Archive of SID

اشتباه در شناسایی باکتری های بیماری زای معمول در آزمایشگاه یک بیمارستان دانشگاهی

فاتح رحیمی[۱]*، جلال مهماندوست[۲]، مریم دانش[۲]

۱- دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

***نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکدعلوم، بخش میکروب شناسی، f.rahimi@sci.ui.acc.ir
دریافت مقاله: دی نود و چهار پذیرش برای چاپ: اسفند نود و چهار

چکیده

سابقه و هدف: شناسایی دقیق و قطعی باکتریهای بیماری زا، جهت تشخیص صحیح بیماری، درمان عفونت و ردیابی شیوع بیماریهای مرتبط با عفونت های میکروبی ضروری است. *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* بخشی از فلور طبیعی بدن انسان است و همچنین به عنوان یک بیماری زای فرصت طلب نیز شناخته می شود. این باکتری مهمترین عامل ایجاد عفونتهای مرتبط با ابزارهای مصنوعی محسوب می شود. *اشرشیا کلای*، فلور طبیعی روده انسان و حیوانات است و فراوانترین باکتری عامل ایجاد عفونتهای معمول دستگاه ادراری است. هدف این مطالعه، ارائه میزان اشتباه در شناسایی دو باکتری معمول در یک بیمارستان دانشگاهی در اصفهان است.

روش کار: در طی دی ماه ۱۳۹۳ لغایت آذر ماه ۱۳۹۴، تعداد ۲۸۴ جدایه *اشرشیا کلای* و ۱۳۵ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* از آزمایشگاه یک بیمارستان دانشگاهی در اصفهان جمع آوری گردیدند. تمامی جدایه ها در آزمایشگاه با استفاده از آزمونهای معمول بیوشیمیایی و آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مجددا مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته ها: در مجموع نتایج حاصل از آزمونهای فنوتیپی و ژنتیکی در آزمایشگاه منطبق بر یکدیگر بودند، اما این نتایج با شناسایی سویه ها در بیمارستان مغایر بودند. بر این اساس، مشخص گردید که ۵۵ جدایه (۱۹/۴ درصد) *اشرشیا کلای* و ۲۸ جدایه (۲۰/۷ درصد) نیز *استافیلوکوکوس اپدرمایدیس* نبودند.

نتیجه گیری: تشخیص صحیح و مناسب باکتریهای بیماریزا، استفاده از روشهای اجرایی استاندارد (SOP) در آزمایشگاههای تشخیص طبی و ارائه دستورالعملهای مفید درمانی می تواند بهترین کمک به پزشکان جهت حذف و ریشه کنی عفونتها از بیمارستانها و جامعه باشد.

واژگان کلیدی: شناسایی باکتریها، اشرشیا کلای، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس

مقدمه

با توجه به گسترش و شیوع فراوان و رو به رشد بیماریهای عفونی در بیمارستانها و جوامع، تشخیص صحیح و سریع عوامل ایجاد ابن بیماریها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می باشد. از همین رو، در طی دهه های اخیر روشها و دستگاه های مختلفی برای این منظور ارائه شده اند تا بتوانند با حساسیت و اختصاصیت بالای خود محققان و متخصصان را یاری نمایند. در حال حاضر، شناسایی باکتریها در آزمایشگاه های کشور بیشتر مبتنی بر روشهای فنوتیپی است که از سرعت و دقت پایینی برخوردار است و شناسایی صحیح جدایه ها نیازمند استفاده از طیف وسیعی از آزمونهای بیوشیمیایی می باشد(۱, ۲).

اشرشیا کلای، فلور طبیعی روده انسان و حیوانات است که به عنوان عضوی از خانواده *انتروباکتریاسه* و یک باکتری لاکتوز مثبت شناخته می شود. این باکتری فراوانترین باکتری عامل ایجاد عفونتهای معمول دستگاه ادراری است و به فراوانی از بیماران واجد سوندهای ادراری جداسازی می شود(۳). تشکیل بیوفیلم توسط *اشرشیا کلای* یکی از عوامل حدت در این باکتری حتی در غیاب اجسام خارجی مانند سوندها، کاتترها و ابزارهای مصنوعی محسوب می شود(۴, ۵). عفونتهای ادراری از جمله عفونتهای بیمارستانی محسوب می شود که ناشی از کلنیزه شدن *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک (UPEC) در مخاط دستگا ادراری است. این عونتها معمولا در مثانه و کلیه ها نیز به صورت سیستیت و پیلونفریت مشاهده می شوند که به طور کلی به دوسته عفونتهای sporadic و recurrent تقسیم می شوند(۶).

