فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۲- تابستان ۱۳۹۵

مقاله تحقیقی

پروفایل ژن‌های اگزوتوکسین تب‌زای استرپتوکوکی (*spe*) در میان ایزوله‌های حامل و بیمار استرپتوکوکوس گروه A در ایران

فرشته بوربور عظیمی [۱]، فهیمه باغبانی آرانی*[۲]، ملیحه کرامتی [۳]

۱. گروه میکروبیولوژی. دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا
۲. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا
۳. بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

* **مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۰

چکیده

استرپتوکوکوس گروه A (GAS)، عامل چندین نوع بیماری تهاجمی و غیرتهاجمی می‌باشد. با این حال اطلاعات کمی درباره توزیع فاکتورهای ویرولانس و ارتباط آن با محل جغرافیایی و همچنین علائم بالینی بیماران مبتلا در دسترس است. در مطالعه کنونی پروفایل ژن‌های اگزوتوکسین تب‌زای استرپتوکوکی (*speA*، *speB* و *speC*) در۷۲ سویه GAS شامل ۳۲ ایزوله از افراد حامل و ۴۰ ایزوله از بیماران با علائم بالینی که از نمونه‌ها خون، ادرار، زخم و نازوفارنکس جداسازی شدند، بررسی شد. پروفایل ژن‌ها توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دوگانه (duplex-PCR) جهت شناسایی دو ژن *speA* و*speC* و نیز یک PCR منفرد برای شناسایی *speB* تعیین گردید. نتایج نشان داد ژن‌های بیماری‌زای *speA*، *speB* و*speC* به ترتیب در ۶۹/۴، ۶۹/۴ و ۶۶/۷ درصد از سویه‌ها حضور داشتند. در سویه‌های جدا شده از بیماران، فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین *spA* ۶۷/۵، *speB* ۶۲/۵ و ژن *speC* ۶۷/۵ درصد بود. اگرچه ۷۱/۹ درصد از سویه‌های جدا شده از افراد حامل دارای ژن *speA* ، ۷۸/۱۰ درصد دارای *speB* و ۶۰/ ۶۵ درصد دارای ژن *speC* بود، اما تفاوت معنی‌داری بین ایزوله‌های حامل و بیمار (بالینی) در فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین وجود نداشت. در مجموع در این مطالعه شیوع ژن‌های *spe* در ایران برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت و طبق نتایج بدست آمده، توزیع فاکتورهای ویرولانس در میان سویه‌های GAS ایرانی ارتباط با بیماری را نشان نمی‌دهد. قطعا نتایج این مطالعه اطلاعات مفیدی پیرامون پتانسیل بیماریزایی سویه‌های GAS و نیز اپیدمیولوژی ملکولی این باکتری در ایران فراهم می کند.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس پایوژنز، اگزوتوکسین، *speA*، *speB*، *speC*

مقدمه

باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز گروهA (GAS)، باعث طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها شامل عفونت‌های سطحی پوست و دستگاه تنفس فوقانی تا عفونت‌های تهاجمی و خطرناکی مانند باکتریمی، سلولیت، باد سرخ، منتژیت، پنومونی، التهاب پلانتار نکروزان و سندروم شوک سمی استرپتوکوکی در انسان می‌شود (۱).

