

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

*صدیقه رفیعی طباطبائی (MD, MPH)، فاطمه فلاخ (PhD)، داود افشار (PhD)، علی نظری عالم (PhD)

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: ۹۷/۰۲/۲۱، پذیرش: ۹۷/۰۲/۳۰، اصلاح: ۹۷/۰۲/۲۵

خلاصه

سابقه و هدف: استرپتوکوکوس پنومونیه جزء پاتوژن های مهم ایجاد کننده بیماری های تهاجمی مثل پنومونی و منژیت 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 روش ها: 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.

یافته ها: تعداد و درصد ایزوله های استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده از نمونه های مایع مغزی خلط، خون، مایع شستشو برونش، چشم و ترشحات بینی به ترتیب ۱۲٪، ۷٪، ۶٪، ۵٪، ۴٪، ۳٪، ۲٪، ۱٪ و ۰٪ بود. در مطالعه حاضر سروتیپ های شناسایی شده به سروتیپ های ۱، ۴، ۶A/B، ۶F، ۶A، ۱۹F، ۱۹A، ۱۱A، ۱۵A، ۱۴، ۱۱F تعلق داشتند.

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

واژه های کلیدی: استرپتوکوکوس پنومونیه، سروگروه، واکشن زنجیر پلیمراز Multiplex، ایران.

مقدمه

اما در حال حاضر جهت افزایش کارایی واکسن، واکسن کوتزنگه ده گانه و سیزده گانه استفاده می گردد؛ این نوع واکسن ها علاوه بر سروتیپ های مذکور، شامل سروتیپ های ۱، ۴، ۶A، ۶F، ۶A، ۱۹A، ۱۴، ۱۱A می باشند (۷). سازمان بهداشت جهانی توصیه کرده که جهت مبارزه بر علیه پنوموکوک، استفاده از واکسن چند طرفینی 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 منطقه و در زمان های مختلف انجام گیرد (۹،۱۰)؛ در مطالعات متعدد نشان داده شده است که سروتیپ های عامل بیماری های تهاجمی در مناطق مختلف جغرافیایی دارای گوناگونی زیادی هستند. حتی این تنوع در یک منطقه جغرافیایی در زمان های گوناگون نیز متفاوت می باشد. 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

باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک) در نازوفارنکس انسان می تواند به صورت بدون علامت کلوئیزه گردد؛ اما این پاتوژن یکی از مهم ترین عوامل ایجاد بیماری های تهاجمی مثل پنومونی، سپتی سمی و منژیت می باشد (۹،۱۰)؛ 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 باکتری های گرم مثبت بوده و دارای بیش از ۹۰ سروتیپ می باشد. مهم ترین و اصلی ترین فاکتور ویروسان 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 (۵). 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 هفت گانه (PCV7) بود (۱). سروتیپ های موجود در PCV7 شامل: سروتیپ های ۴، ۶، ۹V، ۱۴، ۱۸ F، ۲۳F، ۱۹ F، ۱۸ C می باشد.

□ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۵۰۵۰ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر علی نظری عالم

به عنوان کنترل کیفی از سویه استاندارد استریپتوکوکوس پنومونیه ۴۹۶۱۹ ATCC استفاده گردید. برای ذخیره سازی، ایزوله ها در محیط STGG (شرکت Merck آلمان) در دمای منفی ۰°C نگهداری گردیدند.

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

PCR: در این مطالعه برای تائید ایزوله های استریپتوکوکوس پنومونیه از روش PCR استفاده شد. در مطالعه حاضر برای شناسایی استریپتوکوکوس پنومونیه از ژن cps A استفاده شد. در این بررسی برای 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 Multiplex PCR 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 تهابی و همچنین سویه های موجود در واکسن ها (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 پیکلاکسون و کای اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

