تعیین میزان صحت تشخیص استرپتوکوک پنومونیه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با روش‌های فنوتایپی و مولکولی

علی احمدی[۱](Ph.D)، ملیحه طالبی[۲](Ph.D)، شیرین سیاح‌فر [۳](M.D)، غلامرضا ایراجیان [*۲](Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی

۲- دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، بخش میکروب‌شناسی

۳- دانشگاه علوم پزشکی ایران، بیمارستان حضرت علی اصغر (ع)، بخش عفونی اطفال

چکیده

سابقه و هدف: استرپتوکوکوس پنومونیه یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های باکتریائی و عضوی از استرپتوکوک‌های ویریدانس بشمار می‌رود. تشخیص صحیح و تمایز این باکتری از سایر باکتری‌های مشابه، اهمیت بسیاری در اپیدمیولوژی بالینی و روند مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی پنوموکوک دارد. در این مطالعه میزان صحت تشخیص استرپتوکوک پنومونیه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با روش‌های فنوتایپی و ژنوتایپی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ایزوله های بالینی که توسط آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به‌عنوان پنوموکوک شناسایی شده بودند، دریافت و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از خالص‌سازی کلنی‌ها، تعیین هویت بیوشیمیایی با استفاده از آزمون‌های حساسیت به اپتوچین و حلالیت در صفرا انجام گردید. DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت استخراج شده و تعیین هویت مولکولی از طریق آزمون PCR برای تشخیص ژن lytA انجام شد.

یافته‌ها: پس از تعیین هویت مجدد، در نهایت ۵۰ ایزوله به‌عنوان پنوموکوک واقعی شناسایی شده و ۶۰ ایزوله دیگر شامل ۳ کوکوباسیل گرم منفی، ۷ استرپتوکوک غیرآلفاهمولیتیک و ۵۰ استرپتوکوک ویریدانس بودند. بیش‌ترین میزان اشتباه در تشخیص پنوموکوک، مربوط به عفونت‌های تنفسی و چشمی بود. تمام ۵۰ ایزوله که به‌عنوان پنوموکوک شناسایی شده بودند، از نظر ژن lytA مثبت بوده و ایزوله‌های مقاوم به اپتوچین از نظر ژن lytA منفی بودند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، میزان خطا در تشخیص پنوموکوک ۵۵ درصد تعیین شد. به‌نظر می‌رسد استفاده از دیسک‌های اپتوچین به تنهائی و عدم انجام آزمایشات تکمیلی و فقدان کنترل کیفی مناسب، علل اصلی عدم تشخیص درست پنوموکوک در ایران است. تشخیص غلط باعث اطلاعات اپیدمیولوژیک نادرست، درمان‌های غیرضروری و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری می‌شود. رعایت مسائل فوق‌الذکر و حضور یک متخصص میکروب‌شناسی در آزمایشگاه بیمارستان می‌تواند بسیار موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: استرپتوکوک پنومونی، واکنش زنجیره ای پلیمراز، فنون تشخیصی مولکولی

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه عامل طیف وسیعی از عفونت‌های ملایم مانند عفونت گوش میانی و سینوزیت و هم‌چنین عفونت‌های شدید مانند پنومونی، سپتی سمی و منتژیت به‌ویژه در بچه‌های زیر ۵ سال و افراد مسن می‌باشد [۱]. در دو دهه اخیر، بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی گسترده به‌ویژه نسبت به پنی‌سیلین و اریترومایسین به‌شدت افزایش یافته و درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را با مشکل مواجه کرده است.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۸۰۵۸۶۴۹-۰۲۱ Email: irajian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۸