GAS دارای تعداد زیادی فاکتورهای بیماری‌زاست که به پاتوژنیسیته پیچیده آن کمک می کند از قبیل: پروتئین M، کپسول هیالورونیک‌اسید، استرپتوکیناز، استرپتولیزین، اگزوتوکسین‌های تب‌زای استرپتوکوکی (spe)، پروتئین‌های متصل‌شونده به فیبرونکتین، C5a پپتیداز. در این میان پروتئین M و اگزوتوکسین‌های تب‌زای استرپتوکوکی مهم‌ترین فاکتور-های ویرولانس در GAS هستند (۲). اگزوتوکسین‌های تب‌زای استرپتوکوکی توسط ژن‌های spe (Streptococcal pyrogenic exotoxin) کدشده و توسط طیف وسیعی از استرپتوکوکوس‌ها ترشح می‌شوند، فعالیت بسیار قوی به‌عنوان سوپرآنتی‌ژن دارند و نقش کلیدی در بروز بیماری ایفاء می‌کنند (۳). در مجموع بر اساس ساختمان پروتنینی و نحوه عملکرد، ۱۴ سوپرآنتی-ژن I*spe*, *speK*, *speL*, *speJ*, *speB*, *speO*, *speN*, *speM*, *speA*, *speC*, *speG*, *speH*, اگزوتوکسین میتوژن استرپتوکوکی Z (*smeZ*) و سوپرآنتی‌ژن‌های استرپتوکوکی (SSA) در GAS تا به امروز شناسایی شده‌است (۴). در واقع پروتئین‌های spe، توکسین‌هایی تب‌زا هستند که باعث افزایش حساسیت میزبان به شوک اندوتوکسیک و سرکوب تولید ایمونوگلوبولین‌ها می شوند. همچنین با فعالیت میتوژنیک خود زیر مجموعه‌ای از T-cell های خاص را فعال می‌کند که این فعالیت منجر به فعال‌شدن گسترده سیستم ایمنی و رهاسازی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند فاکتور نکروز تومور α، اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما می‌شود که نتیجه آن می تواند شوک و آسیب گسترده باشد (۵).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که پروفایل ژن‌های اگزوتوکسین در بین سویه‌های جداشده از بیماران و افراد حامل و نیز سویه‌های مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است (۲،۶). این تفاوت علاوه بر اینکه می تواند اطلاعاتی پیرامون نقش این ژن ها در نحوه بیماریزایی استرپتوکوک فراهم کند، همچنین اشاره به تفاوت های اپیدمیولوژی این باکتری دارد. لذا با توجه به اهمیت عفونت‌های استرپتوکوکی از یک طرف و نیز عدم گزارش در مورد سویه‌های ایران مطالعه حاضر برای اولین بار به منظور فراهم‌کردن اطلاعات ملکولی پیرامون فراوانی ژن-*های speA*، *speB* و *speC* در سویه‌های GAS و همچنین مقایسه میزان فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین بین سویه‌های بالینی و افراد حامل و نیز سویه‌های جدا شده از بیماران با علائم بالینی متفاوت صورت‌پذیرفت. لازم به ذکر است مطالعات محدودی در خصوص GAS در ایران صورت گرفته که عمدتا شامل بررسی فنوتیپی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد(۱۰-۷).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از بیماران با علائم عفونت استرپتوکوکی و نیز افراد حامل بدون علامت در طی مدت یک سال صورت پذیرفت. کشت نمونه‌های جمع‌آوری شده در محیط بلاد آگار حاوی ٪۵ خون دفیبرینه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ٪۱۰ انجام‌شد. شناسایی ایزوله‌های رشدیافته با استفاده از مورفولوژی کلنی، نحوه همولیز محیط کشت بلاد آگار، تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم و تست حساسیت به باسیتراسین (۰/۰۴U) انجام گرفت. سپس، سویه‌های تاییدشده در محیط کشت مایع BHI (Brain heart infusion) حاوی ۲۰درصد گلیسرول در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

به منظور تعیین ویژگی‌های مولکولی سویه‌هایGAS، استخراج DNA با استفاده از کیت DNA CinnaPure (سیناژن) صورت‌پذیرفت. ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده با استفاده از اسپکترو فتومتری صورت‌گرفت و نسبت‌های ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ بررسی شد. در نهایت جهت تایید کیفیت DNA، الکتروفورز روی ژل ٪۱ نیز انجام شد.

برای بررسی حضور ژن‌های *speA*،*speB* و*speC* در ایزوله‌های‌های مورد مطالعه، با توجه به TM پرایمرهای طراحی‌شده دو ژن *speA* و *speC* با استفاده از یک تست duplex PCR و ژن *speB* نیز در یک PCR به صورت منفرد تکثیر گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده (۳) و اندازه قطعات تکثیری در جدول ۱ نشان داده شده است. حجم نهایی هر واکنش PCR ۲۰ میکرولیتر و شامل ۲ میلی‌مولار یون منیزیم (MgCl2)، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۴۰ نانوگرم از ژنوم باکتری، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۵ پیکومول از جفت پرایمرهای اختصاصی(جدول ۱) می‌باشد. تکثیر *speB* در ۳۵ سیکل و شرایط دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سنتزDNA در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه انجام شد. همچنین، دناتوراسیون

اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و تکثیر نهایی واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. DuplexPCR جهت ارزیابی حضور ژن های *speA*و*speC* نیز در شرایط دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر DNA در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و برای ۳۵ سیکل انجام‌شد. در نهایت الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز۱٪ حاوی Gel Red تحت شرایط ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد و نتایج حاصله در طول موجUV مورد آنالیز قرار گرفت.

