بررسی فراوانی بیوتایپ های هموفیلوس انفلوانزا، اهمیت کلینیکی و ارتباط آن با نوع بیماری

هما فروهش تهرانی* عباس عبداللهی اکرم اسدی اسدآباد** رؤیا مکاری نژاد** فاطمه نوبهار****
مژگان عشاقی*** مژگان مرادی*****

* کارشناس ارشد میکروبیولوژی و بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

** کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

*** دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

**** کارشناس میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

زمینه و هدف

هموفیلوس آنفلوانزا، عامل عفونت‌های گوناگونی هم‌چون مننژیت، اپی‌گلوتیت، پنومونی، سلولیت، باکتریمی، آرتریت عفونی و عفونت ملتحمه چشم است. این باکتری به هفت بیوتایپ بر اساس سه تست ایندول، اوره‌آز و دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه اورنیتین تقسیم می‌شود. این بررسی، به دلیل ارتباط بیوتایپ ها با عفونتی خاص و هم‌چنین الگوی مقاومت ضدمیکروبی انجام گرفت که با تعیین میزان شیوع و بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا ارتباط آن با نوع عفونت ایجاد شده نیز بررسی می‌گردد.

روش بررسی

در بررسی ۱۸ ماهه از فروردین ۱۳۸۴ لغایت مهرماه ۱۳۸۵، تمام نمونه های کلینیکی که امکان جداسازی هموفیلوس وجود داشت، بر روی محیط های استاندارد شده شکلات‌آگار و بلادآگار به همراه کشت خطی استافیلوکوک اورئوس کشت گردیدند. انواعی که پدیده ساتلیتیسم را نشان دادند، از نظر تولید ایندول، اوره‌آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین برای تعیین بیوتایپ بررسی شدند.

یافته‌ها

از ۲۴ نمونه هموفیلوس آنفلوانزا جدا شده از نمونه های کلینیکی ۱۱ مورد از چشم، ۱۱ مورد از سینوس، ۱ مورد از مایع نخاع و ۱ مورد از خون جدا شد. نمونه های سینوسی به بیوتایپ III، نمونه های جدا شده از چشم ۶ مورد به بیوتایپ II و ۵ مورد به بیوتایپ III تعلق داشت. انواع جدا شده از مایع نخاع و خون از نوع بیوتایپ I بودند. سایر بیوتایپ ها جدا نگردیدند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که بیشتر بیوتایپ های جدا شده از چشم از نوع II و III بودند و هم‌چنین در مورد سینوزیت نیز انواع جدا شده به بیوتایپ III تعلق داشتند.

کلیدواژه: هموفیلوس آنفلوانزا نوع B، بیماری‌های واگیر، عفونت

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۵ تاریخ پذیرش:۸۶/۲/۳

نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

e-mail:homf_27@ yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا در بین ۹گونه موجود در جنس هموفیلوس، از شایع‌ترین گونه‌هاست. این باکتری عامل بسیاری از عفونت‌های انسانی شامل مننژیت، اپی‌گلوتیت، پنومونی، سلولیت، باکتریمی، آرتریت عفونی، عفونت گوش میانی، سینوزیت، عفونت دستگاه تناسلی و ملتحمه چشم است[۱].

هموفیلوس آنفلوانزا، باکتری‌کپسول‌داری است که از نظر تفاوت در قندهای تشکیل دهنده کپسول پلی‌ساکاریدی به ۶ سروتایپ کپسولی (a, b, c, d, e, f) تقسیم می‌شود و هموفیلوس آنفلوانزا سروتایپ b مهم‌ترین پاتوژن در میان دیگر سروتایپ های کپسولی است[۲ و ۳]. Killian در سال ۱۹۷۶ تست‌های بیوشیمیایی را برای تشخیص و تعیین بیوتایپ هموفیلوس ها انجام داد. تعیین بیوتایپ هموفیلوس ها بر اساس سه تست تولید ایندول، اوره‌آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین صورت می‌گیرد و هموفیلوس آنفلوانزا را به هفت بیوتایپ بدون ارتباط با سروتایپ‌های کپسولی تقسیم می کند[۴ و ۵ و ۶].

