Archive of SID

Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.40; No.4; 2017

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:35 +0430 on Sunday June 25th 2017

Comparison of culture and multiplex PCR in detection of fastidious bacteria associated with otitis media among suspected patient admitted to Amir-Alam Hospital

Tina Delsouz Bahri[1], Mehdi Goudarzi[1], Sasan Dabiri Satri[2], Nasrin Ebrahimi[1], Arezoo Asadi[1], Seyed Mohammad Ghafoori[3], Hamid Reza Houri[1], Hossein Goudarzi[1*]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Ear, Nose and Throat Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Islamic Azad University, Tehran Medical Branch

(Received:2015/01/28 Accept:2016/12/31)

Abstract

Background: *Otitis media (OM) is a common disease among children. Various factors, including bacteria and viruses are the cause of OM. The most common bacterial pathogens that can cause OM are Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis and Streptococcus pyogenes. Recently, Alloiococcus otitidis is known as one of the causes of OM. For some reasons such as fastidious growth and difficulty in sampling, few studies have been completed on this bacterium. The aim of this study was comparison of culture and multiplex PCR in detection of fastidious bacterial pathogens associated with otitis media.*

Material & Methods: *In this descriptive studies, during a period of 5 month from March 2013 to July 2014, 50 middle ear discharge specimens were collected from patients suspected with otitis media in Amir-Alam Hospital. Samples were assessed by culture and multiplex PCR method.*

Results: *In the study, 3 strains of Alloiococcus otitidis (6%), 3 strains of Haemophilus influenzae (6%) and 1 strain of Moraxella catarrhalis (2%) were isolated by culture. Also, by multiplex PCR method 25 Alloiococcus otitidis (50%), 28 Haemophilus influenzae (56%) and 11 Moraxella catarrhalis (22%) were detected in the samples.*

Conclusion: *Identifying fastidious bacteria with culture method is difficult, but multiplex PCR method is more accurate, faster and more sensitive of culture method and biochemical tests and can be done quickly.*

Keywords: *Otitis media, Alloiococcus otitidis, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Multiplex PCR*

* *Corresponding author: Hossein Goudarzi*
E-mail: hgod100@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۰، شماره ٤، ۱۳۹۵، صفحات ۱۹۲ تا ۱۹۶

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:35 +0430 on Sunday June 25th 2017

مقایسه روش کشت و Multiplex PCR در تشخیص باکتری‌های سخت رشد در بیماران مبتلا به عفونت گوش میانی مراجعه کننده به بیمارستان امیر اعلم تهران

تینا دلسوزبحری[۱]، مهدی گودرزی[۱]، ساسان دبیری سطری[۲]، نسرین ابراهیمی[۱]، آرزو اسدی[۱]،
سید محمد غفوری[۳]، حمیدرضا حوری[۱]، حسین گودرزی*[۱]

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- مرکز تحقیقات گوش و حلق و بینی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۸ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۵/۱۰/۱۱

چکیده:

سابقه وهدف: عفونت گوش میانی یکی از بیماری‌های شایع در میان کودکان است. عوامل مختلفی از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها از عوامل ابتلا به عفونت گوش میانی هستند. به تازگی آلویوکوکوس اوتیتیدیس به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده این عارضه شناخته شده است. به عللی مانند سخت رشد بودن و دشواری نمونه‌گیری، مطالعه‌های محدودی روی این باکتری انجام گرفته است. هدف از مطالعه حاضر مقایسه دو روش کشت و *Multiplex PCR* برای تشخیص باکتری‌های سخت رشد ایجادکننده عفونت گوش میانی بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع توصیفی به مدت ۵ ماه از اسفند ماه سال ۱۳۹۲ تا تیر ماه سال ۱۳۹۳ و روی ۵۰ بیمار مبتلا به عفونت گوش میانی مراجعه‌کننده به بیمارستان امیراعلم تهران انجام شد. نمونه‌های اخذ شده به وسیله روش‌های کشت و *Multiplex PCR* برای یافتن باکتری‌های سخت رشد بررسی شدند و با آزمون کای دو مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: به استفاده از روش کشت، تعداد ۳ ایزوله (۶درصد) آلویوکوکوس اوتیتیدیس، ۳ ایزوله (۶درصد) هموفیلوس آنفلوآنزا و یک ایزوله (۲درصد) موراکسلا کاتارالیس جداسازی شد اما به وسیله تکنیک *Multiplex PCR*، ۲۵ مورد آلویوکوکوس اوتیتیدیس (۵۰درصد)، ۲۸ مورد هموفیلوس آنفلوآنزا(۵۶درصد) و ۱۱ مورد موراکسلا کاتارالیس (۲۲درصد) در نمونه‌ها شناسایی شد.*(p<0/05)*