در تمامی مراحل تکثیر با PCR از سوش استاندارد *S. pyogenes* ATCC strains 12351 به عنوان کنترل مثبت و از واکنش فاقد DNA نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از محاسبه میزان فراوانی هر ژن در ایزوله‌های GAS تفاوت فراوانی ژن‌ها در دو گروه ایزوله‌های جداشده از بیماران و افراد حامل با استفاده از آزمون مربع کای و به کمک نرم افزار SPSS- 22 مورد بررسی قرار گرفت. *P-value*< 0.05 معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۱ - پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی ژن *speB* ,*speC*, *speA* در سویه‌های GAS.

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه قطعه (**bp**)
SpeB	Forward:AAGAAGCAAAAGATAGC Reverse:TGGTAGAAGTTACGTCC	۹۵۵
SpeA	Forward:TAAGAACCAAGAGATGG Reverse:ATTCTTGAGCAGTTACC	۲۴۸
SpeC	Forward:GATTTCTACTTATTTCACC Reverse:AAATATCTGATCTAGTCCC	۵۸۴

نتایج

در این مطالعه ۴۰ سویه GAS از بیماران (میانگین سنی ۹/۳ سال) و ۳۲ سویه از ناقلین بدون علامت (میانگین سنی ۱۶ سال) جدا شد که در مجموع از ۴۰ سویه جداشده از بیماران، ۱۲ سویه (۳۰٪) از نمونه‌های بیماریزای غیرفارنژیت شامل نمونه‌های جداشده از گوش (۴ مورد)، پوست (۱ مورد)، ادرار (۵ مورد) و خون(۲ مورد) و ۲۸ سویه (۷۰٪) از نمونه-های بیماریزایی فارنژیت بود. پس از استخراج DNA از سویه-های به دست‌آمده ، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن-های *speB*، *speA* و *speC* ، تست PCR جهت بررسی حضور این ژن‌ها صورت گرفت. تصویر ۱ تکثیر موفق ژن *SpeB* در یک PCR منفرد (A) و ژن‌های *speA* و*speC* را در duplex PCR، (B) نشان می‌دهد. در هر واکنش PCR حضور باند مورد نظر در کنترل مثبت و عدم حضور آن در کنترل منفی واکنش، صحت انجام واکنش را تایید می‌کند.

نتایج بررسی ملکولی نشان‌داد در بین ۷۲ سویه GAS مورد مطالعه فراوانی سه ژن *speA*، *speB* و *speC* به ترتیب ۶۶/۷ ، ۶۹/۴ و۶۹/۴ درصد می‌باشد. اگرچه توزیع این سه ژن در بین سویه‌های جدا شده از بیمار و حاملین الگوی متفاوتی دارد اما از نظر آماری این تفاوت در مورد هر سه ژن معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۲). همچنین میزان فراوانی این سه ژن در

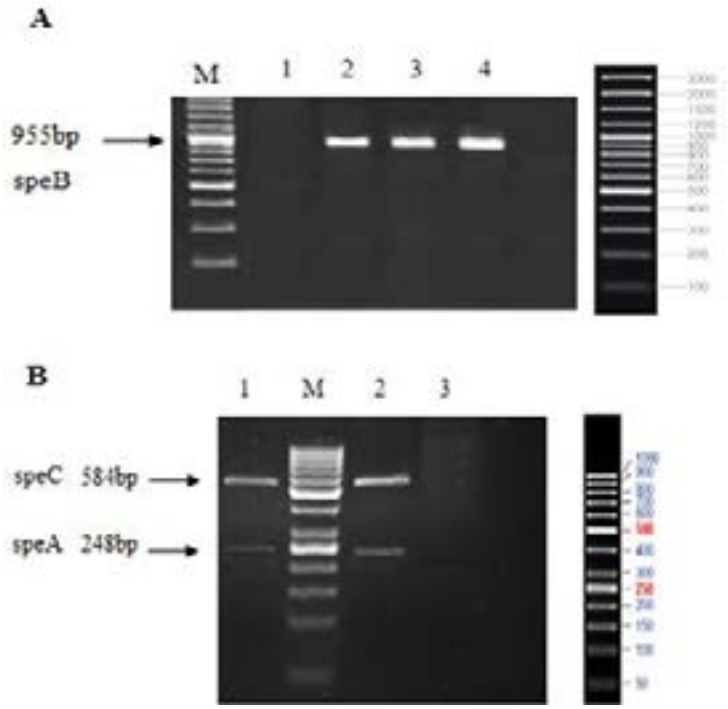
بین سویه‌های بیماریزای فارنژیتی و غیر فارنژیتی نیز تفاوت دارد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می شود، این تفاوت در ژن *speA* با فراوانی ۷۵درصد در سویه‌های فارنژیتی و ۵۰ درصد در غیر فارنژیت‌ها، بیشتر می‌باشد.

