



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

Mohammad Mohsenpoor<sup>1</sup>, Ali Mehrabi-Tavana<sup>2</sup>, Ramezan-Ali Ataee<sup>1,3</sup>, Reza Ranjbar<sup>4</sup>, Reza Mirnejad<sup>4</sup>

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.

### 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



Farname Inc.

## جداسازی و شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه از بیماران بستری در بیمارستان‌های

تهران در سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۲

محمد محسن پور<sup>۱</sup>، علی مهربابی توانا<sup>۲</sup>، رضمانعلی عطایی<sup>۳</sup>، رضا رنجبر<sup>۴</sup>، رضا میرنژاد<sup>۴</sup>

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

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک) باکتری بیماری‌های گرم- مثبت است که عامل ایجاد پنومونی، سپتی‌سمی، مننژیت، عفونت گوش میانی، سینوزیت، برونشیت، باکتری می و سایر پروسه‌های عفونی شده 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 انجام شده است.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه تعداد ۱۷۵ نمونه بالینی مختلف از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران طی مدت ۳ سال (۱۳۹۲-۱۳۹۴)، 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 ۴۰ سویه پنوموکوک به روش‌های کشت و PCR شناسایی و مورد تأیید قرار گرفته است. آمپلیکون تکثیرشده در این تحقیق یک قطعه ۱۶۰ 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 ارزیابی شده 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 میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

**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 مهربابی توانا  
مرکز تحقیقات مدیریت سلامت،  
دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)،  
تهران، ایران

**تلفن:** ۰۹۸۹۱۲۱۰۹۷۳۵۸

**پست الکترونیک:**  
[mehrab@bmsu.ac.ir](mailto:mehrab@bmsu.ac.ir)

### مقدمه

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

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

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، باکتری می و سایر پروسه‌های عفونی معرفی شده است (۲،۱). باکتری ناشی از پنومونی نیز می‌تواند به عفونت‌های شدیدتر مانند مننژیت، اندوکاردیت و آرتریت عفونی منجر شود (۱).

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 از نظر 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. پس از آن پلیت‌های حاوی کلنی‌های مشکوک به *استرپتوکوکوس پنومونیه* از نظر وجود همولیز آلفا به‌دقت بررسی شده، 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 (۱۱،۱۲).

### استخراج DNA

برای استخراج ژنوم باکتری‌های حاصل از کشت نمونه‌های بالینی، از روش جوشاندن و فریز نمودن استفاده گردید (۱۳،۱۴). پس از اندازه‌گیری 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، پس از آنالیز بیوانفورماتیکی از پرایمر اختصاصی cpsA با شماره بانک ژنی AF057294، استفاده گردید که اطلاعات پرایمر در جدول زیر بیان شده است.

عمل آید. ۱۰ کشوری که بیشترین موارد عفونت *پنوموکوک* در آن‌ها گزارش شده 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 زده شده 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 *پنوموکوک* 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 درحال توسعه می‌گردد (۶). ۱/۹ میلیون کودک در جهان در سال ۲۰۰۰ در اثر عفونت‌های تنفسی حاد (*پنوموکوک* 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 پاتوزن 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 درحال توسعه 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. از آنجاکه هنوز در اکثر آزمایشگاه‌های بالینی و میکروبی‌شناسی 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.

جدول ۱: مشخصات پرایمر انتخاب شده در مطالعه

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

(۱۱ میکرولیتر)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر داخل میکروتیوب‌های استریل اضافه شده، پس از مخلوط نمودن مختصر محتویات میکروتیوب‌ها، به مدت ۱۰ ثانیه در دور پایین چرخانده (اسپین نموده) و در دستگاه ترموسایکلر (Analytik-Jena آلمان) با قابلیت شیب دمایی قرار داده شدند که پس از انجام چندین بار PCR، چرخه حرارتی طبق جدول ۲ بهینه‌سازی گردید.

به منظور راه‌اندازی PCR، ژنوم استخراج شده استرپتوکوکوس پنومونیه سویه استاندارد (۱ میکرولیتر)، Master Mix (ساخت شرکت Ampliqon دانمارک) حاوی 0.05، 0.4 mM dNTPs، 0.2% Tween 20، 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> Inert red dye و unit/μL Ampliqon Taq DNA Polymerase and a stabilizer (۱۲/۵ میکرولیتر)، پرایمرهای راست و چپ cpsA (هر کدام ۰/۲۵ میکرولیتر) و آب مقطر دیونیزه استریل

جدول ۲: چرخه دمایی استفاده شده در ترموسایکلر

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

جهت بررسی ویژگی (تعیین اختصاصیت)، با استفاده از ژنوم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی تحت شرایط فوق و در حضور پرایمر مورد استفاده، به طور جداگانه PCR انجام شد و نتیجه از نظر تشکیل یا عدم ایجاد باند اختصاصی برای پرایمر اختصاصی در محدوده مورد نظر، 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 جدا شده 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 مورد بررسی قرار گرفتند.

