BRIEF REPORT

Identification and Detection of Invasive Haemophilus Influenzae Type b Strains in Clinical Samples Using Polymerase Chain Reaction

Somayeh Bagherzadeh Khodashahri[1],
Seyed Davar Siadat[2],
Mohammad Rahbar[3]

[1] MSc Student in Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman Science and Research Branch , Kerman, Iran
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Pasteur Institue of Iran, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Microbiology, Reference Health Laboratories Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

(Received March 4, 2013 ; Accepted Jun 17, 2014)

Abstract

Background and purpose: Haemophilus influenzae type b (Hib), is one of the major causes of bacterial meningitis in children younger than five years of age, especially in countries that immunization against Hib is not conducted. In this study we have determined the serotype, encapsulated Haemophilus influenzae strains isolated from clinical samples by polymerase chain reaction (PCR) method.

Material and Methods: In this study, DNA of H. Influenzae spp was extracted through boiling method. The encapsulated strains were determined by bexA gene primers. The encapsulated strains serotype were then detected using type-specific primer sets "a to f".

Results: From the total of 50 strains of the Haemophilus influenzae isolated from clinical specimen, four strains have shown the bex A gene which all of them were encapsulated and all of four isolates have been determined as type b strains.

Conclusion: It is well shown that H influenzae spp were not detected by routinely culture method in many clinical laboratories. Despite the presence of pathogenic strains of Hib in different clinical specimens, molecular diagnostic such as PCR should be replaced and performed for miss detected bacteria.

Keywords: Haemophilus influenzae type b, serotype, PCR

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(114): 135-139 (Persian).

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۴ تیر سال ۱۳۹۳ (۱۳۹-۱۳۵)

شناسایی و تشخیص سویه های تهاجمی هموفیلوس آنفلوانزای تایپ b در نمونه های بالینی، به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز

سمیه باقرزاده خداشهری[۱]
سید داور سیادت[۲]
محمد رهبر[۳]

چکیده

سابقه و هدف: هموفیلوس آنفلوانزای تایپ b (Hib)، یکی از مهم‌ترین عوامل مننژیت های باکتریایی در کودکان زیر ۵ سال، به‌خصوص در کشورهایی است که واکسیناسیون علیه Hib را انجام نمی‌دهند. در این مطالعه، ما سروتایپ سویه‌های کپسول دار هموفیلوس آنفلوانزای جدا شده از نمونه‌های بالینی را به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، تعیین کردیم.

مواد و روش ها: در این تحقیق، DNA نمونه های بالینی هموفیلوس آنفلوانزا به روش جوشاندن استخراج گردید. سویه‌های دارای کپسول توسط آغازگرهای ژن bexA تعیین و نوع سروتایپ سویه‌های کپسول دار توسط مجموعه آغازگرهای اختصاصی تایپ "a تا f" مشخص شد.

یافته ها: از ۵۰ سویه هموفیلوس آنفلوانزای جدا شده از نمونه‌های بالینی، ۴ سویه ژن bexA را نشان دادند که تمام آن‌ها دارای کپسول بودند و هر ۴ جدایه، به عنوان سویه‌های تایپ b تعیین شدند.

استنتاج: با توجه به عدم رشد باکتری‌های تعیین شده در این بررسی در آزمایشگاه‌های اولیه (جواب های منفی کاذب) و وجود سویه‌های بیماری‌زای Hib در نمونه‌ها بالینی، انجام روش PCR با ژن‌های اختصاصی روی نمونه‌ها و موارد مشکوک ضروری به نظر می‌رسد.

واژه های کلیدی: هموفیلوس آنفلوانزای تایپ b، سروتایپ، PCR

مقدمه

جدایه های هموفیلوس آنفلوانزا، می‌توانند بر اساس حضور و یا عدم حضور کپسول به اشکال کپسول دار (Typeable) و یا بدون کپسول (Nontypeable or NTHi) طبقه بندی شوند(۱). سویه‌های کپسول دار هموفیلوس آنفلوانزا به خصوص Hib (Haemophilusinfluenzae type b) علت مهم عفونت خون، مننژیت، اپی گلوتیت در کودکان جوان، به ویژه در کشورهای در حال توسعه هستند که میزان واکسیناسیون در آن‌ها پایین است و یا انجام نمی‌شوند(۲). در میان سویه‌های کپسول دار، Hib به عنوان شایع‌ترین و بیماری‌زاترین نوع هموفیلوس آنفلوانزا در نظر گرفته شده است که در بیش از ۹۵

مولف مسئول: سید داور سیادت– ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، گروه میکروبشناسی E-mail:d.siadat@gmail.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، کرمان، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروبشناسی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. استاد، بخش میکروبشناسی، مرکز تحقیقات آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۲/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱/۲۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۳/۲۷

درصد موارد، کودکان زیر ۵ سال را مبتلا می کند(۳). در دوران قبل از ارائه واکسن هموفیلوس آنفلوانزا، حدود ۹۰ درصد از موارد تهاجمی، به علت سویه‌های تایپ bایجاد می‌شد که بعد از معرفی واکسن ترکیبی Hib در اروپا و آمریکا، شیوع بیماری‌های تهاجمی هموفیلوس آنفلوانزای تایپb در این کشورها، بطور چشمگیری کاهش یافت(۵،۴) ولی در کشور ما، با توجه به این‌که واکسیناسیون علیه Hib، به صورت واکسیناسیون روتین در برنامه کار وزارت بهداشت قرار نگرفته است، به همین دلیل هموفیلوس آنفلوانزای تایپ b به عنوان یکی از بیماری‌های تهاجمی شایع، بهخصوص در کودکان زیر ۵ سال معرفی می شود. با توجه به اینکه در تشخیص هموفیلوس آنفلوانزا به روش کشت و یا به دلیل استفاده از آنتی بیوتیک، نتایج منفی کاذب گزارش می‌گردد و یا احتمال مثبت شدن کشت در خون و دیگر مایعات بدن، به خصوص مایع مغزی نخاعی کم می گردد، می‌توان از روش مولکولی PCR که روش سریع و مطمئنی است، برای شناسایی این باکتری استفاده نمود تا بتوان در نمونه‌های بالینی باکتری را به سرعت و با حساسیت بیشتری تشخیص داد. هدف از این مطالعه، شناسایی سویه های کپسول دار و همچنین تشخیص نوع سروتایپ سویه‌های کپسول دار هموفیلوس آنفلوانزای جدا شده از نمونه‌های بالینی مشکوک به عفونت‌های هموفیلوسی به روش PCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز) بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، تعداد ۵۰ سویه هموفیلوس آنفلوانزاکه از خون، حلق، چشم، مایع مغزی نخاعی و مایع شستشوی ریه بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد، امام خمینی و مفید شهر تهران در طی سال‌های ۸۹ تا ۹۱ جمع‌آوری شده بودند،استفاده شد. ابتدا سویه‌ها از لحاظ مورفولوژی و تست‌های بیوشیمیایی و نیاز به هر دو فاکتور X و V مورد بررسی قرار گرفتند(۶). در مرحله بعدی DNA نمونه‌های دریافتی به روش جوشاندن جدا شد و به منظور استفاده‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد(۷) در مجموع از ۳ سویه ATCC هموفیلوس آنفلوانزا، به عنوان سویه‌های کنترل برای واکنش PCR استفاده گردید. این سویه‌ها شامل سویه‌های ATCC 9006 تایپ a، ATCC 10211تایپ b و سویه ATCC 49766 برایNTHi بودند که از مجموعه میکروبی بخش باکتری شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. برای شناسایی سویه‌های کپسول دار از سویه های بدون کپسول، از جفت آغازگرهای اختصاصی ژن bexA و برای تعیین سروتایپ سویه‌های کپسول‌دار هموفیلوس آنفلوانزا، از مجموعه آغازگرهای aتا f (تمامی آغازگرهای مورد استفاده از شرکت تکاپو زیست تهران- ایران تهیه شدند) استفاده شد، کلیه این پرایمرها در مطالعه Falla و همکاران آمده است(۷). واکنش PCR، به منظور تکثیر DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت که مواد و مقادیر آن در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره۱: مواد و مقادیر مورد نیاز در واکنش PCR جهت تکثیر ژن bexA و سروتایپینگ کپسولی

مواد	مقادیر (µl)
بافر(۱۰X)	۲/۵
$MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)	۱/۵
dNTP (۱۰ میلی مولار)	۰/۵
پرایمرهای (F-R)(۱۰ پیکومول)	هرکدام ۰/۵
آنزیم*Taq*پلی مراز (۵ U/µl)	۰/۲
DNA الگو	۲
آب دو بار تقطیر	۱۷/۳
حجم نهایی	۲۵

فرآیند PCR شامل ۵ دقیقه واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۲۵ چرخه حرارتی، شامل ۳ مرحله واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن قطعه تکثیر شده در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه می‌باشد. در نهایت، مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت(۷). سپس

محصولات PCR بر رول ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز و قطعات تکثیر یافته توسط دستگاه ژل داکیومنشن (Gel Documention) مشاهده شدند.

یافته ها و بحث

از مجموع ۵۰ سویه هموفیلوس آنفلوانزای جمع‌آوری شده، ۵ مورد (۱۰ درصد) از چشم، ۱ مورد (۲ درصد) از مایع شستشوی ریه، ۲ مورد (۴ درصد) از مایع مغزی نخاعی، ۳ مورد (۶ درصد) از خون و ۳۹ مورد (۷۸ درصد) نیز از حلق بیماران جداسازی شده بودند.جهت شناسایی سویه های کپسول دار، پس از بهینه سازی و انجام آزمون PCR بر روی تمام نمونه‌های هموفیلوس آنفلوانزای دریافتی، ۴ سویه از ۵۰ سویه از نظر ژن bexA مثبت بودند یعنی این سویه‌ها در سطح خود دارای کپسول هستند که طول باند قطعه تکثیر شده توسط این جفت آغازگر،۳۴۳ جفت باز می باشد و هر ۴ سویه پس از سروتایپینگ توسط مجموعه آغازگرهای a تا f، باند ۴۸۰جفت باز مربوط به سروتایپ b هموفیلوس آنفلوانزای کپسول داررا نشان دادند یعنی هر ۴ سویه کپسول دار از نوع تایپ b بودند.

سروتایپینگ کپسولی روش مهمی برای بررسی خصوصیات هموفیلوس آنفلوانزا است.تشخیص ژن bexA و ژن‌های اختصاصی کپسولی توسط PCR، رایج‌ترین روش مورد استفاده برای تعیین سروتایپ کپسول است(۸). Leaves و Falla چنین بیان کردند که روش مبتنی بر PCR، نوع کپسول را بدون ابهام بیان می کند. موتانت‌های کپسول ناقص از سویه‌های تایپ b (سویه‌های -Hib) که به طور خودبه خودی اتفاق می‌افتد نیز توسط این روش می‌تواند شناسایی شود، هم‌چنین این روش برای ارزیابی دقیق از تأثیر واکسن‌های تایپ b مطلوب است(۷، ۹).

Singhi و همکاران در سال ۲۰۰۲، روش‌های کشت میکروبی و PCR را برای Hib ازنمونه‌های مایع مغزی نخاعی کودکان مبتلا به مننژیت باکتریال مورد مقایسه قرار دادند که نتایج نشان داد، از ۱۰۷ نمونه مورد بررسی، تنها ۱۴ مورد کشت مثبت از نظر هموفیلوس اتفلوانزا داشتند در حالی‌که به روش PCR، ۳۷ مورد نتایج مثبت نشان دادند(۱۰).

آمارهای سازمان بهداشت جهانی نشان می دهد که در منطقه مدیترانه شرقی (که کشور ما نیز در این محدوده قرار دارد)، Hib شایع ترین عامل مننژیت باکتریال است(۱۱). در این مطالعه با توجه به اینکه اکثر نمونه‌های دریافتی از حلق جداشده بودند با این حال از مجموع ۵۰ سویه جدا شده از نمونه های مشکوک به هموفیلوس آنفلوانزا، ۴ مورد از نوع Hib بودند که ۸ درصد سویه‌های مورد آزمایش را تشکیل می‌دادند هم‌چنین وجود این تعداد سویه های هموفیلوس آنفلوانزا در نمونه‌های بالینی که از لحاظ کشت های روتین، منفی کاذب به نظر می‌رسند، نشان می‌دهد که انجام روش‌های مولکولی از تشخیص جنس تا حد گونه و تایپ برای این باکتری ضروری است. در آزمایشگاه‌های روتین جدا کردن هموفیلوس آنفلوانزا از نمونه های خون و csf بسیار مشکل می‌باشد و به همین علت موارد کشت مثبت به ندرت گزارش می گردد. از طرفی، کودکان مبتلا به مننژیت معمولا قبل از رسیدن به بیمارستان با تشخیص سایر عفونت‌ها، تحت درمان انواع آنتی‌بیوتیک‌ها قرار می‌گیرند که همین امر سبب عدم رشد باکتری بر روی محیط‌های کشت آزمایشگاهی می‌شود و حتی باعث حذف سریع این باکتری از مایع نخاع شده که منجر به نتایج کشت منفی کاذب خواهد شد، به همین دلیل استفاده از روش‌هایی که بتواند وجود مقادیر کم باکتری در نمونه‌های بالینی، بهخصوص مایع مغزی نخاعی را تشخیص دهد ضروری به‌نظر می‌رسد(۱۲). در نتیجه با توجه به عدم تشخیص قطعی هموفیلوس آنفلوانزا به روش کشت و یا به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک، می‌توان از روش مولکولیPCR که روش سریع و مطمئن و دارای حساسیت بیش‌تری برای شناسایی این باکتری است، استفاده نمود تا بتوان باکتری فوق را در نمونه‌های بالینی مثل مایع

مغزی نخاعی و سایر مایعات بیولوژیکی به سرعت تشخیص داد. بنابراین از اهم فعالیت‌های مراکز پژوهشی بهداشت و درمان، توسعه و ابداع روش‌های جایگزین جهت تشخیص به موقع باکتری‌های سخت رشد می‌باشد. از بین روش‌های جایگزین، امروزه تشخیص سریع به کمک PCR، نقش مهمی در تشخیص به موقع هموفیلوس آنفلوانزای جدا شده دارد.

سپاسگزاری

این مقاله به طور مشترک از طرح تحقیقاتی و پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد استخراج شده است که با حمایت‌های مالی و معنوی مرکز تحقیقات باکتری شناسی انستیتو پاستور ایران و حمایت معنوی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات کرمان و بخش میکروبیولوژی بیمارستان میلاد تهران، انجام شده است و بدین وسیله نویسندگان، مراتب قدردانی خود را نسبت به همکاریهای صورت گرفته برای انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

References

1. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species hemophilus influenzae. J Exp Med 1931; 53(4): 471-492.
2. Morris SK, Moss WJ, Halsey N. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine use and effectiveness. Lancet Infect Dis 2008; 8(7): 435-443.
3. Hallstrom T, Blom AM, Zipfel PF, Riesbeck K. Nontypeable Haemophilus influenzae protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. J Immunol 2009; 183(4): 2593-2601.
4. Fogarty J, Moloney AC, Newell JB. The epidemiology of Haemophilus influenzae type b disease in the Republic of Ireland. Epidemiol Infect 1995; 114(3): 451-463.
5. Ueno K, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Kawano Y. Presence of multiple copies of capsulation loci in invasive Haemophilus influenzae type b (Hib) strains in Japan before introduction of the Hib conjugate vaccine. Microbiol Immunol 2010; 54(3): 160-163.
6. Kilian M. A taxonomic study of the genus Haemophilus, with the proposal of a new species. J Gen Microbiol 1976; 93(1): 9-62.
7. Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of Haemophilus influenzae. J Clin Microbiol 1994; 32(10): 2382-2386.
8. Davis GS, Sandstedt SA, Patel M, Marrs CF, Gilsdorf JR. Use of bexB to detect the capsule locus in Haemophilus influenzae. J Clin Microbiol 2011; 49(7): 2594-2601.
9. Leaves NI, Falla TJ, Crook DW. The elucidation of novel capsular genotypes of Haemophilus influenzae type b with the polymerase chain reaction. J Med Microbiol 1995; 43(2): 120-124.
10. Singhi SC, Mohankumar D,Singhi PD, Ganquly NK. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) for diagnosing Haemophilus influenzae b meningitis . Ann Trop Paediatr. 2002; 22(4):347-353.
11. Sasan MS, Naderi Nasab M, Kaffi M, Hamedi AK, Kharazmi AA. Haemophilus influenzae meningitis in infants and childrens. J Med Mashhad 2009;52(3): 141-146 (Persian).
12. Moller Lv, Regelink AG, Grasselier H, Van Alphen L, Dankert J. Antimicrobial suspectibility of Haempphilus Influenzae in the respiratory tracts of patients with cystic fibrosis. Int J Antimicrob Agent Chemother. 1998; 42(2): 319-327.