بررسی حضور توام ژن‌های *spe* در سویه‌های GAS نشان می-دهد که در ۲۵٪ سویه-های بیماری‌زا و ۳۷/۵٪ سویه‌های جدا شده از حاملین هر سه ژن *spe* مورد بررسی به صورت هم-زمان دیده می‌شوند. چهار سویه بیماری‌زا و یک سویه جداشده از حاملین نیز هیچکدام از ژن‌های مورد بررسی را نداشتند (جدول ۳).

بحث

نقش سوپرآنتی‌ژن‌ها در بیماری‌زایی با مطالعات اپیدمیولوژیک اخیر که نشان‌دهنده افزایش نسبی ایزوله‌های بیماری‌زایی است که دارای برخی از سوپرآنتی‌ژن‌ها می‌باشند

و نیز مطالعات سرولوژیک که پاسخ ایمنی نسبت به سوپرآنتی ژن‌ها را نشان داده است، اثبات شده است (۱۱). نتایج برخی از مطالعات بیانگر ارتباط بین اگزوتوکسین‌ها و بیماری‌های تهاجمی است. مطالعه Eriksson و همکاران از جمله این بررسی‌ها است (۱۲). هرچند در مقابل مطالعاتی نیز وجود دارد که که این ارتباط را رد می‌کند (۱۵-۱۳).



شکل ۱ - نتایج PCR ژن‌های *speB*، *speA* و *speC* در سویه‌های GAS. A) نتایج حاصل از تکثیر ژن *speB*: M: مارکر DNA(DNA Ladder marker 1Kb, Fermentas)، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک۲: کنترل مثبت، چاهک ۳ و ۴: نمونه دارای ژن *speB*. B) نتایج duplex PCR برای ژن‌های *speA* و *speC*: مارکر(DNA Ladder Marker 50 bp ,Fermentas) DNA، چاهک۱: کنترل مثبت، چاهک ۲: نمونه مثبت، چاهک ۳: کنترل منفی.

جدول ۲ - درصد حضور ژن‌های *speB* ,*speA* و *speC* در سویه‌های استرپتوکوکوس پایوژنز مورد مطالعه.

نمونه ها		سویه‌های حامل ژن (٪)		
	تعداد	*SpeC*	*SpeB*	*SpeA*
کل سویه‌ها	۷۲	۵۰ (۶۹/۴)	۵۰ (۶۹/۴)	۴۸ (۶۶/۷)
سویه‌های بیماری‌زا	۴۰	۲۷ (۶۷/۵)	۲۵ (۶۲/۵)	۲۷ (۶۷/۵)
نمونه‌های بیماری‌زای غیرفارنژیت	۱۲	۸ (۶۶/۶)	۷ (۵۸/۳)	۶ (۵۰)
نمونه‌های بیماری‌زای فارنژیت	۲۸	۱۹ (۶۷/۸)	۱۸ (۶۴/۲)	۲۱ (۷۵)
سویه‌های غیر بیماری‌زا	۳۲	۲۱ (۶۵/۶)	۲۵ (۷۸/۱)	۲۳ (۷۱/۸)
p value*		۰/۶۸۹	۰/۱۵۳	۰/۸۶۷

* مقدار *p value* تفاوت فراوانی بین سویه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا.