اهمیت تعیین بیوتایپ در هموفیلوس آنفلوانزا، به دلیل ارتباط اختصاصی بیوتایپ ها با عفونت های متفاوت، منابع، ویژگی‌های آنتی‌ژنیک و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جدا شده است. در قدیمی‌ترین پژوهش انجام شده توسط Oberhofer و همکاران بر روی ۴۶۴ نمونه هموفیلوس آنفلوانزا، بیوتایپ I بیشتر از خون، مایع نخاع و ترشحات دستگاه تنفسی جدا گردید، بیشتر مبتلایان کودکان زیر یک سال بودند و اغلب بیوتایپ های I هموفیلوس آنفلوانزا به سروتایپ b تعلق داشتند. به علاوه در این مطالعه مشخص گردید، بیوتایپ‌های II و III بیشتر از عفونت های چشم جدا می‌گردند[۷]. در مطالعه Alrawri و همکاران بر روی تعیین بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا جدا شده از عفونت‌های چشم، تیپ های II و III شایع‌ترین بیوتایپ گزارش گردیدند[۸]. Quentin و همکاران در بررسی های خود، بیوتایپ IV را با عفونت‌های دستگاه تناسلی زنان و عفونت‌های نوزادان در ارتباط دانسته و از۴ سیستم برای ارزیابی و تعیین بیوتایپ بر روی ۱۸۸ نمونه جدا شده از دستگاه تناسلی و عفونت های نوزادان استفاده کردند[۹].

جداسازی گونه‌های هموفیلوس از نمونه‌های کلینیکی، به دقت در جمع‌آوری نمونه، نحوه انتقال و محیط کشت مناسب نیاز دارد و به دلیل ماهیت سخت رشد باکتری و حساسیت فوق‌العاده آن به خشکی و درجه حرارت، تشخیص و جداسازی آن دقت، مهارت و تجربه بیشتری را می‌طلبد. هدف از این بررسی، علاوه بر تعیین میزان جداسازی هموفیلوس آنفلوانزا از نمونه‌های مختلف کلینیکی، تعیین فراوانی بیوتایپ ها و ارتباط آن با نمونه‌های مختلف کلینیکی است.

Archive of SID
www.SID.ir

روش بررسی

در بررسی ۱۸ ماهه از نوع توصیفی، از فروردین ۱۳۸۴ لغایت مهرماه ۱۳۸۵، تمام نمونه‌هایی که امکان جداسازی هموفیلوس از آنها وجود داشت، از قبیل مایع نخاع، خون، ترشحات چشم، ترشحات گوش، مجرا، ترشحات سینوسی و خلط بر روی محیط های بلادآگار خون گوسفند و محیط شکلات-آگار استاندارد کشت گردیدند. به دلیل آن که بلادآگار خون گوسفند، حاوی آنزیم های غیرفعال کننده فاکتور V است، نمونه های استریل بدن مانند مایع نخاع و خون بر روی محیط بلادآگار به همراه کشت خطی استافیلوکوک اروئوس کشت گردیدند تا با ایجاد پدیده ساتلیتیسم، هموفیلوس های نیازمند به فاکتور V به علاوه، انواع نیازمند به فاکتور X نیز به دلیل آزاد شدن Hemin و هماتین از گلبول های قرمز ناشی از عمل‌کرد همولیزین استافیلوکوکی به صورت اقماری[1] در اطراف کشت استافیلوکوک اروئوس رشد کنند. در مورد نمونه‌های دیگر به دلیل وجود فلور نرمال، به کشت خطی استافیلوکک ارئوس در پلیت اولیه نیاز نیست. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در جار شمع‌دار و در دمای $35^{\circ}C$، بعد از ۲۸ – ۲۴ ساعت پلیت ها بررسی شدند. پس از مشاهده مورفولوژی کلنی و رنگ‌آمیزی گرم و کشت خطی استافیلوکوک، انواعی که پدیده ساتلیتیسم را نشان دادند، برای تعیین گونه از طریق نیاز به فاکتورهای X و V بر روی محیط BHI در حضور دیسک های X و V و XV کشت گردیدند. به علاوه، همزمان نیز از بریده شکلات‌آگار به عنوان منبع فاکتور X و کشت استافیلوکوک اورئوس به عنوان منبع فاکتور V در محیط مولر هنیتون آگار (بدون افزودن خون) برای مقایسه با دیسک های حاوی فاکتورهای X و V برای تعیین گونه هموفیلوس استفاده گردید. برای تعیین بیوتایپ، سوسپانسیونی غلیظ در محیط تریپتوفان براث کشت گردید و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری با افزودن چند قطره معرف کوواکس و مشاهده رنگ قرمز تولید ایندول مشخص گردید. سطح محیط کریستنسنس اوره‌آگار نیز با سوسپانسیون غلیظ باکتری کشت گردید و بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته، از نظر تولید آنزیم اوره‌آز با ایجاد رنگ ارغوانی بررسی شد. محیط مایع مولر دکربوکسیلاز حاوی ۱٪ اورنیتین نیز با سوسپانسیون غلیظ باکتری کشت گردید و سپس سطح آن با روغن معدنی استریل پوشانده شد و همزمان نیز از یک محیط کشت داده نشده به عنوان کنترل استفاده گردید. دکربوکسیلان اسیدآمینه اورنیتین با ایجاد رنگ ارغوانی پررنگ مشخص گردید.

بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا با بررسی نتایج سه تست تولید ایندول، آنزیم اوره‌آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین و با استفاده از جداول مرجع مشخص شد[(1)].

[1] . Satellite Colonies

Archive of SID
www.SID.ir

یافته ها

از ۳۴۵۶ نمونه کلینیکی که امکان جداسازی هموفیلوس آنفلوانزا در آن وجود داشت، ۲۷۳۰ نمونه کشت خون، ۵۹۳ نمونه ترشح سینوسی، ۱۰۵ مورد مایع نخاع و ۳۰ مورد ترشحات چشم، ۲۴ مورد (۰/۶۹٪) هموفیلوس آنفلوانزا به‌دست آمد، میزان جداسازی آن از هر یک از نمونه های کلینیکی شامل کشت خون ۱ مورد (۰/۰۳۶٪) ترشح سینوسی ۱۱ مورد (۲/۳۵٪)، مایع نخاع ۱ مورد (۰/۶۶٪) و ترشحات چشم ۱۱ مورد (۳۶/۶٪) بود. از نظر فراوانی بیوتایپ‌ها، ۲ مورد (۸/۳٪) به بیوتایپ I (ایندول، اوره‌آز و اورنیتین دکربوکسیلاز مثبت) ۶ مورد (۲۵٪) به بیوتایپ II (ایندول و اوره‌آز مثبت، اورنیتین دکربوکسیلاز منفی) و ۱۶ مورد (۶۶/۶٪) به بیوتایپ III (ایندول و اورنیتین دکربوکسیلاز منفی و اوره‌آز مثبت) تعلق داشت. از نظر ارتباط بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا با نوع نمونه کلینیکی، موارد جدا شده از خون و مایع نخاع به بیوتایپ I، انواع جدا شده از سینوس، به بیوتایپ III و انواع جدا شده از چشم ۶ مورد به بیوتایپ II و ۵ مورد به بیوتایپ III تعلق داشتند. سایر بیوتایپ‌ها جدا نگردیدند. نتایج تشخیص باکتری با استفاده از دیسک های تجاری X و V با روش استفاده از بریده شکلات‌آگار و کشت استافیلوکک ارئوس کاملاً هم‌خوانی داشت.

بحث

هموفیلوس آنفلوانزا در زمرهٔ باکتری‌هایی است که عفونت‌های تهاجمی و موضعی در هر دو گروه سنی کودکان و بزرگسالان را ایجاد می‌کند. ارتباط بین بیوتایپ باکتری و مکان عفونت در بسیاری از مطالعات به عنوان مارکری برای مطالعات اپیدمیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است. در این بررسی، بیوتایپ III شایع‌ترین بیوتایپ در هموفیلوس آنفلوانزا جدا شده از موارد کلینیکی بود که ۱۱ مورد از ترشحات سینوس و ۵ مورد از ترشحات چشم جدا گردید. در بیشترمطالعات انجام شده در مورد سینوزیت باکتریایی باکتری ها در $\frac{۳}{٤}$ موارد عامل آن بوده و در ۵۰٪ موارد هموفیلوس آنفلوانزا شایع‌ترین باکتری گزارش گردیده است[۱۰].