www.SID.ir

Archive of SID

استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس بخشی از فلور طبیعی بدن انسان است که به عنوان مهمترین عضو استافیلوکوکهای کواگولاز منفی شناخته می شود(۷, ۸). *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* همچنین یک بیماریزای فرصت طلب است و مهمترین عامل ایجاد عفونتهای مرتبط با ابزارهای مصنوعی مانند کاتترهای قلبی، مفاصل مصنوعی، پروتزها، شانتهای CSF، لنزهای چشم و سوندهای ادراری محسوب می شود(۹, ۱۰). معمولا عفونهای مرتبط با ابزارها که ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* هستند نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف به خوبی پاسخ نمی دهند و فعالیت عوامل ضدمیکروبی بر علیه آنها بی اثر است. استافیلوکوکهای چسبنده و مولد بیوفیلم که بر روی ابزارهای مصنوعی مانند سوندهای ادراری تسشکیل می شوند، مقاومت بیشتری را نسبت به آنتی بیوتیکها، در مقایسه با باکتریهای پلانکتونیک، نشان می دهند(۹, ۱۱, ۱۲).

با توجه به اهمیت دو باکتری مذکور در ایجاد عفونتهای مختلف، در زمان جمع آوری این سویه ها از آزمایشگاه یک بیمارستان دانشگاهی در شهر اصفهان در طی دی ماه ۱۳۹۳ لغایت آذر ماه ۱۳۹۴ برای اهداف دیگر، و در زمان شناسایی آنها متوجه خطا در شناسایی این جدایه ها در مرکز مورد نظر شدیم و به دلیل رخ دادن این اشتباه به دفعات، تصمیم بر نگارش این مقاله گرفته شد؛ شاید بتوان با رائه یک راهکار مناسب از بروز این خطا در سایر آزمایشگاههای کشور جلوگیری نمود.

روش کار

در این مطالعه در طی دی ماه ۱۳۹۳ لغایت آذر ماه ۱۳۹۴ تعداد ۲۸۴ جدایه *اشرشیا کلای* و ۱۳۵ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* از آزمایشگاه یک بیمارستان دانشگاهی در اصفهان جمع آوری گردید. تمامی جدایه ها در آزمایشگاه به عنوان سویه های مورد نظر شناسایی شده بودند. در آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان، تمامی جدایه ها بر اساس آزمونهای استاندارد بیوشیمیایی مجدا مورد شناسایی قرار گرفتند. در مورد *اشرشیا کلای*، این آزمونها مشتمل بر کشت بر روی محیط EMB، حرکت، IMViC، رشد در محیط TSI و آزمون اوره و در مورد *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* نیز مشتمل بر کشت بر روی محیط Mannitol salt agar، کاتالاز، کواگولاز، مقاومت به باسیتراسین، کواگولاز، DNase، حساسیت نسبت به نوبیوسین، PYR، اوره آز و تخمیر قندهای مانیتول و ترهالوز، بودند(۱۳, ۱۴).

چهت تأیید سویه های شناسایی شده به روش فنوتیپی، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *tufA* برای *اشرشیا کلای* و *gseA* برای *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* استفاده شد(جدول ۱). تمامی محیطهای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) تهیه شدند. برای استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده گردید(۱۵). به طور خلاصه، یک کلنی تک از باکتری *اشرشیا کلای* و چند کلنی نیز از باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر سوسپانسیون و یکنواخت شدند. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دستگاه Thermoblock (Whatman Biometra, Göttingen, Germany)، به مدت ۱۵ دقیقه با دور 13000 × g سانتریفیوژ شدند و از سوپرناتانت به عنوان الگوی DNA استفاده گردید. جهت انجام PCR دستورالعملهای ارائه شده توسط Ikeda و همکاران برای *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و Varielle و همکاران برای *اشرشیا کلای* استفاده شدگرفتند(۱۶, ۱۷).