جدول ۳: حضور هم‌زمان ژن‌های *speA*, *speB* و*speC* در سویه‌های حامل و بیمار (تعداد=n)

Spe / سویه‌ها	*SpeC* n(%)	*SpeB* n(%)	*SpeA* n(%)	*SpeA/SpeB/SpeC* n(%)	*SpeB/SpeC* n(%)	*SpeA/SpeC* n(%)	*speA/SpeB* n(%)	Non of genes n(%)
بیماری‌زا	۳ (۷/۵)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۰ (۲۵)	۶ (۱۵)	۸ (۲۰)	۹ (۲۲/۵)	۴ (۱۰)
حامل	۱ (۳/۱)	۱ (۳/۱)	۳ (۹/۳)	۱۲ (۳۷/۵)	۶ (۱۸/۷)	۲ (۶/۲)	۶ (۱۸/۷)	۱ (۳/۱)
کل	۴ (۵/۵)	۱ (۱/۳)	۳ (۴/۱)	۲۲ (۳۰/۵)	۱۲ (۱۶/۶)	۱۰ (۱۳/۸)	۱۵ (۲۰/۸)	۵ (۶/۹)

در تکمیل این مطالعات و به منظور فراهم‌کردن اطلاعاتی برای اولین بار از وضعیت این ژن‌ها در سویه‌های ایرانی، در مطالعه حاضر سویه‌های استرپتوکوکوس پایوژنز جداشده از نمونه های بالینی و حاملین بدون علامت از نظر حضور ژن‌های *speA*، *speB* و *speC* مورد بررسی قرار گرفت.

طبق نتایج بدست آمده ژن *speA* برای حاملین بدون علامت در ایتالیا ۱۳/۹۰ ٪ (۱۹)، در آفریقای جنوبی برای حاملین بدون علامت ۸٪ و برای سویه‌های بیمار ۲۲٪ بوده‌است (۱۶). این یافته‌ها، تفاوت توزیع این ژن در جمعیت‌های مختلف را یادآور می‌شود. همچنین در پژوهش حاضر حضور این ژن در سویه‌های فارنژیت و غیرفارنژیت مورد بررسی قرار گرفت به‌طوری‌که*speA* در ۵۰٪ از سویه‌های غیرفارنژیت و (۷۵٪) از سویه‌های فارنژیتی حضور داشت. اگر چه این نتیجه با یافته‌های مطالعه‌ای در کانادا که در آن ۸۱/۳۰٪ از نمونه-های غیرفارنژیتی ژن *speA* را دارا بودند (۱۷)، مشابه است، اما در برخی بررسی‌ها نیز نتایج متفاوتی گزارش شده‌است. فراوانی ژن *speA* در تایوان ۹/۵۰٪ برای سویه‌های غیرفارنژیت و ۱۷/۲۰٪ برای سویه‌های فارنژیت (۱۸)، در ایتالیا ۱۶/۸۰٪ برای سویه‌های فانژیت (۱۹)، در دانمارک ۳۷٪ برای سویه‌های غیر فارنژیت و ۱۸٪ برای سویه‌های فارنژیت گزارش شده‌است (۲۱). در مطالعه حاضر فراوانی ژن *speA* در سویه‌های فارنژیت بسیار بیشتر می‌باشد، با توجه به کم بودن تعداد نمونه‌های غیرفارنژیت در این مطالعه، پیشنهاد می‌گردد بررسی‌های بیشتری روی سویه‌های غیرفارنژیت استرپتوکوکوس پایوژنز و به ویژه جداشده از مناطق دیگر ایران انجام گردد.

حضور ژن *speB* در سویه‌های جداشده از بیماران در کانادا ۴۳٪ (۱۷) و در مطالعه حاضر ۶۲/۵۰٪ بود. نتایج مطالعه حاضر در مورد حضور این ژن در سویه‌های بیمار تنها با مطالعه‌ای در آفریقای جنوبی با فراوانی ۷۹٪ نزدیک می-باشد. حضور این ژن در حاملین بدون علامت در مطالعه ما ۷۸/۱۰٪ بود در حالی‌که در آفریقای جنوبی فراوانی *speB* بسیار کمتر (۴۷٪) از ایران می‌باشد (۱۶). سویه‌های غیرفارنژیت حامل ژن *speB* در نروژ (۴)، دانمارک (۲۱)، هند (۲) و انگلیس (۲۲) به ترتیب ۹۹/۶۰٪، ۱۰۰٪، ۴۵٪ و ۱۰۰٪ بود، اما در مطالعه حاضر ۵۸/۳۳٪ گزارش‌شد. این تفاوت‌ها اگرچه ممکن است به دلیل ساختار ژنتیکی متفاوت سویه‌های ایرانی نسبت به مناطق جغرافیایی دیگر باشد اما همچنان باید توجه‌داشت که درصورت مطالعه روی نمونه‌های بیشتر غیرفارنژیتی احتمال تغییر این عدد نیز وجود دارد.