در بررسی حاضر ۷۸/۹٪ ترشحات سینوسی کشت مثبت داشتند، ولی جداسازی ۱۱ مورد هموفیلوس آنفلوانزا نشان می‌دهد که باید به استفاده از روش‌های کشت و تکنیک‌های مناسب در جداسازی این باکتری توجه داشت. مطالعه N.N. Bgun وهمکاران بر روی ۲۰۰ مورد هموفیلوس آنفلوانزا، نشان داد که بیوتایپ II و III به ترتیب غالب‌ترین بیوتایپ در عفونت‌های موضعی بوده اند[۱۱]. در بررسی حاضر بیوتایپ II به میزان ۶ مورد شایع‌ترین نوع پس از بیوتایپ III بود که از چشم جدا شد و نقش این بیوتایپ را در عفونت‌های موضعی نشان داد.

در بررسی Mitsumasa و همکاران با روش ژل الکتروفوز میدان پالسی[1] بر روی ۲۰۰ نمونه هموفیلوس آنفلوانزا نشان داده شد که بیشتر نمونه های کلینیکی به بیوتایپ I، II و III تعلق دارند و حتی موارد بدون کپسول هموفیلوس آنفلوانزا در ناقلان سالم بیوتایپ II و III هستند[۱۲]. در سال ۱۹۸۲، Prober و همکاران، مننژیت ناشی از بیوتایپ II و سروتایپ b را در کودک دو ساله‌ای که در مهدکودک نگه‌داری می‌شد، گزارش کردند. نمونه‌برداری از حلق و بینی ۲۶ کودک دیگر در همان مهدکودک بیوتایپ II را نشان داد[۱۳]. این مطالعات اهمیت تعیین بیوتایپ را در مطالعات اپیدمیولوژی برای تعیین منبع و سطح تماس بیماران خاطرنشان می‌سازد.

[1]. Pulsed Field Electrophoresis

Archive of SID
www.SID.ir

در بررسی حاضر دو مورد بیوتایپ I به ترتیب از خون و مایع نخاع جدا گردید که نقش این بیوتایپ را در عفونت‌های سیستمیک نشان می‌دهد. مننژیت ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا، بیماری شدیدی است و میزان مرگ و میر ناشی از آن در سطح بالایی قرار دارد. تخمین زده می شود که ۹۹٪ موارد عفونت سیستمیک هموفیلوس آنفلوانزا به وسیله سروتایپ آنفلوانزا Hb و بیوتایپ I به وجود می آید. در یک بررسی، ۷۶٪ مننژیت ناشی از سروتایپ b به بیوتایپ I و ۱۸٪ موارد به سروتایپ II تعلق داشته است[۱۴].

در بررسی انجام شده در کودکان زیر ۵ سال ویتنامی مبتلا به مننژیت ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا، سروتایپ b با روش ژل الکتروفوز میدان پالسی[1] ۳ /۶۸٪ به بیوتایپ II و ۲۲/۸٪ به بیوتایپ I تعلق داشتند. مقاومت آنتی-بیوتیک باکتری جدا شده بدون ارتباط با بیوتایپ نشان داد که ۵۷٪ مقاوم به آمپی سیلین بوده و بتالاکتاز از Tem-1 تولید می‌کردند[۱۵].

