گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۵۲-۴۶

شناسایی و تشخیص مولکولی سروتیپ های استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده از بیمارستان‌های منتخب تهران با روش Multiplex PCR

صدیقه رفیعی طباطبایی (MD, MPH)[۱]، فاطمه فلاح (PhD)[۲،۴]، داود افشار (PhD)[۳]، علی نظری عالم (PhD)[۴*]

۱-مرکز تحقیقات عفونی اطفال، بیمارستان کودکان مفید، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳-گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۴-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

دریافت: ۹۷/۲/۳۰، اصلاح: ۹۷/۷/۲۱، پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

خلاصه

سابقه و هدف: استرپتوکوکوس پنومونیه جزء پاتوژن های مهم ایجاد کننده بیماری های تهاجمی مثل پنومونی و مننژیت می باشد. مطالعات اپیدمیولوژیک سروتیپ های این میکروارگانیسم جهت ارزیابی تاثیر واکسن پنوموک در هر جامعه لازم می باشد. لذا این مطالعه به منظور شناسایی و تشخیص مولکولی سروتیپ های استرپتوکوکوس پنومونیه با روش Multiplex PCR جدا شده از بیمارستان های منتخب تهران انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی بر روی ۳۲ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونیه بدست آمده از نمونه های بالینی بیماران بستری شده در بیمارستان های مختلف تهران، انجام شد. ایزوله ها بر اساس تست های فنوتیپی و روش PCR شناسایی شدند. از روش Multiplex PCR جهت تعیین سروتیپ استفاده شد.

یافته‌ها: تعداد و درصد ایزوله های استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده از نمونه های مایع مغزی نخاعی، خلط، خون، مایع شستشو برونش، چشم و ترشحات بینی به ترتیب ۱۲ (۳۷/۶٪)، ۷ (۲۱/۸٪) ، ۶ (۱۸/۷٪) ، ۳ (۹/۵٪)، ۲ (۶/۲٪) و ۲ ایزوله (۶/۲٪) بود. در مطالعه حاضر سروتیپ های شناسایی شده به سروتیپ های ۱، ۴، ۶A/B ، ۷F، ۹V، ۱۱A، ۱۴، ۱۵A، ۱۹A، ۱۹Fو ۲۳F تعلق داشتند.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، بیش از پنجاه درصد سروتیپ ها جزء سروتیپ های موجود در واکسن های رایج مورد استفاده در جامعه نبودند.

واژه‌های کلیدی: استرپتوکوکوس پنومونیه، سروگروه، واکنش زنجیر پلیمراز Multiplex، ایران.

مقدمه

باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک) در نازوفارنکس انسان می تواند به صورت بدون علامت کلونیزه گردد؛ اما این پاتوژن یکی از مهم ترین عوامل ایجاد بیماری های تهاجمی مثل پنومونی، سپتی سمی و مننژیت می باشد(۲و۱). در جهان سالیانه این باکتری باعث مرگ و میر افرادی خیلی زیادی می شود، به طوری که این آمار بیش از ۱/۶ میلیون نفر برآورد می گردد؛ که این مرگ و میر بیشتر در کودکان زیر ۵ سال و افراد سالخورده دیده می شود (۳). این باکتری جزء باکتری‌های گرم مثبت بوده و دارای بیش از ۹۰ سروتیپ می باشد. مهم ترین و اصلی‌ترین فاکتور ویرولانس پنوموکوک، کپسول پلی ساکاریدی آن بوده که اساس سروتیپ بندی آن محسوب می گردد (۴). با مقایسه همزمان ایزوله های عامل بیماری های تهاجمی و غیر تهاجمی مشاهده شده که بیماری زایی پنوموکوک وابسته به نوع سروتیپ کپسولی می باشد. در اکثر نقاط دنیا، از بین تمام سروتیپ ها، پانزده نوع اصلی ترین سروتیپ هایی هستند که باعث ایجاد بیماری های تهاجمی در میزبان می شوند (۶و۵). امروزه بیشتر واکسن های موجود علیه این باکتری از کپسول پلی ساکاریدی تهیه می گردد. اولین واکسن چند گانه در سال ۲۰۰۰ مجوز استفاده از آن فراهم شد که از نوع هفت‌گانه (PCV7) بود (۱). سروتیپ های موجود در PCV7 شامل: سروتیپ های ۴، ۲۳F، ۱۹ F، ۱۸ C، ۱۴، ۹V، ۶ B می باشد.