جدول ۱- پرایمرهای استفاده جهت شناسایی استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و اشرشیا کلای

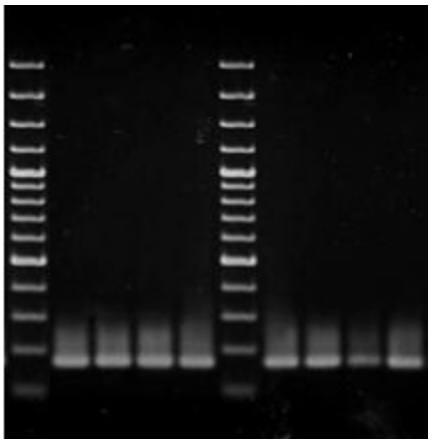
پرایمر	توالی	منبع
gseA-F	5'-ATGAAAAAGAGATTTTTATCT-3'	Ikeda, 2004
gseA-R	5'-GTTTGGTGACACTCTTAAG-3'	
tufA-F	5'-TGGTTGATGACGAAGAGCTG-3'	Vareille, 2007
tufA-R	5'-GCTCTGGTTCCGGAATGTAA-3'	

www.SID.ir

Archive of SID

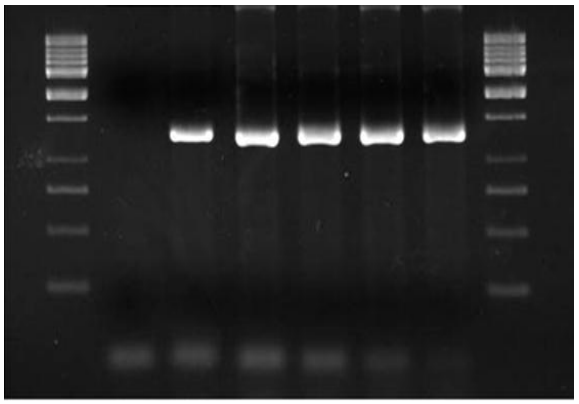
یافته ها

نتایج حاصل از آزمونهای بیوشیمیایی و فنوتیپی برای شناسایی *اشرشیا کلای* نشان داد که ۵۵ (۱۹/۴ درصد) جدایه *اشرشیا کلای* نبود و به عنوان سویه های جنسهای *کلبسیلا*، *انتروباکتر* و *پروتئوس* شناسایی شدند. بدین صورت که بر روی محیط EMB فاقد جلای فلزی بودند، لاکتوز منفی بودند، آزمونهای IMViC به صورت --++ نبود و یا کلنیهای آنها در کشت بر روی محیطهای مختلف به صورت لزج بودند. پس از انجام آزمون PCR (تصویر ۱)، مجددا نتایج حاصل از آزمونهای فنوتیپی تأیید گردیدند و بدین ترتیب تنها ۲۲۹ جدایه (۸۰/۶ درصد) به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* تأیید شدند.



تصویر ۱- آزمون PCR جهت شناسایی *اشرشیا کلای*

در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* نیز نتایج حاصل از آزمونهای فنوتیپی و مولکولی نشان دادند که ۲۸ جدایه (۲۰/۷ درصد) *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* نبود و به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند(تصویر ۲). بدین ترتیب در نهایت سویه‌های کاتالاز و اوره‌آز مثبت، ترهالوز، مانیتول، PYR و DNase منفی که نسبت به نووبیوسین حساس بودند، به عنوان سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* شناسایی شدند.



تصویر ۱- آزمون PCR جهت شناسایی *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

شناسایی باکتریها در بالین و آزمایشگاههای تشخیص طبی از اهمیت بالایی برخوردار است. با شناسایی صحیح باکتریهای مختلف است که امکان ارائه راهکارهای درمانی میسر می گردد. در مطالعه حاضر، که نمونه های شناسایی شده از یکی از بیمارستانهای دانشگاهی جمع آوری شده است متأسفانه آمارهای مطلوبی از شناسایی صحیح باکتریها به دست نیامد. به عبارت دیگر، در ابتدا هدفی مبنی بر نگارش این مقاله وجود نداشت و تنها جهت انجام پایان نامه دو دانشجوی کارشناسی ارشد، نمونه گیری از آزمایشگاه بیمارستان انجام گرفت و باکتریهای *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *اشرشیا کلای* جداسازی شده از عفونتها و بخشهای مختلف بیمارستان جمع آوری شدند. متأسفانه پس از بررسی اولیه سویه ها مشخص گردید که تعدادی از آنها باکتری مورد نظر نیستند و متأسفانه این روند در نمونه گیریهای بعدی نیز مشاهده گردید و بدین ترتیب بر آن شدیم که مقاله ای کوتاه در این زمینه نوشته شود تا شاید با ارائه راهکار مناسب بتوان از بروز این فاجعه در مراکز دیگر جلوگیری نمود.

