ارزیابی آزمون های بیوشیمیایی در تشخیص استرپتوکوک پیوژنز

*[1]دکتر زهرا اسلامی نژاد، [2]دکتر باقر بحرینی، [3]دکتر محمد حسین داعی پاریزی، [4]دکتر نیکو نیک نفس

چکیده

هدف

استرپتوکوک پیوژنز یکی از مهاجم ترین پاتوژن ها است. کشت میکروبی کماکان متداول ترین روش تشخیص آزمایشگاهی این باکتری محسوب می شود. کارکنان آزمایشگاه های بالینی، برحسب تسهیلاتی که در اختیاردارند از روش های تشخیصی متفاوتی در این زمینه استفاده می نمایند. در این مطالعه معمول ترین روش ها مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفته اند.

مواد و روش کار

۱۵۹ سویه استرپتوکوک بتاهمولیتیک، جمع آوری شده از کانون های عفونی متفاوت، از نظر توان و شدت همولیز، حساسیت به باسی تراسین (BC)، حساسیت به کوتریموکسازول (SXT)، آزمون ووگس پروسکوئر (VP) مورد بررسی قرار گرفتند. بر پایه آزمون پیرولیدونیل- بتا -- نفتیل آمید(PYR)، ارزش پیشگویی مثبت، منفی و حساسیت هر یک از آزمون های فوق محاسبه گردید.

نتایج

ارزش پیشگویی مثبت، منفی و حساسیت همولیز استرپتوکوک پیوژنز در محیط کشت حاوی خون گوسفند به ترتیب ۷۵، ۸۹ و ۸۹ درصد و در محیط کشت حاوی خون انسان ۷۶، ۸۹ و ۵۳ درصد بود. در مورد آزمون BC، معیارهای مذکور به ترتیب ۵۲، ۷۰ و ۸۹ درصد، آزمون VP ۵۷، ۸۹ و ۹۴ درصد و در نهایت آزمون SXT با ۴۹، ۴۷ و ۶۳ درصد، کمترین ارزش کاربردی را در تشخیص آزمایشگاهی استرپتوکوک پیوژنز نشان داد.

نتیجه گیری

آزمون PYR مستدل ترین روش تشخیصی استرپتوکوک پیوژنز در میان استرپتوکوک های بتا همولیتیک است. در صورتی که امکان استفاده از این آزمون نباشد، مجموع دو مشخصه همولیز با قطر ≥ 3 mm به اضافه حساسیت به باسی تراسین با قطر ≥ 10 mm با احتمال ۸۹٪ ارزش تشخیصی دارد. فعالیت همولیتیک این باکتری در محیط کشت حاوی خون انسان، مستدل و معادل همولیز قوی در محیط کشت حاوی خون گوسفند به دست آمد. نتیجه مثبت آزمونVP با احتمال ۸۹٪ در رد این باکتری مناسب تشخیص داده شد. اما استفاده از آزمون SXT در زمینه تشخیص استرپتوکوک پیوژنز ارزش محدودی نشان داد.

کلمات کلیدی: استرپتوکوک پیوژنز، تشخیص آزمایشگاهی، همولیز، باسیتراسین، کوتریموکسازول، ووگس پروسکوئر.

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۱۶۶۵، z_eslaminejad@kmu.ac.ir

