Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 16, No. 3, Autumn 2016, Pages 251-260

Distribution of Gens for Five Protein Antigens among *Streptococcus Pneumoniae* Isolates Recovered from Healthy Children in Ardabil, Iran

Parvizi M[1], Mousavi SF[2], Mohammadi KH[1], Arzanlou M[3]*

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Ahar, East Azarbaijan, Iran
2. Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

**** Corresponding author.*** Tel:+98453-3351278 Fax: +984533522086 E-mail: m.arzanlou@arums.ac.ir

Received: Apr 21, 2016 Accepted: Aug 20, 2016

ABSTRACT

Background & objectives: *Streptococcus pneumoniae is* one of the major causes of vaccine - preventable diseases worldwide. Current pneumococcal vaccines consist of serotype specific capsular polysaccharide antigen and do not offer full clinical protection against pneumococcal diseases. Due to such limitations, a new generation of protein-based pneumococcal vaccines is being developed. The objective of this study was to determine the distribution of gens encoding five protein antigens including pneumococcal histidine triad D and E (*phtD*, *phtE*), rlr- regulated gene A (*rrgA*), Autolysin (*lytA*) and Pneumococcal surface protein C (*pcpC*) among pneumococcal isolates collected from nasopharyngeal specimens in healthy children.

Methods: A total of 43 pneumococcal isolates were collected from nasopharyngeal specimens of healthy children attending the kindergartens in Ardabil province. The strains were identified using optochin susceptibility and bile solubility testes and further confirmed by amplification of capsular polysaccharide A gene (*cpsA*). PCR was used for screening the presence of *pcpC*, *phtD*, *phtE*, *rrgA* and *lytA* genes.

***Results*:** 81.4 % of isolates were found to contain at least one of the tested genes. *lytA*, *pcpC*, *phtE*, *phtD* and *rrgA* were detected in 70, 60, 39.5, 35 and 25.5 percent of isolates, respectively. The results showed that the genes were not distributed consistently among the isolates and for obtaining a full coverage pneumococcal vaccine, multiple choices of these antigens should be included.

Keywords: *Streptococcus pneumonia;* Pneumococcal Surface Protein C (PspC); Polyhistidine Triad Protein D (PhtD); Polyhistidine Triad Protein E (PhtE); RrgA Protein, Autolysin (LytA)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

توزیع ژن‌های کدکننده پنج آنتی‌ژن پروتئینی در ایزوله‌های استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده از کودکان سالم اردبیل, ایران

معصومه پرویزی[۱]، سیدفضل الله موسوی[۲]، خدیجه محمدی[۱]، محسن ارزنلو[۳]*

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، آذربایجان شرقی، ایران ۲. گروه میکروب‌شناسی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران ۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۳۵۱۲۷۸ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۲۲۰۸۶ پست الکترونیک: m.arzanlou@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوکوس پنومونیه به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر قابل پیشگیری توسط واکسن در سراسر دنیا است. واکسن‌های رایج پنوموکوک از آنتی‌ژن‌های کپسولی باکتری تشکیل شده‌اند. این واکسن‌ها وابسته به سروتیپ هستند و حفاظت کامل در برابر عفونت‌های پنوموکوکی را به وجود نمی‌آورند. به دلیل چنین مشکلاتی نسل جدید واکسن‌ها بر پایه پروتئین های پنوموکوکی در حال توسعه هستند. هدف این مطالعه تعیین توزیع ژن‌های کدکننده پنج آنتی‌ژن پروتئینی استروپتوکوکوس پنومونیه شامل پروتئین سطحی پنوموکوکی C (*pspC*)[۱] هیستیدین تریاد پنوموکوکی D و E (*phtD, phtE*)[۲]، پروتئین A تنظیم شونده توسط rlr (*rrgA*)[۳] و اتولیزین (*lytA*)[۴] در میان ایزوله‌های پنوموکوکی جدا شده از نمونه‌های نازوفارنژیال کودکان سالم بود.

روش کار: در مجموع ۴۳ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونیه از نمونه‌های نازوفارنژیال کودکان سالمی که در سال ۱۳۹۲ به مهدکودک‌های شهرستان اردبیل مراجعه کرده بودند، جدا شد. ایزوله‌ها در ابتدا توسط آزمایشات فنوتیپی مانند حساسیت به اپتوچین و حلالیت در صفرا شناسایی شدند. سپس توسط ردیابی ژن کد کننده آنتی‌ژن کپسولی (*cpsA*) تایید شدند. برای ردیابی ژن‌های *pspC*، *phtD*، *phtE*، *rrgA* و *lytA* از روش PCR استفاده شد.

یافته ها: در ۸۴/۴ درصد ایزوله‌ها حداقل یکی از ژن‌های مورد مطالعه ردیابی شد. ژن‌های *lytA*، *pspC*، *phtE*، *phtD* و *rrgA* به ترتیب در ۷۰، ۶۰، ۳۹/۵، ۳۵ و ۲۵/۵ درصد ایزوله‌ها شناسایی شدند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ژن‌های مورد مطالعه به طور یکنواخت در میان ایزوله‌ها وجود ندارند و برای بدست آوردن یک واکسن پنوموکوکی با پوشش حفاظتی کامل بایستی از مجموعه‌ای از این آنتی‌ژن‌ها استفاده شود.

