Archive of SID

دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال ششم، شماره ۲، صفحه۱۱٤- ۱۰٤ (اسفند۱۳۸۲)

تشخیص سریع استافیلوکوکوس اورئوس و جنس استافیلوکوک با روش هیبریدیزاسیون در موضع توسط پروب های فلوئورسنت (FISH)

دکترسعید تاج‌بخش[۱]*، دکتر سیدمجتبی موسویان [۲]، دکتر علی‌رضا سمرباف‌زاده [۳]، دکترمجید صادقی‌زاده [٤]،
کریستین آدلر[٥]، دکتر مایکل هوگارد[٦]، پروفسور یورگن هیسمن[۷]

[۱] استادیار باکتری شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[۲] استادیار میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز
[۳] استادیار ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز
[٤] استادیار ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
[٥] کارشناس باکتری شناسی , مؤسسه ماکس ون پتن کوفر - مونیخ - آلمان
[٦] استادیار باکتری شناسی، مؤسسه ماکس ون پتن کوفر - مونیخ - آلمان
[۷] استاد باکتری شناسی، مؤسسه ماکس ون پتن کوفر - مونیخ - آلمان

چکیده

روش هیبریدیزاسیون در موضع توسط پروبهای نشان دار شده با مواد فلوئورسنت (FISH)، تکنیک نوینی است که علاوه برتشخیص اختصاصی میکروب ها در سطح مولکولی، مورفولوژی آنها را نیز به وضوح قابل رؤیت می سازد. در این مطالعه، به منظور ارزیابی روش FISH برای تشخیص استافیلوکوک ها، ۷٦ نمونه خلط و ٤۱ نمونه کشت خون مورد آزمایش قرار گرفت. در تکنیک مذکور، از سه پروب الیگونوکلئوتیدی که به 16S rRNA متصل می شوند استفاده شد. درمقایسه با روش کشت، حساسیتFISH برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های خلط۸٦/۷ ٪، و ویژگی آن ۱۰۰٪ بود. در مورد نمونه های کشت خون، حساسیت و ویژگی FISH برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس برابر با۱۰۰٪، و برای تشخیص استافیلوکوک های غیراورئوس حساسیت این روش ۹۵/۷٪ و ویژگی آن۱۰۰٪بود. کل مراحل FISH حداکثر به ۳ ساعت زمان نیاز داشت. بنابراین FISH روشی سریع، حساس و اختصاصی برای تشخیص استافیلوکوک ها می‌باشد.

واژگان کلیدی : استافیلوکوکوس، هیبریدیزاسیون در موضع، فلوئورسنت، پروب، 16S rRNA، FISH

* بوشهر ، خیابان معلم دانشگاه علوم پزشکی ،دانشکده پزشکی‌ص.پ : ۳٦۳۱ تلفن: ۰۷۷۱۲۵۲۸۵۸۷ فاکس: ۰۷۷۱۲۵۲۸۷۲٤
پست الکترونیکی tajbakhshsaeed@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

استافیلوکوک‌ها از مهمترین عوامل بیماریزا در انسان به شمار آمده و می‌توانند عفونت‌های سطحی و عمیق را بوجود آورند که بعضاً کشنده هستند (۱). از میان عفونت‌های حائز اهمیت این باکتری‌ها می‌توان به عفونت‌های تنفسی اشاره نمود. پنومونی استافیلوکوکی خطرناک است و تا ۵۰٪ تلفات دارد. یک نوع آن را پنومونی استنشاقی گویند که پس از تضعیف حاصل از عفونت‌های ویروسی و یا در بیمارستانها بدنبال اعمالی نظیر لوله‌گذاری و آسپراسیون ایجاد می‌گردد. نوع دیگر را پنومونی هماتوژن می‌نامند که در نتیجه باکتریمی استافیلوکوکی پدید می آید (۳-۱). مسئله مهم دیگر، به بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس یا CF[1] مربوط است. در این بیماری ژنتیکی , نقص عملکرد مژک‌های سلول‌های مخاطی دستگاه تنفس، منجر به کلونیزاسیون پایدار میکروبی شده که حاصل آن عفونت‌های مزمن ریوی می‌باشد و می‌تواند منجر به مرگ شخص شود. یکی از عوامل بسیار مهم عفونت در این افراد، استافیلوکوکوس اورئوس[2] می‌باشد. همچنین سودوموناس‌آئرو ژینوزا[3]، بورخلدریاسپاشیا[4] و استرپتوکوک‌ها نیز از دیگر عوامل مهم عفونت در بیماران CF به شمار می‌آیند (۸-٤). متأسفانه شناسایی دقیق عامل عفونت با روشهای معمول, حداقل ۱ تا ۳ روز زمان نیاز دارد. ضمناً گاهی پیش از نمونه‌گیری، بیمار آنتی‌بیوتیک مصرف نموده که در جداسازی باکتری از طریق کشت اشکال ایجاد می‌نماید (۲ و ٤).

مثال دیگر اینکه در عفونت اعضاء مصنوعی، استافیلوکوک‌ها از نظر متابولیکی دچار تغییر شده و به واریته‌های کند رشد تبدیل می‌شوند, بطوریکه کشت و جداسازی آنها زمانی طولانی را طلب می‌کند (۹). بنابراین لازم است روشهای دیگری در کنار کشت یا به جای آن به کار گرفته شوند.

