

کاربرد فناوری Luminex در تشخیص پاتوژن‌های دستگاه گوارش

جدول (۱)

	US-VD (Catalog # K32C0316)	Health Canada IVD (Catalog # K32C0415)	CE-IVD Europe (Catalog # K32C0324)
Bacteria and Bacterial Toxins			
Campylobacter	*	*	*
Chlamydia difficile, Toxin A/B	*	*	*
Escherichia coli O157	*	*	*
Enterotoxigenic E. coli (ETEC) LT07	*	*	*
Shiga-like Toxin producing E. coli (STEC) serotype	*	*	*
Salmonella	*	*	*
Shigella	*	*	*
Vibrio cholerae	*	*	*
Yersinia enterocolitica	*	*	*
Viruses			
Adenovirus 40/41	*	*	*
Norovirus GI/II	*	*	*
Rotavirus A	*	*	*
Parasites			

Target (Analyte)	Sensitivity	Specificity
Bacteria & Bacterial Toxins	97.7%	99.9%
Viruses	97.7%	99.9%
Campylobacter	97.7%	99.9%
Escherichia coli O157	100%	100%
Shiga-like Toxin	99.2%	99.9%

در تشخیص بیماری‌های عفونی مانند عفونت‌های دستگاه تنفسی، دستگاه گوارش و آزمایش‌های سلامت زنان، فناوری Luminex طیف وسیعی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی قرار داده است. در این زمینه از هر دو فناوری xTAG® Technology برای پانل مولتی پلکس سندرومیک و MultiCode® Technology برای آزمایش‌های سریع real-time PCR استفاده می‌شود.

از آزمایش‌های در دسترس Lu-minex که پذیرش FDA را نیز به دست آورده است، می‌توان به نمونه زیر اشاره نمود:

- xTAG Respiratory Viral Panel (RVP)
- xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel (GPP)
- MultiCode-RTx HSV 1&2 Kit

در این مقاله نگاهی به آزمایش xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel (GPP) و کاربرد آن در تشخیص همزمان پاتوژن‌های دستگاه گوارش خواهیم داشت.

پیش‌گفتار

xTAG GPP یک آزمایش مولتی پلکس مولکولی کیفی است، که برای تشخیص و شناسایی هم‌زمان چندین پاتوژن دستگاه گوارش شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها و

انگل‌ها استفاده می‌شود. این روش از فناوری ویژه Luminex با نام xTAG® Technology بر پایه تکنولوژی xMAP® Technology برای تشخیص چندین پاتوژن در یک نمونه بهره می‌برد. xTAG GPP می‌تواند عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی مانند C. difficile یا norovirus، عفونت‌های برآمده از راه خوراکی‌ها مانند E. coli یا Salmonella، و عوامل شایع اسهال در نوزادان و کودکان زیر ۵ سال همانند rotavirus A، Campylobacter و Shigella را شناسایی کند.

چالش‌های گوارشی در جهان

برآورد می‌شود که سالانه ۲ میلیارد نمونه بیماری اسهالی در دنیا با مرگ و میر نزدیک به ۸/۱ میلیون نفر روی می‌دهد [۱]. بیماری‌های اسهالی دومین عامل مرگ و عامل سوء تغذیه در کودکان کمتر از ۵ سال است. بیماری‌های اسهالی هزینه‌های زیادی را بر سیستم بهداشتی بار می‌کند، و نقش مهمی در مرگ و میر جمعیت‌ها دارد.

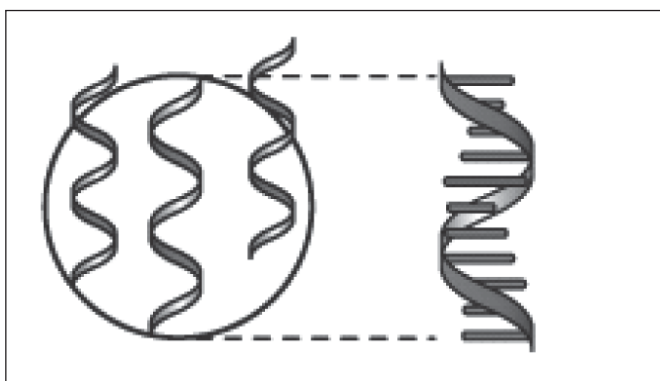
در سال ۲۰۱۰ در آمریکا هزینه‌ی عمومی بیش از ۲۳۷ هزار بیمار با

جدول (۲)