نتیجه‌گیری: شناسایی باکتری‌های سخت رشد به روش کشت بسیار دشوار است اما روش *Multiplex PCR* به مراتب از روش‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی دقیق‌تر، سریع‌تر و حساس‌تر است و می‌توان در زمان کوتاهی این باکتری ها را شناسایی کرد.

واژگان کلیدی: عفونت گوش میانی، آلویوکوکوس اوتیتیدیس، هموفیلوس آنفلوآنزا، موراکسلا کاتارالیس، *Multiplex PCR*

مقدمه:

عفونت گوش میانی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دوران کودکی و یکی از دلایل اصلی مراجعه کودکان زیر سه سال برای بازدید از سوی پزشک عمومی است(۱). عفونت گوش میانی (Otitis Media) یک واژه کلی برای بیان عفونت‌های با عوارض مختلف در ناحیه گوش میانی است. عفونت‌های گوش میانی به شکل استاندارد در سه دسته طبقه‌بندی شده‌اند: عفونت گوش میانی حاد Acute Otitis Media که با ترشح و التهاب گوش میانی و نیز علایمی مانند درد، ترشح، تب و تحریک‌پذیری گوش همراه است. عفونت گوش میانی همراه با ترشح (Otitis Media with Effusion) که فاقد علایم عفونت حاد است اما با ترشح مایعات از گوش میانی همراه است. عفونت مزمن چرکی گوش میانی (Chronic Suppurative Otitis Media) یک نوع التهاب مزمن گوش میانی است که در آن پرده گوش آسیب دیده و از آن ناحیه خروج چرک مشاهده می‌شود و اگر ترشحات گوش برای مدت حداقل ۳ تا ۶ هفته ادامه یابد به این بیماری عفونت مزمن چرکی گوش اطلاق می‌شود(۲). به طور تقریبی ۶۵ تا ۷۰ درصد کودکان تا سن ۲ سالگی حداقل یک حمله اوتیت میانی حاد را تجربه می کنند و همچنین نیمی از کودکان تا سن ۳ سالگی حداقل ۲ بار یا بیشتر دچار حمله اوتیت میانی حاد می شوند و این بیماری یکی از علل مهم تجویز آنتی بیوتیک در کودکان است(۳, ۴). نتایج مطالعه‌های انجام شده علاوه بر عوامل میکروبی مانند باکتری ها و ویروس‌ها، عواملی مانند آناتومیک (اختلال عملکرد شیپور استاش)، ویژگی‌های فردی (مثل سن، زمینه ژنتیکی، آلرژی تنفسی)، عوامل مرتبط با اختلال‌ها و

نویسنده مسئول: حسین گودرزی
پست الکترونیک: *hgod100@yahoo.com*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:35 +0430 on Sunday June 25th 2017

نقص‌های ایمونولوژیک و خطر های محیطی (مانند حضور افراد سیگاری در خانه و فصول سال و...) را عوامل افزایش خطر ابتلا به عفونت گوش میانی بیان می‌کنند. سیستم ایمنی نابالغ و شیپور استاش کوتاه در نوزادان و کودکان آن‌ها را برای ابتلا به عفونت گوش میانی مستعدتر می‌کند(۵).

