تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

فراوانی تیپ emm و فنوتیپ های مقاومت به اریترومایسین در استرپتوکوکهای گروه A جدا شده ازگلودرد های چرکی درغرب استان مازندران

مصطفی جعفرپور
استادیارگروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران، تنکابن

علی ناظمی
استادیارگروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران، تنکابن

امیر میرزایی
کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، ایران، لاهیجان

ساسان رهبر فرزامی حق
کارشناس ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، ایران، تنکابن

نویسنده مسئول: مصطفی جعفرپور
تلفن : 01924270514
پست الکترونیک: s.jafarpour@toniau.ac.ir
آدرس : تنکابن، ولی آباد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی

وصول مقاله: 90/7/24
اصلاح نهایی: 90/11/3
پذیرش مقاله:90/11/30

چکیده

زمینه و هدف : شناسایی سویه های استرپتوکوکوس گروهA (استرپتوکوکوس پیوژنز) عمدتا برپایه روشهای سرولوژیک ، مبتنی برآنتی ژن های سطحی TوMبوده وبر این اساس سروتایپ های مختلفی از سراسر جهان گزارش شده است. بدنبال آن تعیین توالی انتهای آمینی ژن emm جایگزین روشهای قدیمی تر شده و براین اساس بیش از150 تیپ emm در سراسر جهان شناخته شده است. هدف این مطالعه تعیین شیوع تیپ های emm دربین جدایه های حلقی حاصل از گلودرد های چرکی و همچنین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها درمناطق غربی استان مازندران طی سالهای 89-90 می باشد.

روش بررسی:50 جدایه از حلق افراد مبتلا به گلودرد های چرکی مراجعه کننده به مراکز بیمارستانی مستقر در شمال ایران شامل بیمارستانهای شهید رجایی تنکابن، امام سجاد رامسر و طالقانی چالوس طی سالهای 89-90 به روش کشت در محیط آگار خوندار، آزمایش حساسیت به باسیتراسین، آزمون PYR و همچنین اگلوتیناسیون توسط آنتی سرم های اختصاصی شناسایی شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها با استفاده از دیسک های خریداری شده از شرکت پادتن طب ایران، توسط روش کربی باثر و تجزیه وتحلیل آن بوسیله جدول استاندارد CLSI انجام گرفت. ارزیابی مکانیسم مقاومت به اریترومایسین توسط روش مضاعف دیسکی در حضور اریترومایسین و کلیندامایسین انجام شد.
ژنemm همه جدایه ها تکثیر و محصولات PCR آنها توسط شرکت ماکروژن کره تعیین توالی شده و با استفاده از برنامه BLAST2.0 (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ،قابل دسترسی در پایگاه (WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) توالی های ژنهای مورد نظر با توالی های منتشره در بانک ژنی ، جهت تعیین تیپ emm مقایسه شدند.

یافته‌ها: 4تیپ مختلف emm شناسایی شد. از میان آنها emm5 فراوانترین بوده(26 مورد، 52%) وبدنبال آن emm12 (12 مورد، 24%) و emm79 وemm86 با فراوانی یکسان (6 مورد، 12%) حضور داشتند. همه آنتی بیوتیک های دارای حلقه بتا لاکتام اثر مهاری بر ایزوله ها نشان دادند، در صورتیکه 18% از جدایه ها (9مورد) مقاوم به اریترومایسین بودند. شایع ترین فنوتیپ مقاوم cMLSB (66,6%) وبدنبال آن فنوتیپ M (33,3%) بوده، درحالیکه در هیچکدام از جدایه ها فنوتیپ iMLSB مشاهده نشد. 6 مورد از جدایه ها (12%) مقاوم به کلیندا مایسین بودند.

