مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره ۲، بهمن ۱۳۹۳، صفحه ۳۵-۲۹

روش مولکولی شناسایی استرپتوکوکوس آگالاکتیه با استفاده از ژن gbs1805 و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها

ساناز ده باشی (MSc)[۱]، محمدرضا پورمند (PhD)*[۲]، محمود محمودی (PhD)[۳]، راحیل مشهدی (MSc)[۴]

۱-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲-مرکز تحقیقات زیست فناوری، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳-گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴-مرکز تحقیقات اورولوژی بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: ۹۳/۶/۷ ، اصلاح:۹۳/۷/۲ ، پذیرش:۹۳/۹/۵

خلاصه

سابقه و هدف: استرپتوکوکوس آگالاکتیه عامل اصلی ایجاد کننده سپسیس و منتژیت در نوزادان و پنومونی و باکتریمی در افراد مسن است. علی رغم اهمیت روزافزون این پاتوژن، آمار دقیقی از شیوع عفونت های ناشی از آن به خصوص در بزرگسالان در دسترس نیست. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه و مطالعه بیوانفورماتیک و آزمایشگاهی کاربری ژن gbs1805 در شناسایی ایزوله ها می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه مقطعی، ۵۲۲ نمونه ادراری و سواب ژنیتال از بیماران مشکوک به عفونتهای دستگاه ادراری تناسلی جمع آوری شده و با روش کشت و تستهای بیوشیمیایی بررسی شدند. ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه، از نظر وجود ژنgbs1805 و نیز حساسیت آنتی بیوتیکی طبق راهنمای CLSI مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این بررسی، ۵۴ ایزوله استرپتوکوکوس آگالاکتیه (۱۰/۳٪) از عفونت های ناشی از آن جداسازی گردید. ایزوله های فوق همگی دارای ژن حفاظت شده gbs1805 بودند. بیشترین و کمترین میزان حساسیت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون (۷۶٪) و اریترومایسین (۳۳٪) مشاهده شد.

نتیجه گیری: شناسایی ژن حفاظت شده gbs1805 در نمونه های بالینی می تواند بیان کننده عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه باشد. با توجه به مقاومت رو به افزایش در ایزوله ها نسبت به پنی سیلین استفاده از آنتی بیوتیکهای جایگزین مناسب در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ضروری است.

واژه های کلیدی: استرپتوکوکوس آگالاکتیه، تشخیص مولکولی، ژن gbs1805، حساسیت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

استرپتوکوکوس آگالاکتیه در دستگاه های ادراری-تناسلی، تنفسی و گوارشی کلونیزه می شود. این باکتری در نوزادان موجب بروز باکتریمی، پنومونی و منتژیت می شود (۱). بیماری در نوزادان اغلب توسط سروتیپ های کپسولی Ia، III و V ایجاد می گردد. این باکتری موجب باکتریمی، پنومونی، عفونت های پوستی در زنان غیر باردار و مردان مسن و نیز عفونت زخم وعفونت های دستگاه ادراری و باکتریوری بدون علامت و سیستیت یا التهاب حاد مثانه و التهاب حاد کلیه و لگنچه اکتسابی از واژن در زنان باردار می شود. اغلب بیماری های بزرگسالان توسط سروتیپ های Ia و V بروز می کند (۳و۲). طی دهه گذشته شیوع عفونت‌های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه به خصوص در افراد پیر مبتلا به نقص ایمنی افزایش یافته است، به طوری که در حال حاضر در ایالات متحده اکثر مرگ و میرهای مرتبط با استرپتوکوکوس آگالاکتیه بین افراد مسن رخ می‌دهد (۵و۴). میزان کلونیزاسیون استرپتوکوکوس آگالاکتیه در زنان باردار در ایالات متحده و سایر کشور های صنعتی بین ۲۴-۱۶ درصد بوده (۶) و نیز ۳۴-۳۲ درصد زنان غیر باردار و مردان در آمریکا در دستگاه های ادراری و تناسلی با استرپتوکوکوس آگالاکتیه کلونیزه می شوند (۷). در ایران میزان کلونیزاسیون واژن با استرپتوکوکوس آگالاکتیه در زنان باردار ۲۶/۷-۵/۲ درصد گزارش شده است (۱۰-۸). اما در رابطه با میزان کلونیزاسیون دستگاههای ادراری و تناسلی در بالغین غیر باردار در ایران مطالعاتی در دسترس نیست. انتقال عفونت از طریق تماس های جنسی و یا گوارش صورت می گیرد (۷). انتقال به نوزاد حین عبور از کانال زایمان و یا از طریق مایع آمنیوتیک رخ می دهد (۱۱). کلونیزاسیون بدون