Target (Analyte)	Sensitivity	Specificity
Bacteria & Bacterial Toxins		
Shigella	97.7%	97.8%
Campylobacter	97.5%	97.8%
Verotoxin-producing E. coli (VTEC)	N/A*	100.0%
Enterohaemorrhagic E. coli (EHEC) (EHEC)	N/A*	97.2%
E. coli O157	99.2%	99.8%
Shiga-like Toxin-producing E. coli (STEC) (sh1/hly2)	100.0%	99%
Salmonella	92.1%	98.1%
Clostridium difficile/toxin A/B	97.7%	94.9%
Vibrio cholerae	N/A*	100.0%
Toxins		
Adenovirus 40/41	100.0%	100.0%
Rotavirus A	94.7%	99.8%
Norovirus GII/IV	93.5%	99%
Parasites		
Giardia lamblia	100.0%	99.2%
Cyclospora	97.5%	100%
Enterococcus faecalis	100.0%	99.4%

*Due to the sample size, clinical sensitivity was not assessed for ETEC, Verotoxin-producing E. coli and Vibrio cholerae. However, analytical accuracy for these analytes was demonstrated in the limit of detection and specificity studies with cultural isolation or plasmids.

شکل (۱)



روش به شرح جدول (۱) است.
حساسیت و ویژگی آزمایش برای هر کدام از پاتوژن‌ها به شرح جدول (۲) است.

روش انجام کار

به گونه‌ی فشرده xTAG GPP دارای ۴ مرحله انجام کار است، که در ادامه شرح داده می‌شود.

استخراج و خالص سازی DNA

در این مرحله اسید نوکلئیک از نمونه آماده سازی شده استخراج و خالص سازی می‌شود. کیت مورد استفاده پیشنهادی توسط کمپانی سازنده

NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux®) running Specific A ۱.۰.۲ protocol است.

مدت زمان لازم برای این مرحله ۴۵ دقیقه است. (شکل ۱)

• **امپلیفیکاسیون پیدها مولتی پلکس**
اسید نوکلئیک استخراج شده در یک multiplex RT-PCR تکثیر می‌شود

مدت زمان لازم برای این مرحله ۲.۵ ساعت است. (شکل ۲)

• **هیبریدیزاسیون پیدها و دیتکشن**
محصول RT-PCR به یک Streptavidin و universal tag R-Phycoerythrin conjugate اضافه می‌شود.

مدت زمان لازم برای این مرحله ۱ ساعت است. (شکل ۳)

جمع آوری و آنالیز داده‌ها

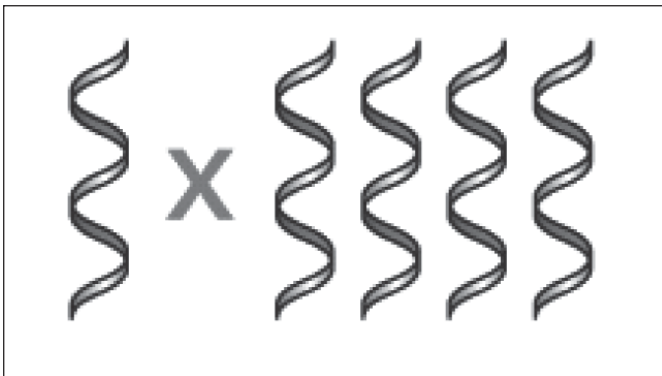
مرحله پایانی شامل جمع آوری و آنالیز داده‌ها با MAGPIX® یا Luminescence Reader™، یا استفاده

عفونت دستگاه گوارش بالغ بر ۶ میلیارد دلار بوده است [۲]. به علت تظاهرات مشابه، افتراق عوامل ایجاد کننده عفونت از قبیل ویروس‌ها، باکتری‌ها و انگل‌ها از یکدیگر بسیار مشکل است. از این رو حدود ۸۰ درصد از همه‌ی نمونه‌های اسهال تشخیص داده نمی‌شوند، که بیشتر به درمان نامناسب منجر می‌شود. در حالی که با تشخیص صحیح و به موقع قابل پیشگیری و درمان هستند.

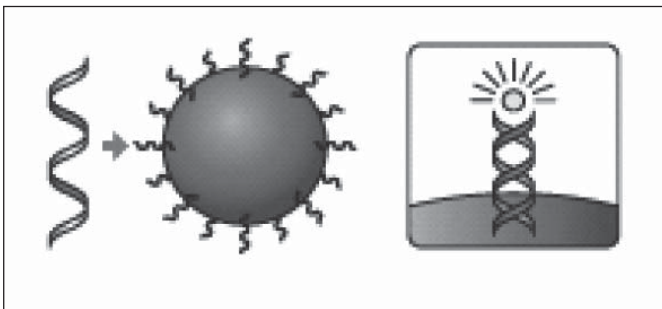
با توجه به گفته‌های بالا، اهمیت فناوری Luminex، در این است که می‌تواند بیش از ۹۰ درصد باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌های عفونت‌های گوارشی را در یک روز تشخیص دهد. همچنین با یک آزمایش می‌توان ۱۱ پاتوژن مختلف را مورد آزمایش قرار داد و نیاز به مدیریت چندین نمونه و روش‌های آزمایش مختلف را حذف کرد. از سویی این فناوری نیاز به نیروی انسانی و صرف هزینه کمتری دارد، و سرانجام بازدهی آزمایشگاه و بیمارستان را افزایش می‌دهد.