عـلاوه بـر مـوارد ذکـر شـده، تشـخیص سـریع استافیلوکوک‌ها در کشت های خون نیز بسیار ضروری است. استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم سپتی سمی بوده که شناسایی این باکتری در کشت‌های خون با روشهای مرسوم به ۲ تا ۳ روز زمان نیاز دارد که این برای بیمار مبتلا به سپتی سمی زمانی طولانی است. تشخیص سریع و اختصاصی عامل عفونت در این افراد از اهمیت خاصی برخوردار است, زیرا به نوبه خود منجر به انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب خواهد شد که نه تنها پاسخ درمانی خوبی برای بیمار در پی دارد بلکه از صرف هزینه‌های بی‌مورد برای آنتی‌بیوتیکهای غیر مؤثر جلوگیری خواهد شد (۳، ۱۰). البته جهت تشخیص مستقیم میکروارگانیسم‌ها در بطری‌های کشت خون، کیت‌های تجارتی ایمونولوژیک و یا بیوشیمیایی موجود می‌باشند، اما تغییرات خصوصیات آنتی‌ژنیک و یا بیوشیمیایی استفاده آنها را محدود می‌نماید (۳).

بنابر آنچه توضیح داده شد، لازم است روشهای تشخیص نوینی به کار گرفته شود که از سرعت، حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار باشند. اخیراً روش هیبریدیزاسیون در موضع با استفاده از پروب‌های[5] نشاندار شده با مواد فلوئورسنت[6] (FISH) وارد حیطه میکروب‌شناسی گردیده که علاوه بر تشخیص سریع و اختصاصی میکروب‌ها در سطح مولکولی، مورفولوژی آنها را نیز به وضوح قابل رؤیت می‌سازد (۱۵-۱۱). این تکنیک نسبت به PCR سریعتر است (۳). در این روش پروب‌های الیگونوکلئوتیدی نشاندار شده با رنگهای فلوئورسنت مورد استفاده قرار می‌گیرند که ترادف‌های خاصی از RNA ریبوزومی(rRNA) را شناسایی کرده وبه آنهامتصل می‌شوند (۳،۱۰ و ۱۲-۱۱).

یکی از مزایای FISH در مقایسه با PCR، عدم نیاز آن به استخراج اسیدنوکلئیک از باکتری و عدم نیاز به تکثیر DNA می‌باشد (۱٦ و ۱۷). در تحقیق حاضر، روش FISH برای تشخیص سریع و دقیق استافیلوکوک‌ها در

[1] Cystic Fibrosis
[2] *Staphylococcus aureus*
[3] *Pseudomonase aeruginosa*
[4] *Burkholderia cepacia*
[5] Probe
[6] Fluorescent In Situ Hybridization

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های کشت خون و نمونه‌های خلط مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها:

الف) فیکساسیون سویه‌های مرجع[1]

سویه‌هایی که به عنوان کنترل در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، عبارت بودند از : استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213 و ATCC 25923)، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (ATCC 12228) و استرپتوکوکوس پیوژن (DSM 2071)[2]. به منظور فیکساسیون، سویه‌های مذکوردرمحیط مایع لوریابرتانی(LB)[3] در دمای ۳۷°C به صورت هوازی پرورش یافتند(۳ و٤). سپس در مرحله رشد لگاریتمی، سوسپانسیون میکروبی در دور ۸۰۰۰ rpm و دمای ٤°C به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب سلولی با PBS شستشو شده و به دنبال آن مجدداً توسط PBS از آن سوسپاسیون تهیه شد و بعد با حجم مساوی از اتانل مطلق (۱۲) مخلوط گردید و بدین صورت فیکساسیون انجام گرفت. سویه‌های میکروبی فیکس شده در ۲۰°C- نگهداری شدند (۱۸).

ب) کشت وفیکساسیون نمونه‌های خلط

در این پروژه نمونهٔ خلط بیماران پنومونیک و نمونهٔ خلط بیماران CF مورد مطالعه قرار گرفتند. ۷٦ نمونهٔ خلط از این بیماران گرفته شد و در ظروف استریل و شرایط سرما به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل گردید. از آنجائیکه خلط‌های CF بسیار غلیظ و موکوئید بودند، در ابتدا به منظور هضم آنها، یک حجم از نمونه با یک حجم از محلول DTT[4] با غلظت ۱mg/ml مخلوط گردیده و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در ۳۷° C اینکوبه شد. سپس به منظور محاسبه CFU[5]، از نمونه‌های خلط رقتهای متوالی تهیه گردید و بر روی محیط تریپتون سوی‌آگار[6] (TSA) یا محیط آگار BHI[7] ومحیط مانیتول‌سالت‌آگار[8] (MSA) (۷) کشت داده شده و به صورت هوازی اینکوبه شدند (٤). کلنی‌های مشکوک به استافیلوکوک با رنگ‌آمیزی گرم، آزمایشهای کاتالاز، کواگولاز و سایر آزمایشهای بیوشیمیایی و سیستم API مورد شناسایی قرار گرفته و میزان CFU آنها نیز تعیین گردید.

در ضمن، به منظور انجام FISH، یک حجم از نمونهٔ خلط با یک حجم از اتانل مطلق مخلوط و فیکس شد. در مورد خلط بیماران CF، نمونهٔ تیمار شده با DTT توسط اتانل به روش فوق فیکس گردید.

