ORIGINAL ARTICLE

Isolation and Detection of Alloiococcus Otitidis in Children with Otitis Media with Effusion Using Culture and PCR Methods

Farzaneh Gharibpour[1],
Seyed Sajjad Khoramrooz[2],
Akbar Mirsalehian[3],
Mohammad Emaneini[3],
Fereshteh Jabalameli[3],
Davood Darban-Sarokhalil[4],
Asghar Sharifi[1],
Mehdi Mirzaii[5]

[1] School of veterinary Mrdicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2] Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
[3] Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Department of Microbiology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[5] Faculty of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

(Received January 22, 2013 ; Accepted May 5, 2013)

Abstract

Background and purpose: Otitis media with effusion (OME) is one of the major childhood diseases. Alloiococcus otitidis as an agent of OME is a fastidious organism. The aim of this study was to determine the prevalence of *A. Otitidis* in children with OME using culture and PCR methods.

Materials and methods: A total of 65 specimens of middle ear effusions were obtained from 50 children diagnosed with OME under general anesthesia in operation room. PCR and bacterial culture methods were used for detection and isolation of *A. otitidis*. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates was determined by disk agar diffusion (DAD) method.

Results: The patients included 45 male and five female. *A. otitidis* were isolated from 15 (23.07%) cases using culture and 26 (40%) patients through PCR. All the isolates were susceptible to amoxicillin and amoxicillin/ clavulanate. Whereas most of the isolates were resistant to Macrolides such as Erythromycins and Azithromycin.

Conclusion: *A. otitidis* is one of the most important bacterial agents of OME in Iranian children. Considering the antibiogram susceptibility pattern, we can propose these antibiotics as the drugs of choice for the treatment of OME patients. Also, this study showed that PCR is more sensitive than culture method for identification of this bacterium.

Keywords: Otitis media with effusion (OME), Alloiococcus otitidis, culture, PCR

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(100): 52-60 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۰ اردیبهشت سال ۱۳۹۲ (۶۰-۵۲)

جداسازی و شناسایی آلویوکوکوس اوتیتیدیس در کودکان مبتلا به عفونت گوش میانی همراه با ترشحات با روش کشت و PCR

فرزانه غریب پور[۱]
سید سجاد خرم روز[۲]
اکبر میرصالحیان[۳]
محمد ایمان عینی[۳]
فرشته جبل عاملی[۳]
داود دربان ساروخلیل[۴]
اصغر شریفی[۲]
مهدی میرزایی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: التهاب گوش میانی همراه با ترشحات Otitis media with effusion (OME) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های دوران کودکی است. از آن‌جا که آلویوکوکوس اوتیتیدیس به عنوان یکی از عوامل باکتریایی این عفونت، به علت سخت رشد بودن به میزان کمی شناسایی شده است. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع این باکتری کودکان مبتلا به (OME) با روش کشت و PCR بود.

مواد و روش‌ها: ۶۵ نمونه کلینیکی ترشحات گوش میانی از ۵۰ کودک مبتلا به عفونت گوش میانی همراه با ترشحات (OME) جمع آوری شد. نمونه ترشحات گوش میانی در اتاق عمل توسط پزشک متخصص جمع‌آوری و سپس بخشی از نمونه‌ها درآزمایشگاه در محیط کشت جهت رشد باکتری‌ها تلقیح و بر روی بخشی دیگر از نمونه‌ها واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR انجام شد. باکتری‌های جداشده نیز از لحاظ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بررسی شدند.

یافته‌ها: از ۵۰ بیمار مبتلا به OME، ۴۵ نفر پسر و ۵ نفر دختر بودند. آلویوکوکوس اوتیتیدیس با روش کشت در ۱۵ مورد (۲۳/۰۷ درصد) و با روش PCR در ۲۶ مورد(۴۰ درصد) از ۶۵ نمونه ترشحات گوش میانی شناسایی شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که تمام ایزوله ها به آموکسی سیلین، آموکسی سیلین/ کلاونات، حساس هستند در حالی‌که اغلب ایزوله ها (۸۶/۶ درصد) به ماکرولیدها مثل اریترومایسین و آزیترومایسین مقاوم بودند.

استنتاج: آلویوکوکوس اوتیتیدیس یکی از عوامل مهم باکتریایی جدا شده از ترشحات گوش میانی در ایران است و با توجه به الگوی حساسیت میکروبی می‌توان پیشنهاد کرد که آموکسی سیلین و آموکسی سیلین/ کلاولانات در درمان مورد استفاده قرار بگیرد. همچنین روش PCR در مقایسه با کشت حساسیت بالاتر در شناسایی باکتری دارد.