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

### PCR تعیین حساسیت و ویژگی

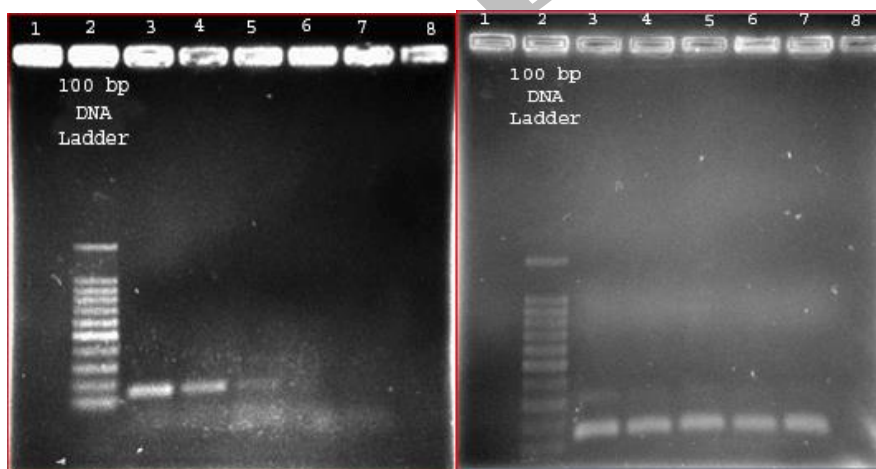
پس از به دست آوردن بهترین دما در مراحل مختلف PCR، به خصوص دمای اتصال مجدد پرایمرها، جهت تعیین حساسیت PCR و همچنین تعیین غلظت مناسب از DNA استخراج شده برای استفاده در واکنش، PCR با شیب غلظت DNA الگو شامل غلظت‌های اولیه (رقیق نشده)، ۱۰<sup>-۱</sup>، ۱۰<sup>-۲</sup>، ۱۰<sup>-۳</sup> و ۱۰<sup>-۴</sup> انجام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

### نتایج حاصل از کشت و تعیین هویت بیوشیمیایی

طبق نتایج سویه‌های پنوموکوک شناسایی شده 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، به صورت دیپلوکوک شعله شمعی و گرم- مثبت مشاهده شدند. 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 جمع‌آوری شده 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.

### 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 استخراج شده 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 معرفی شده در این تحقیق وجود دارد. باین‌حال، آنالیز تصاویر و مقایسه باندهای حاصل از PCR ژنوم رقیق نشده و ژنومهای رقیق شده، بهترین غلظت مورد استفاده 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 ۱۰۰۰ bp، ۳- دمای ۵۴°C، ۴- دمای ۵۵°C، ۵- دمای ۵۶°C، ۶- دمای ۵۷°C و ۷- دمای ۵۸°C) (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°C (از چپ به راست: ۱- کنترل منفی، ۲- لدر، ۳- غلظت اولیه، ۴- غلظت ۱۰<sup>-۱</sup>، ۵- غلظت ۱۰<sup>-۲</sup>، ۶- غلظت ۱۰<sup>-۳</sup> و ۷- غلظت ۱۰<sup>-۴</sup>) (شکل سمت چپ). باندهای تولید شده اختصاصی پرایمر، ۱۶۰ bp می‌باشند.

عمل می‌نماید و ویژگی آن برای این باکتری، ۱۰۰ درصد می‌باشد (شکل ۲ الف).

طی نتایج حاصل از PCR ژنوم باکتری‌های دیگر در شرایط فوق، هیچ باندهای در محدوده ۱۶۰ bp تکثیر نشد که نشان می‌دهد پرایمر cpsA به‌طور اختصاصی برای شناسایی پنوموکوک

شناسایی و مورد تأیید قرار گرفتند که محدوده تشکیل باندهای اختصاصی، ۱۶۰ bp بوده است (شکل ۲ ب).

در نهایت پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، تعداد ۴۰ سویه پنوموکوک شناسایی شده در مرحله قبل، به روش PCR نیز



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 داده شده است. چاهک ۱ لدر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد (شکل سمت راست).  
ب) نتایج PCR سویه‌های جدا شده بالینی در حضور سویه استاندارد پنوموکوک در شرایط بهینه با پرایمر cpsA نشان داده شده است. از چپ به راست: چاهک‌های کنترل منفی، کنترل مثبت، لدر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی و سویه‌های جدا شده بالینی (چاهک‌های ۱-۳) قابل مشاهده‌اند (شکل سمت چپ). باندهای تولید شده اختصاصی پرایمر، ۱۶۰ bp می‌باشند.