مطالعات قبلی نشان دادند که ژن *speC* در تشدید بیماری نقش دارد (۱۹،۲۲،۲۳) و فراوانی بالای آن در نمونه-های بیمار و حاملین بدون علامت در ایران هشداری است که با فعال شدن آن احتمال بیماری‌زاشدن سویه‌های ایرانی وجود دارد. در این مطالعه این ژن در ۲۱ نمونه (۶۵/۶۰٪) از حاملین بدون علامت و ۲۷ نمونه (۶۷/۵۰٪) بیمار وجود داشت. در آفریقای جنوبی این ژن در ۷۱٪ سویه‌های بیمار و ۴٪ حاملین بدون علامت یافت‌شد (۱۶)، همچنین این ژن در سویه‌های غیرفارنژیت ۸ نمونه (۶۶/۶۶٪) و در ۱۹ نمونه (۶۷/۸۵٪) از سویه‌های فارنژیت بود که تقریبا با حضور این ژن در دانمارک با ۵۹٪ در سویه‌های غیرفارنژیت و ۷۱٪ در سویه‌های فارنژیت همسو می‌باشد (۲۱). اما در آلمان ۴۱/۸۰٪ سویه‌های فارنژیت

دارای این ژن بودند که با مطالعه حاضر همسو نمی‌باشد درحالی‌که ایزوله‌های غیرفارنژیت ۶۰/۸۰٪ در آلمان (۲۰) از لحاظ حضور این ژن با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. به طور کلی نتایج بیانگر توزیع متفاوت ژن‌های اگزوتوکسین در مناطق مختلف بوده در عین حال، بیانگر بالا بودن فراوانی این ژن‌ها در سویه‌های ایرانی است.

در این مطالعه اگرچه فراوانی *speA* در سویه‌های سالم یا حاملین بدون علامت (۷۱/۴۰٪) بیشتر از سویه‌های بیمار (۶۷/۵۰٪) است، اما نتایج آنالیز آماری نشان داد که این تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد (*P= 0.689*). فراوانی ژن *speB* نیز در سویه‌های جداشده از بیماران ٪۶۲/۵۰ و سویه-های جداشده از افراد سالم ٪۷۸/۱۰ تفاوت معنی‌داری ندارد (*P = 0.153*). همچنین فراوانی ژن *speC* در سویه‌های سالم ٪۶۵ بود در صورتی‌که ۲۷ نمونه از سویه‌های بیمار وجود ژن *speC* را نشان‌دادند، این میزان تفاوت در دو گروه سالم و بیمار معنی-دار نمی‌باشد (*P= 0.867*). تاجایی که ما می‌دانیم تنها دو مطالعه تاکنون به بررسی تفاوت فراوانی این ژن‌ها در دو گروه بیمار و حاملین سالم پرداخته‌اند که نتایج Creti و همکاران در سال ۲۰۰۵ در کشور ایتالیا مشابه مطالعه حاضر بوده و اختلاف معنی‌داری بین حضور این ژن‌ها در دو گروه مشاهده نشد (۱۹). در مقابل مطالعه‌ای در آفریقای جنوبی در سال ۲۰۱۲ انجام شده که نشان می‌دهد فراوانی هر سه ژن در گروه بیمار و حاملین بدون علامت به طور معنی‌داری متفاوت است. (۱۶). به عبارتی این مطالعه به نوعی نشان داده‌است که حضور ژن‌های اگزوتوکسین تب‌زا و بیان آنها در باکتری باعث بیماری‌زایی سویه‌های آفریقای جنوبی شده‌است. نکته‌ای که در اینجا لازم است ذکرگردد این است که حتی اگر فراوانی این ژن‌ها در گروه بیمار و حاملین تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشته باشد و نشان‌دهنده ارتباط مستقیم این ژن‌ها با بیماری‌زایی در سویه‌های یک منطقه جغرافیایی نداشته‌باشد اما اگر فراوانی ژن‌های اگزوتوکسین تب‌زا در گروه حاملین بالا باشد هشداری‌است بر پتانسیل بیماری‌زایی سویه‌های غیربیماریزا، چرا که تحت شرایطی مثل تغییرات محیطی یا تعاملات باکتری و میزبان ممکن است این ژن‌ها فعال شده و باکتری بیماری‌زا گردد. این مساله دقیقا هم در مطالعه حاضر و هم مطالعه انجام شده در ایتالیا قابل ملاحظه‌است چرا که در هر دو مطالعه فراوانی ژن‌های spe در حاملین نیز شبیه سویه‌های بیمار بالا می‌باشد. این نکته لازم است توسط پزشکان مورد توجه قرارگیرد چرا که سویه‌ای از GAS که در حال حاضر علامتی ایجاد نکرده یا تنها علایم ملایمی از عفونت فارنژیتی را دارد ممکن است تحت تغییر شرایط بیمار به سویه‌ای خطرناک با تظاهرات شدید بالینی تبدیل شود.