واژه های کلیدی: استرپتوکوکوس پنومونیه، پروتئین سطحی پنوموکوکی C (PspC)، هیستیدین تریاد پنوموکوکی D و E (PhtE و PhtD)، پروتئین A تنظیم شونده توسط rlr (RrgA) و اتولیزین

دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۹ **پذیرش:** ۱۳۹۵/۰۶/۰۷

مقدمه

پنوموکوک یا استرپتوکوکوس پنومونیه یکی از گونه‌های جنس استرپتوکوک است. این باکتری بیش از ۹۲ سروتیپ را شامل می‌شود که تمامی آنها بیماریزا هستند، اما ۱۰ سروتیپ از میان بقیه اهمیت بیشتری در عفونت‌های انسان دارند. انواع استرپتوکوکوس پنومونیه بیشتر براساس ترکیب آنتی ژن مربوط به پلی ساکاریدهای کپسولی طبقه بندی می‌شوند. پنوموکوک از مهمترین پاتوژن‌های باکتریایی است که باعث ایجاد بیماری‌های مهاجمی

[1] Pneumococcal Surface Protein C
[2] Pneumocoocal Histiding Triad D & E
[3] Rlr-Regulated Gene A
[4] Autolysin

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

مانند سپسیس، منتژیت، پنومونی و عفونت گوش میانی در انسان می‌شود [۱]. مهمترین عوامل بیماریزایی شناخته شده این باکتری شامل کپسول، اجزای دیواره سلولی، هیالورونات لیپاز، پنومولیزین o، نوروآمینیداز، اتولیزین و پروتئین‌های سطحی می‌باشند [۲].

پنوموکوک با مکانیسم تهاجم باعث ایجاد بیماری می‌شود. در عفونت‌های پنوموکوکی کلونیزاسیون یا استقرار باکتری اولین قدم در ایجاد بیماری محسوب می‌شود. استقرار باکتری در نازوفارنکس نیازمند فاکتورهای اتصالی است. باکتری پنوموکوک بواسطه پروتئین‌های سطحی مانند PhtD, PhtE، PspC و RrgA که در دیواره سلولی باکتری وجود دارند، به بافتهای میزبان اتصال پیدا می‌کند [۳].

این باکتری بیشتر در بین کودکان زیر ۶ سال و افراد مسن ایجاد بیماری می‌کند. بیماری‌های ناشی از آن در کشورهای در حال توسعه شیوع بیشتری دارد [٤]. پنوموکوک مهمترین پاتوژن مسئول عفونت‌های مجاری تنفسی اکتسابی از جامعه می‌باشد. این باکتری در مکان‌هایی مانند پادگان‌ها، مراکز نگهداری کودکان، سالمندان، افراد دچار نقص سیستم ایمنی، افراد با بیماری‌های مزمن و سوءِ تغذیه به راحتی منتقل شده و سالانه موجب مرگ حداقل نیم میلیون کودک در کشورهای درحال توسعه می‌شود [۵]. پنوموکوک ابتدا در ناحیه نازوفارنکس افراد کلونیزه شده و سپس به سایر بافت‌ها و ارگان‌های بدن پیشرفت می‌کند. مرحله کلونیزاسیون برای بیماریزایی ضروری است. اگر این مرحله حذف شود، بیماری ایجاد نخواهد شد [۶].

پیشگیری عفونت‌های پنوموکوکی مانند پیشگیری بیماریهای تنفسی است. از آنجاییکه بیماری‌های تنفسی در مکان‌های پرازدحام مانند مهدکودک‌ها، زندان‌ها، خانه سالمندان و غیره به راحتی منتقل می‌شوند، برای پیشگیری از این بیماری‌ها باید به این مراکز توجه خاصی داشت. پنوموکوک‌ها قبلا به پنی‌سیلین حساس بودند ولی در سال‌های اخیر موارد زیادی از مقاومت به پنی‌سیلین گزارش شده است. معمولاً سویه‌های مقاوم به پنی سیلین در مقابل دیگر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی نیز مقاوم می‌باشند. به دلیل افزایش مقاومت دارویی، امروزه تمرکز برای تولید واکسن‌ها بیشتر شده است. واکسن‌های اولیه بر اساس پلی ساکاریدهای کپسولی ساخته شدند، مانند واکسن کونژوگه هفت ظرفیتی که در مقابل بیماری‌های مهاجم پنوموکوکی بسیار موثر بود. اما پوشش این واکسن‌ها محدود بوده ودر آینده برای تولید واکسن‌های دیگر به ویژه واکسن‌هایی با ماهیت پروتئینی باید تدابیر دیگری اندیشیده شود [۷].

امروزه از آنتی ژن‌های پلی‌ساکارید کپسولی برخی تیپ‌های پنوموکوک که مسؤل ۸۰ درصد عفونت‌های پنوموکوکی هستند واکسن ساخته‌اند. دو نوع واکسن در حال حاضر تولید و استفاده می‌شود. البته عوارض جانبی این واکسن خفیف بوده و شامل اریتم موضعی و تورم در محل تزریق می‌باشد.

۱- واکسن پلی ساکاریدی پنوموکوکی که شامل۲۳ تیپ شایع کپسولی است و تقریبا ۹۰٪ کل عفونت‌های شدید پنوکوکی را موجب می‌شود و فقط در افراد بالای ۲ سال تجویز می‌شود. دوره مصونیت تا ۵ سال بعد از تزریق است [۸].

