# طراحی و ارزیابی کیت جدیدی برای شناسایی سریع استرپتوکوکوس پیوژنز از نمونه‌های گلو

**اکرم رحیمی مقدم[۱]*، سیاوش سلمانزاده-اهرابی[۲]، طاهره فلسفی[۳]، مهوش سیفعلی[۴]**

۱. کارشناس‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
۳. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۱۹

## چکیده

**زمینه و هدف** استرپتوکوکوس پیوژنز شایع‌ترین عامل باکتریایی فارنژیت است. بیماران مبتلا به گلودرد استرپتوکوکی باید به‌سرعت با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب درمان شوند. در صورت عدم‌درمان مناسب عوارضی از قبیل تب روماتیسمی و گلومرولونفریت حاد ایجاد خواهد شد. همچنین، مصرف نابه‌جای آنتی‌بیوتیک نیز باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود. روش استاندارد در تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز، کشت سواب گلوست که وقت‌گیر است. بنابراین، ابداع کیتی جدید، ارزان، سریع و مناسب در تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز از نمونه‌های گلو اهمیت ویژه دارد.

**مواد و روش‌ها** در این پژوهش کیت جدیدی به‌منظور تشخیص سریع استرپتوکوکوس پیوژنز طراحی شد. ۲۴ جدایهٔ استرپتوکوکوس پیوژنز با تست لاتکس آگلوتیناسیون و کیت جدید بررسی شد. با درنظرگرفتن نتایج روش لاتکس آگلوتیناسیون، حساسیت و اختصاصیت کیت جدید محاسبه شد. همچنین، در بررسی اثر کیت جدید بر فلور نرمال گلو، ۳۰ نمونه از دانشجویان دانشگاه الزهرا (س) به‌دست آمد.

**یافته‌ها** ۲۴ جدایه با روش لاتکس آگلوتیناسیون، استرپتوکوکوس پیوژنز تشخیص داده شد. با استفاده از کیت جدید نیز همان نتایج به‌دست آمد ($\kappa = 1$). حساسیت و اختصاصیت کیت جدید به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود. رشد فلور نرمال گلو در خانهٔ دوم پلیت سه خانه مهار شد.

**نتیجه‌گیری** کیت جدید زمان و هزینهٔ لازم در تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز از نمونه‌های گلو را کاهش می‌دهد. همچنین، امکان درمان سریع با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب را فراهم می‌کند و از مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عوارض حاصل از مصرف نابه‌جای آنتی‌بیوتیک، همچنین ایجاد تب روماتیسمی و گلومرولونفریت حاد جلوگیری می‌کند.

**کلیدواژه‌ها:**
استرپتوکوکوس پیوژنز، تشخیص سریع، گلودرد.

## مقدمه

فارنژیت عفونت و التهاب ناحیهٔ حلق و لوزه‌هاست که توسط باکتری‌ها یا ویروس‌ها ایجاد می‌شود. شایع‌ترین عامل باکتریایی فارنژیت استرپتوکوکوس پیوژنز است [۱]. گلودرد

* **نویسندهٔ مسئول: اکرم رحیمی‌مقدم**
**نشانی:** تهران، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی
**تلفن:** ۹۸۹۳۵۵۳۹۸۶۶۸+ **دورنگار:** ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱۲
**رایانامه:** rahimi8668@gmail.com
**شناسه ORCID: اکرم رحیمی مقدم 0000-0002-4192-3405**

مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۵، شمارهٔ ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۷، ص ۴۹-۵۴
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

استرپتوکوکی معمولاً با علایمی از قبیل تب، اریتم حلق، گلودرد، تورم لوزه، وجود اگزودا و لنفادنوپاتی زنجیرهٔ قدامی گردن تشخیص داده می‌شود، اما گاهی نیز این علایم در بیمار مشاهده نمی‌شود [۲].