نتیجه گیری

بررسی حضور ژن‌های *speA*،*speB* و *speC* در بین سویه-های بالینی و افراد سالم اطلاعاتی پیرامون نحوه ارتباط علائم بالینی و حضور این ژن‌ها در سویه‌های بالینی به ما می‌دهد. علاوه بر این اطلاعات اپیدمیولوژیکی در مورد وضعیت سویه-های بومی یک منطقه جغرافیایی ارائه می‌کند، به طوری‌که طبق نتایج مطالعه حاضر قراوانی این ژن‌ها به طور کلی نسبت به مطالعات دیگر در دیگر مناطق دنیا بیشتر می‌باشد که خود می‌تواند اشاره‌ای به بالا بودن پتانسیل بیماری‌زایی بیشتر سویه‌های ایرانی داشته‌باشد. هر چند فراوانی این ژن‌ها در دو گروه سالم و بیمار تفاوت معنی‌داری نداشتند. اما این حضور بالا در سویه‌های جدا شده از افراد سالم هشداری است که احتمالا در شرایط فرصت طلب این سویه‌ها نیز بتوانند بیماری‌زا شده و بیماری‌های خطرناکی مانند فارنژیت، گلومرولونفریت، اوتیت، تب مخملک و غیره را ایجاد کنند.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا می باشد. .

منابع مورد استفاده

1. Facklam, R., 2002. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clin Microbiol 15: 613–630.
2. Balaji, K., Thenmozhi, R., Prajna, L., Dhananjeyan, G., Pandian, S. K., 2013.

Comparative analysis of emm types, superantigen gene profiles and antibiotic resistance genes among *Streptococcus pyogenes* isolates from ocular infections, pharyngitis and asymptomatic children in south India. Infect Genet Evol 19: 105-112.