نتیجه گیری : نتایج حاصل حضور متفاوتی ازتیپ های emm جدا شده ازموارد حلقی، نسبت به جدایه های سایر نقاط جهان نشان می دهد، وجود تیپ emm86 درفارنژیت که در گزارشات قبلی ذکر نشده است حائز اهمیت میباشد. وجود مقاومت آنتی بیوتیکی به اریترومایسین از یافته های ارزشمند این تحقیق می باشد.

واژه های کلیدی : استرپتوکوکوس پیوژنز ،تیپemm ، اریترومایسین ، iMLSB ، cMLSB

آدرس مقاله:
جعفرپور م، ناظمی ع ، میرزایی ا ، فرزامی حق ر. " فراوانی تیپ emm و فنوتیپ های مقاومت به اریترومایسین در استرپتوکوکهای گروه A جدا شده ازگلودرد های چرکی درغرب استان مازندران". مجله علوم آزمایشگاهی پاییز و زمستان ، 1390دوره پنجم(شماره2) :19-15

مقدمه

استرپتوکوکوس گروهA(استرپتوکوکوس پیوژنز) یکی از عوامل واگیری ومرگ ومیر در بسیاری ازنقاط جهان می باشد (1). در کشورهای توسعه یافته فرم حاد وتهاجمی بیماری و التهاب حلق از مهمترین مشکلات بهداشت جامعه می باشند، در حالیکه درکشورهای کمتر توسعه یافته، تب روماتیسمی ، فرم تهاجمی و گلومرولونفریت استرپتوکوکی همراه با عفونت های پوستی عمده ترین اشکال بیماری را تشکیل می دهند(2). درگذشته شناسایی سویه های باکتری برپایه روشهای سرولوژیک ، مبتنی برآنتی ژن های سطحی MوT بوده و بر این اساس سروتایپ های مختلفی از سراسر جهان گزارش شده است (3).

در سالهای بعد تعیین توالی انتهای آمینی ژن emm (ژن کد کننده پروتئین M) جایگزین روشهای قدیمی تر شده و معایبی همانند دسترسی محدود به آنتی بادی های تعیین کننده تیپ و مشکلات تفسیر نتایج را برطرف کرده است(4) علاوه براین مزایایی همانند ارزان بودن، به آسانی اجراء شدن حتی برروی تعداد زیاد نمونه، حساسیت و اختصاصیت بالای آزمایش و تکرارپذیری آن نیز از توانایی های این روش محسوب می گردد. این آنتی ژن پروتئینی یکی از مهمترین مارکرهای اپیدمیو ایمونولوژیک جهت تعیین مشخصات استرپتوکوکوس گروه A می باشد. در این روش با استفاده از دو پرایمر شدیدا حفظ شده قسمت بزرگی از ژن emm تکثیر میگردد(3000-5000bp) تعیین تیپ و تحت تیپ emm براساس ارزیابی 150 نوکلئوتید قابل تغییر کد کننده 50 اسید آمینه انتهای آمینی پروتئین M می باشد. براین اساس بیش از150 تیپ emm در سراسر جهان شناخته شده است.

اطلاعات اندکی درخصوص همه گیری شناسی مولکولی وحساسیت آنتی بیوتیکی استرپتوکوکوس گروهA در ایران وجود دارد . هدف این مطالعه تعیین شیوع تیپ های emm دربین جدایه های حلقی حاصل از گلودرد های چرکی درمناطق غربی استان مازندران طی سالهای 89-90 می باشد و علاوه براین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها به آنتی بیوتیک های مشخصی تعیین شد.

روش بررسی

جداسازی وشناسایی استرپتوکوکوس گروه A

50 جدایه حلقی از167 بیمار مبتلا به گلودرد های چرکی مراجعه کننده به مراکز بیمارستانی مستقر در شمال غرب ایران شامل بیمارستانهای شهید رجایی تنکابن، امام سجاد رامسر و طالقانی چالوس طی سالهای 89-90 شناسایی شدند. تمام این نمونه ها بروی محیط آگار خوندار همولیزبتا داشته، آزمایش حساسیت به باسیتراسین و PYR (کیت Flucka ساخت کشور سوئیس) مثبت بوده و با آنتی سرم های اختصاصی استرپتوکوکوس گروه A اگلوتینه شدند.