▣ این مقاله حاصل پایان نامه ساناز ده باشی دانشجوی رشته میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمدرضا پورمند
آدرس: تهران خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی. تلفن: ۸۸۹۵۴۹۱۰-۰۲۱
E-mail: mpourmand@tums.ac.ir

[DOI: 10.22088/jbums.17.2.29] [DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.4.9]

علامت استرپتوکوکوس آگالاکتیه در افراد سالم می تواند باعث انتقال باکتری به افراد با ریسک بالا شامل زنان باردار، افراد مسن و افراد تحت درمان شود. بنابراین تعیین شیوع عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه در جامعه به منظور جلوگیری از انتقال آن به افراد با ریسک بالا و نیز نوزادان لازم است. آنتی بیوتیک پنی سیلین، داروی خط اول برای درمان عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه است. در حالی که این باکتری به پنی سیلین، آمپی سیلین و و نکومایسین حساس است اما به خط دوم آنتی بیوتیک ها مثل اریترومایسین و کلیندامایسین مقاومت (۲۰-۱۰ درصد) پیدا کرده است (۱۲). همچنین در سالهای اخیر، مواردی از مقاومت باکتری به پنی سیلین نیز مشاهده است (۱۳). در مطالعات مختلفی که تاکنون انجام شده است، ژن های متعددی برای تشخیص مولکولی باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه در نمونه های بالینی، استفاده شده اند. برخی از این ژن ها نظیر scpB و cfb به عنوان شاخصی برای تشخیص توسط PCR تایید شدند (۱۵و۱۴).

ژن های دیگری نظیر lmb، bca، bac و rib نیز مورد بررسی قرار گرفته اند که حضور آن ها در همه ایزوله ها مورد تایید قرار نگرفت (۱۶). در بررسی بیوانفورماتیک ژنوم استرپتوکوکوس آگالاکتیه به مجموعه ای از پروتئین ها برمی‌خوریم که به نظر می رسد مشابه با پروتئین های متصل شونده به گلوکان در سایر باکتری ها هستند. گلوکان پلی ساکارید تشکیل شده از واحدهای دی گلوکز است. پروتئینهای متصل شونده به گلوکان شامل آنزیم هایی هستند که سنتز گلوکان را کاتالیز می کنند و در ضمن توانایی هیدرولیز گلوکان به نشاسته و سلولز مورد نیاز برای رشد باکتری رادارند (۱۷). ژن gbs1805 که کد کننده این پروتئین است و تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است در این مطالعه مورد توجه قرار می گیرد. مطالعه بیوانفورماتیک نشان داد که ژن gbs1805 به صورت حفاظت شده صرفا در باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه با ترادف معنی داری وجود دارد. بنابراین به نظر می رسد که استفاده از شاخص جدیدی که به صورت کاملا حفاظت شده منحصرا در ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه وجود دارد، جهت تشخیص آزمایشگاهی این گونه باکتریایی، مفید باشد. مطالعه حاضر علاوه بر بررسی عفونتهای ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه و حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها، در نظر دارد تا کارایی تشخیص مولکولی این عفونتها توسط ژن gbs1805 را نیز مورد توجه قراردهد.

مواد و روش‌ها

روش نمونه گیری: دراین پژوهش مقطعی ۵۲۲ نمونه ادراری و سواب ژنیتال از بیماران مشکوک به عفونت های دستگاه ادراری-تناسلی مراجعه کننده به آزمایشگاه های پاتوبیولوژی نور و مرکزی مورد مطالعه قرار گرفت.