به طور کلی، روند شناسایی جدایه ها در اغلب آزمایشگاه ها در کشور به صورت فنوتیپی و مبتنی بر آزمونهای بیوشیمیایی و بیشتر به صورت تجربی است. استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی معمول بسیار زمان بر، وقت گیر و خسته کننده است و تشخیص دقیق و قطعی جدایه ها نیازمند استفاده از تعداد زیادی آزمون بیوشیمیایی است که همین امر مستلزم یک فرآیند طولانی آماده سازی و کشت جدایه ها می‌باشد. بنابراین، زمانی که تعداد مراجعه کنندگان به آزمایشگاه افزایش پیدا می کند، عملا امکان فراهم نمودن و آماده سازی و حتی انجام کامل این آزمونها وجود ندارد، و عملا باعث کاهش تعداد آزمونهای مورد نظر می شود و در ادامه منجر به پایین آمدن دقت شناسایی جدایه ها و ارائه پاسخهای ناصحیح می گردد.

در مورد باکتریهای گرم منفی و به خصوص *اشرشیا کلای* عملا مشکل تشخیص صحیح جدایه ها چندان مرسوم نیست و با توجه به اینکه معمولا این باکتریها از پیچیدگی تشخیصی کمتری برخوردار هستند، لذا به راحتی با استفاده از چند محیط کشت و انجام چند آزمون می توان این جدایه ها را شناسایی نمود. در مورد باکتری مانند *اشرشیا کلای* معمولا کشت باکتری بر روی محیط EMB و تشکیل کلنیهای بنفش تیره و با مرکز تیره همراه با جلای سبز فلزی در اکثریت قریب به اتفاق موارد می تواند یک آزمون تأییدی برای *اشرشیا کلای* باشد، و عملا مشکل شناسایی نباید حادث شود. با توجه به اینکه بسیاری از جدایه هایی که به نام *اشرشیا کلای* از طرف آزمایشگاه ارائه شده اند از عفونتهای ادراری جداسازی شده اند، عملا تشخیص اشتباه منجر به ارائه راهکار درمانی ناصحیح نیز شده است و بنابراین عملا عفونهای sporadic را به عفونتهای recurrent مبدل نموده است. همچنین، باید توجه داشت که *اشرشیا کلای* یک باکتری لاکتوز مثبت است و از طریق کشت بر روی MacConkey می توان به تفاوت آن با *پروتئوس ولگاریس* و *پروتئوس میرابیلیس* پی برد و حتی در صورت حذف آزمون TSI نیز عملا نباید اشکالی در تشخیص باکتریهای لاکتوز مثبت و لاکتوز منفی از یکدیگر حاصل شود. در مورد باکتریهای *کلبسیلا* و *انتروباکتر* نیز پس از کشت بر روی محیط EMB، تشکیل کلنیهای بزرگ لزج صورتی رنگ با مرکز آبی می تواند احتمال تشخیص اشتباه به عنوان *اشرشیا کلای* را رد نماید(۱۳, ۱۴).