3. Hotomi, M., Hotomi, DS., Togawa, A., Ikeda, Y., Takei, S., Kono, M., Ogami, M., Ubukata, K., Sugita, R., Fujihara, K., Yamanaka, N., 2009. Distribution of fibronectin-binding protein genes (prtF1 and prtF2) and streptococcal pyrogenic exotoxin genes (spe) among *Streptococcus pyogenes* in Japan. J Infect Chemother 15: 367-373.
4. Meisal, R., Andreasson, I. K. G., Hqiby, E. A., Aaberge, I. S., Michaelsen, T. E., Caugant, D. A., 2010. *Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in norway in 2006 to 2007: emm types, multilocus sequence types, and superantigen profiles. J Clin Microbiol 48: 842-851.
5. Commons, R., Rogers, S., Gooding, T., Danchin, M., Carapetis, J., Robins-Browne, R., Curtis, N., 2008. Superantigen genes in group A streptococcal isolates and their relationship with emm types. J Med Microbiol 57: 1238-1246.
6. Maripuu, L., Eriksson, A., Norgren, M., 2008. Superantigen gene diversity among clinical groupA streptococcal isolates. FEMS Immunol Med Microbiol 54: 236–244.
7. Ghaffari, M., Moaddab, R., Rafi, A., Roshdi-Maleki, M., 2012. Study of group A β-hemolytic streptococci colonization and resistance drug of isolates on 12-14 year old healthy students of aras free zone schools. Iran J Med Microbiol 6: 40-50 (In Persian).
8. Javan, K., Baghbani-Arani, F., Davari, K., 2015. Characterization of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes:* prevalence, phenotype and genotype. Pajouhandeh 20: 45-50 (In Persian).
9. Sasan, M. S., Riyahi, F., Birjandi, B., Naderinasab, M., Ejtehadi, M. M., 2011. Extremely high prevalence of erythromycin resistance of group A beta hemolytic Streptococci in Mashhad (Iran). Iran Pediatr 21: 126-128 (In Persian).
10. Mohseni, F., Shahidizandi, B., Shabani, Shahrbabak, Z., Rezaeian, M., Jafarpour, P., Hadavi, M., 2013. Antibiotic resistance pattern on Beta hemolytic (A) streptococci among Rafsanjan's secondary school pupils in 2009. J Rafsanjan Univ Med Scie 12: 291-298 (In Persian).
11. Commons, R. J., Smeesters, P. R., Proft, T., Fraser, J. D., Browne, R. R., Curtis, N., 2014. Streptococcal superantigens: categorization and clinical associations. Trends Mol Med 20: 48-62.
12. Eriksson, B. K., Andersson, J., Holm, S. E., Norgren, M., 1999. Invasive Group A Streptococcal Infections: Isolates Expressing Pyrogenic Exotoxins A and B in Combination with Selective Lack of Toxin-Neutralizing Antibodies Are Associated with Increased Risk of Streptococcal Toxic Shock Syndrome. J Infect Dis 180:410–8.
13. Mylvaganam, H., Bjorvatn, B., Osland, A., 2000. Distribution and sequence variations of selected virulence genes among group A streptococcal isolates from western Norway. APMIS 108: 771- 8.
14. Hsueh, P. R., Wu, J. J., Tsai, P. J., Liu, J. W., Chuang, Y. C., Luh, K. T., 1998 .Invasive group A streptococcal disease in Taiwan is not associated with the presence of streptococcal pyrogenic exotoxin genes. Clin Infect Dis 26: 584-9.
15. Deschemaeker, P., Loock, F. V., Hauchecorne, M., Vandamme, P., Goossens, H., 2000. Molecular characterization of group A streptococci from invasive and non- invasive disease episodes in Belgium during 1993-1994. J Med Microbiol 49: 467-471.
16. Muhamed, B., 2012. The molecular characterization of group A Srteptococcus among children with pharyngitis in the Vanguard community (Bonteheuwel/ Langal), Cape town, South Africa. University of Cape Town: Ph. D thesis.
17. Tyler, S. D., Johnson, M. W., Huang, J. C., Ashton, F. E., Wang, G., Low, D. E., Rozee, K. R., 1992. Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strain isolated in Canada from 1940 to 1991. J Med Microbiol 30: 3127-3131.
18. Creti, R., Gherardi, G., Imperi, M., Hunolstein, C. V., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Alfarone, G., Cardona, F., Dicuonzo, G., Orefici, G., 2005. Association of group A streptococcal emm types with virulence traits and macrolide resistance genes is independent of the source of isolation. J Med Microbiol 54: 913-917.
19. Wu, P. C., Lo, W. T., Chen, S. J., Wang, C. C., 2013. Molecular characterization of group A streptococcal isolates causing scarlet fever and

20. pharyngitis among young children: A retrospective study from a northern Taiwan medical center. J Microbiol Immunol Infect 6: 1-7.

21. Ekelund, K., Darenberg, J., Norrby T. A., Hoffmann, S., Bang, D., Skinhqj, P., Konradsen, H. B., 2005. Variations in emm type among group A streptococcal isolates causing invasive or non-invasive infections in a nationwide study. J Clin Microbiol 43: 3101–3109.

21.Luca H. B., Ekelund, K., Vander, M., Staum-Kaltoft, M., Hammerum, A., Jasir, A., 2008. Clinical and epidemiological aspects of invasive *Streptococcus pyogenes* infections in Denmark during 2003 and 2004. J Clin Microbiol 46: 79-86.

22.Talkington, D. F., Schwartz, B., Black, C. M., Todd, J. K., Elliott, J., Breiman, R. F., Facklam, R. R. 1993. Association of phenotypic and genotypic characteristics of invasive streptococcus pyogenes isolates with clinical components of Streptococcal toxic shock syndrome. Infect Immun 61: 3369-3374.

23. Brussow, H., Canchaya, C., Hardt, W., 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements tolysogenic conversion. Microbiol Mol Biol Rev 68: 560–602.