سه باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس پنومونیه (۲۵–۵۰درصد)، هموفیلوس آنفلوآنزای غیر قابل تقسیم‌بندی (۱۵–۳۰درصد) و موراکسلا کاتارالیس (۳–۲۰درصد) از مهم‌ترین علل اوتیت میانی هستند(۴, ۶, ۷). موراکسلا کاتارالیس، هموفیلوس آنفلوآنزا و آلویوکوکوس اوتیتیدیس از باکتری‌های سخت رشد ایجادکننده اوتیت میانی شناخته می‌شوند. باکتری سخت رشد به باکتری‌هایی اطلاق می‌شود که نیازهای تغذیه پیچیده‌ای داشته باشد. یک باکتری سخت رشد تنها زمانی رشد می‌کند که مواد مورد نیاز در درون محیط آن موجود باشد(۸–۱۰). بررسی مطالعه‌های پیشین نشان‌دهنده تفاوت بالا در آمار به دست آمده از فراوانی این سه باکتری در نمونه‌های اوتیت میانی به وسیله روش کشت و روش مولکولی است. ضرورت شناسایی به موقع عوامل ایجادکننده بیماری و همچنین عوامل مستعد کننده کودکان به ایجاد عفونت گوش میانی دانشمندان را بر آن داشت تا با استفاده از روش‌های دقیق‌تر، سریع‌تر و حساس‌تر مانند روش‌های مولکولی به بررسی باکتری‌های بیماری‌زا در هنگام بیماری و قبل از آن بپردازند. هدف از مطالعه حاضر بررسی و مقایسه روش‌های کشت و Multiplex PCR برای تشخیص باکتری‌های آلویوکوکوس اوتیتیدیس، موراکسلا کاتارالیس و هموفیلوس آنفلوآنزا به عنوان سه پاتوژن سخت رشد ایجاد کننده اوتیت میانی است.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌گیری:

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی است که در یک دوره ۵ ماهه از اسفند ماه سال ۱۳۹۲ تاتیر ماه سال ۱۳۹۳ به طول انجامید. این مطالعه روی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان گوش، حلق و بینی امیر اعلم تهران انجام شد. از میان این مراجعان ۵۰ نمونه از افرادی که اوتیت میانی با ترشحات (OME) آن‌ها به تایید پزشک متخصص رسیده بود، نمونه‌گیری شد. پیش از نمونه‌گیری، بیماران مطلع و رضایت آن‌ها اخذ شد و سن، جنس و تاریخ مراجعه بیمار یادداشت شد. پیش از روند عمل جراحی و جمع‌آوری نمونه، کانال گوش خارجی به وسیله بتادین به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی و سپس سه مرتبه با سالین نرمال استریل شستوشو داده شد. نمونه‌ها با دستگاه کالکتور گوش در هنگام عمل جراحی از بیمار اخذ شد. هنگام عمل جراحی و پس از ایجاد سوراخ کوچکی در پرده صماخ توسط جراح، در صورت وجود مایع در گوش میانی، نمونه توسط کالکتور اخذ شده و وارد محفظه پلاستیکی دستگاه شد. نمونه ها توسط محیط انتقالی استوارت (شرکت HI-Media) و در کمتر از دو ساعت به بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی شهید بهشتی منتقل شدند و نیمی از نمونه برای کشت استفاده و نیمی دیگر برای انجام آزمایش های مولکولی در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۱, ۱۲).

جدول : پرایمرهای مورد استفاده (۱۵)

پاتوژن	توالی پرایمر(۳'→۵')	طول قطعه (bp)
A.otitidis (Fw)	GGG GAA GAA CAC GGA TAG GA	۲۶۲
M.catarrhalis (Fw)	CCC ATA AGC CCT GAC GTT AC	۲۳۵
H.influenzae (Fw)	CGT ATT ATC GGA AGA TGA AAG TGC	۵۲۳
Universal (Rw)	CTA CGC ATT TCA CCG CTA CAC	-------