در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*، به دلیل نقش مهم و شناخته شده این باکتری در تشکیل بیوفیلم در افراد واجد سوند، کاتتر و ابزارهای پلاستیکی، شناخت صحیح آن از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. به طور کلی، شناسایی دقیق باکتریهای گرم مثبت پیچیده تر از باکتریهای گرم منفی است. برخی از این آزمونها مانند PYR و تخمیر قندهای مختلف با توجه به هزینه بالا در بسیاری از آزمایشگاه ها قابل انجام نیستند؛ اما معمولا یک ویژگی بارز جدایه های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* عدم استفاده از قند مانیتول در محیط مانیتول سالت آگار است. بنابراین با کشت باکتری در این محیط و عدم ظهور رنگ زرد در محیط می توان تا حد زیادی بحث اشتباه با *استافیلوکوکوس اورئوس* را حل کرد. علاوه بر این، واکنشهای منفی کواگولاز و DNase نیز می توانند به این شناسایی کمک نمایند، هر چند که با توجه متغیرهای بیشتر آزمون کواگولاز، استفاده از محیط DNase از ارجحیت بیشتری برخوردار است. بنابراین، تشخیص صحیح باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* نیز فرآیند چندان پیچیده ای ندارد(۱۳, ۱۴).

روشهای بیوشیمیایی فرآیندهای پیچیده، زمان بر و خسته کننده ای هستند که در نهایت نیز پاسخ قطعی و دقیقی ارائه نمی کنند. اما در مقابل، استفاده از روشهای مبتنی بر ژن مانند آزمونهای PCR و Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی روشهایی سریع، دقیق، حساس و اختصاصی هستند که در مدت زمان بسیار کوتاهی (۴-۵ ساعت در مقایسه با چند روز در روشهای بیوشیمیایی) پاسخی

www.SID.ir

Archive of SID

دقیق و اختصاصی ارائه می نمایند. در بحث هزینه نیز روشهای مولکولی در مجموع می توانند با هزینه کمتر و یا برابر، پاسخی بهتر و دقیقتر ارائه نمایند(۱, ۲).

نتیجه گیری

در مجموع، تمامی روشهای مختلفی در دنیا با هدف بهبود و تسریع روند کار معرفی می شوند. با توجه به اهمیت سلامت افراد و تلاش جهت درمان عفونتهای مختلف، بنابراین اشتباه بیست درصدی در شناسایی سویه های معمول و شناخته شده در قرن بیست و یکم نمی تواند توجیه منطقی داشته باشد.

تشخیص صحیح و مناسب باکتریهای بیماریزا، استفاده از روشهای اجرایی استاندارد (SOP) در آزمایشگاههای تشخیص طبی و ارائه دستورالعملهای مفید درمانی می تواند بهترین کمک به پزشکان جهت حذف و ریشه کنی عفونتها از جامعه باشد که این امر خود نیازمند استفاده از روشها و دستگاههای جدید و کارآمد و استفاده از متخصصین مجرب است. به نظر می رسد که آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت در این زمینه باید نقش مؤثرتر و پررنگتری ایفا نماید و با آزمایشگاههای خاطی به شدت برخورد نماید.

REFERENCES

1. Janda JM,
Abbott SL. Bacterial identification for publication: when is enough enough? Journal of Clinical Microbiology. 2002;40(6):1887-91.
2. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iranian Biomedical Journal. 2007;11(3):161-7.
3. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. Nature Reviews Urology. 2010;7(12):653-60.
4. Hunstad DA, Justice SS. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. Annual Review of Microbiology. 2010;64:203-21.
5. Kai-Larsen Y, Luthje P, Chromek M, Peters V, Wang X, Holm Å, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. PLoS Pathog. 2010;6(7):e1001010-e.
6. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and Molecular Pathology. 2008;85(1):11-9.
7. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. Nature Reviews Microbiology. 2011;9(4):244-53.
8. Otto M, editor Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. Seminars in Immunopathology; 2012: Springer.
9. Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JK-M, Peters G, et al. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. International Journal of Medical Microbiology. 2004;294(2):203-12.
10. O'Gara JP. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters. 2007;270(2):179-88.
11. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. Future Microbiology. 2010;5(6):917-33.
12. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*—the'accidental'pathogen. Nature Reviews Microbiology. 2009;7(8):555-67.
13. Mac Faddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Third, editor: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
14. Winn WC, Koneman EW. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth, editor: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.
16. Ikeda Y, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Ishibashi K, Kikuchi K. PCR-based identification of *Staphylococcus epidermidis* targeting *gseA* encoding the glutamic-acid-specific protease. Canadian Journal of Microbiology. 2004;50(7):493-8.
17. Vareille M, De Sablet T, Hindré T, Martin C, Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(24):10199-204.

www.SID.ir