نتایج

طبق اعلام شرکت Luminex پاتوژن‌های قابل شناسایی با این



شکل ۲



شکل ۳

این فناوری در تشخیص، به قابلیت آن در مدیریت بیمار و کنترل عفونت به خصوص در بیماران بستری و بیماران دارای نقص ایمنی اشاره شده است (۳). در بررسی دیگری که توسط Eugene Halligan و همکاران انجام گرفته از xTAG GPP به نام روشی که دارای برتری زمان کوتاه در انجام آزمایش است و حساسیت و ویژگی بالای آن نسبت به دیگر آزمایش‌ها اشاره شده است. همچنین در این بررسی آمده است که آزمایش قابلیت ساده سازی درخواست پزشکان به خصوص در شناسایی سندروم‌ها را دارا است. در این بررسی نتیجه گیری شده که اغلب اسهال‌های بیمارستانی غیر عفونی هستند. فقط در ۱۷ درصد از آن‌ها ارگانیزم عامل قابل شناسایی است. در این بررسی ذکر شده که آزمایش‌های بر پایه سندروم با پانلی از مجموعه اهداف (ارگانیزم‌ها) برای موارد مراجعه کننده از جامعه مناسب‌تر است، زیرا پاتوژن‌های موجود در جامعه طیف وسیع‌تری را شامل می‌شوند [۴]. در بررسی دیگری C. Mengelle و همکاران به ارزیابی xTAG GPP پرداخته اند، و علاوه بر برتری‌های یاد شده در پژوهش‌های دیگر به ارزش روش‌های قدیمی تشخیص نظیر کشت اشاره شده است. از این جنبه که هنوز برای شناسایی سایر ارگانیزم‌هایی که این آزمایش قادر به شناسایی آن‌ها نیست و همچنین در موارد نیاز به تعیین مقاومت دارویی به آزمایش‌هایی نظیر کشت میکرو ارگانیزم‌ها نیازمندیم. با توجه به نتایج پژوهش‌های گوناگون و برتری‌های گفته شده برای فن آوری Luminex در کل و برای آزمایش xTAG GPP به صورت اختصاصی به نظر می‌رسد: ورود تجهیزات و راه اندازی

از نرم افزار TDAS است. مدت زمان لازم برای این مرحله ۱۰ دقیقه است (شکل ۴).

بحث و نتیجه گیری

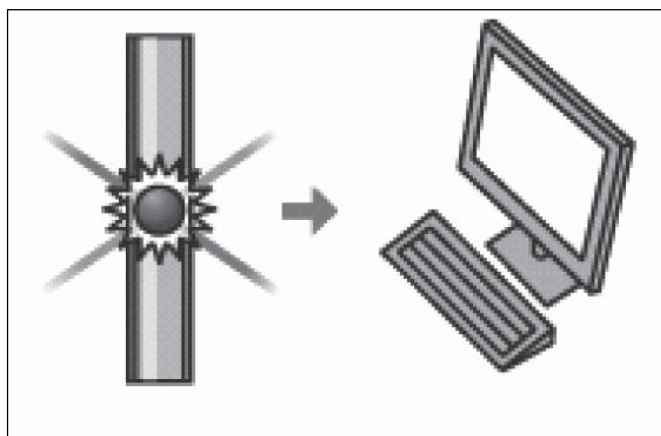
با توجه به داده‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی فناوری نوین Luminex، به گونه‌ای گسترده در پژوهش و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین در بیش از ۱۶۰۰۰ نشریه peer reviewed مورد استناد قرار گرفته است. هر ماه بیش از ۲۰۰ مقاله در این زمینه به چاپ می‌رسد. در جدول (۳) لیستی از ژورنال‌هایی که بیشترین مقالات در ارتباط با فناوری Luminex تا June ۲۰۱۳ داشته اند، قابل مشاهده است که هر مجله دست کم ۱۰۰ مقاله در این زمینه به چاپ رسانیده است.