جدول : مقدار مواد در هر میکروتیوب واکنش

مواد	شرکت سازنده	حجم (میکرو لیتر)	غلظت
آب مقطر	Sigma Aldrich	۱۶	-
پرایمر A.otitidis (Fw)	Random Hexamer	۱	۱۰ picomol
پرایمر M.catarrhalis (Fw)	Random Hexamer	۱	۱۰ picomol
پرایمر H.influenzae (Fw)	Random Hexamer	۱	۱۰ picomol
پرایمر مشترک (Rw)	Random Hexamer	۳	۱۰ picomol
مستر میکس	Master Mix Red	۲۵	۱,۵ unit
الگو DNA	-	۳	۲۰ ng
حجم کل	-	۵۰	

جدول : سیکل دمایی واکنش PCR

تعداد سیکل	مرحله	دما(°C)	زمان
۱	دناتوراسیون اولیه	۹۵	۶ (min)
۴۰	دناتوراسیون	۹۵	۳۰ (S)
	اتصال	۵۸	۴۵ (s)
	طویل سازی	۷۲	۱ (min)
۱	طویل سازی نهایی	۷۲	۸ (min)

کشت و شناسایی باکتری‌ها:

نمونه‌ها روی محیط شکلات آگار و بلاد آگار (شرکت Sigma Aldrich) حاوی ۵درصد خون گوسفند غنی شده با فاکتورهای X و V به روش کشت خطی کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در صورت مشاهده کلنی‌های مشکوک به هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه برای تعیین مورفولوژی ارگانیسم، رنگ آمیزی گرم انجام شد و برای تشخیص قطعی تست‌های افتراقی شامل آزمون کاتالاز، اکسیداز، DNase، تولید اسید از گلیسرول، تولید اسید از مانیتول و تولید اسید از گلوکز انجام شد و در خیر این صورت برای مدت ۱۴ روز برای مشاهده احتمالی کلنی باکتری‌های مورد نظر انکوباسیون ادامه یافت(۱۲–۱۴).

آزمون Multiplex PCR :

استخراج DNA از سویه‌های ایزوله به روش تخلیص DNA با فنول–کلروفرم انجام شد(۱۲). برای انجام واکنش PCR از سویه‌های آلویوکوکوس اوتیتیدیس ATCC ۵۱۲۶۷، موراکسلا کاتارالیس ATCC ۸۱۷۶ و هموفیلوس آنفلوآنزا ATCC ۱۰۲۱۱ تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی تهران به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

پرایمرهای مورد استفاده در جدول زیر ارائه شده است و محلول‌های واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر آماده‌سازی شدند. دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient – eppendorf) مطابق با جدول شماره ۳ به منظور تکثیر ژن‌ها تنظیم شد. برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد و بافر TBE 1X استفاده شد. ۵ میکرولیتر از هر محصول PCR درون چاهک‌های ژل قرار گرفت. برای الکتروفورز از ولتاژ ۱۰۰ میلی‌ولت به مدت یک ساعت استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز، مشاهده و عکسبرداری از باندها با استفاده از دستگاه ژل داک انجام شد(۱۵). برای بررسی‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و از آزمون کای دوبا سطح معناداری P<0/001 استفاده شد. برای رسم جدول‌ها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج:

در طول مدت ۵ ماه مطالعه ۵۰ نمونه ترشح اوتیت میانی جمع‌آوری شد. تمام نمونه‌ها از بیماران مراجعه‌کننده به بخش گوش و حلق و بینی بیمارستان امیر اعلم که بیماری آن‌ها به تایید پزشک متخصص رسیده بود، اخذ شد.