کشت و آنتی بیوگرام: پس از کشت باکتری روی محیط آگار خوندار و انکوباسیون شبانه، باکتری های گرم مثبت دارای همولیز بتا از نظر تست های کاتالاز، CAMP و رشد در محیط بایل اسکولین مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری های کاتالاز منفی که تست CAMP مثبت داشته و فاقد توانایی رشد در بایل اسکولین بودند، به عنوان استرپتوکوکوس آگالاکتیه تایید شدند. حساسیت ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۱۰ units)، آمپی سیلین (۱۰µg)، ونکومایسین(۳۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، کلیندامایسین (۲ µg) و سفتریاکسون (۳۰ µg) در محیط مولر هینتون بلاد آگار و انکوباسیون شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر اساس راهنمای CLSI با دیسک های شرکت Himedia(India) بررسی شد.

استخراج ژنوم: ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه در ۵ میلی لیتر محیط LB broth تلقیح و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از این مدت محیط کشت مورد نظر در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس به ته نشین آن۳۰۰ میکرولیتر از محلول STET(Tris-Hcl, EDTA, Triton X100, NaCl) اضافه و مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانده شدند. پس از آن مخلوط مورد نظر در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده، مایع رویی به میکروتیوب استریل دیگری منتقل شده و سه برابر حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید و ۲۰ دقیقه در ۲۰- درجه قرار داده شد. پس از این مدت، میکروتیوب در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی خارج شده و در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید تا الکل آن کاملا خشک شود. سپس ۵۰ µl آب مقطر استریل به میکروتیوب ها اضافه شده و در ۲۰- درجه نگهداری شدند. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده، آن را روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز کردیم.

تکنیک PCR: طراحی پرایمرها در این مطالعه براساس اطلاعات ژن gbs1805 پایگاهJCVI sequencedatabase انجام گرفت. توالی پرایمرهای Forward و Reverse در این مطالعه به ترتیب زیر تعیین گردیدند:

Forward Primer: AAT ACA TAT AAC TAT GCA GTA GAT GTA

Reverse primer: ATT CGG ATA AAT GTA GCT AAC TAC

ژن حفاظت شده gbs1805 در ایزوله های مورد بررسی با تکنیک PCR با ۱۲ میکرولیتر از مخلوط mastermix (سیناکلون، ایران)، ۲ میکرولیتر DNA (۵۷ ng/ul) و یک میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ pmol/µl) و ۹ میکرولیتر آب مقطر استریل طبق برنامه موجود در جدول یک تکثیر گردید. سویه استاندارد استرپتوکوکوس آگالاکتیه NEM316 بر اساس مراحل ذکر شده از نظر وجود ژن gbs1805 مورد بررسی قرار گرفت و محصول به دست آمده برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. جهت بررسی نتایج از آزمون مک نیمار با سطح معنی داری $p<0/05$ استفاده شد.

جدول ۱. برنامه PCR برای شناسایی ژن gbs1805

مراحل	دما/زمان	تعداد دوره ها
واسرشتگی اولیه	۹۵°C/ ۵ دقیقه	۱
واسرشتگی ثانویه	۹۵°C/ یک دقیقه	۳۰
اتصال	۵۹°C/ ۴۵ ثانیه	
طویل سازی	۷۲°C/ ۴۵ ثانیه	
طویل سازی نهایی	۷۲°C/ ۱۰ ثانیه	

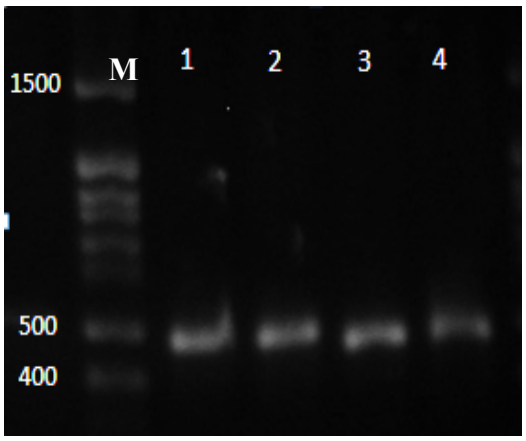
[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.4.9]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.29]