ج) کشت نمونه‌های خون و فیکساسیون

در این بخش از پروژه، به ترتیب زیر, ٤۱ نمونهٔ کشت خون حاوی کوکسی‌های گرم مثبت از کشتهای خون انتخاب شده و مورد آزمایش قرار گرفتند. در ابتدا نمونه‌های خون بیماران مشکوک به سپتی‌سمی پس از تلقیح به بطری‌های کشت خون در سیستم BACTEC9240 قرار گرفتند. این سیستم یک اینکوباتور مخصوص کشت خون می‌باشد که CO_2 حاصل از رشد میکروارگانیسم‌ها را مانیتور کرده و فرد آزمایشگر را از مثبت بودن رشد در بطری مربوطه آگاه می‌سازد (۳). بطری‌های کشت خون که بدین صورت علائم رشد میکروارگانیسم را نشان دادند، از BACTEC خارج شده و توسط سرنگ و نیدل‌استریل از آنها نمونه‌گیری به عمل آمد. سپس رنگ‌آمیزی گرم بر روی این نمونه‌های کشت خون انجام گرفت و در صورت مشاهده کوکسی گرم مثبت (۳ و ۱۰)، ضمن اینکه روی محیط جامد BHI یا آگار خونی[9] پاساژ داده شدند، جهت انجام FISH نیز ٤۰۰ µl از آنها با ٤۰۰µl اتانل مطلق مخلوط و فیکس گردید. کلنی‌های پرورش یافته بر روی محیط جامد که مشکوک به استافیلوکوک بودند با توجه به

[1] reference strains
[2] Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM)
[3] Luria-Bertani
[4] dithiothreitol
[5] colony forming unit
[6] Tryptone Soy Agar
[7] Brain Heart Infusion Agar
[8] Mannitol Salt Agar
[9] Blood Agar = BA

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ‌آمیزی گرم، آزمایشهای کاتالاز، کواگولاز و سیستم API مورد شناسایی قرار گرفتند.

د) FISH

در مطالعه حاضر از سه پروب الیگونوکلئوتیدی استفاده شد که مشخصات آنها در جدول ۱ منعکس گردیده است. این پروبها از کمپانی Metabion (مونیخ ـ آلمان) و یا کمپانی TIB-MOLBIOL (برلین ـ آلمان) تهیه شدند. پروب Sau که مخصوص گونهٔ استافیلوکوکوس اورئوس است، به یک سکانس خاص در 16S rRNA این گونه متصل شده و در واقع به طور اختصاصی آن را شناسایی می‌نماید (۳ و ٤) انتهای ´5 این پروب با فلورو کروم Cy3 نشاندار شده بود. Cy3 که از گروه رنگ‌های سیانینی[1] می‌باشد (۳، ٤ و ۱۲)، سیگنال (فلوئورسانس) قرمز تولید می‌کند. پروب Sta مخصوص جنس استافیلوکوکوس می‌باشد که سکانس ویژه‌ای را در 16S rRNA گونه‌های این جنس شناسایی می‌نماید (۳). پروب Eub338 که سکانس آن مکمل یک ناحیه ویژه از 16S rRNA باکتریها می‌باشد، تقریباً می‌تواند به 16S rRNA کلیه باکتری‌ها متصل شود (۳، ٤، ۱۲ و۲۱-۱۹). انتهای ´5 پروب‌های Sta و Eub با مشتقاتی از فلوئورسین نظیر FLOUS[2] با FLU[3] نشاندار شده بود که سیگنال سبز تولید می‌نمایند (۱۲، ۱٤ و۲٤- ۲۲). FISH برای سویه‌های مرجع فیکس شده (به عنوان کنترل) و نمونه‌های خلط و کشت خون فیکس شده بر روی لامهای ۳ حفره‌ای یا ٦ حفره‌ای (Marienfeld-Bad-Germany) انجام شد. برای هر نمونه دو حفره از یک لام در نظر گرفته شد که ۱۰µl از نمونهٔ فیکس شده مربوطه در هر کدام از این دو حفره قرار داده و پس از خشک کردن درهوا، به منظور آب‌گیری در اتانل ۵۰٪، ۸۰٪ و اتانل مطلق (هر کدام به مدت ۳ دقیقه) قرار گرفتند (۳، ٤ و ۲۲). سپس به منظور نفوذپذیر نمودن دیواره سلولی نسبت به پروب‌ها، هضم آنزیمی توسط لیزوزیم با غلظت ۱mg/ml به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C و لیزواستافین (Sigma) با غلظت ۱۰ µg/ml به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷° C انجام پذیرفت (٤). فرآیند هیبریدیزاسیون با پوشاندن هر حفره توسط ۱۰ µl از بافر هیبریدیزاسیون (20 mMTris - HCl [pH8] ,0/9 M NaCl) (%20 formamide , %0/01 SDS حاوی پروب با غلظت ۵ ng/µl در دمای ٤٦°C به مدت ۹۰ دقیقه (۳، ٤، ۱٦، ۲۳) در یک محفظه مرطوب (۲۵) صورت گرفت بطوری که دو پروب Sau-Cy3 و Eub-Flous به صورت مخلوط در یک حفره و پروب Sta-Fluos در حفره دیگر وارد شد. بدین ترتیب در واقع هر نمونه تحت تأثیر هر سه پروب قرار گرفت. پس از ۹۰ دقیقه، لامها توسط بافر شستشو (225mMNaCl , %0/01SDS , 20mMTris – HCl[pH8]) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤۸°C شستشو شدند. در مرحله بعد لامها توسط DAPI[4] باغلظت ۱ µg/ml به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند که این ماده به صورت غیر اختصاصی DNA را رنگ کرده و فلئورسانس‌آبی بروز می‌دهد (۳). نهایتاً پس از شستشوی لامها با PBS و خشک نمودن آنها در هوا، توسط ماده مانتینگ (DAKO) پوشانده شدند و توسط میکروسکوپ فلئورسنت دارای یک سری از فیلترهای استاندارد (Leica Microsystem یا Nikon E400) مورد مطالعه قرار گرفتند. کل مراحل تکنیک FISH حداکثر به ۳ ساعت زمان نیاز داشت.