میزان شناسایی باکتری‌های سخت رشد در روش‌های کشت و PCR با آزمون کای دو مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

www.SID.ir

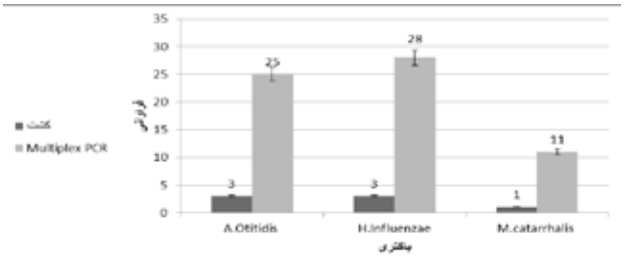
Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:35 +0430 on Sunday June 25th 2017

از ۵۰ بیمار که از آن‌ها نمونه‌گیری شده بود ۲۹ (۵۸درصد) نفر زن و ۲۱ (۴۲درصد) نفر مرد بودند. بیشترین بیماران مبتلا به اوتیت میانی در بازه سنی ۷ تا۱۸ سال و سپس ۲ تا ۷ سال قرار داشتند.

در مطالعه حاضر به وسیله روش کشت از نمونه‌ها تعداد ۳ ایزوله آلویوکوکوس اوتیتیدیس (۶درصد)، ۳ ایزوله هموفیلوس آنفلوآنزا (۶درصد) و یک ایزوله موراکسلا کاتارالیس (۲درصد) جداسازی شد. تمامی سویه‌های جداسازی شده به وسیله روش کشت توسط آزمون PCR تایید شدند. به وسیله تکنیک Multiplex PCR، ۲۵ مورد آلویوکوکوس اوتیتیدیس (۵۰درصد)، ۲۸ مورد هموفیلوس آنفلوآنزا (۵۶درصد) و ۱۱ مورد موراکسلا کاتارالیس (۲۲درصد) در نمونه‌ها شناسایی شد. لازم به توضیح است که ۱۲درصد از نمونه‌ها به صورت همزمان دارای هر سه باکتری بودند. نمودار شماره ۱ میزان شناسایی سه باکتری مورد مطالعه را در روش‌های کشت و Multiplex PCR نشان می‌دهد.

بحث:



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان جداسازی سه باکتری مورد مطالعه با دو روش کشت و Multiplex PCR

تصویر شماره ۱: تصویر الکتروفورز ژن‌های تکثیر شده روی ژل آگارز
M: مارکر ۱۰۰ BP،۱و۲و۳ کنترل‌های مثبت،N : کنترل منفی، ۵: نمونه‌های مثبت بیماران

تحقیق نشان داد که میزان رشد و تشخیص باکتری‌های سخت رشد در روش‌های بررسی شده اختلاف معنادار داشته‌اند($p<0/05$). به وسیله روش کشت ۳ ایزوله (۶درصد) آلویوکوکوس اوتیتیدیس، ۳ ایزوله (۶درصد) هموفیلوس آنفلوآنزا و یک ایزوله (۲درصد) موراکسلا کاتارالیس جداسازی شد. بیشترین باکتری شناسایی شده در این مطالعه به وسیله PCR هموفیلوس آنفلوآنزا با ۲۸ ایزوله (۵۶درصد) و سپس آلویوکوکوس اوتیتیدیس با ۲۵ مورد (۵۰درصد) و تعداد موارد شناسایی شده موراکسلا کاتارالیس ۱۱ مورد (۲۲درصد) بود. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که روش Multiplex PCR روشی دقیق‌تر و حساس‌تر برای شناسایی باکتری‌های مورد مطالعه است.

درصد فراوانی زنان و مردانی که نمونه‌گیری از آن‌ها انجام شده بود به ترتیب ۵۸درصد و ۴۲درصد بود که فراوانی دو جنس به طور تقریبی یکسان است و اختلاف معناداری بین درصد فراوانی زنان و مردان مشاهده نمی‌شود. در میان ۵۰ بیمار که نمونه‌گیری از آن‌ها انجام شد ۳۱ نفر (۶۲درصد) در بازه سنی ۷ تا ۱۸ سال و ۱۶ نفر (۳۲درصد) در بازه سنی ۲ تا ۷ سال قرار داشتند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تعداد بالایی از بیماران مبتلا به اوتیت میانی کودک و نوجوان بودند.