یافته ها

از ۵۲۲ نمونه مورد بررسی، ۵۴ ایزوله استرپتوکوکوس آگالاکتیه (۱۰/۳ درصد) شامل ۶ ایزوله از سواب ژنیتال و ۴۸ ایزوله از نمونه های ادراری جداسازی گردیدند. ۵۵ درصد نمونه ها از جنس مونث و ۴۵ درصد از جنس مذکر بودند. ۸۵ درصد ایزوله ها از نمونه های مربوط به زنان بیمار جداسازی شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها بررسی شده و بیشترین و کمترین میزان حساسیت به ترتیب در سفتریاکسون و ونکومایسین (۷۶ درصد) و اریترومایسین (۴۸ درصد) بدست آمد (جدول ۲). بین آنتی بیوتیک های پنی سیلین و اریترومایسین و نیز آنتی بیوتیکهای سفتریاکسون و اریترومایسین اختلاف معنی داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). همه ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه جدا شده به روش کشت، از نظر ژن حفاظت شده gbs1805 مورد بررسی قرار گرفتند. ایزوله هایی که دارای باند حدود ۴۳۲ جفت باز در الکتروفورز محصول PCR بودند، به عنوان حمل کننده ژن gbs1805 تایید شدند (شکل ۱).

جدول ۲. حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه

آنتی بیوتیک	حساس تعداد(درصد)	حساسیت حدواسط تعداد(درصد)	مقاوم تعداد(درصد)
پنی سیلین(۱۰ units)	۳۲(۶۴)	–	۱۸(۳۶)
آمپیسیلین(۱۰µg)	۲۹(۵۸)	–	۲۱(۴۲)
ونکومایسین(۳۰µg)	۳۸(۷۶)	–	۱۲(۲۴)
سفتریاکسون(۳۰µg)	۳۸(۷۶)	–	۱۲(۲۴)
اریترومایسین(۱۵µg)	۲۴(۴۸)	۱۸(۳۶)	۸(۱۶)
کلیندامایسین(۲µg)	۳۵(۷۰)	۶(۱۲)	۹(۱۸)



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژنgbs1805 با باند حدود ۴۳۲ جفت باز روی ژل آگارز ۱ درصد.(M) مارکر 100bp(Gene On, USA)،(۱) کنترل مثبت، سویه Streptococcus agalactiae NEM316، ۴-۲ ایزوله های دارای ژن gbs1805

سویه Streptococcus agalactiae NEM316 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بر این اساس، همه ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه دارای ژن gbs1805 بودند. نتیجه تعیین توالی ژن در Gene Bank ثبت گردیدو هیچ گونه موتاسیونی در ژن مورد بررسی دیده نشد (Accession Number: KM39696). نتایج هم ردیفی چندگانه(Multiple Alignment) نشان داد که این ژن در سویه های مختلف استرپتوکوکوس آگالاکتیه شباهت ۱۰۰ درصدی داشته و کاملا حفاظت شده است. علاوه بر آن ژن gbs1805 اختصاصی باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه بوده و در سایر باکتری ها مشاهده نمی شود.