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی، با استفاده از دیسک های پنی سیلین، آموکسی سیلین، اریترومایسین، آمپی سیلین، سفکسیم، وانکومایسین و کلیندامایسین خریداری شده ازشرکت (پادتن طب- ایران) توسط روش کربی بایر انجام شد. هاله های اطراف هر یک از دیسک ها با توجه به جدول استاندارد CLSI، بررسی گردید. به علت اهمیت استفاده از اریترومایسین به جای پنی سیلین درافراد حساس(6)، ارزیابی مکانیسم مقاومت به اریترومایسین توسط روش مضاعف دیسکی(7) با دیسک های (15µg) اریترومایسین و (2 µg)کلیندامایسین به فاصله 20 mm کنار هم، درمحیط آگار خوندار، با انکوباسیون 35 درجه سیلیسوس یک شب و5% CO2 انجام گرفت.

جدایه های مقاوم به اریترومایسین و حساس به کلیندامایسین که منطقه ممانعت کنند گی آن کلفت و ضخیم شده، فنوتیپiMLSB (inducible Macrolid,Lincosamide,StreptograminB) جدایه های مقاوم به هر دوآنتی بیوتیک فوق الذکر فنوتیپ cMLSB; (Macrolid, Lincosamide,StreptograminB constitutive) و جدایه های مقاوم به اریترومایسین وحساس به کلیندامایسین که منطقه ممانعت کنند گی آن کلفت و ضخیم نیست ، فنوتیپ M (macrolid efflux) رانشان می دهند .

تکثیر ژن emm

برداشت مقدار مناسبی ازباکتری مثبت در آزمایشات بیوشیمیایی (یک لوپ کامل) و تهیه سوسپانسیون سلولی در 300µl NaCl 0/085%، قراردادن میکروتیوپ های حاوی باکتری در 70ºC به مدت 15 دقیقه، سانتریفوژ میکروتیوپ ها با ماکزیمم سرعت(14000 rpm در دقیقه) و دور ریختن مایع رویی، سوسپانسیون مجدد رسوب سلولی در50µl بافر TE (10 mM Tris و EDTA 1 mM و pH 8) و 10µl موتانولیزین (3000units/ml) و 2µl هیالورونیداز، انکوباسیون میکروتیوب ها در C 37 به مدت 30 دقیقه، قراردادن میکروتیوپ ها در C 100 به مدت 10 دقیقه. سپس 5µl از DNA استخراج شده با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن emm و مطابق برنامه زمانی و دمائی پیشنهادی Montes و همکاران امپلیفیه شدند(5).

1)TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA
2) GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT

تیپ بندی توالی های emm

محصولات PCR با استفاده ازپرایمر شماره 1 توسط شرکت ماکروژن کره تعیین توالی شدند. برنامه BLAST2.0 (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ،قابل دسترسی در پایگاه (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) جهت مقایسه توالی های DNA با توالی های منتشرشده در بانک ژنی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین تیپ و تحت تیپ ، حداقل 240 باز اولیه حاصل از تکثیر پرایمر 1یا 2 emm sec در جایگاه اختصاصی پیش فرض تیپ جستجو شد، بدنبال تطابق کامل (180/180) توالی وارد شده با داده های اختصاصی تیپ و یا شباهت کامل بازهای 180-31 با اختلاف 3 و یا کمتر در بازهای 30-1 ، سویه وتحت سویه مشخص گردید.

یافته ها

50 ایزوله بخوبی تعیین توالی شده و همه آنها در تجزیه و تحلیل توالی یابی ناحیه emm، شباهت داشتند. 4تیپ مختلف شناسایی شد. از میان آنها emm5 در 26 مورد شناسائی شد(52%) و فراوانترین تیپ بود و بدنبال آن emm12 با 12 مورد(24%) و mm79 وemm86 با فراوانی یکسان 6 مورد (هر کدام 12%) شناسائی شدند(جدول1).