عفونت گوش میانی یکی از بیماری‌های شایع به ویژه در دوران کودکی است. درصد مرگ و میر ایجاد شده توسط این بیماری پایین است، اما شیوع بالا و هزینه‌های درمانی که جوامع متحمل آن می‌شوند باعث شده است که دانشمندان به دنبال یافتن راه کارهایی برای پیشگیری و درمان موثر این بیماری باشند.

میزان بالای تشخیص این سه باکتری به وسیله روش‌های مولکولی نسبت به روش کشت در مطالعه سایر محققان نیز مشاهده می‌شود. در مطالعه Gharibpour و همکارانش در سال ۲۰۱۳ میزان جداسازی ایزوله‌های آلویوکوکوس اوتیتیدیس توسط کشت ۲۳/۷درصد و توسط PCR ۴۰درصد گزارش شد(۱۶). همچنین در مطالعه Leskinen و همکارانش، جداسازی موراکسلا کاتارالیس و هموفیلوس آنفلوآنزا به ترتیب ۷درصد و ۱۵درصد گزارش شد و در این مطالعه بیان شد که با کشت موفق به جداسازی آلویوکوکوس نشده‌اند اما با روش Multiplex PCR میزان شناسایی این سه باکتری به ترتیب ۶۳درصد، ۳۳درصد و ۲۰درصد گزارش کردند(۹).Kaur و همکاران نیز مطالعه‌ای روی نمونه‌های اوتیت میانی کودکانی که نتیجه کشت آن‌ها منفی شده بود، انجام دادند. آن‌ها این نمونه‌ها را با روش Multiplex PCR بررسی کردند و مشخص شد که در ۴۹ نمونه ۱۰ مورد (۲۰/۴درصد) آلویوکوکوس اوتیتیدیس، ۴ مورد (۸/۱۶درصد) موراکسلا کاتارالیس و ۸ مورد (۱۶/۳۲درصد) هموفیلوس آنفلوآنزا مشاهده شد(۱۲). در مطالعه Farajzadah و همکارانش که در ایران انجام دادند، به وسیله روش کشت باکتری‌های آلویوکوکوس اتیتیدیس، موراکسلا کاتارالیس و استرپتوکوکوس پنمونیه به ترتیب در ۱،۴، ۲،۹ و ۴،۳ درصد از نمونه‌ها شناسایی شدند. همچنین به وسیله روش کشت باکتری هموفیلوس آنفلوآنزا جداسازی نشد. به وسیله روش PCR، بیشترین باکتری شناسایی شده آلویوکوکوس اتیتیدیس با ۲۵درصد فراوانی بود و پس از استرپتوکوکوس پنمونیه و هموفیلوس آنفلوآنزا با۲۰درصد و موراکسلا کاتارالیس با ۱۲درصد قرار داشتند(۱۷). همچنین در مطالعه Aly و همکارانش به وسیله باکتری‌های جداسازی شده به وسیله کشت به ترتیب برای استرپتوکوکوس پنمونیه و موراکسلا کاتارالیس ۱۰ و ۱۲ درصد بود اما با روش PCR میزان جداسازی این دو باکتری ۳۶ و ۴۴ درصد بود(۱۸). از بررسی نتایج مطالعه‌های ذکر شده و نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که روش‌های مولکولی به مراتب از روش‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی دقیق‌تر، سریع‌تر و حساس‌تر هستند و می‌توان در زمان کوتاهی پاتوژن‌های مهاجم را به وسیله این روش‌ها شناسایی کرد.

با در نظر گرفتن آمار گزارش شده از شیوع آلویوکوکوس اوتیتیدیس، موراکسلا کاتارالیس و هموفیلوس آنفلوآنزا به وسیله روش مولکولی PCR به عنوان روش دقیق‌تر و حساس‌تر در مطالعه‌های انجام شده در ایران و سایر کشورها مشاهده می‌شود که شیوع آلویوکوکوس اوتیتیدیس گزارش شده در مطالعه حاضر بیش از مطالعه‌های مشابه در سوئد (۱۹/۲درصد) و فنلاند (۲۰/۳۲درصد) بود(۷, ۱۴) اما با مطالعه‌های انجام شده در ایران (۴۰درصد) و استرالیا (۴۰درصد) مشابهت داشت(۱۵, ۱۶). به نظر می‌رسد شیوع این باکتری ارتباط مستقیمی با سطح توسعه یافتگی کشورها در بهداشت عمومی دارد.