طراحی روش‌های تشخیص سریع عفونت‌های پنوموکوکی اقدام نمایند؛ به‌این ترتیب، Ahmadi و همکاران با استفاده از پرایمر طراحی شده جهت تشخیص ژن *lytA* و انجام PCR، نشان دادند حدود ۵۰ درصد از سویه‌های شناسایی شده با استفاده از ویژگی‌های فنوتیپی، به‌اشتباه به‌عنوان پنوموکوک معرفی شده‌اند (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 تکثیر شده با پرایمر فوق، یک محصول ۷۲۷ جفت بازی در یک پلاسمید بوده است (۱۸) که چنانچه باکتری پلاسمید مورد نظر را از دست بدهد، نتیجه منفی خواهد شد، اما در این مطالعه محصول PCR، یک قطعه ۱۶۰ جفت بازی کاملاً محافظت شده بوده و در تمامی سویه‌های پنوموکوک وجود دارد.

#### 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 منتشر شده است؛ از جمله، 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 جدا شده به وانکومایسین مقاوم‌اند (۱۵).

گزارش منتشر شده دیگری حاکی از آن است که ۸ درصد سویه‌های پنوموکوک جدا شده 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

پنوموکوک قابل شناسایی می‌باشد؛ به این ترتیب شاید بتوان از این روش به عنوان 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 انجام شده در کشور، نتایج قابل قبولی ارائه نموده و همانند این مطالعات، روش مولکولی PCR را روشی مطمئن و قابل اعتماد معرفی نموده است (۲۱-۱۷). با توجه به تأیید نتایج حاصل از کشت به وسیله PCR و مطابقت آنها با هم، می‌توان چنین مطالعه‌ای را به طور مستقیم بر روی نمونه‌های بالینی نیز انجام داد و کارایی آن را ارزیابی نمود.

علی‌رغم مطالعات مولکولی انجام شده در کشور و تأیید آن، هنوز در آزمایشگاه‌های میکروبی شناسی از روش کشت و آزمایش‌های بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری استفاده می‌شود که معمولاً از حلالیت در صفرا هم استفاده نشده، در نتیجه 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، مقرون به صرفه‌تر خواهد بود.

#### تقدیر و تشکر

از روسای محترم مراکز تحقیقات مدیریت سلامت، بهداشت و تغذیه، بیولوژی مولکولی و گروه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (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 میکروبی شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

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 انجام شده، از ۹۰ سویه جمع‌آوری شده مشکوک به پنوموکوک، ۴۰ سویه به روش‌های کلاسیک و مولکولی شناسایی و مورد تأیید قرار گرفته‌اند (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 ارزیابی شده است (۲۰).

Ghotaslou و همکاران عوامل شایع مننژیت باکتریایی در اطفال، از جمله پنوموکوک را به روش‌های مختلف شناسایی کرده و با هم 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 به دست آمده از افراد بستری و غیر بستری، جدا و شناسایی نمایند. ویژگی و حساسیت روش مولکولی استفاده شده به ترتیب، ۹۹ و ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۲۲).

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

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 به عنوان 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

## References

- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. The *Streptococci*. In: Jawetz, Melnick & Adelberg's. Medical Microbiology. 25<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2010. p. 219-236.
- Driver C. Pneumonia part 2: signs, symptoms and vaccinations. Br J Nurs 2012; 21(4):245-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- Scott JAG. The global epidemiology of childhood pneumonia 20 years on. Bull World Health Organ 2008; 6(6):494-6.
- 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.
- Black RE, Morris SS, Bryce J. Where and why are 10 million children dying every year? Lancet Infect Dis 2003; 361(9376):2226-34.
- Obaro S, Adegbola R. The *Pneumococcus*: carriage, disease and conjugate vaccines. J Med Microbiol 2002; 51(2):98-104.
- Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to *Pneumococcal* disease. Lancet Infect Dis 2004; 4(3):144-54.
- 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*. 2<sup>th</sup> ed. Switzerland: WHO; 2011. p.73-86.
- Betty A, Daniel F, Alice S. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11<sup>th</sup> ed. Saint Louis: Mosby; 2002.
- 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.
- 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.
- 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]
- 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.
- 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]
- Aghamiri F, Soleimani M, Mohseni AH, Majidzadeh K. Design of an improved polymerase chain reaction (PCR) assay for molecular detection of *Streptococcus pneumoniae*. Qom Univ Med Sci J 2013; 7(4):81-88. [in Persian]
- 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]
- 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.
- 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.
- Nomanpour B, Ghodousi A, Babaei T, Mousavi SA, Asadi S, Feizabadi M. Detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae* from Iranian patients with pneumonia and individual carriers by Real-Time PCR. AJB 2011; 10(60):12826-32.