قبل از معرفی واکسن Hib، سالانه موارد زیادی از بیماری‌های تهاجمی ناشی از این باکتری در بسیاری از نقاط دنیا گزارش می‌گردید. در حال حاضر کارایی این واکسن ۱۰۰- ۹۵٪ است . با توجه به اطلاعات به دست آمده مربوط به بار بیماری هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b در منطقه مدیترانه شرقی که این باکتری را یکی از علل اصلی مننژیت کودکان می‌داند، واکسن Hib تنها در ۱۱ کشور مدیترانه شرقی در برنامه جاری واکسیناسیون به کار می‌رود. در ایران هنوز به دلیل به کارگیری روش‌های نامناسب آزمایشگاهی، میزان جداسازی این باکتری پایین است[۱۶]. از این رو انتظار می رود با تقویت و توان‌مندسازی آزمایشگاه‌ها، اقدامات فراگیری برای تعیین میزان شیوع بیماری‌های ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا به‌ویژه مننژیت ناشی از این باکتری صورت گیرد و با تعیین بیوتایپ و سروتایپ و چگونگی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن، اطلاعات جامعی از این باکتری به دست آید. هم‌چنین در این بررسی نشان داده شد که با استفاده از روش‌های آسان و در دسترس با استناد به ویژگی‌های باکتری، می‌توان بدون نیاز به فاکتورهای تجارتی X و V تنها با به کارگیری بریده شکلات‌آگار (منبع X) و کشت استافیلوکوک اورئوس (منبع فاکتور V) باکتری به‌دست آمده را در حد جنس و گونه تشخیص داد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که بیشتر بیوتایپ‌های جدا شده از چشم بیوتایپ II و III بودند و هم‌چنین در مورد سینوزیت نیز انواع جدا شده به بیوتایپ III تعلق داشتند.

[1]. Pulsed Field Gel Electrophoresis

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Washington Winn, Jr Stephen Allen, William janda, Elmer Koneman, Gary procop, Paul shreckenberger, et al. Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbilogy. 6th ed. Philadelphia, lippincott Williams and wilkins; 2006. p. 429-548.

2. Neuman H B, Wald E R. Bacterial Meningitis in Childhood at the Children's Hospital of Pitsbargh. Clin pediatr (Phila) 2001: 40: 595-600.

3. Sarangi J. Cartwight K., Stuart J. Invasive Haemophilus influenzae disease in adults. Epidemiol infect 2000; 124: 441-447.

4. Kilian M .A Taxonomic Study of the Genus Haemophilus with the Proposal of a New Species. J Gen Microbiol 1983; 13: 1615-1016.

5. Gratten M .Haemophilus Influenzae Biotype VII. J clin Microbiol 1983;13:1615-1016.

6. Sottnek F, Albritton Wl . Haemophilus Influenzae Biotype VIII. J clin Microbiol 1984; 20:815-816.

7. Oberhofer TR, Back AE . Biotypes of Haemophilus Influenzae Encountered in Clinical Laboratories. J Clin Microbial 1984;20:815-816.

8. Alrawli AM, CHern KC, cevallos V. Biotypes and Sertypes of Haemophius Influenzae Ocular Isolates. Br J ophthalmol 2002; 86:276-227.

9. Quentin R, Dubarvy I, Martin C . Evaluation of Four Commercial Methods for Identification and Biotyping of Genital and Neonatal Strains of Haemophilus Speaies. Eur J clin Microbiol infect Dis 1992; 11: 543-549.

10. Forbes Betty A , Sahm Daniel F. Weissfeld Alices. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. St. louis Mosby ;2002. p. 925-926.

11. Begum NN, Al-khuttaf AA, Kambal AM, Yebooh EA . Prevalence of H. Influenzae Biotypes and Their Clinical Significance in a University Hospital Saudi. Med J 2003 Dec; 24 (12) : 1308-1312.

12. Saito M, umeda A, Yoshida S. Subtyping of Haemophilus Influenzae Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol 1999 Jul; 37(7):2142-7.

13. Charles G prober, Moshe M Robert, M BannaTyne. H Influenza Type b in a Nursery School: The value of biotyping. Pediatric 1982 Feb ; 62 (2): 25-30.

14. Isis Tamargo, Gilda Torano, Oxandra Rodriguez. Mirian Perez Characterization of Haemophilus Influenza Obtained from Invasive Disease in Biotyping of the Hib Isolates. Memories do instituto oswaldo cruz. Riodojanerio Juli 1999

15. Phanl T, Ngo T, Dang DA, Vutt, Lenm, tran QC, etal .Genetic and Phenotypic Characterization of Haemophilus Influenza Type b Isolated from Children with Meningitis and their Family Members in Vietnam. Jpn J infect Dis 2006 Apr; 59(2): 111-116.

۱۶ - استقامتی عبدالرضا، عسگری فرشته ، گودرزی نعمت الله. دستورالعمل مراقبت مننژیت.تهران: وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی انتشارات مرکز مدیریت، بیماریها؛ ۱۳۸۴. ص. ۷-۶.

Archive of SID

www.SID.ir