Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Isolation and Identification of *Streptococcus pneumoniae* from Admitted Patients in Tehran Hospitals in during 2013-2015

Mohammad Mohsenpoor[1], Ali Mehrabi-Tavana[2], Ramezan-Ali Ataee[1,3], Reza Ranjbar[4], Reza Mirnejad[4]

1. Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Research Centre for Health Management, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Health and Nutrition Research, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/02/08
Accepted: 2016/10/04
Available online: 2017/10/16

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(2): 09-16

Corresponding author:

Dr. Ali Mehrabi-Tavana

Research Centre for Health Management, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 0989121097358

Email:
mehrab@bmsu.ac.ir

Abstract

Background and Aims: *Streptococcus pneumoniae* is Gram-positive bacterium that causes pneumonia, septicemia, meningitis, otitis media, sinusitis, bronchitis, bacteremia and infectious processes is introduced. Due to the clinical importance of this bacterium and correct and timely diagnosis and separation of isolated samples from patients, this study were performed to identify and isolate strains of *Pneumococcus* from clinical samples by culture and PCR methods.

Materials and Methods: In this study, 175 various clinical samples were collected from admitted patients in Tehran hospitals during 3 years (2013-2015),and culture and PCR methods used to isolate and identify of strains of *Pneumococcus* (after genome extraction and in the presence of specific primer) beside the standard strain ATCC 49619 (as control).

Results: In this study, 40 strains of *Pneumococcus* have been identified and approved by culture and PCR methods. Amplified amplicon in this study, was a 160 bp fragment that were found in all strains of *Streptococcus pneumoniae*. Also, the PCR product was confirmed by sequencing.

Conclusions: According to the obtained results in this study, PCR similar to culture, is a reliable method, but has been assessed relatively faster that can be used in the future to replace the old and conventional methods (biochemical tests and culture).

KeyWords: *Streptococcus pneumoniae*, Culture, Genome, Primer, PCR

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Downloaded from ijmm.ir at 2:29 +0330 on Sunday October 22nd 2017

Final

How to cite this article:

Mohsenpoor M, Mehrabi-Tavana A, Ataee RA, Ranjbar R, Mirnejad R. Isolation and Identification of *Streptococcus pneumoniae* from Admitted Patients in Tehran Hospitals in during 2013-2015. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (2):09-16

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی *استرپتوکوکوس پنومونیه* از بیماران بستری در بیمارستان‌های تهران در سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۲

محمد محسن‌پور[۱]، علی مهرابی توانا[۲]، رمضانعلی عطایی[۱و۳]، رضا رنجبر[۴]، رضا میرنژاد[۴]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات مدیریت سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۱۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۱۰/۲۵

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(2): 09-16

نویسنده مسئول:

دکتر علی مهرابی توانا

مرکز تحقیقات مدیریت سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۱۰۹۷۳۵۸

پست الکترونیک:

mehrab@bmsu.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: *استرپتوکوکوس پنومونیه* (پنوموکوک) باکتری بیماری‌های گرم- مثبت است که عامل ایجاد پنومونی، سپتی‌سمی، مننژیت، عفونت گوش میانی، سینوزیت، برونشیت، باکتریمی و سایر پروسه‌های عفونی معرفی‌شده است. با توجه به اهمیت بالینی این باکتری و جداسازی و تشخیص درست و به‌موقع آن از نمونه‌های بیماران، این مطالعه به‌منظور شناسایی و جداسازی سویه‌های پنوموکوک از نمونه‌های بالینی به روش‌های کشت و PCR انجام‌شده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تعداد ۱۷۵ نمونه بالینی مختلف از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران طی مدت ۳ سال (۱۳۹٤-۱۳۹۲)، جمع‌آوری و از روش‌های کشت و PCR (پس از استخراج ژنوم و در حضور پرایمر اختصاصی)، برای جداسازی و شناسایی سویه‌های پنوموکوک در کنار سویه استاندارد ATCC 49619 (به‌عنوان کنترل) استفاده گردید.