۲- پزشک متخصص گوش، حلق و بینی

۳- استاد گروه کودکان، مرکز آموزشی درمانی افضلی پور کرمان

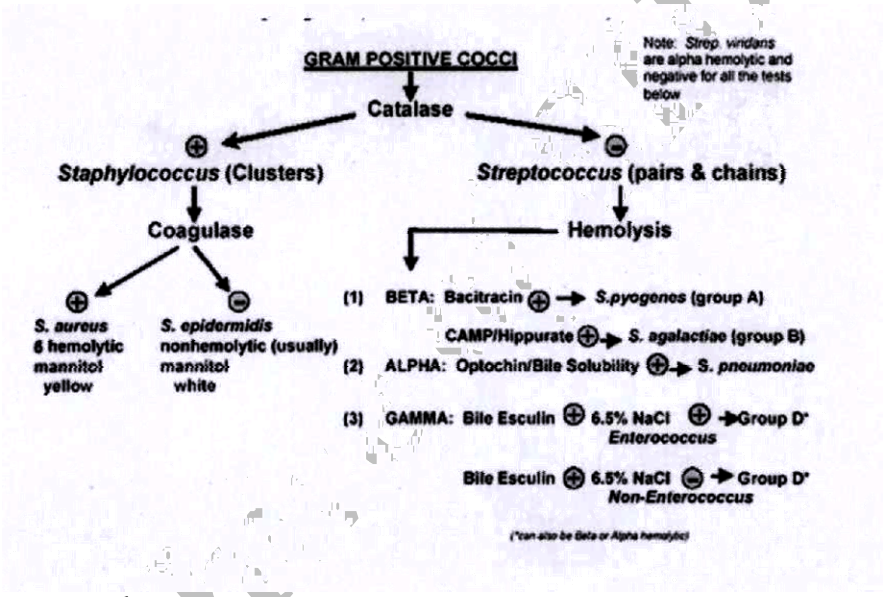
٤- دستیار تخصصی گروه کودکان، مرکز آموزشی درمانی افضلی پور

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

به دلیل دارا بودن فاکتور های متعددی که می تواند در ویرولان باکتری دخالت داشته باشد، استرپتوکوک پیوژنز یکی از مهاجم ترین پاتوژن ها محسوب می گردد(۱). در دهه گذشته به دلایل ناشناخته عفونت های ناشی از این باکتری افزایش یافته است (۲). در راه تشخیص آزمایشگاهی این باکتری، کشت میکروبی همچنان به عنوان " استاندارد طلایی" تلقی می شود (۳) اما بررسی و تفکیک استرپتوکوک ها از ابتدا (۴) تاکنون (۵، ۶) با پیچیدگی هایی همراه بوده است. تشخیص آزمایشگاهی استرپتوکوک پیوژنز و سایر استرپتوکوک هایی که از نظر بالینی مهم هستند، به صورت سنتی بر اساس نمودار زیرصورت می گیرد. در سال های اخیر آزمایش های دیگری به این روش ها اضافه گردیده است (۷، ۸). کارکنان آزمایشگاههای بالینی بر اساس تسهیلاتی که در دسترس دارند، از روش های متفاوتی در این زمینه استفاده می نمایند. در مطالعه حاضر این روش ها مورد ارزیابی آماری قرار گرفته اند.



مواد و روش ها

سویه های باکتری: مجموعا ۱۵۹ استرپتوکوک بتا همولیتیک شامل ۱۵۲ سویه جدا شده از ۶۲۵ نمونه ترشحات حلق بیماران بزرگسال و خردسال با علائم بالینی فارنژیت به اضافه ۱ سویه از مایع مفصل، ۱ سویه از کشت خون، ۳ سویه از کانون های عفونی دندان و ۲ سویه M۱ و M۳ استرپتوکوک پیوژنز، اهدایی از انستیتو پاستور ایران مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمایش های تشخیصی: کشت اولیه در محیط کشت پایه (مرک- آلمان) حاوی خون گوسفند (sheep blood agar) SBA انجام شد (۹). تکرار کشت در همان محیط کشت پایه با خون انسان (banked human blood) BHB صورت پذیرفت. کشت نمونه ها به روش گستردگی در سطح و خنجری(stab) (۹) انجام شد. محیط های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد (۱۰-۵٪ CO2) نگهداری گردید(۷، ۸، ۹، ۱۰). کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی، به صورت زنجیره های کوتاه یا بلند با هر اندازه همولیز نوع بتا که در محیط کشت SBA ظاهر شده بودند مورد ارزیابی مرحله بعد قرار گرفتند.