۲- واکسن کونژوگه پنوموکوکی که محتوی آنتی‌ژن پلی ساکاریدی برای ۷، ۱۰ یا ۱۳ سروتیپ کونژوگه شده با یک پروتئین است. این واکسن در سنین بالای ۶ هفته، ایمنی‌زایی دارد [۹]. با وجود این‌که تحقیقات بیشتر روی درمان متمرکز شده ولی مشکل مقاومت دارویی رو به افزایش بوده و کنترل گسترش پنوموکوک‌های مقاوم نیازمند همکاری همه جانبه جهانی شامل پزشکان، اپیدمیولوژیست‌ها، داروسازها و میکروبیولوژیست‌ها است.

بدلیل ناکارآمدی واکسن‌های موجود پنوموکوک تلاش‌های زیادی برای توسعه و ساخت واکسن‌های مستقل از سروتیپ و بر پایه پروتئین صورت می‌گیرد.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

بنابراین تحقیقات در مورد کاندیداهای جدید واکسن شروع شده تا واکسنی را تولید کنند که ایمنی درمقابل سروتیپ‌های مختلف پنوموکوک را ایجاد کند. اخیراً تحقیقات زیادی روی پروتئین‌های ادهزینی سطح باکتری به عنوان کاندیدای واکسن صورت می‌گیرد.

ادهزین‌های پنوموکوکی که پروتئینی هستند نامزد مناسبی برای تولید واکسن می‌باشند، این ادهزین‌ها نقش مهمی دراتصال پنوموکوک به سلول‌های ناحیه نازوفارنکس، استقرار اولیه باکتری و کلونیزاسیون باکتری دارند [۱۰]. اگر واکسن‌های پروتئینی بتوانند مانع اتصال و کلونیزاسیون باکتری پنوموکوک شوند متعاقباً بیماری نیز ایجاد نخواهد شد. این مطالعه با هدف بررسی فراوانی ژن‌های ادهزینی *phtE*، *phtD*، *rrgA*، *pspC* و همچنین ژن *lytA* در سویه‌های کلونیزه کننده استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده از کودکان زیر ۶ سال شهر اردبیل انجام شد. نتایج این مطالعه می‌تواند تا حدودی نقشه سطحی پنوموکوک‌های کلونیزه کننده را در جمعیت مورد مطالعه مشخص نماید و در طراحی واکسن بومی مورد استفاده قرار گیرد.

روش کار

ایزوله های پنوموکوکی

در این مطالعه که یک مطالعه توصیفی-مقطعی است. در مجموع از ٤۳ ایزوله پنوموکوک استفاده شد. این ایزوله ها در مطالعات قبلی نویسندگان از نمونه های نازوفارنژیال کودکان سالم زیر شش سال در مهد کودک های شهر اردبیل در سال ۱۳۹۲ جداسازی شده بودند. ایزوله ها در ابتدا با استفاده از روشهای فنوتیپی مانند بررسی میکروسکوپی (رنگ آمیزی گرم)، حساسیت به اپتوچین و حلالیت در صفرا تعیین هویت شدند [۱۱]. برای تایید قطعی گونه از ژن *cpsA* [۱۲] با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون (PCR) مطابق پروتکل زیر استفاده شد.

تکثیر ژن‌های مورد مطالعه

در این مطالعه ژنهای ادهزینی *lytA*، *pspC*، *phtD*، *phtE*، *rrgA* در ایزوله های استرپتوکوکوس پنومونیه توسط روش PCR مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور در ابتدا ایزوله های ذخیره شده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد بر روی محیط شکلات آگار کشت داده شدند. پلیت ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در حضور ۵٪ گاز دی اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شد. سپس از کلنی های رشد کرده یک لوپ کامل برداشته و در ۵ سی سی محیط تریپتی کیس سوی براث انتقال داده شد و به مدت ٢٤ ساعت در شرایط ذکر شده در بالا بدون شیک کردن گرمخانه‌گذاری شد. محیطها سانتریفیوژ و از رسوب حاصله برای تهیه DNA کروموزومی استفاده شد. برای این منظور از کیت استخراج DNA ژنومی (کیاژن-هلند) مطابق توصیه شرکت سازنده استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اندازه گیری جذب نوری بادستگاه نانودراپ (ترمو ساینتیفیک، آمریکا) در طول موج¬های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و ارزیابی روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) (شرکت بیونیر، کره جنوبی) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (جدول ۲) و شرایط دمایی واسرشت اولیه ٩٤ درجه سانتی گراد بمدت ۱۲۰ ثانیه، ۳۵ سیکل واسرشت ٩٤ درجه سانتی گراد ۱۰ ثانیه، اتصال برای ژنهای *lytA* و *pspC* 58 درجه سانتی گراد، ژنها *phtE* و *phtD* 52 درجه سانتی گراد و ژنهای *cpsA* و *rrgA* ٥٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه، طویل شدن ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن نهایی به اندازه یک سیکل در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه با استفاده دستگاه ترموسایکلر Eppendorf صورت گرفت.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