گلودرد استرپتوکوکی باید به سرعت با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب درمان شود. در صورت عدم درمان مناسب، عوارضی از قبیل تب روماتیسمی و گلومرولونفریت حاد ایجاد می‌شود. در سال ۲۰۰۵، سازمان جهانی بهداشت (WHO) تخمین زد که میزان بروز سالانهٔ گلومرولونفریت حاد متعاقب عفونت استرپتوکوکی در کشورهای درحال‌توسعه و کشورهای توسعه‌یافته به‌ترتیب ۲۴/۳ و ۶ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ کودک است. میزان بروز سالانهٔ تب روماتیسمی حاد در میان کودکان ۵-۱۵ ساله در کشورهای توسعه‌یافته و نواحی آسیا- اقیانوسیه به‌ترتیب ۱۰ و ۳۷۴ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ کودک است. گزارش کردند که سالانه بیش از ۴۷۰۰۰۰ مورد گلومرولونفریت حاد متعاقب عفونت استرپتوکوکی و ۴۷۱۰۰۰ مورد تب روماتیسمی حاد در سراسر جهان ایجاد می‌شود که ۹۷ درصد از موارد گلومرولونفریت حاد متعاقب عفونت استرپتوکوکی و ۹۵ درصد از موارد تب روماتیسمی حاد مربوط به کشورهای در حال توسعه است [۳].

آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در درمان گلودرد استرپتوکوکی پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها، کلیندامایسین و ماکرولیدهاست [۴]. اگر عامل ایجاد گلودرد ویروس‌ها باشد، نیازی به درمان آنتی‌بیوتیکی نیست و استفادهٔ نابه‌جا از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروب‌ها خواهد شد. امروزه، به‌دلیل مصرف بی‌رویهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی در استرپتوکوکوس پیوژنز افزایش یافته است. رای و همکاران [۵] کاهش حساسیت استرپتوکوکوس پیوژنز نسبت به پنی‌سیلین را گزارش کردند. در سال‌های اخیر سویه‌های استرپتوکوکوس پیوژنز مقاوم به پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها و ماکرولیدها ایجاد شده است [۶-۸].

تشخیص صحیح عامل گلودرد به‌منظور درمان مناسب و جلوگیری از مقاومت آنتی‌بیوتیکی ضروری است. افتراق گلودرد ویروسی از گلودرد استرپتوکوکی بر اساس علایم بالینی امکان‌پذیر نیست، بنابراین عامل گلودرد باید با روشی مناسب تشخیص داده شود.

روش‌های زیادی در شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز از نمونه‌های گلو وجود دارد. تعدادی از این روش‌ها از قبیل لاتکس آگلوتیناسیون، الایزا، PCR و هیبریدکردن فلورسنت درجا (FISH) سریع است و حساسیت و اختصاصیت زیاد دارد، ولی گران است و تجهیزات و امکانات زیادی لازم دارد که در همهٔ آزمایشگاه‌ها موجود نیست [۹-۱۲]. روش هیدرولیز L-پیرولیدونیل بتا نفتیل آمید (PYR) نیز سریع است، ولی تهیهٔ کیت PYR مشکل است و ماندگاری کوتاه‌مدتی دارد. برای تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز از نمونه‌های گلو، کشت میکروبی همچنان استانداردی طلایی تلقی می‌شود [۲، ۱۳، ۱۴]. کشت میکروبی روشی ارزان و ساده است ولی ۴۸-۷۲ ساعت طول می‌کشد.