بحث و نتیجه گیری

از ۵۲۲ نمونه مورد بررسی در این مطالعه ، ۵۴ ایزوله استرپتوکوکوس آگالاکتیه جدا شد که ۸۸ درصد موارد مثبت از نمونه های ادراری بودند. ۸۵ درصد ایزوله ها از خانم ها جداسازی گردید که این میزان نشان دهنده بالا بودن آلودگی در میان زنان نسبت به مردان است. هم چنین، همه ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه به دست آمده در این مطالعه، از نظر ژن gbs1805 مثبت بودند. ۶۴ درصد ایزوله ها حساس به پنی سیلین و ۴۸ درصد حساس به اریترومایسین بودند. در ایران مطالعاتی روی میزان کلونیزاسیون و عفونت در زنان باردار صورت گرفته است که شیوع کلونیزاسیون را بین ۲۶/۷-۵/۲ درصدگزارش کرده اند (۱۱و۱۰). در مطالعه ای دیگر در شهر تهران مشخص شد که شیوع کلونیزاسیون در زنان باردار ۹/۶ درصد است (۱۴). در مطالعه ما تعداد زنان باردار ۴ نفر (۳/۸ درصد زنان باردار) بود که نتایج آن به دلیل تعداد کم نمونه قابل مقایسه با مطالعه اخیر نیست. در بررسی بیست ساله ای که در انگلستان و ولز طی سال های ۱۹۹۹ تا ۲۰۱۰ انجام گرفت، مشخص گردید که میزان سالانه گزارش موارد عفونت استرپتوکوکوس آگالاکتیه دو برابر شده است (از ۱/۴ به ۲/۹ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت) که افزایش قابل توجهی در میان بالغین مشاهده می شود (۱۸). همچنین در بررسی های دیگر مشخص گردید که موارد ابتلا به عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه در میان بزرگسالان، ۳۲ درصد افزایش یافته است (۱۹). در مطالعه اخیر میزان عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه ۱۰/۳ درصد به دست آمده که ۹۴ درصد موارد عفونت در بالغین مشاهده است که به نظر می رسد اگرچه میزان عفونت در نوزادان به دلیل پروفیلاکسی آنتی بیوتیکی کاهش یافته است ولی تغییر روندی به سمت عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه در بالغین دیده می شود.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های بدست آمده نشان داد که پنی سیلین با ۶۴ درصد حساسیت هم چنان یک داروی مناسب برای درمان عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه است. اما باید به این نکته توجه داشت که کاهش حساسیت ایزوله های بالینی نسبت به پنی سیلین، لزوم انتخاب یک آنتی بیوتیک جایگزین مناسب را مطرح می کند. مطالعات مختلف نشان دادند که ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه هیچ گونه مقاومتی نسبت به بتالاکتام ها نشان نمی‌دهند اما میزان مقاومت به اریترومایسین بین ۱۵-۴/۷ درصد گزارش شد (۲۲-۲۰). مطالعاتی که در سال های ۲۰۰۸ و ۲۰۱۱ در ژاپن صورت گرفت، نشان دادند که میزان حساسیت ایزوله های بالینی استرپتوکوکوس آگالاکتیه به پنی سیلین رو به کاهش است که علت آن تغییر در پروتئین PBP2X در دیواره باکتری است، به طوری که ادامه استفاده از این آنتی بیوتیک به عنوان خط اول

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.4.9]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.29]

درمان عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه با چالش رو به رو شده است(۲۴و۲۳). در مطالعه ای دیگر که در نروژ اجرا شد، مقاومت آنتی بیوتیکی ۴۲۶ ایزوله جدا شده به آنتی بیوتیک های اریترومایسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین به ترتیب ۱۰/۲، ۹/۶ و ۷۶/۶ درصد نشان داده شد. همچنین حساسیت به پنی سیلین در این مطالعه۱۰۰ درصد گزارش شد(۲۵). در یک بررسی در سوئیس مشخص گردید که از ۳۶۴ ایزوله بررسی شده، همگی به پنی سیلین حساس بوده و میزان مقاومت به اریترومایسین و کلیندامایسین (با احتساب مقاومت القایی) به ترتیب ۱۴/۵و ۱۴ درصد بود (۲۶). در مطالعه ما حساسیت ایزوله های جدا شده به بتالاکتام ها از ۵۳ تا ۷۶ درصد متغیر بوده و همچنین حساسیت به اریترومایسین ۳۳ درصد بدست آمد. به نظر می رسد دلایل افزایش مقاومت به بتالاکتام در ایزوله های جدا شده مصرف بی رویه آنتی بیوتیک، استفاده از راهنماهای اروپایی یا آمریکایی برای تجویز آنتی بیوتیک و نیز خطای آزمایشگاهی برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه در کشور باشد. بنابراین با توجه به افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک های رایج، سفتریاکسون (۷۶ درصد حساسیت) می تواند انتخاب مناسبی برای درمان عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه به خصوص در موارد وجود آلرژی به پنی سیلین یا مقاومت ایزوله ها به این آنتی بیوتیک باشد.