واژه های کلیدی: عفونت گوش میانی با ترشحات، آلویوکوکوس اوتیتیدیس، کشت PCR

مقدمه

التهاب گوش میانی به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های دوران کودکی، سبب افزایش مراجعه کودکان به پزشک و مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها در این سنین می‌شود. التهاب گوش میانی Otitis Media به دو

مؤلف مسئول: سیدسجاد خرم روز- یاسوج: خیابان دکتر قربانعلی جلیل، جنب بیمارستان امام سجاد، دانشکده پزشکی E-mail: Khoramrooz@gmail.com
۱. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
۳. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز،کرج، ایران
۵. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۱۱/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۱/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۲/۱۵

زیر گروه اصلی التهاب حاد گوش میانی Acute (AOM) otitis media و التهاب گوش میانی همراه با ترشحات Otitis media with effusion (OME) تقسیم می‌شود. AOM به عنوان عفونت گوش میانی مطرح است که با نشانه ها و علائم التهاب حاد گوش میانی همراه است(۱). درموارد OME، ترشحات به مدت ۳ ماه یا بیش‌تر پایدار می ماند که التهاب گوش میانی مزمن یا التهاب گوش میانی همراه با ترشحات نامیده می‌شود(۲). بیش از ۸۵-۵۰ درصدکودکان در سنین ۵-۳ سالگی حداقل یک بار به التهاب حاد گوش میانی مبتلا می‌شوند. موارد عود التهاب گوش میانی در ۴۰ درصد از کودکان مبتلا، دیده می‌شود و در نهایت ۲۰ درصد ازکودکان دچار عود عفونت، پایداری ترشحات در گوش میانی را تجربه می کنند(۳). به طور طبیعی فضای گوش میانی دارای مقدار کمی فشار هوای منفی نسبت به قسمت محیط بیرونی است و این فشار منفی به صورت دوره‌ای با باز کردن شیپور استاش در طی خمیازه کشیدن و جویدن کاهش می‌یابد. نقص در عملکرد شیپور استاش به عنوان یکی از مکانیسم‌های اولیه در پیدایش التهاب گوش میانی است(۴). به علت کوتاه‌تر بودن شیپور استاش بچه‌های جوان، محتویات نازوفارنکس بیشتر دچار رفلاکس می‌شوند. اختلال در عملکرد شیپور استاش در طی عفونت‌های فوقانی تنفسی در بچه‌های کم‌تر از ۲ سال در مقایسه با بچه‌های بزرگ‌تر بسیار شدیدتر است و بچه‌های سنین پائین‌تر به عنوان افراد مستعد AOM در طی عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی محسوب می گردند. فشار منفی در فضای گوش میانی این امکان را به وجود می‌آورد که محتویات نازوفارنکس در طی باز شدن موقتی شیپور استاش به درون گوش میانی وارد شوند(۳). درصد مثبت کشت باکتریایی نمونه‌های گوش میانی به روش مطالعه، نحوه نمونه‌گیری و همچنین حساسیت تکنیک‌های میکروبی در تشخیص باکتری‌ها بستگی دارد. در اغلب مطالعات باکتری‌های پاتوژن شایع جدا شده از گوش میانی شامل استرپتوکوک پنومونی، هموفیلوس انفلوانزا غیر قابل تیپ بندی و موراکسلا کاتارالیس هستند(۵). یکی دیگر از باکتری‌های عامل عفونت‌های گوش میانی آلویوکوکوس اوتیتیدیس است و اطلاعات موجود در ارتباط با این باکتری اندک است به طوری که این باکتری نخستین بار در سال ۱۹۸۹ به وسیله Faden و همکاران شناسایی شد(۶). فادن و همکاران در سال ۱۹۸۹ با مطالعه بر روی ۲۰۰ کودک مبتلا به التهاب گوش میانی یک باکتری منحصر به فرد را در مایع گوش میانی آن‌ها جداسازی کرد که اغلب این بچه‌ها بین ۱۰ ماه تا ۳۴ ماه سن داشتند. این ارگانیسم منحصر به فرد در روی محیط کشت جامد بعد از۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رشد آرامی داشت. بر روی محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار همراه با خون گوسفند، کلنی‌های کوچک آلفا همولیتیک تولید می‌کرد. در کشت مجدد ایزوله‌ها نیز خصوصیات مشابهی یافت شد. در رنگ‌آمیزی گرم ارگانیسم‌ها به صورت کوکسی‌های گرم مثبت و درشت بودند و اغلب به صورت دوتایی یا چهارتایی در زیر میکروسکوپ دیده می‌شدند. ارگانیسم در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد یا در محیط‌های بیهوازی قادر به رشد نیست. این باکتری‌ها به طور یکسان کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند. بر اساس توالی باکتری‌ها و همچنین به دلیل تمایز فنوتیپی و فیلوژنتیکی ارگانیسم ناشناخته، پیشنهاد شد که این ارگانیسم در درون یک جنس جدید به نام آلویوکوکوس (Alloiococcus) و به عنوان Alloiococcus otitis در نظر گرفته شود(۷). گونه آلویوکوکوس اوتیتیس (Alloiococcus otitis) که به وسیله Aguirre و Collins نام‌گذاری شد به گونه آلویوکوکوس اوتیتیدیس (Alloiococcus otitidis) تغییر نام پیدا کرد(۷،۸). بدین ترتیب نام جدید آلویوکوکوس اوتیتیدیس به وسیله Greveitz بر اساس کد باکتری شناسی پیشنهاد و تأیید شد(۹).