یافته‌ها: در این تحقیق، تعداد ٤۰ سویه پنوموکوک به روش‌های کشت و PCR شناسایی و مورد تأیید قرار گرفته است. آمپلیکون تکثیرشده در این تحقیق یک قطعه ۱٦۰ جفت بازی بود که در همه سویه‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* یافت گردید. نتیجه تعیین توالی نیز محصول PCR را تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه، PCR همانند کشت، روشی مطمئن اما نسبتاً سریع‌تر از آن ارزیابی‌شده است که در آینده می‌تواند جایگزین روش‌های قدیمی و متداول (آزمایش‌های بیوشیمیایی و کشت) گردد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس پنومونیه*، کشت، ژنوم، پرایمر، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک)، در دستگاه تنفسی فوقانی ۴۰-۵ درصد افراد سالم وجود دارد و عامل ایجاد پنومونی، سپتی‌سمی، مننژیت، عفونت گوش میانی، سینوزیت، برونشیت، باکتریمی و سایر پروسه‌های عفونی معرفی‌شده است (۱،۲). باکتریمی ناشی از پنومونی نیز می‌تواند به عفونت‌های شدیدتر مانند مننژیت، اندوکاردیت و آرتریت عفونی منجر شود (۱).

استرپتوکوکوس پنومونیه به واسطه اهمیت آن به‌عنوان عامل بیماری در انسان، به‌طور گسترده در قرن گذشته در سطوح بالینی و علوم پایه موردبررسی قرارگرفته است (۳).

پنوموکوک، مسئول ۱۱ درصد از مرگ‌ومیرهای کودکان ۵۹-۱ ماهه (بدون در نظر گرفتن مرگ‌ومیر پنوموکوکی در کودکان مبتلابه ایدز)، معرفی‌شده است که باید اقدامات پیشگیرانه و درمانی، به‌ویژه در مناطق با شیوع بالای بیماری، به

Downloaded from ijmm.ir at 2:29 +0330 on Sunday October 22nd 2017

Downloaded from ijmm.ir at 2:29 +0330 on Sunday October 22nd 2017

عمل آید. ۱۰ کشوری که بیشترین موارد عفونت پنوموکوکی در آن‌ها گزارش‌شده است، در آسیا و آفریقا قرار دارند. میزان بروز جهانی ناشی از پنوموکوک، ۱۳/۸ میلیون مورد در سال ۲۰۰۰ در کودکان زیر ۵ سال تخمین زده‌شده است که جنوب شرق آسیا دارای بیشترین موارد و آفریقا داری بیشترین میزان بروز بیماری بوده است (۴). سالانه ۱ میلیون نوزاد در اثر ابتلا به بیماری‌های پنوموکوکی شامل پنومونی، سپتی‌سمی و مننژیت در جهان از بین می‌روند که نشان می‌دهد *پنوموکوک* یکی از عوامل مهم ایجاد بیماری‌های عفونی در نوزادان می‌باشد (۴،۵). *پنوموکوک* سبب مرگ‌ومیر و بیماری‌زایی، به‌ویژه در کودکان کشورهای درحال‌توسعه می‌گردد (۶). ۱/۹ میلیون کودک در جهان در سال ۲۰۰۰ در اثر عفونت‌های تنفسی حاد (پنوموکوکی و غیر آن)، جان‌باخته‌اند که ۷۰ درصد آن‌ها ساکن آفریقا و آسیای جنوب شرقی بوده‌اند (۷). سالانه ۱۰/۶ میلیون نفر از کودکان زیر ۵ سال در جهان، از بیماری‌های ناشی از *پنوموکوک* آسیب می‌بینند (۸). در حال حاضر *استرپتوکوکوس پنومونیه* به‌عنوان یک پاتوژن عمده انسان در دوران کودکی و بلوغ شناخته می‌شود؛ به‌طوری‌که در آمریکا سالانه حدود ۵ میلیون کودک زیر ۵ سال در اثر عفونت‌های تنفسی جان خود را از دست می‌دهند که در اغلب موارد، *پنوموکوک* عامل آن می‌باشد. برآورد می‌شود سالانه ۷ میلیون نفر در آمریکا به عفونت گوش میانی مبتلا می‌شوند که بیشتر موارد توسط این باکتری ایجاد می‌شود. در حال حاضر سپتی‌سمی ناشی از *پنوموکوک*، عامل عمده مرگ‌ومیر نوزادان در کشورهای درحال‌توسعه بوده و بیش از ۱/۲ میلیون نوزاد در سال در اثر بیماری‌های ناشی از آن می‌میرند (۹،۱۰).