تفسیر لامهای FISH

در این مطالعه از سه پروب Eub338، Sta و Sau استفاده شد. پروب‌های Eub338 و Sta با FLUOS یا FLU نشاندار شده بودند که سیگنال سبز را نمایان می‌ساختند و پروب Sau با Cy3 نشان‌دار شده بود که

[1] Cyanine dyes
[2] 5(6)-Carboxy fluorescein-N-hydroxysuccinimide - ester
[3] 5(6)-Carboxy fluorescein
[4] 4′,6′ -diamidino –2- phenyl indole

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ـ پروبهاي الگيونوكلئوتيدي مورد استفاده در اين مطالعه

پروب	ميكرو ارگانيسم هدف	سكانس پروب (5′ – 3′)	جايگاه هدف (target site)	شماره اولين باز مورد هدف پروب روي (16S rRNA)
Eub338	يوباكتريها (Eubacteria)	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16S rRNA	338
Sta	جنس استافيلوكوك	TCC TCC ATA TCT CTG CGC	16S rRNA	697
Sau	استافيلوكوك وس اورئوس	GAA GCA AGC TTC TCG TCC G	16S rRNA	69

سیگنال قرمز را ساطع می‌نمود (شکل ۱). لامها توسط میکروسکوپ فلئورسنت مجهز به فیلترهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. هر سه پروب مذکور به 16S rRNA استافیلوکوکوس‌اورئوس متصل شده و آن را هیبرید می‌کردند. بنابراین در فیلتر سبز، سیگنال پروب‌های Eub و Sta به صورت سبز فلوئورسانس و در فیلتر قرمز سیگنال پروب Sau به صورت قرمز فلوئورسانس قابل مشاهده بود. از آنجائیکه دو پروب Sau و Eub338 به صورت مخلوط (در یک حفره لام) به کار رفته بودند، استافیلوکوکوس اورئوس در فیلتر مخلوط[1] میکروسکوپ که قادر بود رنگ سبز و قرمز این دو پروب را با هم ترکیب کند، به رنگ زرد یا نارنجی مشاهده می‌شد. با تفسیری مشابه، از آنجائیکه استافیلوکوک‌های غیر اورئوس[2] توسط Sau Cy3 شناسایی و هیبرید نمی‌شدند، فاقد سیگنال در فیلتر قرمز بودند ولی توسط هر دو پروب Sta و Eub هیبرید شده و با فیلتر سبز با سیگنال‌های سبزرنگ دیده شدند. در کنار تمامی نمونه‌ها، از استافیلوکوکوس‌اورئوس (ATCC 29213 یا ATCC 25923)، استافیلوکوکوس‌اپیدرمیدیس (ATCC 12228) و استرپتوکوکوس پیوژن (DSM 2071) نیز به عنوان کنترل استفاده شد. استرپتوکوکوس پیوژن (کنترل منفی) فقط توسط پروب Eub هیبرید شده و تنها سیگنال این پروب را آشکار می‌نمود. در فیلتر آبی، کلیه ارگانیسم‌ها سیگنال آبی فلوئورسانس DAPI را ساطع می‌نمودند زیرا DAPI به طور غیر اختصاصی DNA را رنگ می‌کند و در واقع حضور هر نوع ارگانیسم را در نمونه (در صورت وجود) نشان می‌دهد.

نتایج:

۱ـ آزمایش نمونه‌های خلط

از بین ۷۶ نمونهٔ خلط، نتیجه کشت ٤٦ نمونه از نظر استافیلوکوکوس اورئوس منفی بود که روش FISH نیز باکتری مذکور را در این ٤٦ نمونه تشخیص نداد. با روش کشت، استافیلوکوکوس اورئوس از ۳۰ نمونه جداشد که FISH توانست باکتری مذکور را در ۲٦ مورد از این ۳۰ نمونه تشخیص دهد و در مورد چهار نمونه FISH پاسخ منفی کاذب نشان داد. مطابق داده‌های فوق، در مقایسه با روش کشت، (استاندارد طلایی) حساسیت FISH برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس در نمونهٔ خلط ۸٦/۷٪ می‌باشد. خوشبختانه FISH پاسخ مثبت کاذب نشان نداد و داده‌های ما ویژگی آن را برابر با ۱۰۰٪ ارزیابی نمود.