در سال های اخیر از ژن cfb و scpB (۱۵و۱۴)و نیز ژنهای hylB، scpB، cylE، lmb، rib، bcaوbac جهت شناسایی استرپتوکوکوس آگالاکتیه استفاده شده است(۱۶). در مطالعه Dmitriev و همکاران روی تشخیص کلینیکی ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه با ژنscpB، مشخص گردید که این ژن می تواند به عنوان یک ابزار تشخیصی برای استرپتوکوکوس آگالاکتیه کاربرد داشته باشد (۲۷). در مطالعه دیگری حساسیت و ویژگی روش PCR برای ژن scpB به ترتیب ۹۹/۶ درصد و ۱۰۰ درصد و برای ژن cfb به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸ درصد گزارش شد (۲۸و۱۰). در یک مطالعه در مالزی وجود ژنهای hylB، scpB، cylE و lmb در تقریبا همه ایزوله های جدا شده استرپتوکوکوس آگالاکتیه (۱۰۳ ایزوله) تایید شد، در حالی که ژن های rib، bca و bac در ۲۹/۱، ۱۴/۶ و ۹/۷ درصد ایزوله های مورد بررسی وجود داشت (۱۶). در مطالعه حاضر از ژن gbs1805 جهت تایید ایزوله های استرپتوکوکوس آگالاکتیه جداشده با روش کشت استفاده شد که مشخص گردید این ژن به صورت حفاظت شده در تمام این ایزوله ها بدون استثنا وجود دارد. همچنین مطالعات بیوانفورماتیک نشان دادند که این ژن اختصاصی استرپتوکوکوس آگالاکتیه است و در سایر باکتری ها وجود ندارد. با توجه به تجربه آزمایشگاهی این مطالعه به نظر می رسد بتوان از این ژن جهت تشخیص عفونت های استرپتوکوکوس آگالاکتیه استفاده کرد. در مطالعات بیوانفورماتیک گذشته ژنهای متعددی در گونه های باکتریایی گرم مثبت مورد توجه قرار گرفته است که نقش بسزایی در شفاف سازی کاربری آنها در تشخیص گونه ها داشته است (۳۲-۲۹). شناسایی ژن حفاظت شده gbs1805 در نمونه های بالینی می تواند در تشخیص عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه کارایی داشته باشد. با توجه به مقاومت رو به افزایش در ایزوله ها نسبت به پنی سیلین و حساسیت قابل توجه به سفتریاکسون به نظر می رسد آنتی بیوتیک اخیر جایگزین مناسبی جهت درمان عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران، همچنین از کارکنان محترم بخش میکرب شناسی آزمایشگاه های پاتوبیولوژی مرکزی و نور تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.4.9]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.29]

Molecular Identification of Streptococcus agalactiae Using gbs1805 Gene and Determination of the Antibiotic Susceptibility Pattern of Isolates

S. Dehbashi (MSc)[1], M.R. Pourmand (PhD)*[2], M. Mahmoudi (PhD)[3], R. Mashhadi (MSc)[4]

1.Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
2.Biotechnology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
3.Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
4.Urology Research Centre, Sina Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 17(2); Feb 2015; PP:29-35

Received: Aug 29th 2014, Revised: Sep 24th 2014, Accepted: Nov 26th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Streptococcus agalactiae is the major factor for sepsis and meningitis in newborns and pneumonia and bacteremia in the elderly. Despite the importance of this pathogen, no accurate statistics are available regarding the prevalence of associated infections in adults. The purpose of this study was to analyse the efficacy of gbs1805 gene in the identification of isolates using laboratory and bioinformatic analyses and determine the prevalence of infections caused by Streptococcus agalactiae.