با توجه به اهمیت بالینی *پنوموکوک* و روند افزایش مقاومت دارویی در آن، جداسازی سریع و به‌موقع باکتری و تشخیص صحیح آن، نقش مؤثر و تعیین‌کننده‌ای در پروسه درمان ایفا خواهد نمود. ازآنجاکه هنوز در اکثر آزمایشگاه‌های بالینی و میکروب‌شناسی پزشکی داخل کشور از روش قدیمی کشت و تعیین هویت بیوشیمیایی برای شناسایی *استرپتوکوکوس پنومونیه* استفاده می‌شود که درصد خطای آن نیز بالا می‌باشد و همچنین به علت مطالعات انجام‌شده اندک در این زمینه در کشور، این تحقیق به‌منظور راه‌اندازی روشی نسبتاً سریع و مطمئن بر مبنای PCR، برای شناسایی و تأیید باکتری در نمونه‌های بالینی صورت گرفته است که با گسترش آن در قالب کیت تشخیص مولکولی در سطح کشور، می‌تواند به‌عنوان روشی مقرون‌به‌صرفه معرفی شود.

درواقع این مطالعه، مقایسه‌ای بین روش‌های شناسایی کشت و PCR بوده، هدف آن معرفی روش تشخیص مولکولی به‌عنوان یک روش شناسایی سریع و مطمئن در جداسازی باکتری از نمونه‌های بالینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۲ تعداد ۱۷۵ نمونه بالینی مختلف (خون، خلط و ترشحات ریوی، پلور، مایع مغزی- نخاعی، ترشحات چشم و گوش، مایع آسیت و ادرار) از بیماران بستری در مراکز درمانی شهر تهران جمع‌آوری و ازنظر وجود *استرپتوکوکوس پنومونیه بررسی شدند*. نمونه‌های منتقل‌شده به آزمایشگاه با روش‌های کشت و PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. از *استرپتوکوکوس پنومونیه* سویه ATCC 49619 تهیه‌شده از آزمایشگاه رفرانس نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

کشت، جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی

هر یک از نمونه‌های بالینی در شرایط آسپتیک به محیط آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی تازه، تلقیح و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در جار شمع‌دار و انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس‌ازآن پلیت‌های حاوی کلنی‌های مشکوک به *استرپتوکوکوس پنومونیه* ازنظر وجود همولیز آلفا به‌دقت بررسی‌شده، رنگ‌آمیزی گرم انجام و کشت خالص تهیه گردید. جهت تشخیص نهایی *پنوموکوک* از آزمایش‌های بیوشیمیایی مرسوم از قبیل آزمون کاتالاز، حساسیت به دیسک اپتوچین، مقاومت به دیسک باسیتراسین و حلالیت در صفرا (محلول بایل ۱۰٪) استفاده گردید (۱،۱۱،۱۲).

استخراج DNA

برای استخراج ژنوم باکتری‌های حاصل از کشت نمونه‌های بالینی، از روش جوشاندن و فریز نمودن استفاده گردید (۱۳،۱۴). پس‌ازاندازه‌گیری غلظت ژنوم استخراج‌شده با نانودارپ، محصولات PCR با انجام الکتروفورز ارزیابی شدند.

انجام روش مولکولی PCR

در این مطالعه برای شناسایی *استرپتوکوکوس پنومونیه* در سطح گونه، پس‌ازآنالیز بیوانفورماتیکی از پرایمر اختصاصی cpsA با شماره بانک ژنی AF057294، استفاده گردید که اطلاعات پرایمر در جدول زیر بیان‌شده است.

Final Proof

جدول ۱: مشخصات پرایمر انتخاب‌شده در مطالعه

منبع علمی	ژن هدف	طول محصول	جهت PCR	حجم پرایمر (10 Pmol)	میزان پرایمر در حجم 25 µl واکنش	شرایط PCR	توالی پرایمر	نام پرایمر	نام باکتری
(۱۳)	Cps (wzg)	160 bp		0.25µL	0.1 Pmol	۵۶ °C 40 s	Forward primer: 5'-GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC-3'	cpsA-f	S.pneumoniae (General)
				0.25µL	0.1 Pmol	۵۶ °C 40 s	Reverse primer: 5'-GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC-3'	cpsA-r	