اما در حال حاضر جهت افزایش کارایی واکسن، واکسن کونژوگه ده گانه و سیزده گانه استفاده می گردد؛ این نوع واکسن ها علاوه بر سروتیپ های مذکور، شامل سروتیپ های ۱،۳، ۵، ۶ A، ۷ F، ۱۹ A نیز هستند (۷). سازمان بهداشت جهانی توصیه کرده که جهت مبارزه بر علیه پنوموکوک، استفاده از واکسن چند ظرفیتی که در برگیرنده سروتیپ های شایع است، صورت پذیرد (۸). این واکسن در کشورهای پیشرفته اروپایی براساس نوع سروتیپ در گردش جامعه طراحی و ساخته می شود. جهت بررسی کارایی واکسن و همچنین بررسی سروتیپ های در گردش در یک جامعه لازم است که مطالعات اپیدمیولوژی به طور منظم در هر منطقه و در زمان‌های مختلف انجام گیرد(۱۰و۹). در مطالعات متعدد نشان داده شده است که سروتیپ‌های عامل بیماری‌های تهاجمی در مناطق مختلف جغرافیایی دارای گوناگونی زیادی هستند. حتی این تنوع در یک منطقه جغرافیایی در زمان های گوناگون نیز متفاوت می‌باشد. تنوع و گوناگونی سروتیپ ها در استفاده از واکسن ها، می تواند دارای اهمیت زیادی باشد؛ چرا که کارایی هر واکسن، به طور مستقیم به نوع سروتیپ در گردش جامعه بستگی دارد (۱۱). در ایران این واکسن از خارج کشور وارد شده و در گروه های در معرض خطر تزریق می گردد؛ اما یکی از مشکلاتی که وجود دارد این است که بدون مطالعه ای که نشان دهنده نوع سروتیپ باشد، در جامعه مورد استفاده

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۵۰۵ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.
*مسئول مقاله: دکتر علی نظری عالم
آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۳۱-۵۵۵۴۱۱۱۲
E-mail: nazarialam-a@kaums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.46]

قرار می گیرد. این امر باعث کاهش و گاهی اوقات عدم تاثیر واکسن تزریقی می‌گردد و منجر به بروز بیماری‌های خطرناک ناشی از این باکتری (مثل مننژیت و سپتی سمی) می گردد. در ایران مطالعات خیلی کم درباره تعیین میزان فراورانی سروتیپ های پنوموکوک انجام گرفته است؛ به طوری که از سال ۱۳۷۵ تا سال ۱۳۹۷ فقط ۶ مطالعه ثبت شده وجود دارد (۱۶-۱۲ و ۱۰).

با توجه به اهمیت سروتیپ های این باکتری، نیاز به چنین مطالعات اپیدمیولوژی در مناطق مختلف و زمان های متفاوت در ایران لازم و ضروری می باشد؛ فلذا این مطالعه با هدف شناسایی و تشخیص مولکولی سروتیپ‌های استرپتوکوکوس پنومونیه با روشMultiplex PCR جدا شده از بیمارستان های منتخب تهران انجام گرفت.

مواد و روش ها

تشخیص باکتریایی: در این مطالعه مقطعی، تعداد ۳۲ ایزوله پنوموکوک از بیمارستان‌های میلاد، مفید، امام سجاد (ع) و بیمارستان سینا تهران، در فاصله زمانی ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶ جمع آوری گردید. ایزوله‌ها از نمونه هایی مختلف شامل مایع مغزی-نخاعی (CSF)، خلط، خون، لاواژ برونکلو آلوئولار (BAL)، چشم و ترشحات بینی به دست آمد. در ادامه مطالعه، ایزوله‌های رشدیافته روی بلاد آگار گوسفندی (۵ ٪) که از لحاظ فنوتیپی به استرپتوکوکوس پنومونیه شباهت داشتند، با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست حلالیت در صفرا، حساسیت به دیسک اپتوچین مورد شناسایی قرار گرفت.