۲ـ آزمایش نمونه‌های کشت خون

در۱۵ نمونه از ٤۱ نمونهٔ کشت خون، استافیلوکوکوس اورئوس توسط کشت و روشهای معمول میکروبیوژیک جداسازی و شناسایی شد که FISH نیز در هر ۱۵ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس را شناسایی نمود(جدول۲). در ۲٦ نمونهٔ باقیمانده، استافیلوکوکوس اورئوس توسط

[1] mix filter
[2] *non – Staphylococcus aureus*

www.SID.ir

Archive of SID

هیچکدام از دو روش مذکور تشخیص داده نشد. با توجه به این داده‌ها، FISH با حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ استافیلوکوکوس اورئوس را در نمونه‌های کشت خون شناسایی کرد.

استافیلوکوک‌های غیر اورئوس در ۲۲ نمونهٔ کشت خون توسط کشت و روشهای میکروبیولوژیک شناسایی شدند که این باکتریها در هر ۲۲ نمونه توسط تکنیک FISH نیز تشخیص داده شدند. در حالیکه در ۱۸ نمونه، پاسخ هر دو روش از نظر استافیلوکوکهای غیر اورئوس منفی بود. در مورد یک نمونه (جدول ۲ـ گروه ۳) در روش کشت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس همراه با استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شد در حالیکه FISH این استافیلوکوک غیر اورئوس را نشان نداد. بنابراین FISH با حساسیت ۹۵/۷٪ و ویژگی ۱۰۰٪ استافیلوکوکهای غیر اورئوس را تشخیص داد.

جدول ۲) نتایج آزمایش ٤١ نمونهٔ کشت خون توسط روش کشت و FISH برای تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس و غیر اورئوس

گروه	نتایج		تعداد نمونه
	کشت	FISH	
۱	استافیلوکوکوس اورئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	۱٤
۲	استافیلوکوک غیر اورئوس	استافیلوکوک غیر اورئوس	۲۲
۳	عفونت مخلوط : استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوک غیر اورئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	۱
٤	استرتپوکوک / انترو کوک	مورفولوژی استرپتوکوکی (توسط پروب Eub)	٤

FISH هیچگونه پاسخ مثبت کاذب در رابطه با تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس و سایر استافیلوکوکها نشان نداد. نکتهٔ قابل ذکر دیگر این است که از ۲۲ مورد استافیلوکوک غیر اورئوس (جدول ۲ــ گروه ۲)، کشت و آزمایشهای بیوشیمیایی یک مورد را استافیلوکوکوس اینترمدیوس[1] نشان داد که از استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت غیر اورئوس می‌باشد ؛ ۲۱ مورد باقیمانده از این گروه، استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی بودند.

به طور کلی در ٤ نمونه (جدول ۲ـ گروه ٤) در آزمایش FISH استافیلوکوک یافت نشد به عبارت دیگر، نتیجهٔ هیبریدیزاسیون با پروب‌های Sta و Sau منفی بود و تنها نتیجهٔ هیبریدیزاسیون با پروب Eub مثبت بود به طوریکه باکتریهایی با مورفولوژی استرپتوکوکی مشاهده شدند و کشت نیز از این ٤ نمونه استرپتوکوک یا انتروکوک جدا نمود.

[1] *S.intermedius*

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱ــ تصاویر فوق استافیلوکوکوس اورئوس را در فیلترهاي مختلف میکروسکوپ فلوئورسنت نشان میدهد.
این تصاویر مربوط به یك میدان میکروسکوپي میباشند. (الف) در فیلتر آبي به واسطه رنگآمیزي با DAPI، به رنگ آبي مشاهده میشود، (ب) این تصویر نشاندهندة سیگنال سبز پروب Eub-FLUOS در فیلتر سبز میباشد، (ج) در فیلتر قرمز به واسطة هیبریدیزاسیون با پروب Sau-Cy3، فلوئورسانس قرمز مشاهده میگردد، (د) در فیلتر مخلوط، بدلیل ترکیب رنگ سبز Eub-FLUOS و قرمز Sau-Cy3، این باکتری به رنگ زرد یا نارنجی قابل مشاهده است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث :

استافیلوکوک‌ها از شایعترین باکتریهای بیماریزا به شمار می‌آیند. پنومونی یکی از بیماریهای بسیار خطرناک استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد، همچنین این میکروارگانیسم یکی از عوامل مهم عفونت ریوی در بیماران CF به ویژه در اوایل زندگی آنها می‌باشد. تشخیص سریع و دقیق باکتری عامل عفونت در چنین مواردی باعث انتخاب آنتی‌بیوتیک یا روش درمانی مناسب برای درمان این افراد شده که به نوبهٔ خود می‌تواند از تخریب سریع ریه‌ها وسایر قسمتهای دستگاه تنفس جلوگیری کند. برای تشخیص باکتری از طریق کشت و روشهای معمول میکروبیولوژیک، به ۲٤ تا ۷۲ ساعت زمان نیاز است (٤) بنابراین در موارد شدید عفونت معمولاً بدون اینکه عامل آن شناسایی شده باشد، درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها آغاز می‌گردد (۱ و ٤) و چه بسا آنتی‌بیوتیک‌های غیر مفیدی که بدینگونه مصرف می‌شوند (۳) و این روند نه تنها از نظر اقتصادی مشکل‌ساز است، بلکه سودی به حال بیمار نداشته و ممکن است سویه‌های مقاوم میکروبی را نیز پدید آورد (۱۷). لذا باید به فکر راه‌اندازی روشهایی بود که در عین اینکه سریعاً باکتریها را شناسایی می‌کنند، از ویژگی وحساسیت قابل قبولی نیز برخوردار باشند.