به‌منظور راه‌اندازی PCR، ژنوم استخراج‌شده *استرپتوکوکوس پنومونیه سویه* استاندارد (۱ میکرولیتر)، Master Mix (ساخت شرکت Ampliqon دانمارک) حاوی 1.5 mM $MgCl_2$، 20 Tween 0.2%، 0.4 mM dNTPs، 0.05 unit/µL Ampliqon Taq DNA Polymerase و Inert red dye and a stabilizer (۱۲/۵ میکرولیتر)، پرایمرهای راست و چپ cpsA (هرکدام ۰/۲۵ میکرولیتر) و آب مقطر دیونیزه استریل (۱۱ میکرولیتر)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر داخل میکروتیوب‌های استریل اضافه‌شده، پس از مخلوط نمودن مختصر محتویات میکروتیوب‌ها، به مدت ۱۰ ثانیه در دور پایین چرخانده (اسپین نموده) و در دستگاه ترموسایکلر (Analytik-Jena آلمان) باقابلیت شیب دمایی قرار داده شدند که پس‌ازانجام چندین بار PCR، چرخه حرارتی طبق جدول ۲ بهینه‌سازی گردید.

جدول ۲: چرخه دمایی استفاده‌شده در ترموسایکلر

مرحله ۱ (Predenaturation)	مرحله ۲ (Denaturation)	مرحله ۳ (Annealing)	مرحله ۴ (Extention)	مرحله ۵ (Final Extention)
	×۳۵			
۹۵C°	۹۵C°	۵۶C°	۷۲C°	۷۲C°
۳ دقیقه	۳۰ ثانیه	۴۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۵ دقیقه

پس‌ازآنجام PCR، محصول هر واکنش در کنار ۱۰۰bp DNA Ladder (شرکت کیاژن آمریکا)، در ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

تعیین حساسیت و ویژگی PCR

پس از به دست آوردن بهترین دما در مراحل مختلف PCR، به‌خصوص دمای اتصال مجدد پرایمرها، جهت تعیین حساسیت PCR و همچنین تعیین غلظت مناسب از DNA استخراج‌شده برای استفاده در واکنش، PCR با شیب غلظت DNA الگو شامل غلظت‌های اولیه (رقیق نشده)، $۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$ و $۱۰^{-۴}$ انجام شد که پس از الکتروفورز، محصولات PCR با ژل داکت بررسی شدند.

جهت بررسی ویژگی (تعیین اختصاصیت)، با استفاده از ژنوم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی* تحت شرایط فوق و در حضور پرایمر مورداستفاده، به‌طور جداگانه PCR انجام شد و نتیجه ازنظر تشکیل یا عدم ایجاد باند اختصاصی برای پرایمر اختصاصی در محدوده موردنظر، با انجام الکتروفورز بررسی گردید.

راه‌اندازی واکنش PCR برای تشخیص مولکولی *پنوموکوک*

پس از دست‌یابی به شرایط بهینه جهت انجام واکنش PCR با سویه استاندارد، ژنوم سویه‌های جداشده پس از استخراج، در کنار سویه استاندارد، PCR گردیده، محصولات واکنش پس از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، با دستگاه ژل داکت (BIO-RAD آمریکا) و زیر نور UV موردبررسی قرار گرفتند.

Downloaded from ijmm.ir at 2:29 +0330 on Sunday October 22nd 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 2:29 +0330 on Sunday October 22nd 2017