آلویوکوکوس اوتیتیدیس برای نخستین بار با روش کشت از مایع گوش میانی (MEE) کودکان مبتلا به OME جداسازی شد. این باکتری از مایع گوش میانی

۵-۳ درصد از کودکان جداسازی شد(۶). با استفاده از روش مولکولی PCR میزان شیوع این باکتری خیلی بیش‌تر و بالاتر بود به طوری‌که در ۴۱-۱۰ درصد از مایع گوش میانی بچه‌ها این باکتری با روش PCR شناسایی شد(۱۰، ۱۱).

مطالعات نشان دادند که آلویوکوکوس اوتیتیدیس سبب القاء تحریک لنفوسیت T مهارکننده $CD8^+$ سایتوتوکسیک می‌شود و در شرایط آزمایشگاهی سبب القاء IL-8 و IL-12 می‌گردد(۱۳،۱۲). میزان بالای شیوع آلویوکوکوس اوتیتیدیس در مایع گوش میانی افراد مبتلا به OME و همچنین توانایی تحریک کنندگی سیستم ایمنی آن بیانگر خاصیت بیماریزایی این باکتری در گوش میانی است(۷). آلویوکوس اوتیتیدیس یک باکتری سخت رشد است و برای جداسازی آن با روش کشت از نمونه‌های کلینیکی بیماران، به زمان زیادی بین ۱۴-۷ روز نیاز است، بر این اساس اغلب مطالعات قبلی فقط با روش مولکولی PCR میزان شیوع باکتری را بررسی کرده‌اند و یا این‌که با روش کشت قادر به جداسازی باکتری نبوده اند و به همین علت در اغلب این مطالعات تست حساسیت آنتی بیوتیکی انجام نشده است(۱۶-۱۳).

مطالعات کمی در رابطه با بررسی شیوع آلویوکوکوس اوتیتیدیس در عفونت گوش میانی با ترشحات OME با روش PCR وکشت صورت‌گرفته است(۱۱،۱۰،۷،۶). با توجه به این‌که مطالعات انجام شده در این زمینه محدود است هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع آلویوکوکوس اوتیتیدیس در کودکان مبتلا به عفونت‌های گوش میانی همراه با ترشحات (OME) با روش کشت و PCR است و به علاوه بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از بیماران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک مطالعه توصیفی (Cross sectional) می‌باشد. نمونه‌های بالینی مورد استفاده در این مطالعه، از بیماران مراجعه کننده به اتاق عمل گروه گوش، حلق و بینی بیمارستان های امام خمینی و امیر اعلم (دو تا از بیمارستان‌های آموزشی تابعه دانشگاه علوم پزشکی تهران) در فواصل سال ۱۳۹۰- ۱۳۸۹ جمع‌آوری شدند. این مطالعه بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به عفونت گوش میانی که بین ۶ ماه تا ۱۲ سال سن دارند صورت گرفت، تشخیص عفونت گوش میانی و التهاب گوش میانی همراه با ترشحات OME با توجه به علایم بالینی و مشخصات توسط پزشک متخصص گوش، حلق و بینی انجام شد. ابتدا کانال گوش خارجی بیماران با بتادین ضد عفونی گردید و سپس با مقدار فراوان نرمال سالین شست و شو داده شد. در هنگام عمل جراحی و بر روی پرده صماخ توسط پزشک برش کوچکی صورت گرفت و در صورت وجود مایع گوش میانی نمونه‌گیری انجام شد، این فرآیند توسط پزشک متخصص و با استفاده از وسیله Tyms-Tab صورت گرفت. سپس نمونه‌ها طی ۲ ساعت به بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل شد و بلافاصله کشت گردیدند. اطلاعات مورد نیاز هر فرد بر اساس پرونده بیمار و یافته های بالینی در پرسشنامه جداگانه وارد گردید.

نیمی از حجم مایع گوش میانی جهت کشت و تشخیص میکروب‌شناسی به کار رفت. و نیمی دیگر جهت انجام کارهای مولکولی در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد. برای جداسازی اولیه آلویوکوکوس اوتیتیدیس از محیط کشت آگار خوندار (خون گوسفند) ۵ درصد با پایه مولرهینتون آگار استفاده شد. بعد از کشت دادن نمونه بالینی به روش جداسازی در روی محیط کشت مورد نظر، گرم‌خانه گذاری آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن انجام شد، در صورت عدم رشد باکتری‌ها در طی ۷۲ ساعت، محیط‌های کشت به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند و روزانه این محیط‌های کشت جهت بررسی رشد باکتری‌ها مطالعه می‌شدند. در صورت مشاهده رشد، کلنی‌های مورد نظر کشت مجدد داده می‌شدند و مطالعات فنوتیپی زیر انجام شد.

