

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^{۴*} (Ph.D)

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

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

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

چکیده

سابقه و هدف: استرپتوکوکوس پنومونیه یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های باکتریایی 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: ایزوله‌های 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 تنهایی 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 میکروبیولوژی در آزمایشگاه بیمارستان می‌تواند بسیار موثر باشد.

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

مقدمه

در بچه‌های زیر ۵ سال و افراد مسن می‌باشد [۱]. در دو دهه اخیر، بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی گسترده به‌ویژه نسبت به پنی‌سیلین و اریترومايسین به‌شدت افزایش یافته و درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را با مشکل مواجه کرده است.

استرپتوکوکوس پنومونیه عامل طیف وسیعی از عفونت‌های ملایم مانند عفونت گوش میانی و سینوزیت و هم‌چنین عفونت‌های شدید مانند پنومونی، سپتی سمی و مننژیت به‌ویژه

۱۱۰ ایزوله بالینی که به عنوان استرپتوکوکوس پنومونیه تشخیص داده شدند، دریافت و به آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل شد.

تعیین هویت بیوشیمیایی: پس از خالص سازی و بررسی مرفولوژی کلنی، از کلنی های خالص ۲۴ ساعته رنگ آمیزی 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 ۵ درصد خون گوسفند تست حساسیت به اپتوچین انجام شده و هاله عدم رشد طبق پروتکل CLSI تفسیر شد [۴]. در نهایت تست حلالیت در صفا با استفاده از محلول دزوکسی کولات ۱۰ درصد و به روش مستقیم روی کلنی انجام شد [۵]. در مورد ایزوله های غیر پنوموکوک، تعیین هویت بیوشیمیایی بر اساس تست های مرسوم شناسایی کوکسی های گرم مثبت و تشخیص باسیل های گرم منفی انجام شد.

تعیین هویت مولکولی: DNA ایزوله ها با استفاده از High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) استخراج شده و تعیین هویت مولکولی ایزوله ها 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، قطعه ای با وزن ۲۳۰ جفت باز بود [۶]. آزمون PCR به صورت اتفاقی بر روی ۱۰ ایزوله مقاوم به اپتوچین نیز انجام شد. از سویه پنوموکوک ATCC 49619 به عنوان کنترل کیفی در تمام مراحل کار استفاده شد. در نهایت به صورت رندوم چند سویه تعیین توالی شد.

از این رو 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 عفونت های پنوموکوکی و تعیین تیپ آن ها لازم است [۲]. استرپتوکوکوس پنومونیه یک کوکوس گرم مثبت از خانواده استرپتوکوکاسیه و عضو گروه Smith (گروه استرپتوکوکس میتیس - استرپتوکوکوس اورالیس) از استرپتوکوک های گروه ویریدانس است. با توجه این که استرپتوکوکوس پنومونیه به عنوان فلور نرمال در ۴۰-۵ درصد افراد جامعه وجود داشته و اکثر عفونت های ناشی از این باکتری منشأ درونی دارد، تشخیص صحیح پنوموکوک و تمایز آن از سایر باکتری های مشابه موجود، در تعیین اپیدمیولوژی بالینی و بررسی روند مقاومت های آنتی بیوتیک پنوموکوک اهمیت بسیاری دارد [۳]. مهم ترین روش تشخیص این باکتری از سایر اعضای ویریدانس، دو تست حساسیت به اپتوچین و حلالیت در صفا می باشد. در ایران به طور کلی میزان جداسازی و گزارش پنوموکوک کم بوده که دلیل اصلی آن می تواند سخت گیر بودن باکتری و عدم رشد در شرایط کشت غیر استاندارد از نمونه های بالینی می باشد. هم چنین در اکثر آزمایشگاه های 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 می گردد [۳]. هدف این مطالعه تعیین میزان صحت تشخیص استرپتوکوک پنومونیه در آزمایشگاه های تشخیص طبی با روش های فنوتایپی و مولکولی می باشد.

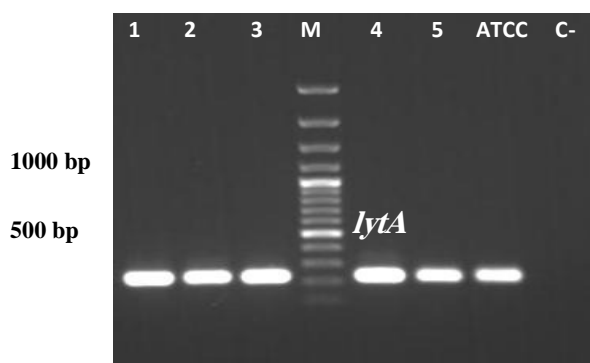
نتایج

پس از تعیین هویت مجدد ایزوله ها بر اساس روش های تعیین هویت فنوتیپی و نیز مهم تر از آن روش مولکولی و مشاهده قطعه ۲۳۰ جفت بازی از ژن *lytA*، مشخص شد که

مواد و روش ها

جمع آوری 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

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



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

بحث و نتیجه گیری

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 اپتوجین و عدم استفاده از سویه کنترل برمی‌گردد. در روش روتین، تشخیص نهایی پنوموکوک تنها بر اساس حساسیت به اپتوجین 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

۵۰ ایزوله از این تعداد واقعاً پنوموکوک بوده و در مقابل ۶۰ ایزوله دیگر پنوموکوک نبودند. ایزوله‌های پنوموکوک به دست آمده دارای مرفولوژی‌های کلنی متغیری از انواع کلنی‌های عادی تا انواع نافی شکل و حتی بسیار موکئید بودند. بیش‌ترین نمونه غیر پنوموکوک 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

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

ایزوله‌های به دست 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 غیر پنوموکوک را بر حسب نمونه‌های بالینی نشان می‌دهد. واکنش PCR با استفاده از پرایمر ژن *IytA* نشان داد تمام ۵۰ ایزوله‌ای که به عنوان پنوموکوک شناسایی شده بودند، از نظر ژن *IytA* مثبت بوده و محصولی با وزن جفت باز ایجاد کردند.

جدول ۲. توزیع فراوانی ایزوله‌های غیر پنوموکوک بر حسب نمونه‌های

بالینی

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

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 پروتکل 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 میکروبی‌شناسی پزشکی در بخش میکروبی‌شناسی 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 سپاس‌گزارى نمایند.

منابع

- [1] Obaro S, Adegbola R. The Pneumococcus: 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

اپتوجین در شرایط بدون CO2 انجام می‌شود که در ایران چنین عملی صورت نمی‌گیرد. به‌علاوه چون از تست حلالیت در صفرا در ایران استفاده نمی‌شود ایزوله‌های پنوموکوکی مقاوم به اپتوجین 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 اپتوجین 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 اپتوجین 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 اپتوجین 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].

- [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 pneumoniae*. *Infect Dis Clin Pract* 2013; 21: 299-301. (Persian).
- [15] Kohanteb J, Sadeghi E. Penicillin-resistant *streptococcus pneumoniae* 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.
- 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 pneumoniae* 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.

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 pneumoniae*.

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 pneumoniae*, Polymerase chain reaction, Molecular diagnostic techniques

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