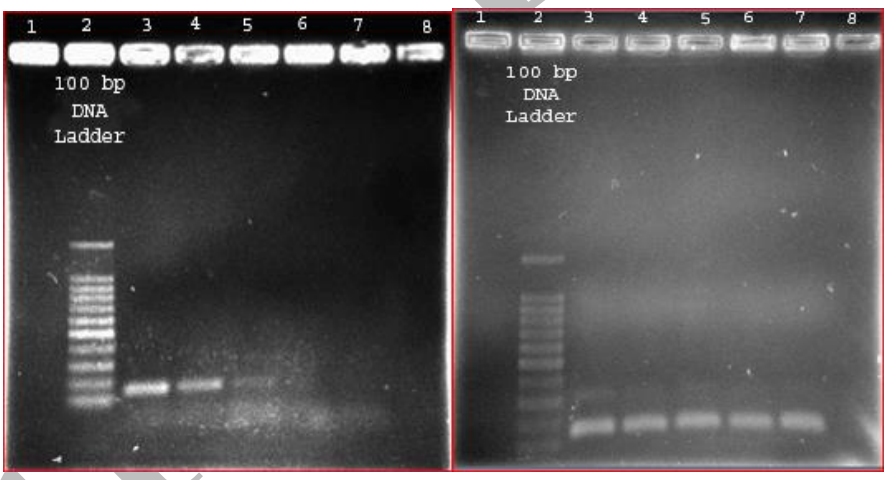
یافته‌ها

نتایج حاصل از کشت و تعیین هویت بیوشیمیایی

طبق نتایج سویه‌های *پنوموکوک* شناسایی‌شده به روش کشت، بر روی محیط آگار خون‌دار، دارای کلنی‌های خاکستری و براق، با همولیز آلفا یا بدون همولیز بوده و در لام رنگ‌آمیزی گرم، به‌صورت دیپلوکوک شعله شمعی و گرم- مثبت مشاهده‌شدند. همچنین *پنوموکوک*، دارای واکنش کاتالاز منفی و به دیسک اپتوچین حساس بوده و کلنی‌ها در محلول بایل صفرا ۱۰٪ حل گردیدند که خصوصیت اخیر، از مشخصات بارز و متمایز *پنوموکوک* نسبت به سایر استرپتوکوک‌ها می‌باشد. در این تحقیق از ۱۷۵ نمونه بالینی جمع‌آوری‌شده شامل ترشحات مجرای تنفسی، خون، مایع مغزی- نخاعی، مایع آسیت، ادرار و ترشحات چشم و گوش، ۴۰ سویه *پنوموکوک* (۲۲/۸٪ از نمونه‌های بالینی) به روش کشت جداسازی و شناسایی شدند.

نتایج حاصل از واکنش PCR، تعیین حساسیت و ویژگی

با توجه به نتایج حاصل از استفاده شیب دمایی ۵۸-۵۴ درجه سلسیوس در انجام واکنش، دمای ۵۶ درجه سلسیوس به‌عنوان دمای آنلینگ (دمای اتصال مجدد) مطلوب و بهینه برای انجام PCR انتخاب گردید (شکل ۱ الف). همچنین انجام شیب غلظت DNA الگو در دمای اتصال ۵۶ درجه سلسیوس نشان داد قدرت شناسایی ژنوم استخراج‌شده به روش جوشاندن تا رقت ۰/۰۱ امکان‌پذیر می‌باشد؛ به عبارتی با توجه به نانودراپ ژنوم سویه استاندارد باکتری و مشخص شدن غلظت آن (۲۹۴ ng/µL)، در صورت تهیه رقت ۰/۰۱ از آن (۲/۹۴ ng/µL)، قابلیت تشخیص آن به روش مولکولی معرفی‌شده در این تحقیق وجود دارد. بااین‌حال، آنالیز تصاویر و مقایسه باندهای حاصل از PCR ژنوم رقیق نشده و ژنوهای رقیق‌شده، بهترین غلظت مورداستفاده از ژنوم، غلظت اولیه و رقیق نشده بوده است (شکل ۱ ب).



شکل ۱: الف) نتایج PCR با شیب دمایی برای سویه *پنوموکوک* استاندارد (ATCC 49619) با پرایمر اختصاصی cpsA (از چپ به راست: ۱-کنترل منفی (میکرو تیوب حاوی کلیه مواد لازم و فاقد ژنوم)، ۲- لدر bp ۱۰۰، ۳- دمای ۵۴^0C، ۴- دمای ۵۵^0C، ۵- دمای ۵۶^0C، ۶- دمای ۵۷^0C و ۷- دمای ۵۸^0C) (شکل سمت راست).

ب) نتایج PCR با شیب غلظت DNA الگو برای سویه *پنوموکوک* استاندارد (ATCC 49619)با پرایمر عمومی cpsA در دمای اتصال ۵۶^0C (از چپ به راست: ۱- کنترل منفی، ۲- لدر، ۳- غلظت اولیه، ۴- غلظت $۱۰^{-۱}$، ۵- غلظت $۱۰^{-۲}$، ۶- غلظت $۱۰^{-۳}$ و ۷- غلظت $۱۰^{-۴}$) (شکل سمت چپ). باندهای تولیدشده اختصاصی پرایمر، bp ۱۶۰ می‌باشند.

طی نتایج حاصل از PCR ژنوم باکتری‌های دیگر در شرایط فوق، هیچ باندی در محدوده bp ۱۶۰ تکثیر نشد که نشان می‌دهد پرایمر cpsA به‌طور اختصاصی برای شناسایی پنومومک عمل می‌نماید و ویژگی آن برای این باکتری، ۱۰۰ درصد می‌باشد (شکل ۲ الف).

Hi Proof

درنهایت پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، تعداد ۴۰ سویه پنوموکوک شناسایی‌شده در مرحله قبل، به روش PCR نیز شناسایی و مورد تأیید قرار گرفتند که محدوده تشکیل باندهای اختصاصی، bp ۱۶۰ بوده است (شکل ۲ ب).