۱- رنگ‌آمیزی گرم برای مشاهده مرفولوژی باکتری‌ها: آلویوکوکوس اوتیتیدیس به صورت کوکسی درشت گرم مثبت به صورت تک تک، دوتایی و چند تایی مشاهده شدند.

۲- تست تولید اسید از گلیسرول: این تست توانایی تولید اسید از گلیسرول را در حضور اریترومایسین نشان می‌دهد. محیط پایه در این تست حاوی ترکیبات آمونیوم دی هیدروژن سولفات ۱ گرم، پتاسیم کلراید ۰/۲گرم، منیزیم سولفات ۰/۲ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم، گلیسرول ۱۰ میلی لیتر، برم کروزل ارغوانی ۰۴/ گرم و آب مقطر ۱ لیتر است. محیط کشت پایه پس از استریلیزاسیون تا ۵۰-۴۵ درجه خنک می‌شود و سپس ۱ میلی لیتر اریترومایسین اضافه می‌شد. نحوه تهیه محلول اریترومایسین به این صورت است که ۴ میلی‌گرم پودر اریترومایسین در ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل می‌شود و سپس با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر می‌رسد و سپس با فیلتراسیون استریل می‌شد و در نهایت ۱ میلی لیتر از محلول نهایی اریترومایسین به یک لیتر از محیط پایه ساخته شده اضافه می‌گیرد. به هر لوله استریل حدود ۱۰-۷ سی‌سی محیط کشت اضافه می‌شود و پس از تلقیح چند کلنی باکتری در محیط کشت، انکوباسیون به مدت ۸-۵ روز در دمای ۳۷ درجه صورت می‌گیرد. تست مثبت با تغییر رنگ ارغوانی اولیه محیط کشت به رنگ زرد صورت می‌گیرد.

۳- روش مولکولی: باکتری‌های مشکوک به آلویوکوکوس اوتیتیدیس با استفاده از روش مولکولی مورد تأیید نهایی واقع شدند، ابتدا با استفاده از روش جوشاندن DNA باکتری استخراج شد و سپس با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن 16srRNA با روش PCR ردیابی گردید. در صورت مشاهده محصولات PCR به اندازه ۲۸۴ جفت باز احتمال حضور آلویوکوکوس اوتیتیدیس در نظر گرفته می‌شد و در نهایت محصول PCR جهت تأیید نهایی تعیین توالی گردید. واکنش‌های ۵۰ میکرولیتری PCR این ژن‌ها آماده شد و سپس محصولات واکنش‌های PCR همراه با پرایمرهای اختصاصی برای انجام سکانسینگ هر دورشته پیرو و پیشرو به کشور کره و شرکت Macrogen(Seoul,South Korea) ارسال شد. در مرحله بعد توالی های ذکر شده در پایگاه NCBI بلاست شد و براساس سویه‌های کنترل در بانک ژن تشخیص قطعی باکتری صورت گرفت. استخراج DNA از ترشحات گوش میانی و انجام PCR: استخراج DNA از مایع گوش میانی با استفاده از کیت (Invitek GmbH, Berlin, and Germany) RTP® Bacteria DNA Mini Kit و براساس دستورالعمل شرکت سازنده آن انجام شد. جهت بررسی حضور آلویوکوکوس اوتیتیدیس در نمونه ترشحات گوش میانی روش PCR بر روی DNA استخراج شده از نمونه‌های بالینی صورت گرفت. برای انجام واکنش PCR از سویه آلویوکوکوس اوتیتیدیس جدا شده از نمونه‌های بالینی مطالعه حاضر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد که با روش تعیین توالی تأیید شده بودند. برای این منظور از پرایمرهای ژن هدف 16SrRNA باکتری‌های ذکر شده که قبلا طراحی شده بودند استفاده گردید(۱۴). برای به دست آوردن مقادیر مناسب ترکیبات مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز گرادیانتی از ترکیبات مختلف قرار داده شد. پس از به دست آمدن مقادیر مناسب مستر میکس برای هر واکنش تهیه و استفاده شد. سیکل دمایی و همچنین مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش PCR در جداول شماره ۱و۲ ارائه شده است.