به عنوان کنترل کیفی از سویه استاندارد استرپتوکوکوس پنومونیه ۴۹۶۱۹ ATCC استفاده گردید. برای ذخیره سازی، ایزوله ها در محیط STGG (شرکت Merck، آلمان) در دمای منفی ۷۰ °C نگهداری گردیدند.

استخراج DNA: ایزوله های باکتریایی در ۲۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون بافر فسفات نمکی (PBS) حل شده و بر اساس دستورالعمل کیت شرکت Roche آلمان استخراج DNA انجام گرفت. با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز در ژل ۱ درصد DNA استخراج‌شده مورد بررسی قرار گرفت.

PCR: در این مطالعه برای تائید ایزوله های استرپتوکوکوس پنومونیه از روش PCR استفاده شد. در مطالعه حاضر برای شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه از ژن کد کننده کپسول پلی ساکاریدی *cps* A استفاده گردید (۱۷). در این بررسی برای انجام واکنش PCR از کیت HotStar Taq Master Mix kit شرکت سیناکلون (ایران) استفاده شد.

سروتیپ بندی با روش Multiplex PCR: برای تعیین سروتیپ در ایزوله های پنوموکوک از روش Multiplex PCR استفاده شد. برای این کار بیست و پنج جفت پرایمر مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). هفت واکنش Multiplex PCR انجام شد (جدول ۲). پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر بر اساس فراوانی سروتیپ های که عامل بیماری های تهاجمی و همچنین سویه‌های موجود در واکسن‌ها (هفت، ده و سیزده گانه) هستند، گروه بندی و انتخاب شدند. بعد از انجام Multiplex PCR، محصولات به دست آمده در ژل ۲ درصد الکتروفورز شدند.

آنالیز آماری: داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۹ و آزمون های ویلکاکسون و کای اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمرها جهت سروتیپ بندی ایزوله های پنوموکوک با روش Multiplex PCR (۱۰)

نام پرایمر	توالی پرایمر ۵' ⟶ ۳'	اندازه باندها بر اساس جفت باز
1-F	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	۲۸۰
1-R	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	
4-F	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	۴۳۰
4-R	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	
3-F	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	۳۷۱
3-R	CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	
5-F	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	۳۶۲
5-R	GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	
6A/B-F	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	۲۵۰
6A/B-R	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	
7F-F	CCT ACG GGA GGA TAT AAA ATT ATT TTT GAG	۸۲۶
7F-R	CAA ATA CAC CAC TAT AGG CTG TTG AGA CTA AC	
7C-F	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A	۲۶۰
7C-R	GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	
8-F	GAT GCC ATG AAT CAA GCA GTG GCT ATA AAT C	۲۹۴
8-R	ATC CTC GTG TAT AAT TTC AGG TAT GCC ACC	
9V-F	CTT CGT TAG TTA AAA TTC TAA ATT TTT CTA AG	۷۵۳
9V-R	GTC CCA ATA CCA GTC CTT GCA ACA CAA G	
10A-F	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC	۶۲۸
10A -R	GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	
11A-F	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G	۴۶۳
11A -R	GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	
12F-F	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G	۳۷۶
12F -R	CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	
14-F	CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT CCC TCT AC	۲۰۸
14-R	GCC AAA ATA CTG ACA AAG CTA GAA TAT AGC C	
15B-F	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C	۴۳۶
15B-R	GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	
16F-F	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA	۹۸۸
16F-R	CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.46]