قرار می گیرد. این امر باعث کاهش و گاهی اوقات عدم تاثیر واکسن تزریقی می گردد و منجر به بروز بیماری های خطرناک ناشی از این باکتری (مثل منتثبت و سپتی سمی) می گردد. در ایران مطالعات خیلی کم درباره تعیین میزان فراوانی سروتیپ های پنوموکوک انجام گرفته است؛ به طوری که از سال ۱۳۷۵ تا سال ۱۳۹۷ فقط ۶ مطالعه ثبت شده وجود دارد (۱۶ 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؛ فلاندا این مطالعه با هدف شناسایی و تشخیص مولکولی سروتیپ های استریپتوکوکوس پنومونیه با روش Multiplex 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 بیمارستان های میلاد، مفید، امام سجاد (ع) و بیمارستان سینا تهران، در فاصله زمانی ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶ جمع آوری گردید. ایزوله ها از نمونه هایی مختلف شامل مایع مغزی-نخاعی (CSF)، خلط، خون، لاواژ برونکلو الوفولار (BAL)، چشم و ترشحات بینی به دست آمد. در ادامه مطالعه، ایزوله های رشیدیافته روی بلاد آگار گوسفنندی (۵٪) که از لحاظ فنوتیپی به استریپتوکوکوس پنومونیه شباهت داشتند، با استفاده از رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست حلالیت در صفراء، حساسیت به دیسک اپتوجین مورد شناسایی قرار گرفت.

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

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه باندها بر اساس جنت باز
۱-F	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	۲۸۰
۱-R	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	
۴-F	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	۴۳۰
۴-R	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	
۳-F	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	۳۷۱
۳-R	CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	
۵-F	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	۳۶۲
۵-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 GGT 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	

نام پرایمر	توالی پرایمر	۳'	۵'	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			۵۷۳
18C-F	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT AAG CC			۴۷۸
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			۳۰۴
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			۵۱۴
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			۳۸۴
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			۷۰۱
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			۴۰۸
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			۶۷۷
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			۵۱۷
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			
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				
۴۷۸	۱۹A	۲		
۳۰۴	۱۹F	۲		
۶۲ °C	۲۵۰	۶A/B	۲	۱
	۲۸۰	۱	۲	
	۱۶۰	cps	۲	
	۳۶۲	۵	۲	
۶۳ °C	۲۰۸	۱۴	۲	
	۸۲۶	۷F	۲	۲
	۷۵۳	۹V	۲	
۶۳ °C	۳۸۴	۲۳F	۳	
	۸۲۶	۷F	۴	
	۴۶۳	۱۱A	۲	۳
	۲۸۰	۱	۲	
	۱۶۰	cps	۲	
	۹۸۸	۱۶F	۴	
۶۲ °C	۵۷۳	۱۸C	۲/۵	
	۶۷۷	۳۵B	۲	۴
	۳۷۶	۱۲F	۲	
۶۱ °C	۲۹۴	۸	۳	
	۳۷۱	۳	۳	
	۴۹۶	۱۵B	۳	۵
	۷۰۱	۳۱	۴	
۶۰ °C	۲۸۰	۱	۳	
	۶۲۸	۱۰A	۳	۶
	۵۱۷	۳۵F	۳	
	۴۰۸	۳۴	۴	
۶۳ °C	۵۱۴	۲۰	۲	
	۲۶۰	۷C	۲	۷
	۶۹۳	۱۷F	۲	
	۴۳۰	۴۴	۲	

یافته‌ها

سروتیپ‌های پنوموکوک در ایزوله های بالینی انجام گیرد. در کشور ترکیه طی بررسی نشان داده شد که شایع‌ترین سروتیپ‌ها شامل: ۱۲ ایزوله ۱۸C، ۶B، ۶F، ۹F و ۲۳F بودند (۲۱)، مقایسه این مطالعات نشان می‌داد 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 ۳، ۴، ۵، ۷، ۹A، ۹F و ۱۴ بود (۲۲). شایع سروتیپ‌های پنوموکوک در عربستان با مطالعه ما مشابه‌تی خیلی زیادی دارد. دلیل احتمالی این امر می‌تواند به خاطر مسافت حاج ایرانی به شهر مکه باشد و افاده ناقل باکتری در هنگام مراجعت به ایران باعث انتشار سویه ها در جامعه می‌شوند. در پاکستان بیشترین فراوانی سروتیپ‌ها مربوط به ۱۸، ۱۴ و ۹F گزارش گردید (۲۳). در مقایسه با مطالعه ما تعداد سروتیپ‌های مشابه کمتری وجود دارند که این امر احتمالاً می‌تواند تایید کننده این نظریه باشد که مسافت اتباع ایرانی به کشورهای همسایه و یا بالعكس، نقش اساسی را در انتشار سویه های متفاوت پنوموکوک در ایران دارد. یکی از یافته‌های قابل توجه در این مطالعه جداسازی سروتیپ‌های ۱، ۴، ۷F و ۱۵A بود. در ایران بر اساس پژوهش‌ها در سایر مطالعات انجام گرفته، این سروتیپ‌ها 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 نمونه های 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 می‌گیرد. پیشنهاد می‌شود 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 استرتپتوکوکوس پنومونیه در ایجاد بیماری‌های با مرگ و میر بالا مثل سپتی می و منزیت و همچنین ارتباط نوع سروتیپ با نوع عارضه ای که منجر به آن می‌شود (۲۴ و ۲۵)، لازم است که شایع سروتیپ‌های 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 می‌گردد. به دلیل اطلاعات کمی که درباره شایع سروتیپ‌های پنوموکوک در ایران وجود دارد پیشنهاد می‌شود که در تمام مناطق کشور و طی چندین سال متولی، شایع سروتیپ‌های پنوموکوک ردیابی شده و بر اساس نتایج به دست آمده، واکسن مناسب چند ظرفیتی معرفی و مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهری بششتی و پرسنل مرکز تحقیقات عفونی اطفال بیمارستان مفید که ما در انجام این مطالعه یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