جهت انجام الکتروفورز از آگارز ۱درصد ساخته شده با بافر TBE, X ۰/۵، استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول تکثیر شده PCR با ۲ میکرولیتر Lodding dye مخلوط گردید و داخل چاهک ژل قرار گرفت. برای الکتروفورز از ولتاژ ۱۰۰میلی ولت استفاده گردید و مدت زمان آن یکساعت بود. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل به مدت ۳۰ دقیقه در اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰µg/ml قرارگرفت و مشاهده باندها با استفاده از دستگاه Gel Documentation صورت گرفت. این مطالعه به وسیله کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تهران تأیید شده است.

جدول شماره ۱: سیکل دمایی واکنش PCR برای شناسایی ژن 16SrRNA باکتری آلویوکوکوس

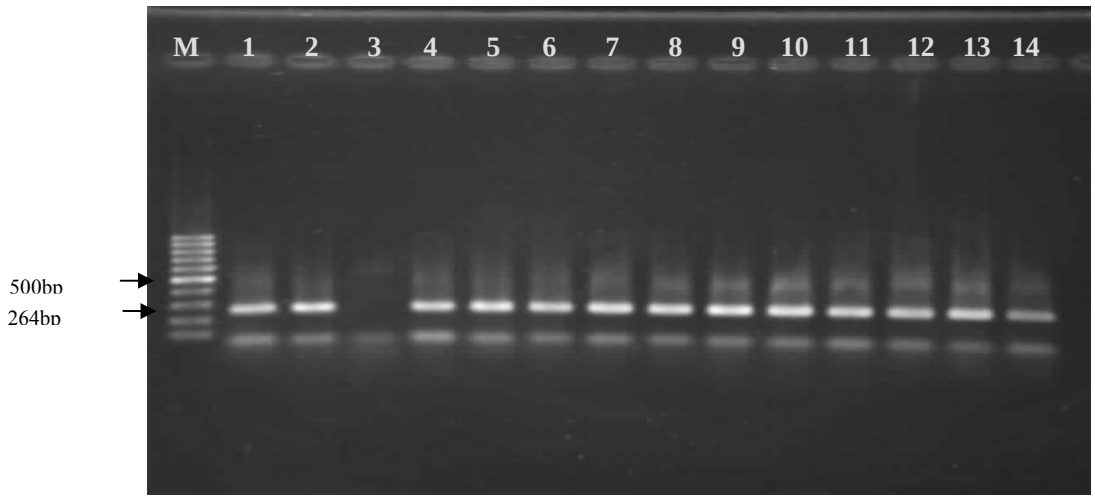
Time (s)	Temperature(c)		
۳۰۰	۹۴	First Denaturation	
۴۵	۹۴	Denaturation	Loop: 30
۴۵	۵۹	Annealing	
۴۵	۷۲	Extension	
۳۰	۷۲	Final Extension	

جدول شماره ۲: مقادیر مناسب ترکیبات مورد استفاده برای یک واکنش PCR

مواد / غلظت و حجم	غلظت	حجم
PCR Buffer 10X	۱ X	۵ µL
Taq Pol 5 u/µL	۱/۵	۰/۲ µL
MgCl 25 mM	۲/۵ µM	۵µL
dNTP Mix 10mM	۰/۲ µM	۱ µL
A. otitidis R	۰/۵ µM	۱ µL
A. otitidis F	۰/۵ µM	۱ µL
DNA	۱۵ µg/ml	۸µL
dH2O	-	۲۸/۸ µM
Final volume	-	۵۰ µL

یافته‌ها

از ۵۰ بیمار مبتلا به التهاب گوش میانی همراه با ترشحات ۴۵ پسر بچه و ۵ دختر بچه بودند. محدوده سنی افراد مراجعه کننده بین ۱۹ماه تا ۱۲ سال با میانگین سنی ۶/۴ سال بود، از مجموع کل بیماران ۳۹ بیمار از بیمارستان امیر اعلم و ۱۱ بیمار از بیمارستان امام خمینی بودند. مطالعه بالینی بیماران نشان داد که تمام افراد شرکت کننده در مطالعه بیش از ۳ ماه پایداری ترشحات در گوش میانی داشته‌اند و تمام افراد مستعد اوتیت گوش میانی بودند. فراوانترین نوع ترشحات گوش در بیماران، ترشحات موکوسی (۲۱ نفر)، ترشحات سروزی- موکوسی (۱۲ نفر)، ترشحات سروزی (۱۰ نفر) و ترشحات موکوسی چسبنده (۷ نفر) بودند. کلیه بیماران تا دو هفته قبل از نمونه‌گیری هیچ‌گونه سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک نداشتند. همچنین هیچ‌کدام از بیماران آدنوئیدوکتومی یا تیمپانوکتومی قبلی نداشتند. تعداد کل نمونه‌های بالینی مایع گوش میانی ۶۵ نمونه بود که ۳۵ بیمار داری ترشحات یک‌طرفه (ترشح در یکی از گوش‌ها) و ۱۵ بیمار دارای ترشحات دو طرفه بودند. میزان جداسازی آلویوکوکوس اوتیتیدیس با روش کشت ۱۵ مورد (۲۳/۰۷ درصد) بود که تمام سویه‌های جدا شده بعد از تشخیص فنوتیپی، با روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفته و بعد با تعیین توالی محصولات PCR به عنوان آلویوکوکوس اوتیتیدیس تأیید شدند. با استفاده از روش مولکولی PCR حضور باکتری‌ها در مایع گوش میانی بررسی شد که آلویوکوکوس اوتیتیدیس در ۲۶ مورد (۴۰ درصد) از ۶۵ نمونه ترشحات گوش شناسایی شد (تصویر شماره ۱).