از سویه استاندارد استرپتوکوکوس پنومونیه ۴۹۶۱۹ ATCC به عنوان کنترل مثبت جهت تکثیر ژن های *lytA*، *phtD* و *phtE* استفاده شد، برای تکثیر ژن *pspC* از سویه استاندارد استرپتوکوکوس پنومونیه ۶۳۰۳ ATCC استفاده شد. این سویه‌ها از بخش میکروب‌شناسی انستیتوپاستور ایران تهیه شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ژن	اسم پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)	رفرنس
lytA	F	5'-CAA CCG TAC AGA ATG AAG CGG-3'	۳۱۹	۱۳
	R	5'-TTA TTC GTG CAA TAC TCG TGC G-3'		
pspC	F	5'-AAG ATG AAG ATC GCC TAC GAA CAC-3'	*۱۵۱۲	۱٤
	R	5'-AATGAG AAA CGA ATC CTT AGC AAT G-3'		
rrgA	F	5'-CAC TTT TAT ACG CTT TTG CTA-3'	۳۷۳	۱۵
	R	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG CCA TCC GTA TTG TTT TTC-3'		
phtD	F	5'-GCA TGC TCC TAT GAA CTT GGT CGT CA -3'	۲٤٥٤	۱۶
	R	5'-CTG CAG CTA AAT GTT TTT TGC GCA CCT -3'		
phtE	F	5'-GCA TGC GCC CTA TGC ACCT AAA CCA GCA -3'	۱۳۹۲	۱۶
	R	5'-CTG CAG CTA AAT GTT TTT TGC GCA CCT -3'		
cpsA	F	5'-GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA 3'	۱۵۰	۱۷
	R	5'-GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC-3'		

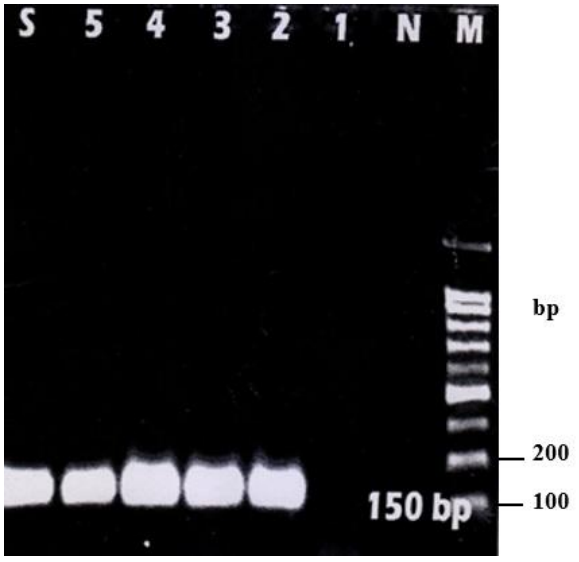
*اندازه قطعات بین ۱۰۰۰-۹۰۰۰ می‌باشد.

جدول ۲. مواد استفاده شده درواکنش PCR

اجزای واکنش	حجم (میکرولیتر)
Tris-HCL (pH 9.0)	2
dNTPs Mix(10mM)	0.5
$MgCl_2$(50mM)	1.5
Forward Primer(10pmol)	0.5
Reverse Primer(10pmol)	0.5
Taq DNA Polymerase (5unit)	0.2
Genomic DNA	2
DDW	17.8
Final Volume	25

یافته‌ها

در این مطالعه از ۵۸ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده از ۲۶۰ کودک زیر ۶ سال در مهدکودک‌های شهرستان اردبیل استفاده شد. در مجموع از میان ۵۸ ایزوله که توسط تستهای حساسیت به اپتوچین و حلالیت در صفرا به عنوان پنوموکوک شناسایی شده بودند، ۴۳ مورد توسط تست مولکولی ردیابی ژن *cpsA* مورد تایید قرار گرفت.

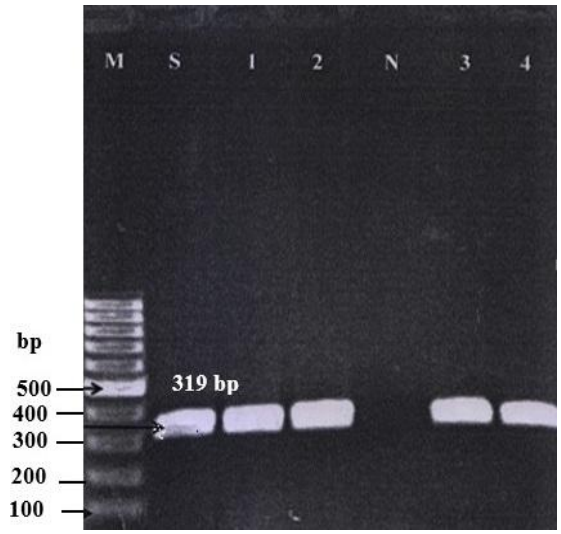


شکل ۱. شناسایی ژن *cpsA* توسط روش PCR: اندازه قطعه تکثیرشده ۱۵۰bp می‌باشد که درکنار مارکر وزن مولکولی نشان داده شده است. M بیانگرمارکروزن مولکولی، شماره‌های ۲، ۳، ٤ و ۵ بیانگرنمونه‌هایی از نتایج مثبت،N بیانگر کنترل منفی و S بیانگر نمونه کنترل مثبت (سویه استانداردداستریتوکوکوس پنومونیه ۴۹۶۱۹: ATCC)

نتایج آزمایش PCR نشان داد که پرایمرهای مورد استفاده بخوبی توانستند ژن *lytA* را تکثیر نمایند.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