بسیاری از پزشکان در ایران از این روش تشخیصی و روش‌های دیگر به‌دلیل محدودیت‌های ذکرشده استفاده نمی‌کنند و بدون تشخیص صحیح عامل گلودرد، به بیماران آنتی‌بیوتیک تجویز می‌کنند. بنابراین، ابداع کیتی جدید، ارزان، سریع و مناسب در تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز از نمونه‌های گلو اهمیت ویژه دارد. در این مطالعه کیت جدید و ارزانی در تشخیص ۱۸ ساعتهٔ استرپتوکوکوس پیوژنز طراحی و ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

**ساخت کیت جدید.** کیت جدید از پلیتی سه‌خانه تشکیل شده است که حاوی محیط کشت بلاد آگار در خانهٔ نخست، محیط کشت بلاد آگار همراه با آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم سولفامتاکسازول (SXT) (۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) در خانهٔ دوم و محیط کشت بلاد آگار همراه با آنتی‌بیوتیک باسیتراسین (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) در خانهٔ سوم است. آنتی‌بیوتیک‌ها از شرکت سیگما خریداری شد. محلول استوک آنتی‌بیوتیک SXT با ترکیب مقادیر برابری از محلول‌های T و S ساخته شد. برای تهیهٔ محلول T، ۰/۰۱۲۵۰ گرم از آنتی‌بیوتیک تریمتوپریم در ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) (مرک) حل و سپس با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیهٔ محلول S نیز ۰/۲۳۷۵۰ گرم از آنتی‌بیوتیک سولفامتاکسازول در ۱ میلی‌لیتر محلول نرمال سدیم هیدروکسید (NaOH) (مرک) حل و سپس با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. غلظت نهایی SXT در محلول استوک ۲۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. برای تهیهٔ محلول استوک آنتی‌بیوتیک باسیتراسین ۰/۰۲۰ گرم از آنتی‌بیوتیک باسیتراسین در ۸ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس، به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول استوک آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲ استریل و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تقسیم‌بندی و در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد ذخیره شد.

برای تهیهٔ محیط کشت بلاد آگار ۴۰ گرم از محیط کشت

بلاد آگار (مرک) در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به حجم ۹۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اتوکلاو و سردشدن تا دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، ۵۰ میلی‌لیتر خون دفیبرینهٔ گوسفند اضافه و محیط کشت‌ها داخل خانهٔ نخست پلیت‌ها توزیع شد. در تهیهٔ محیط کشت بلاد آگار حاوی آنتی‌بیوتیک SXT، ۴۰ گرم از محیط کشت بلاد آگار در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به حجم ۹۴۹ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اتوکلاو و سردشدن تا دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، ۵۰ میلی‌لیتر خون دفیبرینهٔ گوسفند اضافه و در مرحلهٔ بعد ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول استریل آنتی‌بیوتیک SXT اضافه و محیط کشت‌ها داخل خانهٔ دوم پلیت‌ها توزیع شد. محیط‌های دارای آنتی‌بیوتیک SXT در جای تاریک و دور از نور نگهداری می‌شد.

به‌منظور بررسی اثر حلال‌های آنتی‌بیوتیک‌ها بر رشد باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز، محلولی از ۱ میلی‌لیتر DMSO و ۱ میلی‌لیتر محلول یک نرمال NaOH و ۸ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و پس از استریلیزاسیون با فیلتر سر سرنگی ۰/۲ یا استریل نمودن با فیلتر سرسرنگی ۰/۲، ۱ میلی‌لیتر از محلول حاصل، به ۹۹۹ میلی‌لیتر از محیط کشت بلاد آگار افزوده و در پلیت‌های جداگانه‌ای توزیع و جدایهٔ استاندارد استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC 19615) روی آن کشت و نتایج بررسی شد.

برای تهیهٔ محیط کشت بلاد آگار حاوی آنتی‌بیوتیک باسیتراسین، ۴۰ گرم از محیط کشت بلاد آگار در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به حجم ۹۴۹ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اتوکلاو و سردشدن تا دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، ۵۰ میلی‌لیتر خون دفیبرینهٔ گوسفند اضافه و در مرحلهٔ بعد ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول استریل آنتی‌بیوتیک باسیتراسین اضافه و محیط کشت‌ها داخل خانهٔ سوم پلیت‌ها توزیع شد. محیط کشت‌ها به‌صورت هفتگی تهیه و تا زمان استفاده درون کیسه‌های پلاستیکی و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری می‌شد.