Archive of SID
www.SID.ir

از این‌رو در مناطق مختلف دنیا از جمله در بسیاری از کشورهای آسیایی، مطالعات فراوانی در مورد بررسی شیوع و شناسایی بهتر خصوصیات اپیدمیولوژیک این باکتری انجام شده و با توجه به برنامه واکسیناسیون جهانی پیشنهادی توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO) علیه پنوموکوک، تعیین میزان شیوع عفونت‌های پنوموکوکی و تعیین تیپ آن‌ها لازم است [۲]. استرپتوکوکوس پنومونیه یک کوکوس گرم مثبت از خانواده استرپتوکوکاسیه و عضو گروه Smith (گروه استرپتوکوکس میتیس- استرپتوکوکوس اورالیس) از استرپتوکوک‌های گروه ویریدانس است. با توجه این که استرپتوکوکوس پنومونیه به‌عنوان فلور نرمال در ۴۰-۵ درصد افراد جامعه وجود داشته و اکثر عفونت‌های ناشی از این باکتری منشأ درونی دارد، تشخیص صحیح پنوموکوک و تمایز آن از سایر باکتری‌های مشابه موجود، در تعیین اپیدمیولوژی بالینی و بررسی روند مقاومت‌های آنتی‌بیوتیک پنوموکوک اهمیت بسیاری دارد [۳]. مهم‌ترین روش تشخیص این باکتری از سایر اعضای ویریدانس، دو تست حساسیت به اپتوچین و حلالیت در صفرا می‌باشد. در ایران به‌طور کلی میزان جداسازی و گزارش پنوموکوک کم بوده که دلیل اصلی آن می‌تواند سخت‌گیر بودن باکتری و عدم رشد در شرایط کشت غیراستاندارد از نمونه‌های بالینی می‌باشد. هم‌چنین در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، اساس تشخیص پنوموکوک، فقط بر اساس حساسیت به اپتوچین و عدم استفاده از آزمایشات تکمیلی و کنترل کیفی بوده که منجر به تشخیص نادرست این باکتری می‌گردد [۳]. هدف این مطالعه تعیین میزان صحت تشخیص استرپتوکوک پنومونیه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با روش‌های فنوتایپی و مولکولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری ایزوله: پس از مراجعه و هماهنگی با حدود ۱۵ آزمایشگاه تشخیص طبی خصوصی و بیمارستانی در تهران، از فروردین ماه ۱۳۸۹ تا خرداد ماه سال ۱۳۹۱، تعداد ۱۱۰ ایزوله بالینی که به‌عنوان استرپتوکوکوس پنومونیه تشخیص داده شدند، دریافت و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل شد.

تعیین هویت بیوشیمیایی: پس از خالص‌سازی و بررسی مرفولوژی کلنی، از کلنی‌های خالص ۲۴ ساعته رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و بررسی وجود همولیز آلفا انجام شد. در مرحله بعد بر اساس دستورالعمل CLSI با استفاده از دیسک اپتوچین ۵ میکروگرمی (Mast, United Kingdom) در محیط مولر هینتون آگار حاوی ۵درصد خون گوسفند تست حساسیت به اپتوچین انجام شده و هاله عدم رشد طبق پروتوکل CLSI تفسیر شد [۴]. در نهایت تست حلالیت در صفرا با استفاده از محلول دزوکسی کولات ۱۰درصد و به روش مستقیم روی کلنی انجام شد [۵]. در مورد ایزوله‌های غیر پنوموکوک، تعیین هویت بیوشیمیایی بر اساس تست‌های مرسوم شناسایی کوکسی‌های گرم مثبت و تشخیص باسیل‌های گرم منفی انجام شد.

تعیین هویت مولکولی: DNA ایزوله‌ها با استفاده از High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) استخراج شده و تعیین هویت مولکولی ایزوله‌ها از طریق آزمون PCR برای تشخیص ژن lytA انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده شامل 5-CGGACTACCGCCTTTATATCG و 5-GTTTCAATCGTCAAGCCGTT و اندازه محصول مورد انتظار، قطعه‌ای با وزن ۲۳۰ جفت باز بود [۶]. آزمون PCR به‌صورت اتفاقی بر روی ۱۰ ایزوله مقاوم به اپتوچین نیز انجام شد. از سویه پنوموکوک ATCC 49619 به‌عنوان کنترل کیفی در تمام مراحل کار استفاده شد. در نهایت به‌صورت رندوم چند سویه تعیین توالی شد.

نتایج

پس از تعیین هویت مجدد ایزوله‌ها بر اساس روش‌های تعیین هویت فنوتیپی و نیز مهم‌تر از آن روش مولکولی و مشاهده قطعه ۲۳۰ جفت بازی از ژن lytA، مشخص شد که

Archive of SID

www.SID.ir

۵۰ ایزوله از این تعداد واقعاً پنوموکوک بوده و در مقابل ۶۰ ایزوله دیگر پنوموکوک نبودند. ایزوله‌های پنوموکوک به‌دست آمده دارای مرفولوژی‌های کلنی متغیری از انواع کلنی‌های عادی تا انواع نافی شکل و حتی بسیار موکوئید بودند. بیش‌ترین نمونه غیرپنوموکوک را استرپتوکوک ویریدانس تشکیل می‌داد. نتایج تعیین هویت تمام ۱۱۰ ایزوله پنوموکوک در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. نتایج تعیین هویت در ۱۱۰ ایزوله پنوموکوک