نام پرایمر	توالی پرایمر ۵' ⟶ ۳'	اندازه باندها بر اساس جفت باز
17F-F	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	۶۹۳
17F-R	GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	
18C-F	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	۵۷۳
18C-R	TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	
19A-F	GTT AGT CCT GTT TTA GAT TTA TTT GGT GAT GT	۴۷۸
19A-R	GAG CAG TCA ATA AGA TGA GAC GAT AGT TAG	
19F-F	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	۳۰۴
19F-R	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	
20-F	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	۵۱۴
20-R	CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	
23F-F	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	۳۸۴
23F-R	CAC AAC ACC TAA CAC ACG ATG GCT ATA TGA TTC	
31-F	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGTGC	۷۰۱
31-R	CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	
34-F	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	۴۰۸
34-R	CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	
35B-F	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	۶۷۷
35B-R	CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	
35F-F	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	۵۱۷
35F-R	GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	

جدول ۲. شمای کلی از گروه بندی پرایمرهای در روش Multiplex PCR

واکنش	مقدار پرایمر(میکرولیتر)	پرایمرها	اندازه باندها (جفت باز)	دمای Tm پرایمر
۱	۲	۱۹A	۴۷۸	۶۲ °C
	۲	۱۹F	۳۰۴	
	۲	۶A/B	۲۵۰	
	۲	1	۲۸۰	
	۲	*cps*	۱۶۰	
۲	۲	۵	۳۶۲	۶۳ °C
	۲	۱۴	۲۰۸	
	۲	۷F	۸۲۶	
	۲	۹V	۷۵۳	
۳	۳	۲۳F	۳۸۴	۶۳ °C
	۴	۷F	۸۲۶	
	۲	۱۱A	۴۶۳	
	۲	۱	۲۸۰	
	۲	*cps*	۱۶۰	
۴	۴	۱۶F	۹۸۸	۶۲ °C
	۲/۵	۱۸C	۵۷۳	
	۲	۳۵B	۶۷۷	
	۲	۱۲F	۳۷۶	
۵	۳	۸	۲۹۴	۶۱ °C
	۳	۳	۳۷۱	
	۳	۱۵B	۴۹۶	
	۴	۳۱	۷۰۱	
۶	۳	۱	۲۸۰	۶۰ °C
	۳	۱۰A	۶۲۸	
	۳	۳۵F	۵۱۷	
	۴	۳۴	۴۰۸	
۷	۲	۲۰	۵۱۴	۶۳ °C
	۲	۷C	۲۶۰	
	۲	۱۷F	۶۹۳	
	۲	۴۴	۴۳۰	

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.46]

یافته‌ها

ایزوله های پنوموکوک جداشده از نمونه های مختلف شامل: ۱۲ ایزوله (۳۷/۶٪) CSF، ۷ ایزوله (۲۱/۸٪) خلط، ۶ ایزوله (۱۸/۷٪) خون، ۳ ایزوله (۹/۵٪) BAL، ۲ ایزوله (۶/۲٪) چشم، ۲ ایزوله (۶/۲٪) از ترشحات بینی بودند. ۱۹ بیمار (۵۹/۴٪) مذکر و ۱۳ بیمار (۴۰/۶٪) مونث بودند و ۲۲ (۶۹ ٪) نفر از بیماران کودک بودند. در این مطالعه بیست و پنج نوع سروتیپ شایع در دنیا مورد بررسی قرار گرفت و سروتیپ های که شناسایی شدند شامل ۱، ۴، A/B ۶، ۷F، ۹V، ۱۱A، ۱۴، ۱۵A، ۱۹A، ۱۹F، ۲۳F بودند. ایزوله‌های پنوموکوکی که سروتیپ آنها تعیین گردید از نمونه های بالینی CSF (۶ ایزوله)، خون (۳ ایزوله)، خلط (۲ ایزوله)، BAL (۱ ایزوله) و ترشحات بینی (۱ ایزوله) جمع آوری شده بودند. بیشترین فراوانی مربوط به سروتیپ A/B ۶ بود که این سروتیپ بیشتر از افراد بزرگسال جداسازی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه از ۳۲ ایزوله پنوموکوک جداشده، تعداد ۱۹ ایزوله پنوموکوک (۵۹ ٪) جزء هیچ کدام از بیست و پنج سروتیپ مورد بررسی نبودند یا به عبارت دیگر این ایزوله ها در این مطالعه حاضر غیر قابل تیپ بندی (Non-Typble) بودند. آزمون کای اسکوئر و ویلکاکسون بین جنس (p=۰/۲۶)، نوع نمونه بالینی (p=۰/۳۸) و سن بیماران (p=۰/۵۶) با نوع سروتیپ به کار برده شده ارتباط معنی داری را نشان نداد.