از جدایه‌های استاندارد استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC 19615) و استرپتوکوکوس میتیس (ATCC 6942) به‌عنوان کنترل کیفی کیت طراحی‌شده استفاده شد. جدایهٔ استاندارد استرپتوکوکوس میتیس (ATCC 6942) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و جدایهٔ استاندارد استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC 19615) از گروه میکروبیولوژی دانشگاه ایران تهیه شد.

**جمعیت مورد مطالعه.** در این پژوهش ۲۴ جدایهٔ استرپتوکوکوس پیوژنز بررسی شد که در مطالعهٔ پرویزی و همکاران [۱۵] از کودکان ناقل استرپتوکوکوس پیوژنز جدا شده بود. همچنین، در بررسی اثر کیت جدید بر فلور نرمال گلو، نمونه‌گیری از گلوی ۳۰ نفر از دانشجویان دانشگاه الزهرا (س) انجام شد.

**روش‌های تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز.** شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز با استفاده از روش لاتکس آگلوتیناسیون (امگا) و کیت جدید انجام شد. سواب‌های جداشده از گلوی بیماران و جدایه‌های استرپتوکوکوس پیوژنز به‌ترتیب در خانه‌های نخست، دوم و سوم پلیت سه خانه کشت داده شد. پس از ۱۸ ساعت گرماگذاری پلیت‌های سه خانه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و ۵ درصد $CO_2$، حضور کلنی‌های بتاهمولیتیک در پلیت‌ها بررسی شد. شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز بر اساس اطلاعات موجود در جدول ۱ انجام گرفت.

**جدول ۱. شناسایی استرپتوکوکوس‌های بتاهمولیتیک گروه A، C و G با استفاده از کیت جدید.**

| رشد استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک / نوع باکتری | رشد استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک در خانه اول پلیت سه خانه | رشد استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک در خانه دوم پلیت سه خانه | رشد استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک در خانه سوم پلیت سه خانه |
|---|---|---|---|
| استرپتوکوکوس پیوژنز | -/+ | + | - |
| استرپتوکوکوس بتاهمولیتیک گروه C یا G | + | - | - |

+ رشد؛ - عدم رشد

**آنالیزهای آماری.** با درنظرگرفتن نتایج روش لاتکس آگلوتیناسیون، حساسیت و اختصاصیت کیت جدید محاسبه و از آمارهٔ کاپا در سنجش توافق دو روش استفاده شد.

## یافته‌ها

**نتایج کنترل کیفی محیط کشت‌های موجود در پلیت سه‌خانه.** استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC 19615) دارای همولیز بتا، حساس به آنتی‌بیوتیک باسیتراسین و مقاوم به آنتی‌بیوتیک SXT و جدایهٔ استاندارد استرپتوکوکوس میتیس (ATCC 6942) مقاوم به آنتی‌بیوتیک باسیتراسین و حساس به آنتی‌بیوتیک SXT است. جدایهٔ استاندارد استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC 19615) در خانهٔ نخست و دوم پلیت سه‌خانه به‌صورت کلنی‌های بتاهمولیتیک رشد کرد و در خانهٔ سوم پلیت هیچ باکتری‌ای مشاهده نشد و جدایهٔ استاندارد استرپتوکوکوس میتیس (ATCC 6942) در خانهٔ نخست و سوم پلیت سه‌خانه رشد کرد و در خانهٔ دوم هیچ باکتری‌ای مشاهده نشد که نشان‌دهندهٔ کیفیت مطلوب محیط کشت‌هاست. جدایهٔ استاندارد استرپتوکوکوس پیوژنز ( ATCC 19615) در محیط کشت بلاد آگار حاوی حلال‌های آنتی‌بیوتیک‌ها به‌خوبی رشد کرد که نشان‌دهندهٔ عدم‌تأثیر حلال‌ها بر رشد باکتری است.