فراوانی گزارش شده از هموفیلوس آنفلوآنزا در این مطالعه بالاتر از کشورهای سوئد (۳۲/۹درصد)، آمریکا (۲۱/۴درصد)، فنلاند (۱۶/۴درصد)، استرالیا (۴درصد)، اسرائیل (۳۷/۹درصد) بود(۹, ۱۵, ۱۹, ۲۰) اما از آمار گزارش شده Shishegar و همکارانش در شیراز (۹۵/۲درصد) پایین‌تر بود(۲۱). آمار بالای شیوع هموفیلوس آنفلوآنزا در ایران ممکن است به علت عدم استفاده از واکسیناسیون افراد در برابر این بیماری باشد.

فراوانی موراکسلا کاتارالیس گزارش شده در این مطالعه در مقایسه با گزارش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:35 +0430 on Sunday June 25th 2017

محققان از کشورهای آمریکا (۷/۱درصد)، اسرائیل (۲/۱درصد)، فنلاند (۶/۵درصد) و ایران (۱۶/۶درصد) بیشتر بود (۲۲-۲۴) اما از مطالعه‌های انجام شده در سوئد (۵۳/۴درصد) و مطالعه دیگری در فنلاند (۲۷/۱درصد) پایین‌تر بود(۹, ۱۵). به نظر می‌رسد فراوانی گزارش شده از موراکسلا کاتارالیس در مطالعه‌های مختلف مربوط به تفاوت‌های منطقه‌ای کشورهای مذکور و نقش آن در میزان شناسایی و تعیین میزان شیوع باکتری مورد بحث است.

با بررسی مطالعه حاضر و مطالعه‌های سایر محققان می‌توان نتیجه گرفت که سه گونه آلویوکوکوس اوتیتیدیس، موراکسلا کاتارالیس و هموفیلوس آنفلوآنزا نقش مهمی در ایجاد انواع عفونت‌های گوش میانی دارند اما به دلیل نیازهای غذایی پیچیده و رشد آهسته در کشت‌های معمول انجام شده روی نمونه‌های گوش میانی قابل شناسایی و جداسازی نیستند و به عنوان عوامل مهم بیماری‌زایی در بیماران مورد غفلت قرار می‌گیرند. به نظر می‌رسد با برنامه‌های کنترل بهداشتی در سنین پایین مانند انجام واکسیناسیون در برابر هموفیلوس آنفلوآنزا می‌توان باعث کاهش ایجاد اوتیت میانی در کودکان شد.

در نهایت پیشنهاد می‌شود که روش مولکولی Multiplex PCR به عنوان یک روش سریع، دقیق و ارزان که تواما توانایی شناسایی چند گونه پاتوژن را دارا است برای جست‌وجوی باکتری‌های سخت رشد در بیماران برای اتخاذ راهکارهای درمانی مناسب به کار گرفته شود.

منابع:

1. Berman S. Otitis media in developing countries. Pediatrics. 1995;96:126-31.
2. Bluestone CD, Gates GA, Klein JO, al. e. Recent advances in otitis media. 1. Definitions, terminology, and classification of otitis media. Ann Otol Rhinol Aryngol Suppl. 2002;188:8-18.
3. Behrman RE, Kliegman R, Jenson HB. Nelson textbook of pediatrics. 17th ed: New York: Saunders; 2004.
4. Kliegman R, Behrman RE, Nelson WE, Jenson HB, Stanton BF. Nelson textbook of pediatrics. 18th ed: Philadelphia: Saunders; 2007.
5. Cripps AW, Otczyk DC, Kyd JM. Bacterial otitis media: a vaccine preventable disease. Vaccine. 2005;23:2034-310.
6. Klein J. Otitis media. Clin Infect Dis. 1994;19:823-33.
7. Marcdante KJ, Kliegman RM, Jenson HB, Behrman RE. Nelson essentials of pediatrics. 6th ed: Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2010.
8. Jordens JZ, Slack MPE. Haemophilus influenzae: Then and Now. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1995;14:935-48.
9. Leskinen K, Hendolin P, Virolainen Julkunen A, Ylikoski J, Jero J. The clinical role of Alloiococcus otitidis in otitis media with effusion. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2002;66(1):41-8.
10. Murphy TF, Parameswaran GI. Moraxella catarrhalis, a Human Respiratory Tract Pathogen. CLINICAL PRACTICE. 2009;49:124-31.
11. Virolainen A, Salo P, Jero J, Karma P, Eskola J, Leinonen M. Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting Streptococcus pneumoniae in middle ear fluid of children with acute otitis media. J Clin Microbiol. 1994;32(11):2667.
12. Kaur R, G. Adlowitz, D., R. Casey, J., Zeng, M.,E. Pichichero, M. Simultaneous Assay for Four Bacterial Species Including Alloiococcus otitidis Using Multiplex-PCR in Children With Culture Negative Acute Otitis Media. Pediatr Infect Dis. 2010;29(8):741-5.
13. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae. Clinical microbiology reviews. 2007;20(2):368-89.
14. Winstanley TG, Spencer RC. Moraxea catarrkar: antibiotic susceptibility with special reference to trimethoprim. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1986;18(3):425-6.
15. Hendolin PH, Paulin L, Ylikoski J. Clinically Applicable Multiplex PCR for Four Middle Ear Pathogens. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2000;28(1):125-32.
16. Gharibpour F, Khoramrooz SS, Mirsalehian A, Emaneini M, Jabalameli F, Darban-Sarokhalil D, et al. Isolation and Detection of Alloiococcus Otitidis in Children with Otitis Media with Effusion Using Culture and PCR Methods. J Mazand Univ Med Sci. 2013;23(100):52-60.
17. Farajzadah Sheikh A, Saki N, Roointan M, Ranjbar R, Yadyad MJ, Kaydani A, et al. Identification of Alloiococcus otitidis, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis and Haemophilus influenzae in Children With Otitis Media With Effusion. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(3):e17985.
18. Aly BH, Hamad MS, Mohey M, Amen S. Polymerase Chain Reaction (PCR) Versus Bacterial Culture in Detection of Organisms in Otitis Media with Effusion (OME) in Children. Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery. 2012;64(1):51-5.
19. Broides A, Dagan, R., Greenberg, D., Givon-Lavi, N., Leibovitz, E. Acute Otitis Media Caused by Moraxella catarrhalis: Epidemiologic and Clinical Characteristics. Clinical Infectious Diseases. 2009;49:1641-7.
20. Brook I, Yocum, P., Shah, K. Aerobic and Anaerobic Bacteriology of Concurrent Chronic Otitis Media With Effusion and Chronic Sinusitis in Children. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2000;126:174-6.
21. Shishegar M, Faramarzi, A., Kazemi, T., Bayat, A., Motamedifar, M. Polymerase Chain Reaction, Bacteriologic Detection and Antibiogram of Bacteria Isolated from Otitis Media with Effusion in Children, Shiraz, Iran. Iran J Med Sci. 2011;36(4):273-80.
22. Edwards KJ, Schwingel JM, Datta AK. Campagnari AA. Multiplex PCR assay that identifies the major lipooligosaccharide serotype expressed by Moraxella catarrhalis clinical isolates. J Clin Microbiol. 2005;43:6139-43.
23. Kuhnert P, Christensen H. Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects: Caister Academic Press; 2008.
24. Verhaegh SJ, Streefland A, Dewnarain JK, Farrell DJ, van Belkum A, Hays JP. Age-related genotypic and phenotypic differences in Moraxella catarrhalis isolates from children and adults presenting with respiratory disease in 2001-2002. Microbiology. 2008;154(Pt 4):1178-84.

www.SID.ir