جهت انجام آزمون های حساسیت به باسی تراسین BC ۲-۱ پرگنه کشت خالص شده بر روی محیط کشت SBA گسترده شد و دیسک های ۰/۰۴ واحدی BC (پاد تن طب- ایران)، با روش اسپتیک بر روی گستره باکتری قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت اینکوباسیون ، قطر حساسیت بررسی و اندازه گیری شد. حساسیت سویه هایی که قطر آزمون BC آنها ۱۰mm < بود با استفاده از تهیه سوسپانسیون باکتری (معادل ۰/۵ مک فارلند) مجددا سنجیده شد(۱، ۷، ۸، ۱۱).

www.SID.ir

آزمون حساسیت به کوتری موکسازول SXT (پادتن طب- ایران)، همانند آزمون BC و با استفاده از دیسک های آماده، انجام شد. در انجام این آزمون از کشت غلیظ (۸) و مستقیم- بدون تهیه سوسپانسیون- بر روی محیط کشت SBA استفاده شد (۱).

آزمون ووگس پروسکوئر (VP) با کشت ۴- ۳ پرگنه مورد نظر در محیط کشت MRVP (مرک- آلمان) به مدت ۲۴ ساعت و استفاده از معرف های پتاس و آلفا نفتول انجام شد. ایجاد حلقه قرمز تیره، مثبت تلقی گردید (۱، ۱۰).

در نهایت PYR (بکتون، دیکینسون- امریکا) ، با استفاده از کیت آماده و مطابق دستورالعمل مندرج در بروشور ضمیمه انجام شد. ۶-۵ پرگنه برداشت شده از کشت تازه در شرایط اسپتیک بر روی کاغذ های مرطوب شده حاوی سوبسترای PYR گسترده شد. پس از حدود ۲ دقیقه، ۲-۱ قطره معرف متیل آمینوسینامالدئید اضافه گردید. تغییر رنگ پرگنه از زرد خردلی به قرمز ارغوانی نشانه مثبت بودن نتیجه آزمایش بود.

سویه استاندارد: استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A با شماره PTCC: ۱۴۴۷ و ATCC: ۸۶۶۸ در تمام آزمایش ها و استرپتوکوک (انتروکوک) غیر همولیتیک فیکالیس با شماره PTCC: ۱۲۳۷ و NCTC: ۸۲۱۳ به عنوان کنترل مثبت آزمون PYR مورد استفاده قرار گرفتند.

بر پایه آزمون PYR که حساسیت و ویژگی آن ۱۰۰-۹۹/۵٪ اعلام شده است (۱۱) و با استفاده از جدول ۲×۲ ارزش پیشگویی محاسبه شد (۱۲).

		PYR	
		+	--
آزمایش دیگر	+		
	--		

ارزش پیشگویی مثبت (positive predicted value)

$$ppv=\text{True positive}/\text{True positive + false positive}$$

ارزش پیشگویی منفی (negative predicted value)

$$npv=\text{True negative}/\text{True negative + false negative}$$

حساسیت (Sensitivity)

$$sen=\text{True positive}/\text{True positive + false negative}$$

نتایج

بر پایه آزمون PYR، از مجموع ۱۵۹ استرپتوکوک بتا همولیتیک جدا شده ، ۵۴ سویه استرپتوکوک پیوژنز تشخیص داده شد. جدول های ۱-۵ ارزش پیشگویی مثبت، منفی و حساسیت هر یک از مشخصات فنوتیپیک مورد استفاده در تشخیص استرپتوکوک پیوژنز را در مقابل PYR به تفکیک نشان می دهد. در جدول ۶ مجموع دو مشخصه همولیز بتا با قطر ۳ ≥ میلی متر+ حساسیت به باسی تراسین که در کشور ما بیش از بقیه آزمون ها مورد استفاده قرار می گیرد، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

جدول ۱: هم خوانی دو ویژگی همولیز در محیط SBA و آزمون PYR، ($p < ۰/۰۰۱$)، sen= ٪۸۹ ، npv= ٪۸۹ ، ppv= ٪۷۵.