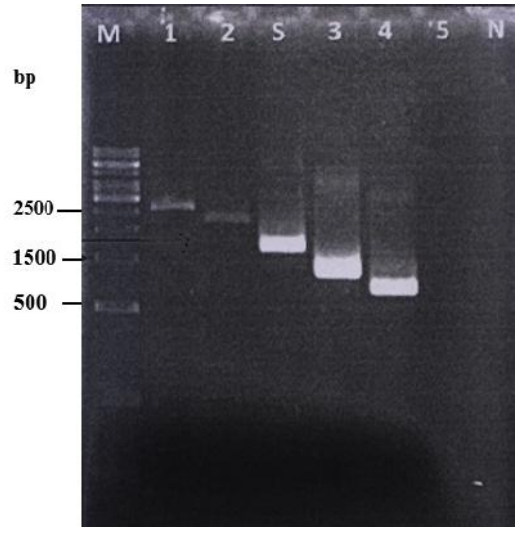
اندازه قطعه تکثیر شده ۳۱۹bp می‌باشد. شکل(۲) نمونه‌ای از محصول PCR این ژن را بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که ۷۰٪ از ایزوله‌ها حاوی ژن*lytA* هستند.



شکل ۲. شناسایی ژن *lytA* توسط روش PCR: M بیانگرمارکروزن مولکولی، شماره‌های۱،۲،۳و٤ بیانگر نمونه‌هایی از نتایج مثبت، N بیانگرکنترل منفی و s بیانگرنمونه کنترل مثبت (سویه استانداردداستریتوکوکوس پنومونیه ATCC: ٤٩٦١٩)

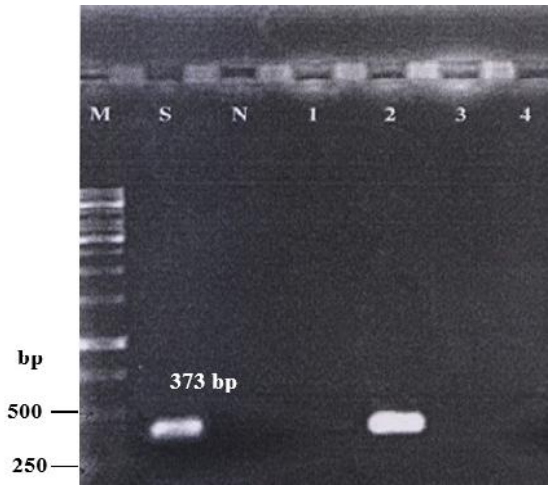
ژن *pspC* دارای ۱۱ انواع الیک مختلف است که پرایمرهای بکار گرفته شده در این تحقیق قادر به تکثیر همه آن‌ها می‌باشند. در این مطالعه ۶ نوع الیک با وزن‌های مولکولی تقریبی ۲۰۰۰ (۳ سویه)، ۱۵۱۲ (۱۲سویه)، ۱۵۰۰(۳سویه) ،۲۵۰۰ (٤ سویه)، ۳۲۰۰ (۲ سویه) و ۲۳۰۰ (۲ سویه) در سویه‌های مورد مطالعه ردیابی شدند.

شکل ۳ نمونه‌ای از محصولPCR این ژن را بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان می‌دهد. در مجموع ۶۰٪ سویه‌ها حاوی این ژن بودند.



شکل ۳. شناسایی ژن *pspC* توسط روش PCR: M بیانگرمارکروزن مولکولی، شماره‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ بیانگرنمونه‌هایی از نتایج مثبت،N بیانگرکنترل منفی و S بیانگرنمونه کنترل مثبت (سویه استاندارد استرپتوکوکوس پنومونیه ATCC:6303)

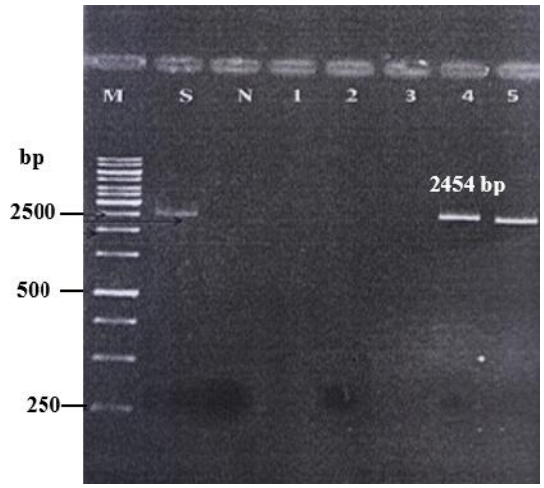
شکل ٤ نمونه‌ای از الکتروفورز محصول PCR ژن *rrgA* را در ژل آگارز ۱٪ نشان می‌دهد. اندازه محصول PCR با استفاده از پرایمرهای بکار گرفته شده ۳۷۳ جفت باز می‌باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که ۲۵/۵٪ ایزوله‌های مورد مطالعه در برگیرنده این ژن هستند.



شکل ٤. نتایج حاصل از PCR ژن *rrgA* توسط روش PCR: M بیانگرمارکر وزن مولکولی، شماره ۲ بیانگر نمونه ای از نتایج مثبت، N بیانگرکنترل منفی وs بیانگر نمونه کنترل مثبت (سویه استاندارد استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده از یک فرد ناقل می‌باشد) که وجود ژن *rrgA* توسط روش تعیین توالی تایید شده بود.