**نتایج روش‌های تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز.** از بین ۲۴ جدایهٔ مورد بررسی، ۲۴ جدایه با روش لاتکس آگلوتیناسیون، استرپتوکوکوس پیوژنز تشخیص داده شد. با استفاده از کیت طراحی‌شدهٔ جدید نیز ۲۴ جدایه استرپتوکوکوس پیوژنز تشخیص داده شد. نتایج مربوط به کشت ۳۰ سواب جداشده از گلوی دانشجویان دانشگاه الزهرا (س) مشابه بود و در تمامی موارد رشد فلور نرمال گلو در محیط کشت بلاد آگار حاوی آنتی‌بیوتیک SXT (۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به محیط کشت بلاد آگار مهار شد.

**حساسیت و اختصاصیت کیت جدید.** در مقایسه با روش لاتکس آگلوتیناسیون، حساسیت و اختصاصیت کیت جدید به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود. همچنین، مقدار محاسبه‌شده برای آمارهٔ کاپا ۱ به‌دست آمد ($\kappa = 1$)، که نشان می‌دهد دو روش توافق کامل دارد.

## بحث

در این پژوهش کیتی برای تشخیص سریع گلودرد استرپتوکوکی طراحی شد که حساسیت و اختصاصیت زیاد در شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز داشت.

کیت طراحی‌شده از پلیتی سه‌خانه تشکیل شده است و شرایطی را فراهم می‌کند که به‌صورت هم‌زمان همولیز بتا باکتری‌ها مشاهده و حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های باسیتراسین و SXT تعیین می‌شود و زمان تشخیص کاهش می‌یابد.

از خانهٔ نخست پلیت سه‌خانه برای مشاهدهٔ همولیز بتا باکتری‌های موجود در سواب گلو و از خانه‌های دوم و سوم پلیت سه خانه به‌ترتیب در تعیین حساسیت باکتری‌های بتاهمولیتیک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های SXT و باسیتراسین استفاده شد. کلنی‌های بتاهمولیتیک استرپتوکوکوس پیوژنز علاوه‌بر خانهٔ نخست، در خانهٔ دوم پلیت سه‌خانه هم مشاهده می‌شود، ولی قطر کلنی‌ها و قطر همولیز بتا کمتر است.

در سال ۲۰۰۴، آلتیندیس و همکاران [۱۶] از پلیتی دوخانه در تشخیص سریع استرپتوکوکوس پیوژنز از نمونه‌های گلو استفاده کردند. در مطالعهٔ آن‌ها از محیط کشت آگار خوندار در یک طرف پلیت و محیط کشت آگار خوندار همراه با آنتی‌بیوتیک باسیتراسین (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) در طرف دیگر پلیت استفاده شد. حضور کلنی‌های بتاهمولیتیک در خانهٔ نخست پلیت و عدم‌حضور آن‌ها در خانهٔ دوم پلیت نشان داد که کلنی‌های بتاهمولیتیکی استرپتوکوکوس پیوژنز است [۱۶].

استرپتوکوکوس پیوژنز به آنتی‌بیوتیک باسیتراسین حساس است. استرپتوکوکوس‌های بتاهمولیتیک گروه C و G هم نسبت به آنتی‌بیوتیک باسیتراسین حساس است [۱۷]. بنابراین، استفاده از پلیت دوخانهٔ طراحی‌شده در مطالعهٔ آلتیندیس و همکاران در تشخیص سریع استرپتوکوکوس پیوژنز ممکن است سبب تشخیص اشتباه استرپتوکوکوس‌های بتاهمولیتیک گروه C و G به عنوان استرپتوکوکوس پیوژنز شود. برای رفع این مشکل در پژوهش حاضر از محیط کشت بلاد آگار همراه با آنتی‌بیوتیک SXT در خانهٔ دوم پلیت استفاده شد تا حساسیت باکتری‌های بتاهمولیتیک نسبت به SXT نیز تعیین شود و حساسیت و اختصاصیت کیت طراحی‌شده افزایش یابد.