	PYR	
	+	--
+	۴۸	۱۶
--	۶	۵۱

β همولیز ≥۳mm
خون گوسفند

جدول۲: هم خوانی دو ویژگی همولیز در محیط HBA و آزمون PYR ($p <۰/۰۰۱$)، sen= ٪۵۳ ، npv= ٪۹۸ ، ppv=٪۷۶.

	PYR	
	+	--
+	۵۳	۱۷
--	۱	۵۰

β همولیز*
خون انسان

*با هر اندازه قطر

جدول۳: هم خوانی دو ویژگی حساسیت به باسی تراسین و آزمون PYR ($p= ۰/۰۶$)، sen =٪۸۹ ، npv= ٪۷۰ ، ppv =٪۵۲.

	PYR	
	+	--
+	۴۸	۴۴
--	۶	۱۲

BC≥۱۰mm

Archive of SID

www.SID.ir

جدول٤: هم خوانی دو آزمون VPو PYR
(p= ۰/۰۰۱)، sen= ٪۹٤ ، npv= ٪۸۹، ppv=٪۵۷

		PYR	
		+	−−
VP	+	۵۱	۳۸
	−−	۳	۲٤

جدول۵: هم خوانی دو آزمون SXT و PYR
(p= ۰/٦)، sen=٪٦۳ ، npv= ٪٤۷ ، ppv=٪٤۹

		PYR	
		+	−−
SXT	+	۳٤	۳٦
	−−	۲۰	۱۸

جدول ٦: هم خوانی ویژگی های همولیز و حساسیت به باسی تراسین و PYR
sen= ٪۷۸ ، ppv= ٪۸۲ ، ppv= ٪۸۹ .

		PYR	
		+	−−
βهمولیز≥۳mm	+	٤۲	۵
BC≥ ۱۰mm	−−	۱۲	۵۵

بحث و نتیجه گیری

تفکیک و دسته بندی استرپتوکوک ها که بر اساس مشخصات فنوتیپیک شامل نوع همولیز، آزمون های بیوشیمیایی و الگوی آنتی ژنی لانسفیلد صورت می گیرد از ابتدا (۴) تاکنون (۶) با مشکلات و پیچیدگی هایی همراه بوده است. در این میان استرپتوکوک پیوژنز متعلق به گروه A لانسفیلد، به سبب برخورداری از قدرت تهاجم بیشتر و ایجاد عوارض غیر عفونی مورد توجه خاص قرار دارد. بر اساس تخمین مرکز کنترل بیماری ها (CDC)، در سال ۲۰۰۴، ۴۵۰۰ مورد بیماری عفونی ناشی از این باکتری در امریکا روی داده است که ۵۰۰ مورد با شوک سمی همراه بوده است. ۴۶٪ آنها منجر به مرگ شده است (۱۳).