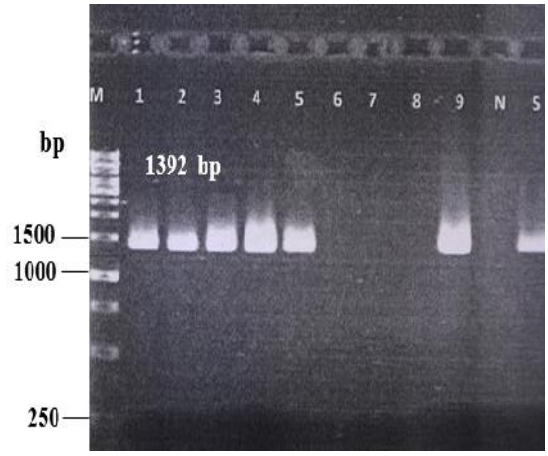
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

نتـایج آزمـایش PCR نشـان داد کـه پرایمرهـای مورداسـتفاده بخـوبی توانسـتند ژن *phtD* را تکثیـر نماینـد. انـدازه قطعـه تکثیـر شـده ۲٤٥٤ جفـت بـاز می‌باشد. شکل ۵ نمونه‌ای از محصول PCR این ژن را برروی ژل آگارز ۱٪ نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که ۳۵٪ ازایزوله‌ها حاوی ژن *phtD* هستند.



شکل ۵. شناسایی ژن *phtD* توسط روش PCR: M بیانگرمارکروزن مولکولی، شماره٤ و ۵ بیانگرنمونه‌هایی از نتایج مثبت، N بیانگرکنترل منفی و S بیانگرنمونه کنترل مثبت (سویه استاندارد استرپتوکوکوس پنومونیه ATCC: 49619)

شـکل ۶ نمونـه‌ای از الکتروفـورز محصـول PCR ژن *phtE* در ژل آگـارز ۱٪ را نشـان مـی‌دهـد. انـدازه محصول PCR با استفاده از پرایمرهـای بکـار گرفتـه شده، ۱۳۹۲جفت باز مـی‌باشـد. نتـایج ایـن آزمـایش نشان داد کـه ایـن ژن در ۳۹/۵٪ ایزولـه‌هـای مـورد مطالعه وجود داشت.



شکل ۶. شناسایی ژن *phtE* توسط PCR: M بیانگر مارکر وزن مولکولی، شماره ۱،۲،۳،٤،۹و ۵ بیانگر نمونه‌هایی از نتایج مثبت، N بیانگرکنترل منفی و S بیانگر نمونه کنترل مثبت (سویه استاندارد استرپتوکوکوس پنومونیه ATCC: 49619)

جـدول ۳ فراوانـی و توزیـع تجمعـی ژن‌هـای مـورد مطالعه را در ایزوله‌های پنوموکوک نشان مـی‌دهـد. همان طوری که در جدول دیـده مـی‌شـود ژن *lytA* بیشترین فراوانی و *rrgA*کمترین فراوانی را بـه خـود اختصـاص داده‌انـد. تنهـا در ۹٪ ایزولـه‌هـا بـه طـور همزمـان همـه ژن‌هـا حضـور داشـتند. در ۸ مـورد هیچکدام از ژنها جدا نشدند.

جدول۳. فراوانی و توزیع تجمعی ژن‌های مورد مطالعه در ایزوله‌های پنوموکوک

الگوی توزیع ژنها	فراوانی (%) n N = 43
lytA	۳۰ (70)
pspC	26 (60)
rrgA	۱۱ (25/5)
phtD	۱۵ (35)
phtE	۱۷ (39/5)
phtD, phtE	۹ (20)
lytA, pspC	۲۲ (52)
lytA, phtD	۱۵ (35)
pspC, rrgA	۹ (20)
lytA, phtE	۱۶ (37/5)
pspC, lytA, rrgA, phtE, phtD	٤ (9)
هیچکدام	۸ (18/5)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

بحث

واکسن‌های نسل اول پنوموکوک در برگیرنده ۲۳ سروتیپ رایج آنتی ژن‌های کپسولی این باکتری هستند. این واکسن‌ها در ۶۰٪ موارد پاسخ ایمنی محافظتی در بالغین ایجاد می‌کند و در کودکان بدلیل عدم بلوغ سیستم ایمنی محافظت قابل قبولی به وجود نمی‌آورد [۱۸]. نسل دوم واکسن‌های پنوموک شامل انواع کونژوگه هستند که در آن آنتی ژن‌های کپسولی (۷ سروتیپ مختلف) با بخشی از اگزوتوکسین دیفتری کونژوگه شده است. این گروه از واکسن‌ها حفاظت قابل توجهی را در کودکان ایجاد می‌کنند [۱۹]. با این وجود پنومونی پنوموکوکی هنوز به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در میان کودکان در کشورهایی که از این واکسن‌ها در برنامه روتین خود استفاده می‌کنند، محسوب می‌شود. واکسن‌های کپسولی تنها باعث ایجاد مصونیت در برابر سروتیپ‌های موجود در واکسن می‌شوند. امروزه شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه در مناطقی که واکسیناسیون پنوموکوک انجام شده است عفونت‌های ناشی از سروتیپ‌های غیر واکسن شیوع بیشتری پیدا کردند. لذا تلاش‌های زیادی برای توسعه واکسن‌های مستقل از سروتیپ و بر پایه پروتئین صورت می‌گیرد. پروتئین‌های سطحی نامزد مناسبی برای ساخت این نوع واکسن‌ها محسوب می‌شوند. تا به حال تعداد زیادی از این نوع پروتئین‌ها در پنوموکوک شناسایی شده‌اند که در پروسه استقرار باکتری بکار گرفته می‌شوند [۲۰و۲۱]. در این مطالعه فراوانی ژن‌های *pspC*، *rrgA*، *phtD*، *phtE* و *lytA* در سطح ایزوله‌های جدا شده از کودکان در شهرستان اردبیل مورد بررسی قرار گرفت.