ستون M: DNA مارکر، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۳: کنترل منفی

تصویر شماره ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن 16SrRNA باکتری آلویوکوکوس اوتیتیدیس

الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ۱۵ سویه آلویوکوکوس اوتیتیدیس نسبت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین، آموکسی سیلین، آموکسی سیلین/کلاونات، اریترومایسین، کلاریترومایسین، آزیترومایسین، کلیندامایسین، کوتریموکسازول، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و سفتریاکسون نشان داد که تمام ایزوله‌ها به آموکسی سیلین، آموکسی سیلین/کلاونات، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و سفتریاکسون حساس بودند، در حالی‌که ۱۳ ایزوله (۸۶ درصد) به اریترومایسین، آزیترومایسین و کلاریترومایسین مقاوم بودند.

بحث

از میان ۵۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان‌های امیراعلم و امام خمینی غالب بیماران مربوط به بیمارستان امیراعلم بودند که به علت این‌که این بیمارستان مرکز مهم گوش، حلق و بینی در تهران است طبیعی است و از طرف دیگر بیماران پسر مراجعه کننده در مقایسه با دختربچه ها، بیش‌تر بودند که نشان دهنده شیوع بیش‌تر این بیماری در پسربچه هاست که شاید به نوعی نشان دهنده تفاوت در وضعیت پوشش و مراقبت بیش تر دختربچه‌ها توسط والدین باشد. در ارتباط با حضور باکتری در گوش بیماران بر اساس نوع ترشحات گوش میانی مثل ترشحات موکوسی ، ترشحات سروزی-موکوسی، ترشحات سروزی و ترشحات موکوسی چسبنده اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر آلویوکوکوس اوتیتیدیس در ۱۵ مورد از ۶۵ نمونه گوش میانی (۲۳/۰۷ درصد) از ترشحات گوش میانی با روش کشت جداسازی شد. این میزان شیوع، از گزارشات ارائه شده در استرالیا (۴۰ درصد) و اسپانیا (۴۸/۲ درصد) کم‌تر بوده(۱۷،۱۵)، در حالی‌که در مقایسه با ایالات متحده (۵، ۴/۷ درصد) بیش‌تر است(۱۸،۶). گزارشی در ارتباط با جداسازی آلویوکوکوس اوتیتیدیس از کشورهای همسایه و همچنین در قاره آسیا برای مقایسه میزان شیوع وجود ندارد. با استفاده از روش PCR بر روی ۶۵ نمونه بالینی از ترشحات گوش میانی ۵۰ بیمار مورد مطالعه مشخص شد که آلویوکوکوس اوتیتیدیس در ۲۶ مورد (۴۰ درصد) شناسایی شده است که این نتیجه مشابه گزارشی از کشور فنلاند(۱۰) است، در حالی‌که بیش‌تر از میزان شیوع ۱۸/۵ درصد تا ۲۸/۱ درصد در کشورهای ترکیه، فنلاند، ژاپن و استرالیا و کم‌تر از شیوع گزارش شده از کشور انگلستان (۵۰) درصد و ژاپن (۶۰/۵) درصد است(۱۹،۱۶،۱۳،۱۰). این تفاوت در میزان جداسازی با کشت و شناسایی این باکتری با PCR در بین این کشورها ممکن است بیانگر تفاوت‌های منطقه‌ای کشورهای مذکور و نقش آن در میزان شیوع این باکتری باشد. در مجموع با روش کشت و PCR این باکتری در ۲۶ مورد (۴۰ درصد) شناسایی شد به طوری‌که تمام ۱۵ مورد کشت مثبت، PCR آن‌ها هم نتیجه مثبت نشان داد و ۱۱ مورد دیگر فقط در تست مولکولی نتیجه مثبت را نشان دادند، که نشان دهنده این است که روش مولکولی مثل PCR در شناسایی ارگانیسم حساسیت بالاتری نسبت به کشت دارد. به نظر می‌رسد آلویوکوکوس اوتیتیدیس نقش مهمی در اتیولوژی عفونت‌های گوش میانی به همراه ترشحات دارد و میزان شیوع آن‌ها در نقاط مختلف متفاوت می‌باشد. ممکن است تفاوت های مشاهده شده در مطالعات مختلف ناشی از تفاوت در برنامه‌های بهداشتی و سلامتی، فرایندهای کنترل و درمان عفونت‌های گوش میانی و همچنین تفاوت‌های جغرافیایی باشد. پراکنش آلویوکوکوس اوتیتیدیس در همراهی با خصوصیات بالینی بیماران (نوع ترشحات: سروزی، موکوسی، سروزی موکوسی) بررسی و آنالیز شد و اختلاف معنی‌داری در جداسازی باکتری از بیماران با علایم کلینیکی متفاوت یافت نشد.

در حال حاضر یکی از مشکلات اساسی در بیماران مبتلا به التهاب گوش میانی همراه ترشحات انتخاب

الگوی مناسبی از آنتی‌بیوتیک‌هاست که بتوانند علیه باکتری‌های غالب که در پاتوژنز این بیماری نقش دارند مؤثر باشند. مهم‌ترین داروهایی که در درمان عفونت‌های گوش میانی به عنوان داروی انتخاب اول یا انتخاب دوم کاربرد دارند شامل بتالاکتام‌های خوراکی مانند آموکسی‌سیلین و آموکسی‌سیلین/کلاولانات و همچنین سفالوسپورین‌ها می‌باشد(۲۰). سایر داروهای مورد استفاده شامل آزیترومایسین، کلاریترومایسین و تری متوپریم/ سولفامتوکسازول هستند(۲۱). فلوروکینولون‌ها ممکن است در آینده نقشی را در درمان پاتوژن‌های مقاوم به چند دارو داشته باشد البته تا زمانی که شواهدی مبنی بر ایمن بودن مصرف این داروها در کودکان ارائه نشود، مورد استفاده قرار نمیگیرند(۲۲). تصمیم‌گیری در مورد استفاده از داروهای ضد میکروبی برای انتخاب یک داروی خاص باید بر مبنای سن بیماران، شدت عفونت، مصرف قبلی آنتی‌بیوتیک، داشتن اطلاعات اختصاصی در ارتباط با پراکنش پاتوژن‌ها در مناطق خاص و همچنین دانستن الگوی مقاومت آن‌ها به آنتی بیوتیک های مختلف است. از این رو در این مطالعه حساسیت آلویوکوکوس اوتیتیدیس به آنتی‌بیوتیک های انتخابی با روش دیسک آگار دیفیوژن بررسی شد. بر اساس مطالعات انجام شده تاکنون گزارشات اندکی در ارتباط با بررسی حساسیت ضد میکروبی آلویوکوکوس اوتیتیدیس انجام شده است. به وسیله (Bosley) و همکاران با استفاده از دستورالعمل CLSI برای باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه الگوی حساسیت این باکتری را بررسی کردند و نشان دادند که این باکتری مقاومت بسیار زیادی به تری متوپریم-سولفامتوکسازول و اریترومایسین دارد(۱۸). اما مارتینز و همکاران نشان دادند که تمام ایزوله‌ها به آموکسی سیلین، تتراسایکلین و کوتریموکسازول حساس هستند(۱۷). آشورت اسمیت (Ashhurst-Smith) و همکاران مشاهده کردند که تمام ایزوله های آلویوکوکس به پنی سیلین حساس هستند اما به میزان زیادی به اریترومایسین مقاوم هستند(۱۵). در همراهی با مطالعات انجام شده نتیجه آنتی بیوگرام روی ایزوله‌های مطالعه حاضر نشان داد که تمام ایزوله ها به ونکومایسین، آموکسی سیلین، آموکسی سیلین/ کلاولانات حساس هستند در حالی‌که اغلب ایزوله‌ها (۸۶/۶ درصد) به ماکرولیدها مثل اریترومایسین و آزیترومایسین مقاوم هستند.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که باکتری آلویوکوکوس اوتیتیدیس، به عنوان یکی از عوامل مهم باکتریایی جدا شده از ترشحات گوش میانی در بیماران مبتلا به التهاب گوش میانی همراه با ترشحات OME در ایران است و بررسی الگوی حساسیت میکروبی نشان داد که اغلب ایزوله‌ها به آموکسی سیلین/ کلاولانات و فلوروکینولون ها حساس بودند ولی میزان مقاومت نسبت به ماکرولیدها زیاد بود و می‌توان پیشنهاد کرد که آموکسی سیلین و آموکسی سیلین/ کلاولانات در درمان عفونت‌های گوش میانی قابل استفاده می باشد. همچنین با توجه به این‌که روش مولکولی در مقایسه با کشت موارد بیش‌تری از باکتری را شناسایی کرد حساسیت بالاتر روش PCR را نشان می‌دهد.

در نهایت پیشنهاد می‌شود که در صورت امکان از آنتی‌بیوتیک های آموکسی سیلین و آموکسی سیلین/ کلاولانات در درمان بیماران مبتلا به OME استفاده شود و همچنین در مطالعات آینده نقش سایر باکتری‌های پاتوژن در التهاب گوش میانی بررسی گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه با همکاری گروه میکروب شناسی و گروه گوش، حلق و بینی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است و لازم می‌دانیم از دستیاران محترم تخصصی گروه آموزشی گوش، حلق وبینی بیمارستان‌های امام خمینی و امیر اعلم تشکر به عمل آید. ضمناً هزینه این پژوهش از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به شماره ۹۵۵۸-۳۰-۰۴-۸۸ تأمین شده است.

References

1. American Academy of Pediatrics. Subcommittee on anagement of Acute Otitis Media. Diagnosis and management of acute otitis media. Pediatrics. 2004; 113(5): 1451-1465.
2. Rovers MM, Schilder AG, Zielhuis GA, Rosenfeld RM. Otitis media. Lancet 2004; 363(9407): 465-473.
3. Gould JM, Matz PS. Otitis media. Pediatr Rev 2010; 31(3): 102-116.
4. Bluestone CD, Klein JO. Otitis Media in Infants and Children. 4th ed. Ontario, Canada Hamilton: BC Decker, Inc; 2007.
5. Vergison A. Microbiology of otitis media: a moving target. Vaccine 2008; 26(Supp 7): G5-10.
6. Faden H, Dryja D. Recovery of a unique bacterial organism in human middle ear fluid and its possible role in chronic otitis media. J Clin Microbiol 1989; 27(11): 2488-2491.
7. Aguirre M, Collins MD. Phylogenetic analysis of Alloiococcus otitis gen. nov., sp. nov., an organism from human middle ear fluid. Int J Syst Bacteriol 1992; 42(1): 79-83.
8. Aguirre M, Collins MD. Development of a polymerase chain reaction-probe test for identification of Alloiococcus otitis. J Clin Microbiol 1992; 30(8): 2177-2180.
9. Von Graevenitz A. Revised Nomenclature of Alloiococcus otitis. J Clin Microbiol 1993; 31(2): 472.
10. Hendolin PH, Kärkkäinen U, Himi T, Markkanen A, Ylikoski J. High incidence of Alloiococcus otitis in otitis media with effusion. Pediatr Infect Dis J. 1999; 18(10): 860-865.
11. Hendolin PH, Paulin L, Ylikoski J. Clinically applicable multiplex PCR for four middle ear pathogens. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 125-32.
12. Harimaya A, Fujii N, Himi T. Preliminary study of proinflammatory cytokines and chemokines in the middle ear of acute otitis media due to Alloiococcus otitidis. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2009; 73(5): 677-680.
13. Himi T, Kita H, Mitsuzawa H, Harimaya A, Tarkkanen J, Hendolin P, et al. Effect of Alloiococcus otitidis and three pathogens of otitis media in production of interleukin-12 by human monocyte cell line. FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 29(2): 101-106.
14. Hendolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors JJ. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. J Clin Microbiol 1997; 35(11): 2854-2858.
15. Harimaya A, Takada R, Somekawa Y, Fujii N, Himi T. High frequency of Alloiococcus otitidis in the nasopharynx and in the middle ear cavity of otitis-prone children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2006; 70(6): 1009-1014.
16. Leskinen K, Hendolin P, Virolainen-Julkunen A, Ylikoski J, Jero J.The clinical role of Alloiococcus otitidis in otitis media with effusion. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2002; 66(1): 41-48.
17. Ashhurst-Smith C, Hall ST, Walker P, Stuart J, Hansbro PM, Blackwell CC, et al. Isolation of Alloiococcus otitidis from Indigenous and non-Indigenous Australian children with chronic otitis media with effusion. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 51(1): 163-170.
18. Martınez MI, Macıas AR. Serous Otitis Media in Children: Implication of Alloiococcus otitidis. Otol Neurotol 2008; 29(4): 526-530.

19. Bosley GS, Whitney AM, Pruckler JM, Moss CW, Daneshvar M, Sih T, et al. Characterization of ear fluid isolates of Alloiococcus otitidis from patients with recurrent otitis media. J Clin Microbiol 1995; 33(11): 2876-2880.
20. Guvenc MG, Midilli K, Inci E, Kuskucu M, Tahamiler R, Ozergil E, et al. Lack of Chlamydophila pneumoniae and predominance of Alloiococcus otitidis in middle ear fluids of children with otitis media with effusion. Auris Nasus Larynx. 2010; 37(3): 269-273.
21. Barkai G, Greenberg D, Givon-Lavi N, Dreifuss E, Vardy D, Dagan R. Community prescribing and resistant Streptococcus pneumoniae. Emerg Infect Dis 2005; 11(6): 829-837.
22. Dagan R, Arguedas A, Schaad UB. Potential role of fluoroquinolone therapy in childhood otitis media. Pediatr Infect Dis J 2004; 23(5): 390-398.