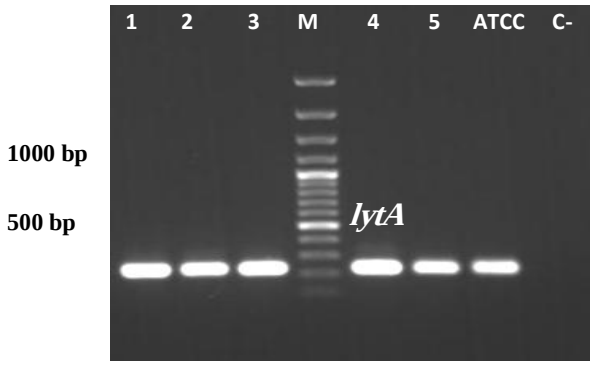
نوع ایزوله	تعداد
پنوموکوک	۵۰
استرپتوکوک ویریدانس	۵۰
استرپتوکوک گاماهمولیتیک	۷
کوکوباسیل گرم منفی	۳
مجموع	۱۱۰

ایزوله‌های به‌دست آمده مربوط به منابع بالینی متنوع و شامل انواع مهاجم و غیرمهاجم بوده که از نظر سنی، بیش‌ترین نمونه‌ها مربوط به گروه سنی اطفال و افراد سال‌خورده بود (اطلاعات نشان داده نشده). جدول ۲ توزیع فراوانی ایزوله‌های غیرپنوموکوک را بر حسب نمونه‌های بالینی نشان می‌دهد. واکنش PCR با استفاده از پرایمر ژن lytA نشان داد تمام ۵۰ ایزوله‌ای که به‌عنوان پنوموکوک شناسایی شده بودند، از نظر ژن lytA مثبت بوده و محصولی با وزن ۲۵۰ جفت باز ایجاد کردند.

جدول۲. توزیع فراوانی ایزوله های غیرپنوموکوک بر حسب نمونه‌های بالینی

نوع نمونه	تعداد موارد کاذب
خلط	۱۹
عفونت چشمی	۹
اوتیت مدیا	۵
زخم	۳
بال	۳
پلور	۲
ترشحات سینوس	۱۷
CSF	۳
تعداد کل	۶۰

همچنین برای تایید آزمون PCR، به‌صورت تصادفی ۵ محصول PCR انتخاب شده و تعیین توالی شدند که نتایج نشان داد با توالی ژن lytA مطابقت دارد. شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR چند ایزوله را در کنار سویه کنترل مثبت نشان می‌دهد. هم‌چنین ۱۰ ایزوله مقاوم به اپتوچین نیز به‌طور اتفاقی انتخاب شده و آزمون PCR شدند که نتیجه PCR ژن lytA در همه آن‌ها منفی بود.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن lytA چند ایزوله پنوموکوک در کنار کنترل مثبت و منفی (مارکر ۱۰۰ bp)

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت میزان بیماری‌ها و مرگ و میر ناشی از عفونت‌های پنوموکوک تا حدی است که طبق توصیه WHO، از سال ۲۰۰۶ واکسن پنوموکوک به برنامه دائمی ایمونیزاسیون کودکان اضافه شده و این مساله لزوم شناسایی درست و تعیین دقیق الگوی اپیدمیولوژی باکتری را آشکار می‌کند [۷]. اولین قدم، تشخیص و جداسازی صحیح پنوموکوک از نمونه‌های بالینی است. مشکل اولیه کار با پنوموکوک در ایران، تشخیص نادرست باکتری است. در این بررسی مشخص شد در تشخیص پنوموکوک ۵۵٪ خطا وجود داشته است که مستقیماً به اتکاء به نتایج آزمایش حساسیت به اپتوچین و عدم استفاده از سویه کنترل برمی‌گردد. در روش روتین، تشخیص نهایی پنوموکوک تنها بر اساس حساسیت به اپتوچین انجام می‌شود که این می‌تواند منجر به خطا در تشخیص گردد [۸]. در روش صحیح، علاوه بر این آزمایش، آزمون حلالیت در صفرا هم انجام شده و چنان‌که ایزوله در صفرا محلول باشد تست