همه آنتی بیوتیک های دارای حلقه بتا لاکتام ، از رشد جدایه های فوق ممانعت کردند، در صورتیکه 18% از جدایه ها (9 از50) مقاوم به اریترومایسین بودند. شایع ترین فنوتیپ مقاوم cMLSB(66,6%) و بدنبال آن فنوتیپ M (33,3%) بوده، درحالیکه هیچکدام از جدایه ها فنوتیپ iMLSB را نشان ندادند. 3 مورد از 9 جدایه مقاوم به اریترمایسین (33,3%) به کلیندا مایسین حساس بودند(جدول2).

جدول 1 : توزیع تیپ های مختلف emm جدایه های استرپتوکوکوس پیوژنز در شمال ایران

تیپ emm	تعداد (درصد)ایزوله ها
5	26(52%)
12	12(24%)
79	6(12%)
86	6(12%)

جدول 2: تعیین فنوتیپ های مقاومت به اریترومایسین در نمونه های استرپتوکوکوس پیوژنز جدا شده از بیماران در شمال ایران

کل جدایه ها(50 ایزوله)	فنوتیپ مقاومت به اریترومایسین(9مورد)	
فنوتیپM	cMLSB	iMLSB
3	6	0
(حساس به کلیندامایسین)	(مقاوم به کلیندامایسین)	

بحث

مطالعات همه گیری شناسی توزیع تیپ های emm استرپتوکوکوس گروه A درکشور و یا ناحیه خاصی ازآن بواسطه تغییراتی که درهمه گیری شناسی استرپتوکوکوس گروه A رخ می دهد ، اهمیت زیادی پیدا کرده است، علاوه براین داده های حاصل از این مطالعات، جهت ساخت وتوسعه واکسن چند ظرفیتی برای پیشگیری ازعفونتهای استرپتوکوکی گروه A ضروری می باشد(8)

مشخص شده که روش مبتنی برتعیین توالی ژن emm ازویژگی وصحت بالایی جهت تیپ بندی استرپتوکوکوس گروه A برخوردار می باشد(4) مطالعه ای در خصوص همه گیری شناسی مولکولی استرپتوکوکوس گروه A درایران گزارش نشده است ولی درمطالعه مشابه ای در برزیل برروی نمونه های دهانی حلقی، برجسته ترین تیپ های شناخته شده emm22 و emm1بوده ،که با نتایج حاصل از مطالعه ما متفاوت می باشد(4) علاوه بر این نتایج حاصل از مطالعات ما اختلافات آشکاری را با نتایج گزارش شده درسایر نقاط جهان نشان میدهد. بطوریکه شایع ترین تیپ های گزارش شده از موارد حلقی در قاره آسیا به ترتیب emm44 وemm12 وemm75، درقاره آفریقا emm75، emm12 وemm3 و درکشورهای پیشرفته اقتصادی emm12 وemm1 وemm4 ، درآمریکای لاتین emm1 وemm12 وemm3 وemm22 ، دراسترالیا ونواحی پاسیفیک emm 5 وemm11 وemm9 ودرکشورهای شرق میانه emm1 وemm12 می باشند(2, 10, 11) دراین مطالعه شاخص ترین تیپ های شناخته شده به ترتیبemm5 وemm12 وemm79 و emm86بودند، که mm12 تقریبا در اکثر نقاط جهان وجود دارد و تیپ 5 در نواحی استرالیا و اقیانوسیه دارای شیوع بالائی می باشد. ازویژگی های برجسته این مطالعه حضور سروتیپ emm86 ازموارد فارنژیت بوده که در هیچکدام ازمطالعات مشابه انجام شده در سایر نقاط دنیا گزارش نشده است.

