn. 7:231–236.

12. Holland, R. D., et al. 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 10:1227–1232.