بحث و نتیجه گیری

براساس نتایج به دست آمده، از ۳۲ ایزوله پنوموکوک مورد بررسی، ۱۹ ایزوله (۵۹٪) از آنها جزء سویه های موجود در واکسن های هفت، ده و سیزده گانه نبودند؛ به عبارت دیگر این ایزوله ها جزء سویه های Non-Typble بودند. در مطالعه حاضر شیوع شایعترین سروتیپ های جهان مورد بررسی قرار گرفت که در واکسن‌های هفت، ده و سیزده ظرفیتی نیز وجود دارند. تعیین سروتیپ های استرپتوکوکوس پنومونیه برای ایجاد ایمنی مناسب در افراد در معرض خطر و نیز در توسعه واکسن دارای اهمیت حیاتی می باشد(۱۸).

در مطالعه ای که توسط Habibian و همکاران در تهران انجام گرفت، بیشترین شیوع سروتیپ ها به ترتیب: ۱۴، ۳، ۲۳F، ۱۹F، ۱۹A ، A ۶، ۹V، و ۶B گزارش شد(۱۹)، که با مقایسه نتایج این مطالعه و مطالعه حاضر، شیوع سروتپ های ۶A، ۹V، ۱۴، ۱۹F و ۲۳F مشابه بودند. در مطالعه Mousavi و همکاران در تهران، بیشترین فراوانی را سروتیپ های ۲۳F، ۳، ۶ ۱۹A در بین سروتیپ های مورد بررسی داشتند (۲۰). در یک بررسی دیگر در تهران که توسط Houri و همکاران انجام گرفت فراوانی سروتیپ ها به ترتیب: ۲۳F، ۱۹F، ۱۹A و ۹V بودند (۱۰)؛ مقایسه نتایج این دو مطالعه با مطالعه ما نشان می دهد که شیوع سروتیپ های ۶A، ۹V، ۱۹A، ۱۹V و ۲۳F مشابه می باشند. شباهت در شیوع سروتیپ ها، به این دلیل است که مکان مورد مطالعه، مشابه می باشد. یکی دیگر از شباهت این دو مطالعه با پژوهش ما در روش سروتایپینگ می باشد که از روش Multiplex PCR استفاده شده است؛ ولی تفاوت در شیوع سایر سروتیپ ها به دلیل تفاوت در زمان مورد مطالعه است. مشاهده چنین تفاوت هایی است که لزوم پیگیری مداوم سروتیپ ها را تایید می کند. به غیر از این دو پژوهشی که ذکر شده مطالعه مشابه ای که سروتیپ های پنوموکوک را در نمونه های بالینی مورد بررسی قرار داده باشند، یافت نشد و به همین دلیل باید مطالعات گسترده تری جهت ردیابی سروتیپ‌های پنوموکوک در ایزوله های بالینی انجام گیرد. در کشور ترکیه طی بررسی نشان داده شد که شایع‌ترین سروتیپ ها شامل ۱۹F، ۶B، ۲۳F و ۱۸C بودند (۲۱)، مقایسه این مطالعات نشان می دهد که سه سروتیپ شایع در ترکیه، در ایران نیز حضور دارند. اما سروتیپ ۱۸C در مطالعه ما مشاهده نگردید. در مطالعه ای که در عربستان سعودی انجام شد، بیشترین فراوانی مربوط به سویه های ۴، ۳، ۱۹F، ۹V، ۱۹A و ۱۴ بود (۲۲). شیوع سروتیپ های پنوموکوک در عربستان با مطالعه ما مشابهت خیلی زیادی دارد. دلیل احتمالی این امر می تواند به خاطر مسافرت حجاج ایرانی به شهر مکه باشد و افراد ناقل باکتری در هنگام مراجعت به ایران باعث انتشار سویه ها در جامعه می‌شوند. در پاکستان بیشترین فراوانی سروتیپ‌ها مربوط به ۱۸، ۱۴ و ۱۹F گزارش گردید (۲۳). در مقایسه با مطالعه ما تعداد سروتیپ های مشابه کمتری وجود دارند که این امر احتمالا می‌تواند تایید کننده این نظریه باشد که مسافرت اتباع ایرانی به کشورهای همسایه و یا بالعکس، نقش اساسی را در انتشار سویه های متفاوت پنوموکوک در ایران دارد. یکی از یافته های قابل توجه در این مطالعه جداسازی سروتیپ های ۱، ۴، ۷F و ۱۵A بود. در ایران بر اساس پژوهش ها در سایر مطالعات انجام گرفته، این سروتیپ ها به ندرت گزارش شده است (۲۱). یکی از دلایل اختلاف در نتایج مطالعات می‌تواند ناشی از این امر باشد که زمان های مورد بررسی در مطالعات مختلف با یکدیگر تفاوت دارند. دلیل دوم اختلاف نتایج ناشی از حجم نمونه های مورد بررسی می‌باشد، چرا که در هر کدام از بررسی ها، حجم نمونه‌های مورد استفاده متفاوت بوده است؛ که از محدودیت های این مطالعه نیز تعداد کم ایزوله های پنوموکوک به دلیل سخت رشد بودن باکتری بود. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه باید این نکته اساسی را در نظر داشت که بیش از نصف ایزوله های پنوموکوک به دست آمده، جزء سروتیپ های موجود در واکسن های مورد استفاده در ایران نبودند که جهت ایمن سازی کودکان مورد استفاده قرار می گیرد. پیشنهاد می شود که جهت همسان سازی مطالعات مختلف در ایران، حجم نمونه مورد استفاده در مطالعات مختلف مشابه در نظر گرفته شده تا بر اساس نتایج به دست آمده مقایسه درست و منطقی صورت گیرد. با توجه به اهمیت استرپتوکوکوس پنومونیه در ایجاد بیماری‌های با مرگ و میر بالا مثل سپتی سمی و مننژیت و همچنین ارتباط نوع سروتیپ با نوع عارضه ای که منجر به آن می‌شود (۲۵و۲۴)، لازم است که شیوع سروتیپ های این باکتری در کشور ایران مورد بررسی قرار گیرد. سپس واکسیناسیون در افراد در معرض خطر مثل کودکان و افراد سالخورده انجام گردد. در ایران مانند سایر کشورهای دنیا، باید عرضه و تجویز واکسن های چند ظرفیتی پنوموکوک براساس نوع سروتیپ در حال گردش صورت پذیرد، که در این حالت ایمن سازی افراد به صورت کامل ایجاد می گردد. به دلیل اطلاعات کمی که درباره شیوع سروتیپ های پنوموکوک در ایران وجود دارد پیشنهاد می‌شود که در تمام مناطق کشور و طی چندین سال متوالی، شیوع سروتیپ های پنوموکوک ردیابی شده و بر اساس نتایج به دست آمده، واکسن مناسب چندظرفیتی معرفی و مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پرسنل مرکز تحقیقات عفونی اطفال بیمارستان مفید که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.46]

Molecular Identification and Detection of Streptococcus Pneumoniae Serotypes Isolated from Selected Hospitals in Tehran Using Multiplex PCR Method

S. Rafiei-Tabatabaei (MD, MPH)[1], F. Fallah (PhD)[1,2], D. Afshar (PhD)[3], A. Nazari-Alam (PhD)[4*]

1.Pediatric Infections Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
2.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
3.Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, I.R.Iran
4.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 46-52
Received: May 20th 2018, Revised: Oct 13th 2018, Accepted: Jan 15th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Streptococcus pneumoniae* is one of the major pathogens responsible for invasive diseases such as pneumonia and meningitis. Epidemiological studies of these microorganisms are necessary to evaluate the effect of pneumococcal vaccine in any community. Therefore, the present study was conducted for molecular identification and detection of *Streptococcus pneumoniae* serotypes isolated from selected hospitals in Tehran using multiplex PCR method.