PspC به عنوان یکی از پروتئین‌های سطحی مهم پنوموکوک است که تحقیقات گسترده‌ای به عنوان نامزد واکسن روی آن صورت گرفته است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که موتانت‌های فاقد ژن *pspC* در مقایسه با سویه‌های اجدادی خود از شدت بیماری‌زایی کمتری در مدل‌های حیوانی برخوردارند. همچنین نشان داده شده است که ایمونیزاسیون موش‌ها با پروتئین PspC حفاظت قابل قبولی را در برابر عفونت پنوموکوکی ایجا می‌کند. این پروتئین به شکل ۱۱ نوع الیک مختلف در میان سویه‌های پنوموکوک وجود دارد. در این مطالعه ژن کد کننده پروتئین PspC در ۶۰٪ ایزوله‌های مورد مطالعه شناسایی شد. در مطالعات قبلی از دیگر نقاط جهان، میزان فراوانی آن بین ٤٧ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است.

خانواده Pht از جمله دیگر پروتئین‌های سطحی پنوموکوک هست که فراوانی ژن‌های کد کننده آن-ها در ایزوله‌های مورد بحث در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. خانوادهPht در بر گیرنده ٤ نوع PhtA، PhtB، PhtD و PhtE هست. توالی ژن‌های pht در میان سروتیپ‌های مختلف پنوموکوک بشدت محافظت شده هستند [۲۲]. این پروتئین‌ها نیز بعنوان یکی از ادهزین‌های مهم پنوموکوک محسوب می‌شوند. نشان داده شده است که ایمونیزاسیون موش‌ها توسط پروتئین‌های PhtA، PhtB و PhtE باعث محافظت موش‌ها در برابر کلونیزاسیون، باکتریمی و سپسیس ناشی از پنوموکوک می‌شود [۲۲]. لذا رغبت زیادی برای استفاده از آن‌ها در قالب واکسن‌های پنوموکوک وجود دارد. در این مطالعه ژن *phtD* در ۳۵٪ و *phtE* در ۳۹/۵٪ ایزوله‌ها ردیابی شدند و تنها در ۲۰٪ ایزوله‌ها هر دو ژن *phtD* و *phtE* وجود داشت. در مطالعه مشابه قبلی درآمریکا نیز نشان داده شده که در ۱۰۷ سویه پنوموکوک مورد مطالعه ۱۰۰٪ سویه‌ها دارای ژن *phtD* و ۹۷٪ سویه‌ها حاوی ژن *phtE* بودند. ٥٤٪ از سویه‌ها هر ٤ ژن خانواده *pht* داشتند.

در بخش دیگر این مطالعه فراوانی ژن *rrgA* در ایزوله‌های پنوموکوک مورد مطالعه قرار گرفت. این ژن کد کننده زیرواحد RrgA پیلی پنوموکوک می‌باشد. پیلی در پنوموکوک از سه زیر واحد رشته-

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

ای (RrgA،RrgB و RrgC) تشکیل شده است. از میان آنها زیرواحد RrgA نقش مهم‌تری در اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال دارد بطوریکه موتانت‌هایی که قادر به تولید آن نیستند ازقدرت عفونت زایی کمتری در مقایسه با سویه‌های اجدادی برخوردارند [۲۳]. نتایج این مطالعه نشان داد که تنها ۲۵/۵٪ ایزوله‌ها حاوی ژن *rrgA*بودند. در مطالعه مشابه دیگری این ژن در ۲۷٪ ایزوله‌های پنوموکوک شناسایی شده بود [۲٤].

آخرین پروتئینی که ژن کد کننده آن در ایزوله‌های مورد بحث در این مطالعه بررسی شد، پروتئین LytA بود. LytA اگرچه نقش ادهزینی ندارد و بطور مستقیم در پاتوژنز استرپتوکوکوس پنومونیه دخالت نمی‌کند، ولی از طریق لیز دیواره سلولی باعث رها شدن دیگر فاکتورهای بیماری‌زایی مانند پنومولیزین از سیتوپلاسم باکتری می‌شود. در این مطالعه از میان ٤۳ ایزوله پنوموکوک ۳۰ مورد (۷۰٪) حاوی ژن *lytA* بودند در یک مطالعه مشابه قبلی این میزان در حدود ٤۵٪ گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

بطور کلی نتایج این مطالعه بطور هماهنگ با مطالعات مشابه قبلی نشان داد که هیچکدام از ژن‌های مورد بحث بصورت یکنواخت در همه ایزوله‌ها وجود نداشت. در این مطالعه فراوانی تک تک ژن‌های مورد مطالعه مابین ۷۰ تا ۳۹/۵٪ بود. تنها در ۹٪ ایزوله‌ها هر ۵ ژن مورد مطالعه بطور همزمان وجود داشت. لذا با توجه به قدرت ایمنی‌زایی متفاوت و توزیع غیر یکنواخت آن‌ها در میان ایزوله‌ها، در صورتی‌که اگر قرار باشد محصولات پروتئینی این ژن‌ها بعنوان واکسن مورد استفاده قرار گیرند، جهت افزایش پوشش واکسن، بایستی مجموعه‌ای از این پروتئین‌ها در قالب واکسن مورد استفاده قرار گیرند. نتایج مطالعات قبلی نیز موید این مطلب است که ایمونیزاسیون با مجموعه‌ای از پروتئین‌های سطحی پنوموکوک مصونیت بهتری ایجاد می‌کنند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل بخشی از نتایج پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی- میکروبیولوژی معصومه پرویزی می‌باشد و محققین از همکاری سازمان بهزیستی اردبیل، بخش میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و بخش میکروب‌شناسی انستیتو پاستور ایران کمال تشکر را دارند.