در این تحقیق, تکنیک FISH برای تشخیص اختصاصی و سریع استافیلوکوکوس اورئوس در ۷٦ نمونهٔ خلط به کار رفت و در مقایسه با کشت به عنوان استاندارد طلایی، حساسیت آن ۸٦/۷٪ برآورد شد. در ٤ نمونهٔ خلط که استافیلوکوکوس اورئوس از آنها جدا شده بود، FISH نتوانست این باکتری را شناسایی نماید (منفی کاذب). کم بودن تعداد باکتری در نمونه می‌تواند یک علت برای این مسئله باشد. هوگارد[1] و همکاران (٤) نشان دادند که برای مثبت شدن FISH در نمونهٔ خلط، حداقل باید ٤×١٠^{٥} CFU/ml از باکتری در این نمونه موجود باشد. در FISH با این نکته مواجه هستیم و برای مثبت شدن این آزمایش، به یک حداقل تعداد باکتری نیاز می‌باشد. بنابراین قاعدتاً در مورد ۳ نمونه از ٤ نمونهٔ دارای پاسخ منفی کاذب در مطالعه ما، این قضیه تأثیرگذار بوده زیرا میزان باکتری در آنها کمتر از ٤×١٠^{٥} CFU/ml بود بطوریکه شمارش باکتری در دو نمونه ١×١٠^{٢} CFU/ml و در نمونهٔ سوم ١×١٠^{٣} CFU/ml بود. اما در یک نمونهٔ باقیمانده از این ٤ مورد، پاسخ منفی کاذب نمی‌توانست بدین علت باشد زیرا شمارش باکتری در آن ٤×١٠^{٧} CFU/ml بود. احتمالاً اتوفلئورسانس زمینه[2] (٤، ۱۲ و ۱۷) که در لام این نمونه به وضوح مشاهده گردید، می‌تواند یک توضیح قانع‌کننده برای این مورد باشد. نمونهٔ خلط، مخصوصاً خلط بیماران CF، حاوی مقدار زیادی از موادی مانند موسین می‌باشد و این مواد ممکن است زمینه‌ای از فلئورسانس را پدید آورند که به نوبهٔ خود می‌تواند مانع مشاهده سیگنال فلئورسانس اختصاصی باکتری مورد نظر شود. البته این پدیده در بعضی از نمونه‌های دیگر نیز مشاهده شده, بطوریکه بافتهای حاوی الاستین، کلاژن و سلول‌های خونی همچون ارتیروسیت وائوزنیوفیل نیز پرتو فلئورسانس ساطع می‌کنند (۱۲) که ممکن است در مشاهده میکروسکوپی باکتری‌ها مزاحمت ایجاد نماید.

گاهی قبل از نمونه‌گیری بیمار آنتی‌بیوتیک مصرف نموده است که این امر یک عامل محدودکننده برای جداسازی باکتری از طریق کشت خلط به شمار می‌آید. نشان داده شده است که این امر در پاسخ FISH تأثیر قابل توجهی نداشته و این تکنیک قادر است RNA ریبوزومی باکتری را علی‌رغم غیر قابل کشت بودن آن، هیبرید و شناسایی نماید و این یکی دیگر از مزایای روش FISH است (٤ و ۱٦).

نتیجه مطالعات ما, ویژگی FISH را ۱۰۰٪ نشان داد که در طی یک مطالعه مشابه، هوگارد و همکاران نیز ویژگی FISH را در رابطه با تشخیص باکتری‌ها در نمونهٔ خلط ۱۰۰٪ گزارش نموده‌اند (٤). بنابراین هر چند حساسیت FISH از کشت کمتر است ولی نظر به اینکه ویژگی آن ۱۰۰٪ است، در موارد اضطراری و عفونت‌های جدی که درنگ و معطلی جایز نیست، به راحتی می‌توان روی پاسخهای مثبت آن تکیه کرده و درمان انتخابی را آغاز نمود.

[1] Hogardt

[2] background autofluorescense

www.SID.ir

Archive of SID

قسمت دیگر این تحقیق مربوط به تشخیص استافیلوکوک‌ها در نمونه‌های کشت خون بود. بدون شک سپتی‌سمی یکی از خطرناکترین انواع عفونت‌های میکروبی بوده که تشخیص و درمان هر چه سریعتر و مناسبتر را می‌طلبد. حادترین گونهٔ این جنس، یعنی استافیلوکوکوس اورئوس، از عوامل مهم سپتی‌سمی بوده و شناسایی آن در کشت‌های خون با روشهای مرسوم به ۲ تا ۳ روز زمان نیاز دارد که با توجه به ماهیت وخیم عفونت، زمانی طولانی قلمداد می‌شود. به منظور تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکهای غیر اورئوس، ٤١ نمونهٔ کشت خون مورد آزمایش قرار گرفت. در مقایسه با کشت، روش FISH توانست استافیلوکوکوس اورئوس را با ویژگی و حساسیت ۱۰۰٪ در این نمونه‌ها شناسایی کند ؛ همچنین این روش با حساسیت ۹۵/۷٪ و ویژگی ۱۰۰٪ استافیلوکوک‌های غیر اورئوس را تشخیص داد که این نتایج با نتایج سایر محققین (۳) همخوانی داشت.