METHODS: In this cross-sectional study, 522 urine samples and genital swabs were collected from patients with suspected urinary tract infections and analyzed using culture and biochemical tests. The Streptococcus agalactiae isolates were examined for the presence of gbs1805 gene and antibiotic susceptibility was determined using Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.

FINDINGS: In this study, 54 isolates of Streptococcus agalactiae (10.3%) were obtained from the infections. All the isolates had preserved gbs1805 genes. The highest and lowest sensitivities were related to ceftriaxone (76%) and erythromycin antibiotics (33%).

CONCLUSION: Identification of preserved gbs1805 gene in clinical samples can determine infections caused by Streptococcus agalactiae. Due to the growing resistance of isolates to penicillin, alternative antibiotics should be used for the treatment of infections caused by these bacteria.

KEY WORDS: *Streptococcus Agalactiae, Molecular Diagnosis, gbs1805 Gene, Antibiotic Susceptibility*.

Please cite this article as follows:

Dehbashi S, Pourmand MR, Mahmoudi M, Mashhadi R. Molecular Identification of Streptococcus Agalactiae Using gbs1805 Gene and Determination of the Antibiotic Susceptibility Pattern of Isolates. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(2):29-35.

* **Corresponding Author; MR. Pourmand (PhD)**
Address: Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Poursina Street, Tehran, I.R. Iran
Tel: +98 21 88954910
E-mail: mpourmand@tums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.4.9]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.29]

References

1. Fluegge K, Schweier O, Schiltz E, Batsford S, Berner R. Identification and immunoreactivity of proteins released from Streptococcus agalactiae. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23(11):818-24.

2. Colbourn T, Gilbert R. An overview of the natural history of early onset group B streptococcal disease in the UK. Early Hum Dev. 2007;83(3):149-56.

3. Hughes MJ, Moore JC, Lane JD, Wilson R, Pribul PK, Younes ZN, et al. Identification of major outer surface proteins of Streptococcus agalactiae. Infect Immun. 2002;70(3):1254-9.

4. Baker CJ, Rench MA, Edwards MS, Carpenter RJ, Hays BM, Kasper DL. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. N Engl J Med. 1988;319(18):1180-5.

5. Reinscheid DJ, Gottschalk B, Schubert A, Eikmanns BJ, Chhatwal GS. Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. J Bacteriol. 2001;183(4):1175-83.

6. Valkenburg-van den Berg AW, Sprij AJ, Dekker FW, Dorr PJ, Kanhai HH. Association between colonization with Group B Streptococcus and preterm delivery: a systematic review. Acta Obstet Gynecol Scand. 2009;88(9):958-67.

7. Brimil N, Barthell E, Heindrichs U, Kuhn M, Lutticken R, Spellerberg B. Epidemiology of Streptococcus agalactiae colonization in Germany. Int J Med Microbiol. 2006;296(1):39-44.

8. Nahaei MR, Ghandchilar N, Bilan N, Ghahramani P. Maternal Carriage and Neonatal Colonization of Streptococcus agalactiae in Tabriz, Northwest Iran. Iran J Med Sci. 2007;32(3):177-81.

9. Rabiee S, Arab M, Yousefi-Mashouf R. Epidemiologic Pattern of Vaginal Colonization by *Group B Streptococcus* in Pregnant Women in Hamadan, Central West of Iran. Iran J Med Sci. 2006;31(2)106-8.

10. Bakhtiari R, Dallal MS, Mehrabadi J, Heidarzadeh S, Pourmand M. Evaluation of culture and PCR methods for diagnosis of group B streptococcus carriage in Iranian pregnant women. Iran J Public Health. 2012;41(3):65-70.

11. Page-Ramsey SM, Johnstone SK, Kim D, Ramsey PS. Prevalence of group B Streptococcus colonization in subsequent pregnancies of group B Streptococcus-colonized versus noncolonized women. Am J Perinatol. 2013;30(5):383-8.

12. Morozumi M, Wajima T, Kuwata Y, Chiba N, Sunaoshi K, Sugita K, et al. Associations between capsular serotype, multilocus sequence type, and macrolide resistance in Streptococcus agalactiae isolates from Japanese infants with invasive infections. Epidemiol Infect. 2014;142(4):812-9.