References

1- Jedrzejas MJ. Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies. Cell Mol Life Sci. 2007 Nov; 64(7): 799-822.

2- Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. Clin Microbiol Infect. 2010 May; 16(5):411-8.

3- Jensch I, Gamez G, Rothe M, Ebert S, Fulde M, Somplatzki D, et al. PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. Mol Microbial. 2010 Jul;77(1):22-43.

4- Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Massai C, Becciolini L, de Martino M, et al. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. J Med Microbiol. 2008 Oct;57(Pt 10):1205-12.

5- Bogaert D, Hermans PW, Boelens H, Sluijter M, Luijendijk A, Rumke HC, et al. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in healthy Dutch children. Clin Infect Dis. 2005 Mar 15;40(6):899-902.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]

6- Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease.Lancet Infect Dis. 2004 Mar;4(4):144-54.
7- Cakan G, Turkoz M, Turan T, Ahmed K, Nagatake T. S-carboxymethylcysteine inhibits the attachment of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells. Microb Pathog. 2003 Jun; 34(6):261-5.
8- Butler JC, Shapiro ED, Carlone GM. Pneumococcal vaccines: history, current status and future directions. Am J Med. 1999 Jul 26;107(1A):69S-76S.
9- Van de Vooren K, Duranti S, Curto A, Garattin L. Cost effectiveness of the new pneumococcal vaccines: a systematic review of European studies. Pharmacoeconomics. 2014 Jan;32(1):29-45.
10- Veenhoven R, Bogaert D, Uiterwaal C, Brouwer C, Kiezebrink H, Bruin J, et al. Effect of conjugate pneumococcal vaccine followed by polysaccharide pneumococcal vaccine on recurrent acute otitis media: a randomised study. Lancet. 2003 Jun 28;361(9376):2189-95.
11- Wessels E, Schelfaut JJ, Bernards AT, Claas EC. Evaluation of several biochemical and molecular techniques for identification of *Streptococcus pneumoniae* and detection in respiratory samples. J Clin Microbiol. 2012 Apr;50(4):1171-7.
12-Mousavi SF,Nobari S,Ramati Ghezelgeh F,Lyriai H. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Tehran by multiplex pcr: are serotypes of clinical and carrier isolates identical. Iran J Microbiol. 2013 Mar; 5(1):220-226.
13- Ronda C, García JL, García E, Sánchez-Puelles JM, Lópe R. Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the lytA gene in *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Biochem. 1987 May; 164(3):621-624.
14- Iannelli F, Oggioni MR, Pozzi G. Allelic variation in the highly polymorphic locus pspC of *Streptococcus pneumoniae*. Gene. 2002 Feb 6; 284(2):63-71.
15- Adamou JE, Heinrichs JH, Erwin AL, Walsh W, Gayle T, Dormitzer M, et al. Identification and characterization of novel family of pneumococcal protein that are protective against sepsis. Infect Immun. 2001 Feb; 69(2): 949-958.
16- Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *S. pneumoniae* isolated. J Clin Microbiol. 2006 Jun;44(1):124-131.
17- Iannelli F , Chiavolini D, Ricci S. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Steptococcus pneumoniae* in mice. Infect Immun. 2004 May;72(5):3077-80.
18- Ogunniyi AD, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combination of pneumococcal virulence protein elicits enhanced protection against challenge with *Steptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2000 May;68(5):3028-33.
19- Ogunniyi AD, Grabowicz M, Briles DE, Cook J, Paton JC. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combination of virulence proteins of Streptococcus pneumoniae. Infect Immun. 2007 Jan; 75(1):350-7.
20- Suzuki N, Yuyama M, Maeda S, Ogawa H, Mashiko K, Kiyoura Y. Genotypic identification of presumptive Streptococcus pneumoniae by PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae*. J Med Microbiol. 2006 Jun;55(Pt 6):709-14.
21- Jedrzejas M. Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol Mol Biol Rev. 2001 Jun; 65(2):187-207.
22- Khan MN, Pichichero ME. Vaccine candidates PhtD and PhtE of *Streptococcus pneumoniae* are adhesins that elicit functional antibodies in humans. Vaccine. 2012 Apr 16;30(18):2900-7.
23- Rioux S, Neyt C, Di Paolo E , Turpin L, Charland N, Labbé S, et al. Transcriptional regulation occurrence and putative role of the Pht family of *Streptococcus pneumoniae*. Microbiology. 2011 Feb;157(Pt 2):336-48.
24- Nelson AL, Rise J, Bagnoli F, Dahlberg S, Fälker S, Rounioja S, et al. RrgA is a pilus-associated adhesion in *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbial. 2007 Oct; 66(2): 329-340.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-01-26]