در مطالعهٔ ما، از بین ۲۲ مورد استافیلوکوک غیر اروئوس (جدول ۲ـ گروه ۲)، کشت و آزمایشهای روتین, ۲۱ مورد را استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی و یک مورد را استافیلوکوکوس اینترمدیوس تشخیص داد که از استافلیوکوک‌های غیر اورئوس کوآگولاز مثبت می‌باشد که در اینجا دو نتیجهٔ مهم گرفته می‌شود : اولاً یک بار دیگر ویژگی بسیار بالای پروب Sau مورد تأیید قرار گرفت , زیرا با وجود اینکه باکتری مذکور یک استافیلوکوک کوآگولاز مثبت است، توسط پروب Sau هیبرید و شناسایی نشد، به عبارت دیگر Sau پروبی بسیار اختصاصی برای تشخیص استافیلوکوکوس اروئوس است. البته این پروب در طی مطالعهٔ کمپف[1] و همکاران (۳) روی انواع سویه‌های مرجع استافیلوکوکوس اورئوس و غیر اورئوس آزمایش شده و اختصاصی بودن آن مورد ارزیابی قرار گرفته بود. اما در آن مطالعه Sau روی استافلیوکوکوس اینترمدیوس آزمایش نشده بود. این مورد در مطالعه ما به طور خودبه‌خود فرصتی را فراهم آورد که Sau روی این گونه نیز مورد آزمایش قرار گیرد. محل سکونت طبیعی این گونه باکتریائی؛ دهان سگ و سایر گوشت‌خواران می‌باشد و به ندرت از انسان جدا می شود. ثانیاً از آنجائیکه ۲۱ مورد باقیمانده از این گروه استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی بودند و با توجه به اینکه کمپف و همکاران نیز در طی مطالعه‌ای دیگر تمامی ٤١ مورد استافیلوکوک غیر اورئوس حاصل از FISH را در کشت به عنوان استافیلوکوک کوآگولاز منفی یافتند، می‌توان نتیجه گرفت که صرف نظر از موارد استثناء، تقریباً همیشه استافیلوکوک‌های غیر اورئوس که در انسان شناسایی می‌شوند، همان استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی هستند (۱، ۳ و ۷).

بنابراین با مقایسه نتیجهٔ هیبریدیزاسیون پروب‌های Sau و Sta می‌توان استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی را از استافیلوکوکوس اورئوس افتراق داد. این امر در تصمیم‌گیری جهت نحوهٔ اقدامات درمانی نقش بسزایی دارد بطوریکه اگر نتیجهٔ آزمایش استافیلوکوکوس اورئوس باشد، باید بسیار جدی گرفته شود و سریعاً درمان انتخابی آغاز گردد ؛ اما اگر نتیجه استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی باشد، باید به شکل دیگری به قضیه نگاه کرد. ثابت شده است که بیش از ۹۰٪ مواردی که استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی در کشت‌های خون یافت می‌شوند به علت آلوده شدن آنها به فلور طبیعی پوست می‌باشد (۳) پس نیازی به درمان ندارند (مگر اینکه با کشت‌های متعدد، عفونت واقعی ناشی از آنها به اثبات برسد) (۳، ۷ و ٢٦). از اینرو با تشخیص سریع استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی، در بیشتر موارد می‌توان از مصرف بیهودهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها و عواقب آن اجتناب ورزید (۱۷). در روشهای روتین تنها با دیدن کوکسی‌های خوشه‌ای گرم مثبت در رنگ‌آمیزی گرم کشت خون معمولاً آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مانند وانکومایسین را تجویز می‌کنند که بر علیه کلیهٔ کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای کارآمد است که این خود باعث تقویت ظهور باکتری‌های مقاوم مانند انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین شده که به نوبه خود باعث شیوع عفونت‌های بیمارستانی توسط آنها خواهد شد (۱۰). با روش FISH می‌توان حداقل ٢٤ ساعت زودتر عامل دقیق را شناسایی نمود و اگر چه شناسایی جنس یا گونه باکتری‌ها مستقیماً حساسیت آنها را

[1] Kempf

www.SID.ir

Archive of SID

به داروها نشان نمی‌دهد، اما حداقل می‌توان از داروهای انتخابی‌تر با طیف عملکرد محدودتر استفاده کرد. در ضمن، اضافه می‌کنیم که تحقیقات دامنه‌داری در رابطه با تشخیص ژن‌های عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک در موضع[1] انجام گرفته و می‌گیرد که می‌تواند این محدودیت را برطرف سازد (۱۶، ۲۳ و ۲۹-۲۷).