شکل ۲: الف) نتایج تعیین ویژگی PCR با استفاده از ژنوم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (چاهک ۴)، *اشریشیا کلی* (چاهک ۵) و *سالمونلا تیفی* (چاهک ۶) در حضور سویه استاندارد *پنوموکوک* به‌عنوان کنترل مثبت (چاهک ۳) و کنترل منفی (چاهک ۲) در شرایط بهینه با پرایمر cpsA نشان داده‌شده است. چاهک ۱ لدر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد (شکل سمت راست).

ب) نتایج PCR سویه‌های جداشده بالینی در حضور سویه استاندارد *پنوموکوک* در شرایط بهینه با پرایمر cpsA نشان داده‌شده است. از چپ به راست: چاهک‌های کنترل منفی، کنترل مثبت، لدر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی و سویه‌های جداشده بالینی (چاهک‌های ۳-۱) قابل‌مشاهده‌اند (شکل سمت چپ). باندهای تولیدشده اختصاصی پرایمر، bp ۱۶۰ می‌باشند.

بحث

نتایج مطالعات متعدد حاکی از آن است که *استرپتوکوکوس پنومونیه* عامل ایجاد انواع عفونت‌ها با مرگ‌ومیر بالا در سنین مختلف بوده، شناسایی دقیق و سریع این باکتری به‌صورت یک اولویت ضروری درآمده است. در ایران نیز نتایج تحقیقات گسترده‌ای در این خصوص منتشرشده است؛ ازجمله، Soltan-Dallal و همکاران پس از کشت باکتریولوژیک ۱۰۲ نمونه عفونت گوش میانی و جداسازی ۱۵ سویه *استرپتوکوکوس پنومونیه* (۱۴/۷٪ نمونه‌ها)، نشان دادند ۵۳ درصد سویه‌های جداشده به وانکومایسین مقاوم‌اند (۱۵).

گزارش منتشرشده دیگری حاکی از آن است که ۸ درصد سویه‌های *پنوموکوک* جداشده از نمونه‌های بالینی نسبت به وانکومایسین مقاوم بوده‌اند (۱۶).

بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک انتخابی خط اول درمان عفونت‌های پنوموکوکی و شکست درمان، ضمن افزایش نگرانی‌ها و افزایش هزینه‌های درمانی، باعث شد دانشمندان نسبت به طراحی روش‌های تشخیص سریع عفونت‌های پنوموکوکی اقدام نمایند؛ به‌این‌ترتیب، Ahmadi و همکاران با استفاده از پرایمر طراحی‌شده جهت تشخیص ژن *lytA* و انجام PCR، نشان دادند حدود ۵۰ درصد از سویه‌های شناسایی‌شده با استفاده از ویژگی‌های فنوتیپی، به‌اشتباه به‌عنوان *پنوموکوک* معرفی‌شده‌اند (۱۷)، که در مقایسه، نشان‌دهنده صحت نتایج حاصل از PCR می‌باشد.

به همین ترتیب، Aghamiri و همکاران با طراحی پرایمر علیه ژن *ply* *استرپتوکوکوس پنومونیه*، نسبت به طراحی روش مولکولی PCR اقدام نمودند که قطعه تکثیرشده با پرایمر فوق، یک محصول ۷۲۷ جفت بازی در یک پلاسمید بوده است (۱۸) که چنانچه باکتری پلاسمید موردنظر را از دست بدهد، نتیجه منفی خواهد شد، اما در این مطالعه محصول PCR، یک قطعه ۱۶۰ جفت بازی کاملاً محافظت‌شده بوده و در تمامی سویه‌های *پنوموکوک* وجود دارد.

Downloaded from ijmm.ir at 2:29 +0330 on Sunday October 22nd 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 2:29 +0330 on Sunday October 22nd 2017

Final Proof

همچنین، Irajian و همکاران در مطالعه خود علاوه بر شناسایی سویه‌های *پنوموکوک* به روش‌های کشت و مولکولی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نیز در این سویه‌ها به روش Multiplex PCR بررسی نموده‌اند که طی مطالعه انجام‌شده، از ۹۰ سویه جمع‌آوری‌شده مشکوک به *پنوموکوک*، ۴۰ سویه به روش‌های کلاسیک و مولکولی شناسایی و مورد تأیید قرارگرفته‌اند (۱۹).