در سال ۱۹۵۳، Maxted برای استرپتوکوک گروه A وجوه تفکیکی همولیز نوع بتا و حساسیت به باسی تراسین ۰/۰۴ واحدی را پایه گذاری نمود (۱۱). فعالیت همولیز باکتری ها در محیط کشت خوندار سنجیده می شود. در این زمینه، در آزمایشگاههای تشخیصی امریکای شمالی استفاده از خون بدون فیبرین گوسفند مورد پذیرش قرار گرفته است (۱۴). اگر چه استفاده ازخون انسان به سبب احتمال آلودگی به میکروب های خونی و اثر ضد میکروبی سیترات و دکستروز موجود در کیسه های خونی، پیشنهاد نشده است(۱۴، ۱۵) اما در کشورهای در حال توسعه به دلیل سهولت تهیه و ارزانی قیمت، از خون اضافی انسان در بانک خون(BHB) و همچنین خون حیوانات دیگر مثل بز، خوک ، اسب استفاده می گردد (۱۴). در کشور ما نیز به صورت وسیع ازBHB در تهیه محیط کشت خوندار استفاده می شود. در بررسی حاضر فعالیت همولیتیک استرپتوکوک های بتا همولیتیک در SBA و HBA مقایسه شد. جداول ۱ و ۲ ppv و npv ویژگی همولیز بتای استرپتوکوک پیوژنز را در این دو نوع محیط کشت نشان می دهد. در این بررسی هر دو شکل همولیز سطحی و یا همولیز در عمق محیط کشت در نظر گرفته شد. نتایج این جداول بیان می دارد اگر استرپتوکوکی با پرگنه درشت (≥۲mm) در محیط SBA دارای قطر همولیز ≥۳mm باشد به احتمال۸۹ ٪ پیوژنز است و اگر در محیط HBA همولیز بتا نداشت، به احتمال ۸۹٪ پیوژنز نیست. ۵۱ سویه مورد بررسی در محیط SBA دارای پرگنه کوچک با همولیز بتای ضعیف(α′) بودند که ۴۲ (۸۲٪) اینها به باسیتراسین نیز حساس بودند (این نتایج در جدول گنجانده نشده است) اما همولیز آنها در HBA به صورت α یا غیر همولیتیک بود لذا همولیز بتای ضعیف در SBA می تواند گمراه کننده باشد. آزمایش PYR نیز پیوژنز بودن آنها را تایید نکرد. ppv و npv آزمایش BC (معمول ترین آزمایش مورد استفاده در کشورمان) با قطر mm ۱۰ ≥ به ترتیب ۵۲٪ و ۷۰٪ (p= ۰/۰۶) بود. حساسیت این آزمون ۸۹٪ به دست آمد. قطر نتیجه مثبت آزمون BC در منابع مختلف متفاوت بیان شده است (۷، ۸). با تجربه صورت گرفته، انجام آزمایش با سوسپانسیونی از باکتری که معادل ۰/۵ مک فارلند باشد، مطمئن ترین نتیجه را به بار می آورد. به سبب حساسیت تعدادی از اعضای گروه های دیگر استرپتوکوک بتا همولیتیک (G و C) به باسی تراسین و شناسایی تعدادی از واریته های مقاوم، ادامه استفاده از این آزمون در تشخیص استرپتوکوک

Archive of SID

www.SID.ir

پیوژنز پیشنهاد نمی گردد (۸، ۱۶). آنتی ژن A لانسفیلد نیز آنتی ژن اختصاصی استرپتوکوک پیوژنز محسوب نمی شود. این آنتی ژن در استرپتوکوک آنژینوسوس، زیر گروه C لانسفیلد هم وجود دارد (۹).

از سال ۱۹۸۱ آزمون بیوشیمیایی PYR با حساسیت و ویژگی ۱۰۰-۹۹/۵٪ به عنوان آزمون انحصاری در تشخیص استرپتوکوک پیوژنز در میان استرپتوکوک های بتا همولیتیک پایه گذاری گردید (۱۱، ۱۷). در بررسی حاضر این آزمایش اساس مقایسه سایر آزمون های تشخیصی بود. بر پایه آزمون PYR، اگر دو صفت قطر همولیز ۳mm≤ و قطر BC ۱۰ mm≤ با هم در نظر گفته شود، ppv به ۸۹٪ و npv به ۸۲٪ (p< ۰/۰۰۱) افزایش می یابد جدول ۶. استرپتوکوک پیوژنز VP منفی و مقاوم به SXT است (۸، ۹). با ppv و npv به دست آمده می توان نتیجه گرفت مثبت بودن آزمون VP با احتمال ۸۹٪ استرپتوکوک پیوژنز را رد می کند. حساسیت این آزمون ۹۴٪ بود اما نتایج متنوعی که از آزمون SXT در تشخیص استرپتوکوک پیوژنز به دست آمد، حساسیت این آزمایش را در حد۶۳٪ نشان داد. ppv و npv این آزمون به ترتیب ۴۹٪ و ۴۷٪ بود (p= ۰/۶).