xTAG GPP نیز به عنوان یکی از آزمایش‌های پردازش شده بر پایه این فن آوری، در بررسی‌های گوناگون مورد ارزیابی قرار گرفته است. در بررسی Eric C. Claas و همکاران که در سال ۲۰۱۳ منتشر شده: از آزمایش xTAG GPP به عنوان اولین آزمایش تشخیصی بر پایه فن آوری Luminex که در دسترس است، و قابلیت شناسایی باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها به صورت همزمان از اسید نوکلئیک استخراج شده از یک نمونه مدفوع را دارد، یاد شده است. در این بررسی به مزیت زمان کوتاه انجام آزمایش (با حدود زمانی ۵ ساعت) اشاره شده است. حساسیت و ویژگی آزمایش به ترتیب بیش از ۹۴ درصد و ۹۸ درصد نیز گزارش شده است. از توان‌های

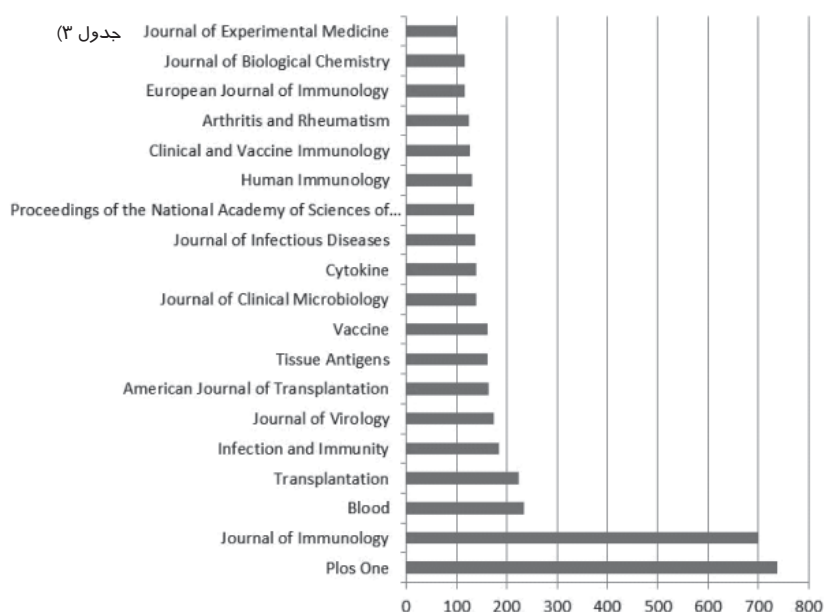
منابع

- [1] World Health Organization. Diarrhoeal Disease, Fact sheet N°330. August 2009. Available at: <http://www.who.int/media-centre/factsheets/fs330/en/index.html>
- [2] U.S. Department of Health and Human Services. 2010 National Statistics on Intestinal Infections. Available from HCUPnet at: <http://hcupnet.ahrq.gov/HCUPnet.jsp>
- [3] Eric C. Claas, Carey-Ann D. Burnham, Tony Mazzulli, Kate Templeton, and Francois Topin, 2013. Performance of the xTAG® gastrointestinal pathogen panel, a multiplex molecular assay for simultaneous detection of bacterial, viral, and parasitic causes of infectious gastroenteritis. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2013), 23(7); 1041–1045
- [4] J.M. Bible, J. S. Ramble, L. Carlton, Carew, P. Cliff, E.P. Halligan. An evaluation of the Luminex xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel at a London teaching hospital 2011: The comparative performance of a rapid molecular multiplex assay and current standard laboratory investigations of gastroenteritis. Available at: <http://www.luminexcorp.com/Products/Assays/ClinicalDiagnostics/xTAGGPP/>
- [5] Mengelle C, 55Mansuy JM, 55Prere MF, 55Grouteau E, 55Claudet I, 55Kamar N, 55Huynh A, 55Plat G, 55Benard M, 55Marty N, 55Valentin A, 55Berry A, 55Izopet J. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Apr 29.

شکل ۴



جدول ۳



آزمایش‌های مذکور در ایران ارزشمند بوده و اقدام نکردن به هنگام، می‌تواند باعث جا ماندن در زمینه‌های پژوهش و تشخیص آزمایشگاهی کشور از دانش روز دنیا شود. همچنین نگارندگان پیشنهاد می‌نمایند که متخصصان امر در زمینه راه اندازی و ارزیابی آزمایش‌های اختصاصی تر همانند پانل تشخیصی بیماری‌های انگلی ایجاد کننده اسهال، با در نظر گرفتن ارگانیزم‌های فرصت طلب مانند میکروسپوریدیها و سیکلوسپورا در کنار دیگر عوامل، به پوشش فراگیری از تشخیص آزمایشگاهی بپردازند.