استرپتوکوکوس‌های بتاهمولیتیک گروه C و G به آنتی‌بیوتیک SXT حساس است، ولی استرپتوکوکوس پیوژنز به آنتی‌بیوتیک SXT مقاوم است. وضعیت رشد استرپتوکوکوس‌های بتاهمولیتیک گروه C و G و استرپتوکوکوس پیوژنز در خانه‌های نخست و سوم پلیت سه‌خانه یکسان است و در تمیزدادن آن‌ها از یکدیگر باید وضعیت رشد در خانهٔ دوم پلیت سه‌خانه بررسی شود. استرپتوکوکوس‌های بتاهمولیتیک گروه C و G در خانهٔ دوم

رشد نمی‌کند، ولی استرپتوکوکوس پیوژنز در خانهٔ دوم رشد می‌کند.

ممکن است فلور نرمال گلو باعث مهار رشد استرپتوکوکوس پیوژنز در خانهٔ نخست پلیت سه‌خانه شود. بسیاری از باکتری‌های فلور نرمال گلو به آنتی‌بیوتیک SXT حساس است. بنابراین، آنتی‌بیوتیک SXT موجود در خانهٔ دوم باعث مهار رشد بسیاری از باکتری‌های فلور نرمال گلو می‌شود و شرایط برای رشد استرپتوکوکوس پیوژنز فراهم می‌شود. اگر کلنی‌های بتاهمولیتیکی در خانهٔ دوم رشد کند، ولی رشد آن در خانه‌های نخست و سوم مهار شود، به این معناست که کلنی‌های بتاهمولیتیک استرپتوکوکوس پیوژنز است.

گان و همکاران [۱۸] محیطی انتخابی را معرفی کردند که از افزودن ۵ درصد خون دفیبرینهٔ گوسفند و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر SXT به محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) ساخته شده بود. استفاده از این محیط انتخابی در کشت سواب گلو باعث مهار رشد فلور نرمال گلو شد و رشد استرپتوکوکوس‌های بتا همولیتیک گروه A بهبود یافت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از این محیط جداسازی استرپتوکوکوس‌های گروه A، نسبت به زمانی که از محیط بلاد آگار معمولی استفاده شده بود، ۴۲ درصد افزایش یافت و ۸۳ درصد از استرپتوکوکوس‌های غیر از گروه A و رشدیافته در محیط بلاد آگار معمولی مهار شد [۱۸]. مطالعات دیگری نیز نشان داد که جداسازی استرپتوکوکوس‌های بتاهمولیتیک با استفاده از محیط‌های انتخابی مهارکنندهٔ میکروب‌های فلور نرمال گلو بهبود می‌یابد [۱۹-۲۵].

با استفاده از این کیت، هزینهٔ لازم در تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز از نمونه‌های گلو نیز کاهش می‌یابد و امکان تجویز صحیح آنتی‌بیوتیک و درمان مناسب فراهم و از مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عوارض حاصل از تجویز نادرست آنتی‌بیوتیک، همچنین ایجاد تب روماتیسمی و گلومرولونفریت نیز جلوگیری می‌شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامهٔ اکرم رحیمی مقدم در مقطع کارشناسی‌ارشد رشتهٔ بیوتکنولوژی میکروبی است. بدین وسیله از دانشکدهٔ زیست‌شناسی دانشگاه الزهرا (س) بابت تأمین هزینهٔ مواد و وسایل و امکانات لازم تشکر می‌کنیم.