METHODS: This cross-sectional study was performed on 32 isolates of *Streptococcus pneumoniae* from clinical specimens of patients admitted to different hospitals in Tehran. The isolates were identified by phenotypic tests and PCR method. Multiplex PCR was used to determine the serotype.

FINDINGS: The number and percentage of *Streptococcus pneumoniae* isolates isolated from cerebrospinal fluid, sputum, blood, bronchoalveolar lavage, eyes, and nasal discharge were 12 (37.6%), 7 (21.8%), 6 (18.7%), 3 (9.5%), 2 (6.2%), and 2 (6.2%) isolates, respectively. In the present study, the identified serotypes were the serotypes 1, 4, 6A/B, 7F, 9V, 11A, 14, 15A, 19A, 19F, and 23F.

CONCLUSION: Based on the results of this study, more than 50% of the serotypes were not among the serotypes present in the vaccines that are commonly used in the community.

KEY WORDS: *Streptococcus pneumoniae, Serogroup, Multiplex Polymerase Chain Reaction, Iran.*

Please cite this article as follows:

Rafiei-Tabatabaei S, Fallah F, Afshar D, Nazari-Alam A. Molecular Identification and Detection of Streptococcus Pneumoniae Serotypes Isolated from Selected Hospitals in Tehran Using Multiplex PCR Method. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:46-52.

***Corresonding Author: A. Nazari-Alam (PhD)**
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran.
Tel: +98 31 55541112.
E-mail: nazarialam-a@kaums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.46]

References

1.Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2017;12(5):e0177113.

2.Nazari-Alam A, Tabatabaii SR, Hashemi A, Yousefi M, Alfatemi SMH. Characterization of 5 Episodes of Vancomycin Nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* From Clinical Isolates in Tehran, Iran. Arch Clin Infect Dis. 2017;12(2):1-4.

3.Leung MH, Bryson K, Freystatter K, Pichon B, Edwards G, Charalambous BM, et al. Sequetyping: serotyping *Streptococcus pneumoniae* by a single PCR sequencing strategy. J Clin Microbiol. 2012;50(7):2419-27.

4.Siira L, Kaijalainen T, Lambertsen L, Nahm MH, Toropainen M, Virolainen A. From Quellung to multiplex PCR, and back when needed, in pneumococcal serotyping. J Clin Microbiol. 2012;50(8):2727-31.

5.Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. Clin Infect Dis. 2000;30(1):100-21.

6.Nagaraj S, Kalal BS, Manoharan A, Shet A. *Streptococcus pneumoniae* serotype prevalence and antibiotic resistance among young children with invasive pneumococcal disease: experience from a tertiary care center in South India. Germs. 2017;7(2):78-85.

7.Midouni B, Mehiri E, Ghariani A, Draoui H, Essalah L, Bouzouita I, et al. Genetic Diversity of *Streptococcus pneumoniae* in Tunisia. Int J Antimicrob Agents. 2018;53(1):63-9.

8.Mollendorf C, Tempia S, von Gottberg A, Meiring S, Quan V, Feldman C, et al. Estimated severe pneumococcal disease cases and deaths before and after pneumococcal conjugate vaccine introduction in children younger than 5 years of age in South Africa. PloS one. 2017;12(7):e0179905.

9.Gjini E. Geographic variation in pneumococcal vaccine efficacy estimated from dynamic modeling of epidemiological data post-PCV7. Sci Rep. 2017;7(1):3049.

10.Houri H, Tabatabaei SR, Saee Y, Fallah F, Rahbar M, Karimi A. Distribution of capsular types and drug resistance patterns of invasive pediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates in Teheran, Iran. Int J Infect Dis. 2017;57:21-6.