13. Kimura K, Matsubara K, Yamamoto G, Shibayama K, Arakawa Y. Active screening of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility and altered serotype distribution isolated from pregnant women in Kobe, Japan. Jpn J Infect Dis. 2013;66(2):158-60.

14. Atkins KL, Atkinson RM, Shanks A, Parvin CA, Dunne WM, Gross G. Evaluation of polymerase chain reaction for group B streptococcus detection using an improved culture method. Obstet Gynecol. 2006;108(3 Pt 1):488-91.

15. Rozhdestvenskaia AS, Bride I, Mikula I Jr, Mikula I, Dmitriev AV. [Use of Streptococcus agalactiae sak0192 gene polymorphism as a molecular epidemiologic marker]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2009;(5):38-43.

16. Eskandarian N, Ismail Z, Neela V, van Belkum A, Desa MN, Amin Nordin S. Antimicrobial susceptibility profiles, serotype distribution and virulence determinants among invasive, non-invasive and colonizing Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) from Malaysian patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014. [Epub ahead of print]

17. Mattos-Graner RO, Porter KA, Smith DJ, Hosogi Y, Duncan MJ. Functional analysis of glucan binding protein B from Streptococcus mutans. J Bacteriol. 2006;188(11):3813-25.

18. Lamagni TL, Keshishian C, Efstratiou A, Guy R, Henderson KL, Broughton K, et al. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. Clin Infect Dis. 2013;57(5):682-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.4.9]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.29]

19. Le Deore K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. Vaccine. 2013;31(Suppl 4):D7-12.
20. Dutra VG, Alves VM, Olendzki AN, Dias CA, de Bastos AF, Santos GO, et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC Infect Dis. 2014;14:323.
21. De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N. Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant Streptococcus agalactiae in Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(8):1741-7.
22. Ueno H, Yamamoto Y, Yamamichi A, Kikuchi K, Kobori S, Miyazaki M. Characterization of group B streptococcus isolated from women in Saitama city, Japan. Jpn J Infect Dis. 2012;65(6):516-21.
23. Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(8):2890-7.
24. Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Tamura T, Shibayama K, et al. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):849-56.
25. Brigtsen AK, Dedi L, Melby KK, Holberg-Petersen M, Radtke A, Lyng RV, et al. Comparison of PCR and serotyping of Group B Streptococcus in pregnant women: The Oslo GBS-study. J Microbiol Methods. 2014;108:31-5.
26. Fröhlicher S, Reichen-Fahrni G, Müller M, Surbek D, Droz S, Spellerberg B, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of group B streptococci in pregnant women: results from a Swiss tertiary centre. Swiss Med Wkly. 2014;144:w13935.
27. Dmitriev A, Suvorov A, Shen AD, Yang YH. Clinical diagnosis of group B streptococci by scpB gene based PCR. Indian J Med Res. 2004;119 (Suppl):233-6.
28. Rallu F, Barriga P, Scrivo C, Martel-Laferriere V, Laferriere C. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B streptococcus carriage in pregnant women. J Clin Microbiol. 2006;44(3):725-8.
29. Pourmand MR, Abdossamadi Z, Salari MH, Hosseini M. Slime layer formation and the prevalence of mecA and aap genes in Staphylococcus epidermidis isolates. J Infect Dev Ctries. 2011;5(1):34-40.
30. Pourmand MR, Memarian M, Hoseini M, Bagherzadeh Yazdchi S. High prevalence of SEA gene among clinical isolates of Staphylococcus aureusin Tehran. Acta Med Iran. 2009;47(5):357-61.
31. Pourmand MR, Foster S. A novel bioinformatic approach for Staphylococcal vaccine development. Tehran Univ Med J. 2006;64(6):19-26.
32. Sadighian H, Pourmand MR. Molecular Detection of Common Bacterial Pathogens Causing Meningitis. Iran J Public Health. 2009;38(1):60-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.17.2.4.9]
[DOI: 10.22088/jbums.17.2.29]