از جناب آقای اردشیر بیدانجیری، مدیرعامل محترم شرکت پادتن طب، و جناب آقای دکتر غلامرضا ایراجیان، مدیر محترم گروه میکروب‌شناسی دانشگاه ایران، که در تهیهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها و جدایه‌های استرپتوکوکوس پیوژنز مورد استفاده در این پژوهش با ما همکاری داشتند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

## References

[1]. Bisno AL. Acute pharyngitis: etiology and diagnosis. Pediatrics. 1996; 97(6 Pt 2): 949-54. Cited in PubMed; PMID 8637780.
[2]. Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G, et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2012; 55(10): 1279-82. Cited in PubMed; PMID 23091044.
[3]. World Health Organization. Maternal, newborn, child and adolescent health. The current evidence for the burden of group A streptococcal diseases [cited 2017 Jan 2]. Available from URL: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/fch_cah_05_07/en.
[4]. Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS. Group a streptococcal infections. In: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, editors. Red Book Report of the Committee on Infectious Diseases. 29th ed. Elk Grove Village, IL. American Academy of Pediatrics. 2012: 668-80.
[5]. Ray D, Sinha S, Saha S, Karmakar S, Dutta RN, Bhattacharya S, et al. A preliminary sentinel surveillance report on antibiotics resistance trend of *Streptococcus pyogenes* in Kolkata region, India. Al Ameen J Med Sci. 2010; 3(2): 146-51.
[6]. Zhou W, Jiang YM, Wang HJ, Kuang LH, Hu ZQ, Shi H, et al. Erythromycin-resistant genes in group A β-haemolytic Streptococci in Chengdu, Southwestern China. Indian J Med Microbiol. 2014; 32(3): 290-3. Cited in PubMed; PMID 25008823.
[7]. Ogawa T, Terao Y, Sakata H, Okuni H, Ninomiya K, Ikebe K, et al. Epidemiological characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with multiple onsets of pharyngitis. FEMS Microbiol Lett. 2011; 318(2): 143-51. Cited in PubMed; PMID 21362024.
[8]. Ibrahim SB, El-Sokkary RH, Elhewala AA, El-Anwar MW, Awad WM, Hamed AM, et al. Emerging resistance to erythromycin and penicillin among *Streptococcus pyogenes* isolates in Zagazig, Egypt. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014; 3(10): 750-6.
[9]. Russell H, Facklam RR, Edwards LR. Enzyme-linked immunosorbent assay for streptococcal M protein antibodies. J Clin Microbiol. 1976; 3(5): 501-5.
[10]. Liu D, Hollingshead S, Swiatlo E, Lawrence ML, Austin FW. Rapid identification of *Streptococcus pyogenes* with PCR primers from a putative transcriptional regulator gene. Res Microbiol. 2005; 156(4): 564-7. Cited in PubMed; PMID 15862455.
[11]. Tajbakhsh S, Gharibi S, Zandi K, Yaghobi R, Asayesh G. Rapid detection of *Streptococcus pyogenes* in throat swab specimens by fluorescent in situ hybridization. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011; 15(3): 313-7. Cited in PubMed; PMID 21528778.
[12]. Bisno AL, Gerber MA, Gwaltney JM, Kaplan EL, Schwartz RH. Practice guidelines for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2002; 35(2): 113-25. Cited in PubMed; PMID 12087516.
[13]. Choby BA. Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. Am Fam Physician. 2009; 79(5): 383–90.
[14]. Gerber MA. Diagnosis and treatment of pharyngitis in children. Pediatr Clin N Am. 2005; 52(3): 729–47. Cited in PubMed; PMID 15925660.
[15]. Parvizi E, Nateghian A, Ahmadi A, Mirsaeedi K, Irajian G. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes*