Hajia و همکاران نیز، پس از شناسایی سویه‌های بالینی *پنوموکوک* به روش‌های متداول، آن‌ها را با روش‌های سرولوژی و Multiplex PCR بررسی نموده و تیپ‌های غالب را گزارش کرده‌اند که طی این مطالعه از نمونه‌های بالینی به روش‌های کلاسیک و مولکولی، ۲۹ سویه شناسایی و نتایج حاصل از روش‌های سرولوژی و مولکولی، تقریباً یکسان ارزیابی‌شده است (۲۰).

Ghotaslou و همکاران عوامل شایع مننژیت باکتریایی در اطفال، ازجمله *پنوموکوک* را به روش‌های مختلف شناسایی کرده و باهم مقایسه نموده‌اند که در مقایسه با روش‌های کشت و سرولوژی، با استفاده از روش PCR تعداد بیشتری از سویه‌های *پنوموکوک* را شناسایی نموده‌اند (۲۱).

Nomanpour و همکاران از روش‌های مولکولی دقیق‌تر مانند Real-Time PCR استفاده نمودند و نتایج حاصل با روش کشت مقایسه گردید. آن‌ها موفق شدند با استفاده از روش‌های کشت و Real-Time PCR، به ترتیب ۱۴ و ۱۵ سویه *پنوموکوک* را از نمونه‌های به‌دست‌آمده از افراد بستری و غیر بستری، جدا و شناسایی نمایند. ویژگی و حساسیت روش مولکولی استفاده‌شده به ترتیب، ۹۹ و ۱۰۰ درصد گزارش‌شده است (۲۲).

از جمع‌بندی نتایج این مطالعات می‌توان دریافت که همه آن‌ها در استفاده از روش مولکولی برای شناسایی سویه‌های *پنوموکوک* تأکیددارند.

در مطالعه حاضر، پرایمر اختصاصی جهت تکثیر ژن *cpsA* با شماره بانک ژنی AF057294 *استرپتوکوکوس پنومونیه* با روش مولکولی PCR، طراحی و ۱۷۵ نمونه بالینی مختلف بررسی گردید. طبق نتایج، تمام باکتری‌هایی که با خصوصیات فنوتیپی به‌عنوان *استرپتوکوکوس پنومونیه* تشخیص داده شدند، با روش مولکولی PCR نیز تأیید شدند. این یافته از اهمیت زیادی برخوردار است؛ زیرا نشان می‌دهد ژن *cpsA* در سویه‌های مختلف *پنوموکوک* قابل‌شناسایی می‌باشد؛ به‌این‌ترتیب شاید بتوان از این روش به‌عنوان یک روش مطمئن و سریع در شناسایی سویه‌های *پنوموکوک* در افراد ناقل و نمونه‌های بالینی بهره گرفت. هم‌چنین این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات مشابه انجام‌شده در کشور، نتایج قابل قبولی ارائه نموده و همانند این مطالعات، روش مولکولی PCR را روشی مطمئن و قابل‌اعتماد معرفی نموده است (۲۱-۱۷). با توجه به تأیید نتایج حاصل از کشت به‌وسیله PCR و مطابقت آنها باهم، می‌توان چنین مطالعه‌ای را به‌طور مستقیم بر روی نمونه‌های بالینی نیز انجام داد و کارایی آن را ارزیابی نمود.

علی‌رغم مطالعات مولکولی انجام‌شده در کشور و تأیید آن، هنوز در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی از روش کشت و آزمایش‌های بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری استفاده می‌شود که معمولاً از حلالیت در صفرا هم استفاده‌نشده، درنتیجه امکان عدم شناسایی صحیح باکتری وجود دارد.

با توجه به صحت نتایج حاصل از PCR در مقایسه با روش‌های قدیمی و متداول، تصور می‌شود بیشتر آزمایشگاه‌های مرجع در آینده از روش‌های مولکولی برای شناسایی تیپ‌های *پنوموکوک* استفاده نمایند (۱۳). هرچند هزینه انجام این روش نسبت به روش‌های متداول در کشور بیشتر است، اما به دلیل مطمئن بودن نتایج حاصل، می‌تواند در مقیاس گسترده باعث تسریع شناسایی باکتری گردد.

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، روش مولکولی PCR می‌تواند همانند روش کشت در شناسایی و جداسازی سویه‌های *پنوموکوک* از نمونه‌های بالینی مورداستفاده قرار گیرد که علاوه بر مطمئن بودن این روش مانند روش کشت، سریع‌تر بوده و در مقیاس گسترده، مقرون‌به‌صرفه‌تر خواهد بود.