مقاومت آنتی بیوتیکی یکی ازمهمترین معضلات در مدیریت مبتلایان به بیماری های عفونی است. خوشبختانه در طی هفت دهه اخیر حساسیت این باکتری به پنی سیلین، بدون هیچ گونه علت شناخته شده ای تغییر نکرده است(13) ولی افزایش مقاومت دارویی به اریترومایسین درسه دهه گذشته افزایش چشم گیری داشته است(7) که با مطالعه ما (18% موارد) مطابقت دارد واین امر شاید به دلیل مصرف بی رویه ونابجای این آنتی بیوتیک باشد.

نتیجه گیری

به عنوان یک نتیجه گیری کلی، یافته های این تحقیق اولین گزارش تیپ بندی استرپتوکوکوس گروه A جدا شده از موارد حلقی درغرب استان مازندران ،کشورایران است که حضور جمعیت نامتجانسی از استرپتوکوکوس گروه A(4تیپ) را نشان می دهد که از میان آنها پدیدار شدن تیپ emm86 این باکتری از نمونه های حلقی دارای اهمیت می باشد.

References

1-Lakshmana GowdaK,JohnMelbinJ,PatilSA,and etal. *Prevalence of emm types of Group A streptococci recoveredfrom school children and hospital patients in Bangalore City,India.Word* J Microbiol Biotechnol.2010; 27:319-323.

2-Steer AC, Law I, Matatolu L , Beall BW, Carapetis JR. Global emm *type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development.Lancet Infect Dis* . 2009; 9:611-616.

3-Colman G, Tanna A, Efstratiou A, Gaworzewska E.T. *The serotypes of Streptococcus pyogenes present in Britain during 1980–1990 andtheir association with disease*. J .Med. Microbiol . 1993; 39:165– 178.

4-Beall B , Facklam R , Thompson T. *Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci*. *J.* Clin. Microbiol. 1996 34: 953–958.

5-Montes M,Ardanuy C, Tamayo E , etal. *Epidemiological and molecular analysis of Streptococcu spyogenes isolates causing invasive disease in Spain(1998–2009): comparison with non-invasive isolates*.EurJClinMicrobiolInfectDis.2011;30:1295-1302.

6-Gerber MA, Antibiotic resistant in group A streptococci,pediart. Clin Nam 1995;42:539-551.

7-Seppala H, Nissinen QY,Huovinen P. *Three different phenotypes of erythromycin- resistance Streptococcus pyogenes in Finland*.J Antimicrob Chemother .1993 ;32:885-891.

8-Dale JB , Penfound T , Chiang EY , Long V , Shulman ST , Beall B. *Multivalent group A streptococcal vaccine elicits bactericidal antibodies against variant M subtypes* Clin. Diagnost. Lab. Immunol. 2005; 12: 833–836.

9-Freshi S, Alencar R , Higa F. *Identification of group A beta hemolytic streptococcus strains in Brazil*. International Congress Series.2006: 34-37

10-Efstratiou A . Group A *streptococci in the 1990s*. J. Antimicrob. Chemother. 2000;45:3– 12.

11-Eisner A, Leitner E, Gebhard F, Kessler HH,Marth E. *Prevalence of emm types and antibiotic resistance of group A streptococci in Austeria. Diagnosis Micobiology and Infection Disease*. 2006; 55:347-350.

12-Shulman S , Tanz R.R , Kabat W, Kabat K , Cederlund E , Patel D , Li Z , Sakota V , Dale JB , Beall B. *US Streptococcal Pharyngitis Surveillance Group, Group A streptococcal pharyngitis serotype surveillance in North America. 2000–2002*. Clin. Infect. Dis. 2004;39 : 325–332.

13-GraciaM,DiazC,*Coronelp.Antimicrobialsusceptibilityof streptococcus pyogenes incentral, eastern and Baltic european countries*.Diaqn Microbiol infect Dis. 2009 ; 64:52-56.