Archive of SID
www.SID.ir

اپتوچین در شرایط بدون CO_2 انجام می‌شود که در ایران چنین عملی صورت نمی‌گیرد. به‌علاوه چون از تست حلالیت در صفرا در ایران استفاده نمی‌شود ایزوله‌های پنوموکوکی مقاوم به اپتوچین علی‌رغم گزارش از بسیاری مناطق دنیا، در ایران تشخیص داده نمی‌شود [۹]. در این مطالعه تست حلالیت در صفرا با روش مستقیم روی کلنی استفاده شد. این روش ۳۰ دقیقه طول می‌کشد و انجام آن بسیار ساده‌تر از روش لوله است. ارزش تشخیصی تست حلالیت در صفرا از حساسیت به اپتوچین بسیار بیش‌تر بوده و بر اساس آن خیلی سریع‌تر می‌توان تشخیص قطعی داد. گذشته از روش‌های بیوشیمیایی، سال‌هاست که از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR هم در تشخیص باکتری‌هایی که کشت و جداسازی آن‌ها مشکل است استفاده می‌شود [۱۰،۱۱،۱۲]. به‌نظر می‌رسد با توجه به مشکلات موجود در نمونه‌گیری و جداسازی و تشخیص بیوشیمیایی پنوموکوک، شاید بتوان در موارد ضروری از روش PCR برای تشخیص پنوموکوک استفاده کرده و از طرفی پنوموکوک‌های مقاوم به اپتوچین را هم بتوان تشخیص داد [۹]. آمار تشخیص غلط گزارش شده در این مطالعه از چند جهت مهم و نگران‌کننده است: اول این‌که بسیاری از نمونه‌ها مربوط به بیمارانی است که وقتی به اشتباه عفونت پنوموکوکی در آن‌ها تشخیص داده می‌شود تحت درمان آنتی‌بیوتیکی قرار می‌گیرند. از سویی به‌طور کلی تست‌های حساسیت به اپتوچین و حلالیت در صفرا وقتی رضایت‌بخش است که باکتری از مناطق استریل بدن جدا شود. اما اگر هدف شناسایی باکتری از نمونه‌های غیر استریل (مانند نمونه‌های تنفسی و ریسک آلودگی با استرپتوکوک ویریدانس) باشد نیاز به دقت بسیار بیش‌تری دارد [۸]. از طرفی چون پنوموکوک جزء فلور نرمال نازوفارنکس است در صورت درمان غیر ضروری، تحت فشار انتخابی و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی قرار می‌گیرد [۱۳]. این مطلب می‌تواند یکی از دلایل بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بالای پنوموکوک‌های گزارش شده در کشورمان باشد [۱۴،۱۵،۱۶].

جدا از مسایل مربوط به درمان، تشخیص غلط پنوموکوک باعث گزارش آمارهای غلط مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و الگوی اپیدمیولوژی پنوموکوک می‌شود [۸]. اطلاعات به‌دست آمده در این مطالعه به آزمایشگاه‌های مربوطه منتقل شده و تعدادی از آنان پروتوکل خود را اصلاح کردند. نتایج مطالعه نشان می‌دهد که نیاز به اجرای یک سیستم نظارتی و کنترل کیفی دقیق‌تر چه در مورد دیسک‌های تشخیصی مورد استفاده و چه از نظر سایر موارد وجود دارد. در نهایت، با توجه به مسائل ذکر شده به‌نظر می‌رسد حضور متخصصین میکروب‌شناسی پزشکی در بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه تشخیص طبی ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

به‌خاطر رعایت مسائل اخلاقی، از ذکر نام مراکزی که در جمع‌آوری ایزوله‌های مورد نظر در این مطالعه همکاری داشتند خودداری شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از تمامی این عزیزان صمیمانه سپاس‌گزاری نمایند.

منابع

[1] Obaro S, Adegbola R. The Pneumonococcus: carriage, disease, and conjugate vaccines. J Med Microbiol 2002; 51: 98-104.

[2] Song JH, Jung SI, Kwan SK, Kim NY, Son JS, Chang HC, et al. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical streptococcus pneumoniae Isolates in Asia (an ANSORP Study). Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2101-2107.

[3] Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho Mda G, Steigerwalt AG, et al. Accuracy of Phenotypic and Genotypic Testing for Identification of Streptococcus pneumoniae and Description of Streptococcus pseudopneumoniae sp. nov. J Clin Microbiol 2004; 42: 4686-4696.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010: M100-S20.

[5] Forbes AB, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th Edition. 2007.

[6] Stralin K, Korsgaard J, Olcenof P. Evaluation a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. Eur Respir J 2006; 28: 568-575.

[7] Goldblatt D, Southern J, Ashton L, Richmond P, Burbidge P, Tasevska J, et al. Immunogenicity and boosting after a reduced number of doses of a pneumococcal conjugate vaccine in infants and toddlers. Pediatr Infect Dis J 2006; 25: 312-329.