تقدیر و تشکر

از روسای محترم مراکز تحقیقات مدیریت سلامت، بهداشت و تغذیه، بیولوژی مولکولی و گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، به خاطر راهنمایی‌های ارزنده و حمایت‌های مالی ایشان و در اختیار گذاشتن فضا و تجهیزات جهت انجام تحقیق و همچنین از مراکز درمانی تهران، به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه‌های بالینی تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Downloaded from ijmm.ir at 2:29 +0330 on Sunday October 22nd 2017

References

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. The *Streptococci*. In: Jawetz, Melnick & Adelberg's. Medical Microbiology. 25th ed. New York: McGraw-Hill; 2010. p. 219-236.
2. Driver C. Pneumonia part 2: signs, symptoms and vaccinations. Br J Nurs 2012; 21(4):245-9.
3. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A brief history of the *Pneumococcus* in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clin Infect Dis 1993; 17(5):913-24.
4. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. Lancet Infect Dis 2009; 374(9693):893-902.
5. Lawn JE, Wilczynska-Ketende K, Cousens SN. Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. Int J Epidemiol 2006; 35(3):706-18.
6. Scott JAG. The global epidemiology of childhood pneumonia 20 years on. Bull World Health Organ 2008; 6(6):494–6.
7. Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. Lancet Infect Dis 2002; 2(1):25-32.
8. Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? Lancet Infect Dis 2003; 361(9376):2226-34.
9. Obaro S, Adegbola R. The *Pneumococcus*: carriage, disease and conjugate vaccines. J Med Microbiol 2002;51(2):98-104.
10. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to *Pneumococcal* disease. Lancet Infect Dis 2004; 4(3):144-54.
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Identification and Characterization of *Streptococcus pneumoniae*. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. 2th ed. Switzerland: WHO; 2011. p.73-86.
12. Betty A, Daniel F, Alice S. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. Saint Louis: Mosby; 2002.
13. Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. J Clin Microbiol 2006; 44(1):124-31.
14. Da Gloria Carvalho M, Pimenta FC, Jackson D, Roundtree A, Ahmad Y, Millar EV, et al. Revisiting *Pneumococcal* carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. J Clin Microbiol 2010; 48(5):1611-8.
15. Soltan-Dallal MM, Jabbari H, Forushani AR, Heidarzadeh S, Afrogh, Sharifi Yazdi MK. Frequency and resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in acute otitis media. J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(98):28-35. [in Persian]
16. Ataee RA, Habibian S, Mehrabi-Tavana A, Ahmadi Z, Jonaidi N, Salesi M. Determination of vancomycin minimum inhibitory concentration for ceftazidime resistant *Streptococcus pneumoniae* in Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2013; 13(1):53-59.
17. Ahmadi A, Talebi M, Sayahfar S, Irajian G. Accuracy of detection of *Streptococcus pneumoniae* in clinical laboratories by using phenotypic and molecular methods. Koomesh 2015; 16(3):384-8. [in Persian]
18. Aghamiri F, Soleimani M, Mohseni AH, Majidzadeh K. Design of an improved polymerase chain reaction (PCR) assay for molecular detection of *Streptococcus pneumonia*. Qom Univ Med Sci J 2013; 7(4):81-88. [in Persian]
19. Irajian G, Ahmadi A, Talebi M. The study of *Streptococcus pneumoniae* in invasive and non invasive infections and multiplex PCR detection of four virulence genes. IEM J 2013; 1(1):3-8. [in Persian]
20. Hajia M, Rahbar M, Rahnami Farzami M, Dolatyar A, Imani M, Saburian R, et al. Efficacy of multiplex PCR procedure for Iranian *Streptococcus pneumoniae* isolates. Caspian J Intern Med 2014; 5(2):109-13.
21. Ghotaslou R, Farajnia S, Yeganeh F, Abdoli-Oskouei S, Ahangarzadeh-Rezaee M, Barzegar M. Detection of acute childhood meningitis by PCR, culture and agglutination tests in Tabriz, Iran. Acta Med Iran 2012; 50(3):192-6.
22. Nomanpour B, Ghodousi A, Babaei T, Mousavi SA, Asadi S, Feizabadi M. Detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae* from Iranian patients with pneumonia and ndividual carriers by Real-Time PCR. AJB 2011; 10(60):12826-32.

Final Proof