در مجموع باید گفت که تشخیص آزمایشگاهی استرپتوکوک پیوژنز با ویرولان قابل توجه دارای اهمیت خاص است. آزمایش کشت همچنان به عنوان " استاندارد طلایی" در این راه تلقی می گردد. نتیجه مثبت آزمون PYR مستدل ترین وجه تفکیک این باکتری از سایر استرپتوکوک های بتا همولیتیک محسوب می گردد. با این حال در صورتی که امکان استفاده از این آزمون فراهم نباشد، ۱۰mm ≤ BC +۳ mm ≤ همولیز بتا، با احتمال ۸۹٪ ارزش تشخیصی دارد. نتایج به دست آمده از همولیز در محیط کشت حاوی خون انسان (به شرط آنکه با رعایت نکات بهداشتی استفاده شود) مستدل و معادل خون گوسفند است. نتیجه مثبت آزمون VP با احتمال ۹۸٪، تشخیص استرپتوکوک پیوژنز را رد می کند. آزمون عدم حساسیت به کوتریموکسازول وسیله تشخیصی مناسبی محسوب نمی گردد.

References

1. Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld: catalase negative gram positive cocci In: Bialy & Scott's Diagnostic Microbiology, Mosby Company, 2002, part III, 308.
2. Kaplan E. L., 1991, The resurgence of group A streptococcal infection and their sequelae, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 10, 2: 55-57.
3. Bisno A. L., 2001, Acute pharyngitis, N. Engl. J. Med., 3: 205-211.
4. Todd E. W., 1928, The conversion of hemolytic streptococci to non hemolytic form, J. Exp. Med., 48: 493-511.
5. Dierksen K. P., Tagg J. R., 2000, Hemolysis- deficient variants of *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. equisismilis may be overlooked as etiological agents of pharyngitis, J. Med. Microbiol., 49:811-816.
6. http:// cmr.asm.org/cgi/cotent/full/15/4/613.
7. http://www.Instate edu/thcme/micro/srep-lab. htm
8. Larsen H. S., Streptococcaceae, In: Mahon C. R., Manuselis G., (eds). Text Book of Diagnostic Microbiology, W. B. Saunders Company, 2000, 253.
9. Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld (eds) Stuart's Baily & Scott'S Diagnostic Microbiology, Mosby Company, 2002, Chap 1, 12, (table 1-1).
10. Kellogg J. A., 1990, Suitability of throat culture procedures for detection of group A streptococci and as reference standards for evaluation of streptococcal antigen detection kits, J. Clin. Microbiol., 28, 2: 165-169.
11. Chen C. H., Huang L. E., Lee W. H., 1997, Presumptive identification of streptococci by pyrrolidonyl beta-naphthylamide (PYR) test, Clin. Med. J. (Taipe), 59: 259-264.
12. Ilstrup D. K., 1990, Statistical method in microbiology, Clin. Microbiol. Rev., 33: 219-226.
13. Murray P. R., Rosenthal K. S., Kabayashi G. S., Pfaller M. A., Streptococcus, In: Medical microbiology, Mosby, 2005, 237.
14. Anand C., Gordon R., Shaw H., Fonseca K., Oslen M., 2000, Pig and goat blood as substitutes for sheep blood in blood-supplement agar media, J. Clin. Microbiol., 38, 2: 591-594.
15. Buxton R., 2005, Blood agar plates and hemolysis protocols, http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp
16. Malhotra-Kumar S., Wang Sh., Lammens C., Chapelle S., Goossens H., 2003, Bacitracin- resistant clone of *Streptococcus pyogenes* isolated from pharyngitis patients in Belgium, J. Clin. Microbiol., 41, 11: 5282-5284.
17. Wellstood S. A., 1987, Rapid, cost-effective identification of group A streptococci and Enterococci by Pyrrolidonyl- β- Naphthylamide hydrolysis, J. Clin. Microbiol., 25, 9: 1805-1806.

Archive of SID
www.SID.ir