به طور خلاصه می‌توان چنین گفت که FISH تکنیکی سریع (حداکثر ۳ ساعت)، حساس و اختصاصی برای تشخیص استافیلوکوک‌ها (و البته سایر باکتری‌ها) می‌باشد. این تکنیک ترکیبی زیبا از میکروب‌شناسی نوین و کلاسیک می‌باشد چرا که نه تنها باکتری را در سطح مولکولی تشخیص می‌دهد, بلکه مورفولوژی آن را نیز نمایان می‌سازد و نباید فراموش کرد که مورفولوژی معمولاً اولین و اساسی‌ترین گام در حیطه میکروب‌شناسی تشخیصی می‌باشد. این تکنیک نسبت به مزایایی که دارد ارزان بوده و نیاز به تجهیزات پیچیده ندارد و به اعتقاد ما قابل راه‌اندازی در آزمایشگاههای تشخیص طبی می‌باشد.

[1] In situ detection of antibiotic resistance gene

تشکر و قدردانی:

نویسندگان مقاله ازمعاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اهواز که در تصویب و تأمین بودجه این طرح نقش بسزا داشتند، کمال تشکر را دارند.

References :

1. Willett HP. *Staphylococcus*, In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, et al. Zinsser microbiology. 20th ed. USA: Prentice Hall International Inc, 1992 . 401-416.
2. Walvogel FA. *Staphlococcus aureus* (Including staphylococcal toxic shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infections diseases 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000, 2069-92.
3. Kempf VAJ, Trebesius K. Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 2000; 38: 830-8.
4. Hogardt M, Trebesius K, Gerger AM, et al. Specific and rapid detection by flurescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2000; 38: 818-25.
5. Knowles MR, Gilligan PH, Boucher RC. Cystic fibrosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principle and practice of infectious disease. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000, 767-772.
6. Singleton P, Sainsbury D. Cystic Fibrosis. In: Dictionary of microbiology and molecular biology 2nd ed. Chichester Wiley International Publication , 1995, 248.
7. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and similar organisms & infections of the lower respiratory tract. In: Diagnostic microbiology. 11th ed, USA: Mosby, St. Louis, 2002, 285-96 & 891.
8. Penn RL, Betts RF. Lower respiratory tract infections. In: Reese, RE, Betts RF. A practical approach to infectious diseases. 4th ed. New York: Little Brown, 1996, 258-61.
9. Krimmer V, Merkert H, Eiff CV, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. J Clin Microbiol 1999; 37: 2667-73.
10. Oliveria K, Procop GW, Wilson D. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluturescent in situ hybiridization with peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol 2002; 40: 247-51.
11. Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situhybridization. Curr Opin Biotechnol 2001; 12: 231-36.
12. Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualzation of microoganisms. J Microb Methods 2000; 41 85-112.
13. Regnault B, Delature SM, Collin ML, et al. Oligonucleotide probe for the visualzation of *Escherichia coli* / *Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential applications. Res Microbiol 2000; 151: 521-3.
14. Stender H, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, et al. Indentification of *Dekkera bruxellensis (Brettanomyces)* from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. Appl Environ Microbiol 2001; 62: 938-41.
15. Stender H, Oliveria K, Rigby S, et al. Rapid detection, indentification, and enumration of *Escherichia coli* by fluorescence in situ hybridzation using an array scanner. J Microb Methods 2001; 45:31-9.
16. Russmann H, Kempf VAJ, Koletzko S, et al. Comparision of fluorescent in situ hybridization and conventioal culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastic biopsy specimens. J Clin Microbiol 2001; 39: 304-8.
17. Thrippleton I. Fluorescence in-situ hybridization (FISH) and real-time microbiology. Lab Technol 2003; 5:14-16.

www.SID.ir

Archive of SID

18. Perry-O'keffe H, Rigby S, Oliveria K, et al. Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. J Microb Methods 2001; 47: 281-92.
19. Moter A, Leist G, Rudolph R, et al. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultred treponems in biopsies from digital dermatitis lesion. Microbiol 1998; 144: 2459-64.
20. Grimm D, Merkert H, Ludwing W, et al. Specific detection of *Legionella pneumophila*: Construction of new 16S rRNA-targeted olignucleotide probe. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 2686-90.
21. Manz W, Amann R, Szewzyk R, et al. In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted olignucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. Microbiol 1995; 141: 29-39.
22. Neef A, Amann R, Schlesner H. Monitoring a widespread bacterial group: in Situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. Microbiol 1998; 144: 3257-66
23. Trebesius K, Panthel K, Storbel S. Rapid and specific detection of *Helicobacter Pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridization. Gut 2000; 46: 608-14.
24. Hagland RP, Flurescein. Oregon green and rhodamine green dyes. In: Gregory J. Handbook of flurescent probs and research products. 9th ed. USA: Molecular Probes, Inç 2002, 46-56.
25. Amann RI, Krumholz L, Stahl DA. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cell for determinative, phylogenic, and environmental studies in microbiology. J Bacteriol 1990; 172: 762-70.
26. Archer GL. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase negative Staphilococci. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Chuchil Livingstone, 2000, 2092-2100.
27. Jansen GJ, Mooibroek M, Idema J. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using flurescently labled oligonucleotide probes. J Clin Microbiol 2000; 38: 814-17.
28. Russmann H, Feydt-Schmidt, A, Adler K. Detection of *Helicobacter Pylori* in paraffin-embedded and in shock frozen gastric biopsy samples by fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol 2003; 41: 813-15.
29. Russmann H, Adler K, Hass R. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobactes pylori* by fluoescent in situ hybridization. J Clin Microbiol 2001; 39: 4142-4.

www.SID.ir