[8] Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV. Accuracy of phenotypic methods for identification of streptococcus pneumoniae isolates included in surveillance programs. J Clin Microbiol 2008; 46: 2184-2188.

[9] Verhelst R, Kaijalainen T, De Baere T, Verschraegen G, Claeys G, Simaey LV, et al. Comparison of five genotypic

Archive of SID

www.SID.ir

techniques for identification of optochin-resistant pneumococcus-like isolates. J Clin Microbiol 2003; 41: 3521-3525.

[10] Brugger SD, Hathaway LJ, Muhlemann K. Detection of streptococcus pneumoniae strain co-colonization in the nasopharynx. J Clin Microbiol 2009; 47: 1750-1756.

[11] Kearns AM, Freeman R, Murphy OM, Seiders PR. Rapid PCR-Based detection of streptococcus pneumonia DNA in cerebrospinal fluid? J Clin Microbiol 1999; 37: 3434-3438.

[12] Khoramrooz SS, Mirsalehian A, Emaneini M, Jabalameli F, Aligholi M, Saedi B, et al. Frequency of alloicoccus otitidis, streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis and Haemophilus influenzae in children with otitis media with effusion (OME) in Iranian patients. Auris Nasus Larynx 2012; 39: 369-373.

[13] Parry CM, Diep TS, Wain J, Hoa NT, Gainsborough M, Nga D, et al. Nasal carriage in Vietnamese children of Streptococcus pneumoniae resistant to multiple antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 484-488.

[14] Ahmadi A, Talebi M, Irajian GR. High prevalence of erythromycin and tetracycline resistance among clinical isolates of streptococcus pneumonia. Infect Dis Clin Pract 2013; 21: 299-301. (Persian).

[15] Kohanteb J, Sadeghi E. Penicillin-resistant streptococcus pneumonia in Iran. Med Princ Pract 2007; 16: 29-33.

[16] Oskoui M, Feizabadi MM, Amirkhani A. Drug susceptibility of streptococcus pneumoniae strains isolated in Tehran, Iran. Arch Iranian Med 2003; 6: 192-195.

Archive of SID

www.SID.ir

Koomesh Spring 2015, 16 (3):

Accuracy of detection of *Streptococcus pneumoniae* in clinical laboratories by using phenotypic and molecular methods

Ali Ahmadi (Ph.D)[1], Malihe Talebi (Ph.D)[2], Shirin Sayahfar (M.D)[3], Gholamreza Irajian (Ph.D)[*2]
1 - Applied Microbiology Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 – Dept. of Medical Bacteriology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 - AliAsghar Children Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: ; Accepted:)

Introduction: *Streptococcus pneumoniae*, is one of the most important bacterial pathogens and a member of viridians streptococci group. Accurate identification and differentiation of this form of bacteria from other relative streptococci, is the base of epidemiological study of this type of organism. The aim of this study was to evaluate the accuracy of detection of *Streptococcus pneumoniae* in clinical laboratories in Tehran, by using phenotypic and genotypic methods.

Materials and Methods: A total number of 110 isolates, identified as pneumococci by some clinical laboratories in Tehran, were collected between March 2010 to May 2012.After isolating the colonies, biochemical identification tests by optochin susceptibility (Mast) and bile solubility (direct method) methods were performed. After DNA extraction, PCR was performed to define lytA gene as a molecular identification for Streptococcus pneumonia.

***Results*:** After re-identifying the isolates, fifty of them were determined as true pneumococci, and other remaining sixty isolates were identified as: three gram negative coccobacilli, seven non alpha hemolytic streptococci, and fifty Viridans streptococci. Most of misidentifications were related to respiratory and eye infecting streptococci. Unlike non pneumococcal isolates, all 50 pneumococcal isolates were positive for lytA gene.

Conclusion: There was 55% error in detection of pneumococci in this study. The use of optochin susceptibility test as the sole detection tool and also lack of supplemental tests and proper quality controlling, are the main causes of failure in diagnosing pneumococci in Iran. Misidentifications may result in incorrect epidemiological data gathering, unnecessary treatment, and false increased antibiotic resistance reports for this organism. Regarding the high incidence of inaccuracies in defining this specific type of microorganism, we suggest the presence of a clinical microbiologist in the hospital laboratories to perform the right diagnostic tests and quality controlling would be essential.

Keywords: *Streptococcus pneumonia*, Polymerase chain reaction, Molecular diagnostic techniques

* Corresponding author. Tel: +98 21 88058649
irajian@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir