

بررسی فراوانی بیوتایپ های هموفیلوس آنفلوانزا، اهمیت کلینیکی و ارتباط آن با نوع بیماری

هما فروزش تهرانی* عباس عبداللہی** اکرم اسدی اسدآباد** رؤیا مکاری نژاد** فاطمه نوبهار**

مژگان عشاقی*** مژگان مرادی***

* کارشناس ارشد میکروبیولوژی و بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

** کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

*** دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

**** کارشناس میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

زمینه و هدف

هموفیلوس آنفلوانزا، عامل عفونت های گوناگونی هم چون مننژیت، اپی گلویت، پنومونی، سلولیت، باکتری می، آرتریت عفونی و عفونت ملتحمه چشم است. این باکتری به هفت بیوتایپ بر اساس سه تست ایندول، اوره آز و دکربوکسیلاسیون اسید آمینه اورنیتین تقسیم می شود. این بررسی، به دلیل ارتباط بیوتایپ ها با عفونتی خاص و هم چنین الگوی مقاومت ضد میکروبی انجام گرفت که با تعیین میزان شیوع و بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا ارتباط آن با نوع عفونت ایجاد شده نیز بررسی می گردد.

روش بررسی

در بررسی ۱۸ ماهه از فروردین ۱۳۸۴ لغایت مهرماه ۱۳۸۵، تمام نمونه های کلینیکی که امکان جداسازی هموفیلوس وجود داشت، بر روی محیط های استاندارد شده شکلات آگار و بلاد آگار به همراه کشت خطی استافیلوکوک اورئوس کشت گردیدند. انواعی که پدیده ساتلیتسم را نشان دادند، از نظر تولید ایندول، اوره آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین برای تعیین بیوتایپ بررسی شدند.

یافته ها

از ۲۴ نمونه هموفیلوس آنفلوانزا جدا شده از نمونه های کلینیکی ۱۱ مورد از چشم، ۱۱ مورد از سینوس، ۱ مورد از مایع نخاع و ۱ مورد از خون جدا شد. نمونه های سینوسی به بیوتایپ III، نمونه های جدا شده از چشم ۶ مورد به بیوتایپ II و ۵ مورد به بیوتایپ III تعلق داشت. انواع جدا شده از مایع نخاع و خون از نوع بیوتایپ I بودند. سایر بیوتایپ ها جدا نگردیدند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که بیشتر بیوتایپ های جدا شده از چشم از نوع II و III بودند و هم چنین در مورد سینوزیت نیز انواع جدا شده به بیوتایپ III تعلق داشتند. کلیدواژه: هموفیلوس آنفلوانزا نوع B، بیماری های واگیر، عفونت

تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۳

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۵

نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

e-mail: homf_27@yahoo.com

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا در بین ۹ گونه موجود در جنس هموفیلوس، از شایع ترین گونه هاست. این باکتری عامل بسیاری از عفونت های انسانی شامل مننژیت، اپی گلویتیت، پنومونی، سلولیت، باکتری می، آرتریت عفونی، عفونت گوش میانی، سینوزیت، عفونت دستگاه تناسلی و ملتحمه چشم است^(۱).

هموفیلوس آنفلوانزا، باکتری کپسول داری است که از نظر تفاوت در قندهای تشکیل دهنده کپسول پلی ساکاریدی به ۶ سرو تایپ کپسولی (a, b, c, d, e, f) تقسیم می شود و هموفیلوس آنفلوانزا سرو تایپ b مهم ترین پاتوژن در میان دیگر سرو تایپ های کپسولی است^(۲ و ۳). Killian در سال ۱۹۷۶ تست های بیوشیمیایی را برای تشخیص و تعیین بیوتایپ هموفیلوس ها انجام داد. تعیین بیوتایپ هموفیلوس ها بر اساس سه تست تولید ایندول، اوره آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین صورت می گیرد و هموفیلوس آنفلوانزا را به هفت بیوتایپ بدون ارتباط با سرو تایپ های کپسولی تقسیم می کند^(۴ و ۵ و ۶).

اهمیت تعیین بیوتایپ در هموفیلوس آنفلوانزا، به دلیل ارتباط اختصاصی بیوتایپ ها با عفونت های متفاوت، منابع، ویژگی های آنتی ژنیک و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده است. در قدیمی ترین پژوهش انجام شده توسط

Oberhofer و همکاران بر روی ۴۶۴ نمونه هموفیلوس آنفلوانزا، بیوتایپ I بیشتر از خون، مایع نخاع و ترشحات دستگاه تنفسی جدا گردید، بیشتر مبتلایان کودکان زیر یک سال بودند و اغلب بیوتایپ های I هموفیلوس آنفلوانزا به سرو تایپ b تعلق داشتند. به علاوه در این مطالعه مشخص گردید، بیوتایپ های II و III بیشتر از عفونت های چشم جدا می گردند^(۷). در مطالعه Alrawri و همکاران بر روی تعیین بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا جدا شده از عفونت های چشم، تیپ های II و III شایع ترین بیوتایپ گزارش گردیدند^(۸). Quentin و همکاران در بررسی های خود، بیوتایپ IV را با عفونت های دستگاه تناسلی زنان و عفونت های نوزادان در ارتباط دانسته و از ۴ سیستم برای ارزیابی و تعیین بیوتایپ بر روی ۱۸۸ نمونه جدا شده از دستگاه تناسلی و عفونت های نوزادان استفاده کردند^(۹).

جداسازی گونه های هموفیلوس از نمونه های کلینیکی، به دقت در جمع آوری نمونه، نحوه انتقال و محیط کشت مناسب نیاز دارد و به دلیل ماهیت سخت رشد باکتری و حساسیت فوق العاده آن به خشکی و درجه حرارت، تشخیص و جداسازی آن دقت، مهارت و تجربه بیشتری را می طلبد. هدف از این بررسی، علاوه بر تعیین میزان جداسازی هموفیلوس آنفلوانزا از نمونه های مختلف کلینیکی، تعیین فراوانی بیوتایپ ها و ارتباط آن با نمونه های مختلف کلینیکی است.

روش بررسی

در بررسی ۱۸ ماهه از نوع توصیفی، از فروردین ۱۳۸۴ لغایت مهرماه ۱۳۸۵، تمام نمونه‌هایی که امکان جداسازی هموفیلوس از آنها وجود داشت، از قبیل مایع نخاع، خون، ترشحات چشم، ترشحات گوش، مجرا، ترشحات سینوسی و خلط بر روی محیط های بلادآگار خون گوسفند و محیط شکلات-آگار استاندارد کشت گردیدند. به دلیل آن که بلادآگار خون گوسفند، حاوی آنزیم های غیرفعال کننده فاکتور V است، نمونه های استریل بدن مانند مایع نخاع و خون بر روی محیط بلادآگار به همراه کشت خطی استافیلوکوک اروتوس کشت گردیدند تا با ایجاد پدیده ساتلیتسم، هموفیلوس های نیازمند به فاکتور V به علاوه، انواع نیازمند به فاکتور X نیز به دلیل آزاد شدن Hemin و هماتین از گلبول های قرمز ناشی از عمل کرد همولیزین استافیلوکوکی به صورت اقماری^۱ در اطراف کشت استافیلوکوک اروتوس رشد کنند. در مورد نمونه‌های دیگر به دلیل وجود فلور نرمال، به کشت خطی استافیلوکوک اروتوس در پلیت اولیه نیاز نیست. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در جار شمع‌دار و در دمای 35°C ، بعد از ۲۸ - ۲۴ ساعت پلیت ها بررسی شدند. پس از مشاهده مورفولوژی کلنی و رنگ‌آمیزی گرم و کشت خطی استافیلوکوک، انواعی که پدیده ساتلیتسم را نشان دادند، برای تعیین گونه از طریق نیاز به فاکتورهای

X و V بر روی محیط BHI در حضور دیسک های X و V و XV کشت گردیدند. به علاوه، هم‌زمان نیز از بریده شکلات‌آگار به عنوان منبع فاکتور X و کشت استافیلوکوک اروتوس به عنوان منبع فاکتور V در محیط مولر هینیتون آگار (بدون افزودن خون) برای مقایسه با دیسک های حاوی فاکتورهای X و V برای تعیین گونه هموفیلوس استفاده گردید. برای تعیین بیوتایپ، سوسپانسیونی غلیظ در محیط تریپتوفان برات کشت گردید و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری با افزودن چند قطره معرف کوواکس و مشاهده رنگ قرمز تولید ایندول مشخص گردید. سطح محیط کریستنسنس اوره‌آگار نیز با سوسپانسیون غلیظ باکتری کشت گردید و بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته، از نظر تولید آنزیم اوره‌آز با ایجاد رنگ ارغوانی بررسی شد. محیط مایع مولر دکربوکسیلاز حاوی ۱٪ اورنیتین نیز با سوسپانسیون غلیظ باکتری کشت گردید و سپس سطح آن با روغن معدنی استریل پوشانده شد و هم‌زمان نیز از یک محیط کشت داده نشده به عنوان کنترل استفاده گردید. دکربوکسیلان اسیدآمینه اورنیتین با ایجاد رنگ ارغوانی پررنگ مشخص گردید.

بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا با بررسی نتایج سه تست تولید ایندول، آنزیم اوره‌آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین و با استفاده از جداول مرجع مشخص شد^(۱).

^۱ . Satellite Colonies

یافته ها

از ۳۴۵۶ نمونه کلینیکی که امکان جداسازی هموفیلوس آنفلوانزا در آن وجود داشت، ۲۷۳۰ نمونه کشت خون، ۵۹۳ نمونه ترشح سینوسی، ۱۰۵ مورد مایع نخاع و ۳۰ مورد ترشحات چشم، ۲۴ مورد (۰/۶۹٪) هموفیلوس آنفلوانزا به دست آمد، میزان جداسازی آن از هر یک از نمونه های کلینیکی شامل کشت خون ۱ مورد (۰/۰۳۶٪) ترشح سینوسی ۱۱ مورد (۰/۲۳۵٪)، مایع نخاع ۱ مورد (۰/۰۶۶٪) و ترشحات چشم ۱۱ مورد (۰/۳۶۶٪) بود. از نظر فراوانی بیوتایپ ها، ۲ مورد (۰/۸۳٪) به بیوتایپ I (ایندول، اوره آز و اورنیتین دکربوکسیلاز مثبت) ۶ مورد (۰/۲۵٪) به بیوتایپ II (ایندول و اوره آز مثبت، اورنیتین دکربوکسیلاز منفی) و ۱۶ مورد (۰/۶۶۶٪) به بیوتایپ III (ایندول و اورنیتین دکربوکسیلاز منفی و اوره آز مثبت) تعلق داشت. از نظر ارتباط بیوتایپ هموفیلوس آنفلوانزا با نوع نمونه کلینیکی، موارد جدا شده از خون و مایع نخاع به بیوتایپ I، انواع جدا شده از سینوس، به بیوتایپ III و انواع جدا شده از چشم ۶ مورد به بیوتایپ II و ۵ مورد به بیوتایپ III تعلق داشتند. سایر بیوتایپ ها جدا نگردیدند. نتایج تشخیص باکتری با استفاده از دیسک های تجاری X و V با روش استفاده از بریده شکلات آگار و کشت استافیلوکوک ارتوس کاملاً هم خوانی داشت.

بحث

هموفیلوس آنفلوانزا در زمره باکتری هایی است که عفونت های تهاجمی و موضعی در هر دو گروه سنی کودکان و بزرگسالان را ایجاد می کند. ارتباط بین بیوتایپ باکتری و مکان عفونت در بسیاری از مطالعات به عنوان مارکری برای مطالعات اپیدمیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است. در این بررسی، بیوتایپ III شایع ترین

بیوتایپ در هموفیلوس آنفلوانزا جدا شده از موارد کلینیکی بود که ۱۱ مورد از ترشحات سینوس و ۵ مورد از ترشحات چشم جدا گردید. در بیشتر مطالعات انجام شده در مورد سینوزیت باکتریایی باکتری ها در $\frac{3}{4}$ موارد عامل آن بوده و در ۵۰٪ موارد هموفیلوس آنفلوانزا شایع ترین باکتری گزارش گردیده است^(۱۰).

در بررسی حاضر ۷۸/۹٪ ترشحات سینوسی کشت مثبت داشتند، ولی جداسازی ۱۱ مورد هموفیلوس آنفلوانزا نشان می دهد که باید به استفاده از روش های کشت و تکنیک های مناسب در جداسازی این باکتری توجه داشت. مطالعه N.N. Bgun و همکاران بر روی ۲۰۰ مورد هموفیلوس آنفلوانزا، نشان داد که بیوتایپ II و III به ترتیب غالب ترین بیوتایپ در عفونت های موضعی بوده اند^(۱۱). در بررسی حاضر بیوتایپ II به میزان ۶ مورد شایع ترین نوع پس از بیوتایپ III بود که از چشم جدا شد و نقش این بیوتایپ را در عفونت های موضعی نشان داد.

در بررسی Mitsumasa و همکاران با روش ژل الکتروفورز میدان پالسی^۱ بر روی ۲۰۰ نمونه هموفیلوس آنفلوانزا نشان داده شد که بیشتر نمونه های کلینیکی به بیوتایپ I، II و III تعلق دارند و حتی موارد بدون کپسول هموفیلوس آنفلوانزا در ناقلان سالم بیوتایپ II و III هستند^(۱۲). در سال ۱۹۸۲، Prober و همکاران، مننژیت ناشی از بیوتایپ II و سروتایپ b را در کودک دو ساله ای که در مهدکودک نگهداری می شد، گزارش کردند. نمونه برداری از حلق و بینی ۲۶ کودک دیگر در همان مهدکودک بیوتایپ II را نشان داد^(۱۳). این مطالعات اهمیت تعیین بیوتایپ را در مطالعات اپیدمیولوژی برای تعیین منبع و سطح تماس بیماران خاطرنشان می سازد.

¹. Pulsed Field Electrophoresis

در بررسی حاضر دو مورد بیوتایپ I به ترتیب از خون و مایع نخاع جدا گردید که نقش این بیوتایپ را در عفونت های سیستمیک نشان می دهد. مننژیت ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا، بیماری شدیدی است و میزان مرگ و میر ناشی از آن در سطح بالایی قرار دارد. تخمین زده می شود که ۹۹٪ موارد عفونت سیستمیک هموفیلوس آنفلوانزا به وسیله سروتایپ آنفلوانزا Hb و بیوتایپ I به وجود می آید. در یک بررسی، ۷۶٪ مننژیت ناشی از سروتایپ b به بیوتایپ I و ۱۸٪ موارد به سروتایپ II تعلق داشته است^(۱۴).

در بررسی انجام شده در کودکان زیر ۵ سال ویتنامی مبتلا به مننژیت ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا، سروتایپ b با روش ژل الکتروفورز میدان پالسی^۱ ۳/۶۸٪ به بیوتایپ II و ۲۲/۸٪ به بیوتایپ I تعلق داشتند. مقاومت آنتی-بیوتیک باکتری جدا شده بدون ارتباط با بیوتایپ نشان داد که ۵۷٪ مقاوم به آمپی سیلین بوده و بتالاکتاز از Tem-1 تولید می کردند^(۱۵).

قبل از معرفی واکسن Hib، سالانه موارد زیادی از بیماری های تهاجمی ناشی از این باکتری در بسیاری از نقاط دنیا گزارش می گردید. در حال حاضر کارایی این واکسن ۱۰۰-۹۵٪ است. با توجه به اطلاعات به دست آمده مربوط به بار بیماری هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b در منطقه مدیترانه شرقی که این باکتری را یکی از علل اصلی مننژیت کودکان می داند، واکسن Hib تنها در ۱۱ کشور مدیترانه شرقی در برنامه جاری واکسیناسیون به کار می رود. در ایران هنوز به دلیل به کارگیری روش های نامناسب آزمایشگاهی، میزان جداسازی این باکتری پایین است^(۱۶). از این رو انتظار می رود با تقویت و توانمندسازی آزمایشگاه ها، اقدامات فراگیری برای تعیین میزان شیوع بیماری های ناشی از هموفیلوس

آنفلوانزا به ویژه مننژیت ناشی از این باکتری صورت گیرد و با تعیین بیوتایپ و سروتایپ و چگونگی مقاومت آنتی بیوتیکی آن، اطلاعات جامعی از این باکتری به دست آید. همچنین در این بررسی نشان داده شد که با استفاده از روش های آسان و در دسترس با استناد به ویژگی های باکتری، می توان بدون نیاز به فاکتورهای تجارتي X و V تنها با به کارگیری بریده شکلات آگار (منبع X) و کشت استافیلوکوک اورئوس (منبع فاکتور V) باکتری به دست آمده را در حد جنس و گونه تشخیص داد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که بیشتر بیوتایپ های جدا شده از چشم بیوتایپ II و III بودند و همچنین در مورد سینوزیت نیز انواع جدا شده به بیوتایپ III تعلق داشتند.

¹. Pulsed Field Gel Electrophoresis

References

1. Washington Winn, Jr Stephen Allen, William janda, Elmer Koneman, Gary procop, Paul shreckenberger, et al. Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia, lippincott Williams and wilkins; 2006. p. 429-548.
 2. Neuman H B, Wald E R. Bacterial Meningitis in Childhood at the Children's Hospital of Pitsburgh. Clin pediatr (Phila) 2001; 40: 595-600.
 3. Sarangi J. Cartwright K., Stuart J. Invasive Haemophilus influenzae disease in adults. Epidemiol infect 2000; 124: 441-447.
 4. Kilian M .A Taxonomic Study of the Genus Haemophilus with the Proposal of a New Species. J Gen Microbiol 1983; 13: 1615-1016.
 5. Gratten M .Haemophilus Influenzae Biotpe VII. J clin Microbiol 1983;13:1615-1016.
 6. Sottnek F, Albritton Wl . Haemophilus Influenzae Biotpe VIII. J clin Microbiol 1984; 20:815-816.
 7. Oberhofer TR, Back AE . Biotypes of Haemophilus Influenzae Encountered in Clinical Laboratories. J Clin Microbial 1984;20:815-816.
 8. Alrawli AM, CHern KC, cevallos V. Biotypes and Sertypes of Haemophius Influenzae Ocular Isolates. Br J ophthalmol 2002; 86:276-227.
 9. Quentin R, Dubarvy I, Martin C . Evaluation of Four Commercial Methods for Identification and Biotyping of Genital and Neonatal Strains of Haemophilus Speaies. Eur J clin Microbiol infect Dis 1992; 11: 543-549.
 10. Forbes Betty A , Sahm Daniel F. Weissfeld Alices. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. St. louis Mosby ;2002. p. 925-926.
 11. Begum NN, Al-khuttaf AA, Kambal AM, Yebooh EA . Prevalence of H. Influenzae Biotypes and Their Clinical Significance in a University Hospital Saudi. Med J 2003 Dec; 24 (12) : 1308-1312.
 12. Saito M, umeda A, Yoshida S. Subtyping of Haemophilus Influenzae Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol 1999 Jul; 37(7):2142-7.
 13. Charles G prober, Moshe M Robert, M BannaTyne. H Influenza Type b in a Nursery School: The value of biotyping. Pediatric 1982 Feb ; 62 (2): 25-30.
 14. Isis Tamargo, Gilda Torano, Oxandra Rodriguez. Mirian Perez Characterization of Haemophilus Influenza Obtained from Invasive Disease in Biotyping of the Hib Isolates. Memories do instituto oswaldo cruz. Riodojanerio Juli 1999
 15. Phanl T, Ngo T, Dang DA, Vutt, Lenm, tran QC, etal .Genetic and Phenotypic Characterization of Haemophilus Influenza Type b Isolated from Children with Meningitis and their Family Members in Vietnam. Jpn J infect Dis 2006 Apr; 59(2): 111-116.
- ۱۶ - استقامتی عبدالرضا، عسگری فرشته ، گودرزی نعمت الله. دستورالعمل مراقبت مننژیت. تهران: وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی انتشارات مرکز مدیریت، بیماریه‌ها؛ ۱۳۸۴. ص. ۶-۷.