isolated from throat cultures of healthy children aged between 5-15 years. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology. 2014; 4(2): 411-6.
[16]. Altindis M, Aktepe OC, Kocagoz T. Comparison of diobacit, bacitracin-trimethoprim/ sulphamethoxazole and latex agglutination in the diagnosis of Group A beta hemolytic streptococci. Yonsei Med J. 2004; 45(1): 56-60. Cited in PubMed; PMID 15004869.
[17]. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Streptococcus*, *Enterococcus*, and similar organisms. In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, editors. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St. Louis: Mosby Inc; 2007. pp. 265-80.
[18]. Gunn BA, Ohashi DK, Gaydos CA, Holt ES. Selective and enhanced recovery of group A and B streptococci from throat cultures with sheep blood agar containing sulfamethoxazole and trimethoprim. J Clin Microbiol. 1977; 5(6): 650-5. Cited in PubMed; PMID 328529.
[19]. Kurzynski T, Meise C, Daggs R, Helstad A. Improved reliability of the primary plate bacitracin test on throat cultures with sulfamethoxazole-trimethoprim blood agar plates. J Clin Microbiol. 1979; 9(1): 144-6. Cited in PubMed; PMID 372212.
[20]. Mirrett S, Monahan JS, Reller LB. Comparative evaluation of medium and atmosphere of incubation for isolation of *Streptococcus pyogenes*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1987; 6(3): 217-21. Cited in PubMed; PMID 3552389.
[21]. Pacifico L, Ranucci A, Ravagnan G, Chiesa C. Relative value of selective group A streptococcal agar incubated under different atmospheres. J Clin Microbiol. 1995; 33(9): 2480-2. Cited in PubMed; PMID 7494053.
[22]. Carlson JR, Merz WG, Hansen BE, Ruth S, Moore DG. Improved recovery of group A beta-hemolytic streptococci with a new selective medium. J Clin Microbiol. 1985; 21(3): 307-9. Cited in PubMed; PMID 3884651.
[23]. Kurzynski TA, Van Holten CM. Evaluation of techniques for isolation of group A streptococci from throat cultures. J Clin Microbiol. 1981; 13(5): 891-4. Cited in PubMed; PMID 7016912.
[24]. Tolliver PR, Roe MH, Todd JK. Detection of group A *Streptococcus*: comparison of solid and liquid culture media with and without selective antibiotics. Pediatr Infect Dis J. 1987; 6(6): 515-9. Cited in PubMed; PMID 3302906.
[25]. Schwabe LD, Gobbo AF, Gottschall RL, Randall EL. Comparison of TestPack Plus Strep A with selective and nonselective culture media for detection of group-A streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis. 1991; 14(5): 367-72. Cited in PubMed; PMID 1797453.
.

# Design and evaluation of a novel kit for rapid detection of *Streptococcus pyogenes* from pharyngeal specimens

**Akram Rahimi-Moghaddam[1*] Siavosh Salmanzadeh-Ahrabi[2], Tahereh Falsafi[3], Mahvash Seifali[4]**

1. M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

## Abstract

**Background** *Streptococcus pyogenes* is the most common cause of bacterial pharyngitis. Patients with streptococcal pharyngitis should be rapidly treated with appropriate antibiotics. Rheumatic fever and acute glomerulonephritis can develop as complications of inadequately treated streptococcal pharyngitis. Furthermore, antibiotic misuse promotes antibiotic resistance. Throat swab culture is standard diagnostic method for detection of *S. pyogenes*, which is time-consuming. Thus, developing a new, rapid, appropriate and inexpensive kit is very important for detection of *S. pyogenes* from pharyngeal specimens.

**Methods and Materials** In this study, a new kit was designed for rapid detection of *S. pyogenes.* Twenty four *S. pyogenes* isolates were examined with both latex agglutination test and new kit. Sensitivity and specificity of new kit were calculated considering latex agglutination test results. Thirty sample swabs were also obtained from students of Alzahra University for examination of effect the new kit on normal throat flora.

**Results** Twenty four *S. pyogenes* isolates were identified as *S. pyogenes* using latex agglutination test and same results were obtained using new kit ($\kappa = 1$). The sensitivity and specificity of our new kit were 100% and 100%, respectively. Growth of the normal flora was inhibited in the second section of three section plates.

**Conclusion** New kit can decrease the required time and expense for detection *S. pyogenes* from pharyngeal specimens. It can also provide possibility rapid treatment with appropriate antibiotics and prevents rheumatic fever, acute glomerulonephritis, unwanted side effects of antibiotic misuse and antibiotic resistance.

**Received:** 2017/04/17
**Accepted:** 2017/07/10

**Keywords:** pharyngitis, rapid detection, *Streptococcus pyogenes.*