11.Balsells E, Dagan R, Yildirim I, Gounder PP, Steens A, Muñoz-Almagro C, et al. The relative invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* among children after PCV introduction: A systematic review and meta-analysis. J Infect. 2018;77(5):368-378.

12.Mehrabi Tavana A, Ataee R, Najde Gerami E, Goya MM, Rahbar M. Serotyping of cliniical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from Tehran, Iran. Iran J Med Microbiol. 2009;2(3):67-72.

13. Sanaei Dashti A, Abdinia B, Karimi A. Nasopharyngeal Carrier Rate of *Streptococcus pneumoniae* in Children: Serotype Distribution and Antimicrobial Resistance. Arch Iran Med. 2012;15(8):500-3.

14.Bokaeian M, Khazaei H, Javadimehr M. Nasopharyngeal carriage, antibiotic resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* among healthy adolescents in Zahedan. Iran Red Crescent Med J. 2011;13(5):328-33.

15.Ghazikalayeh HM, Moniri R, Moosavi SGA, Rezaei M, Yasini M, Valipour M. Serotyping, antibiotic susceptibility and related risk factors aspects of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy school students. Iran J Public Health. 2014;43(9):1284-90.

16.Gharailoo Z, Mousavi SF, Halvani N, Feizabadi MM. Antimicrobial resistant pattern and capsular typing of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Sistan–Baluchestan. Mædica. 2016;11(3):203-7.

17.Rafiei Tabatabaei S, Rahbar M, Nazari-Alam A, Fallah F, Hashemi A, Yousefi M, et al. Detection of *pbp2b* gene and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Tehran hospitals, Iran. Arch Pediatr Infect Dis. 2017;5(1):e38891.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.46]

18.Silva-Costa C, Brito MJ, Pinho MD, Friães A, Aguiar SI, Ramirez M, et al. Pediatric complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 in 13-valent pneumococcal conjugate vaccinees, Portugal, 2010-2015. Emerg Infect Dis. 2018;24(7):1307-14.

19.Habibian S, Mehrabi-Tavana A, Ahmadi Z, Izadi M, Jonaidi N, Darakhshanpoure J, et al. Serotype distribution and antibiotics susceptibility pattern of *Streptococcus pneumonia* in Iran. Iran Red Crescent Med J. 2013;15(10): e8053.

20.Mousavi SF, Nobari S, Ghezelgeh FR, Lyriai H, Jalali P, Shahcheraghi F, et al. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Tehran by Multiplex PCR: Are serotypes of clinical and carrier isolates identical. Iran J Microbiol. 2013;5(3):220-6.

21.Yalçın I, Gürler N, Alhan E, Yaman A, Turgut M, Çelik Ü, et al. Serotype distribution and antibiotic susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* disease isolates from children in Turkey, 2001–2004. Eur J Pediatr. 2006;165(9):654-7.

22.Memish ZA, Balkhy HH, Shibl AM, Barrozo CP, Gray GC. *Streptococcus pneumoniae* in Saudi Arabia: antibiotic resistance and serotypes of recent clinical isolates. Int J Antimicrob Agents. 2004; 23(1):32-8.

23.Shakoor S, Kabir F, Khowaja AR, Qureshi SM, Jehan F, Qamar F, et al. Pneumococcal serotypes and serogroups causing invasive disease in Pakistan, 2005–2013. PloS one. 2014;9(6):e98796.

24.Gounder PP, Bruden D, Rudolph K, Zulz T, Hurlburt D, Thompson G, et al. Re-emergence of pneumococcal colonization by vaccine serotype 19F in persons aged≥ 5 years after 13-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction-Alaska, 2008–2013. Vaccine. 2018;36(5):691-7.

25.Alanee S, McGee L, Jackson D, Chiou C, Feldman C, Morris A, et al. Association of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with disease severity and outcome in adults: an international study. Clin Infect Dis. 2007;45(1):46-51.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.46]