ایزوله های پنوموکوک جدادشده از نمونه های مختلف شامل: ۱۲ ایزوله CSF (۳۷/۶٪)، ۷ ایزوله (۲۱/۸٪) خلط، ۶ ایزوله (۱۸/۷٪) خون، ۳ ایزوله (۵/۵٪) BAL، ۲ ایزوله (۶/۲٪) چشم، ۲ ایزوله (۶/۶٪) از ترشحات بینی بودند. ۱۹ بیمار (۵۹/۴٪) مذکور و ۱۳ بیمار (۴۰/۶٪) موئن بودند و ۲۲ 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، ۱۱A، ۹V، ۷F، ۶A/B، ۴، ۱۴، ۱۱A، ۹V، ۷F، ۶A/B، ۴، ۱۵A، ۲۳F، ۹V، ۹A، ۱۵A 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 جدادشده، 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-Typable) بودند. آزمون کای اسکوافر و ویلکاکسون بین جنس (p=0.26)، نوع نمونه بالینی (p=0.38) و سن بیماران (p=0.56) 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، 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-Typable بودند. در مطالعه حاضر شایعترین سروتیپ های جهان مورد بررسی قرار گرفت که در واکسن های هفت، ده و سیزده ظرفیتی نیز وجود دارند. تعیین سروتیپ های استرپتوکوکوس پنومونیه برای ایجاد اینمی 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 شایع سروتیپ ها به ترتیب: ۱، ۴، ۱۹A، ۹V، ۶A، ۹V، ۲۳F، ۳، ۶F، ۹V و ۶B گزارش شد (۱۹)، که با مقایسه نتایج این مطالعه و مطالعه حاضر، شایع سروتیپ های ۶A، ۹V، ۱۹F، ۱۴، ۹V، ۲۳F و مشابه بودند. در مطالعه Mousavi و همکاران در تهران، بیشترین فراوانی را سروتیپ های ۱۹A در بین سروتیپ Houri های مورد بررسی داشتند (۲۰). در یک بررسی دیگر در تهران که توسط همکاران انجام گرفت فراوانی سروتیپ ها به ترتیب: ۹V، ۱۹A، ۹V، ۲۳F و ۹V بودند (۲۱)؛ مقایسه نتایج این دو مطالعه با مطالعه ما مشابه می باشدند. شباهت در شایع سروتیپ های ۹V، ۱۹A، ۹V، ۲۳F مشابه می باشدند. شباهت در شایع 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 سروتاپیسینگ می باشد که از روش Multiplex PCR استفاده شده است؛ ولی تفاوت در شایع 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 گستره تری جهت ردیابی

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.

***Corresponding 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

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, Tabatabaei 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. Sequotyping: 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.Hourie H, Tabatabaei SR, Saei 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 clinical 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.

- 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, Darakhshanpoore J, et al. Serotype distribution and antibiotics susceptibility pattern of *Streptococcus pneumoniae* in Iran. *Iran Red Crescent Med J.* 2013;15(10): e8053.
- 20.Mousavi SF, Nobari S, Ghezelgeh FR, Lyriaie 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, Shibli 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 \geq 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.