فراوانی سروتایپ‌های کپسولی استرپتوکوکوس گروه B جدا شده از نمونه های بالینی بر اساس ژنوتایپینگ

* **سارا رهنما:** کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران (*مؤلف مسئول).
هما فروهش تهرانی: کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، مربی و عضو هیأت علمی، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران تهران، تهران، ایران.
دکتر نورامیر مظفری: دانشیار میکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران.
دکتر کیهان آزادمنش: استادیار و متخصص بیوتکنولوژی، گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
شیرین بیگلری: کارشناس ارشد میکروب شناسی، آزمایشگاه پاتوبیولوژی سعید، تهران، ایران .

* این مقاله برگرفته از پایان‌نامه سارا رهنما جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی در سال **۱۳۸۹** است.

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوکوس های گروه B (استرپتوکوکوس آگالاکتیه) یکی از عوامل شایع ایجاد سپسیس و مننژیت در نوزادان و همچنین بیماری های مهاجم در زنان باردار هستند و می‌توانند در بزرگسالان با شرایط زمینه‌ای مانند نقص سیستم ایمنی نیز بیماری ایجاد کنند. کپسول پلی‌ساکاریدی جزء فاکتورهای ویرولانس مهم استرپتوکوکوس آگالاکتیه می‌باشد و این باکتری از طریق آنتی‌ژن‌های کپسولی به ۹ سروتایپ تقسیم می‌شود. توزیع سروتایپ‌های کپسولی بسته به دوره‌های زمانی و مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی سروتایپ‌های کپسولی استرپتوکوکوس های گروه B جدا شده از نمونه بالینی بیماران بر اساس ژنوتایپینگ گروه ژن‌های کپسولی و تعیین سروتایپ‌های کپسولی شایع این باکتری می‌باشد.

روش‌کار: در این مطالعه مقطعی- تحلیلی که در مدت ۷ ماه از شهریور ۱۳۸۸ لغایت اسفند ۱۳۸۸ انجام گردید ۵۰ نمونه استرپتوکوکوس گروه B از نمونه‌های کلینیکی شامل: ادرار، ترشحات واژن، مایع منی و ترشحات مجرا جدا شده و با روش رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، واکنش CAMP و مقاومت به دیسک باسیتراسین (۰/۰۴ U) و دیسک SXT مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس DNA ژنومی نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراجDNA تخلیص گردید و سروتایپ کپسولی با استفاده از روش Multiplex PCR تعیین گردید. برای آنالیز آماری از روش Chi-square استفاده شد. از SPSS V.13 نیز استفاده شد.

یافته‌ها: در ۵۰ نمونه بالینی استرپتوکوکوس گروه B، سروتایپ غالب سروتایپ III ۲۵ مورد (۵۰٪) و سپس سروتایپ V ۸ مورد (۱۶٪) بود. سروتایپ‌های بعدی به ترتیب Ia ۷ مورد (۱۴٪) و II ۷ مورد (۱۴٪) بودند و سروتایپ‌های Ib، IV، VI، VII و VIII به دست نیامد. ۳ نمونه (۶٪) نیز غیرقابل تیپ بندی (Nontypeable) بودند.

نتیجه‌گیری: نتیجه کلی حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده این است که سروتایپ‌های III و V رایج‌ترین سروتایپ‌های کپسولی در میان نمونه‌های بالینی استرپتوکوکوس گروه B در بررسی حاضر بودند.

کلید واژه‌ها: استرپتوکوکوس گروه B، سروتایپ‌های کپسولی، ژنوتایپینگ

مقدمه

استرپتوکوکوس های گروه B (استرپتوکوکوس آگالاکتیه) فلور نرمال دستگاه گوارش و مجرای ادراری تناسلی انسان می‌باشند، به طوری که از مجرای ادراری تناسلی حدود ۳۵٪ از زنان بالغ سالم جدا شده اند.[۱] این ارگانیسم یکی از شایع‌ترین عوامل سپسیس، مننژیت، پنومونی و بیماری‌های شدید درمراحل اولیه زندگی نوزاد (Early-Onset Disease) EOD و همچنین بیماری ناشی ازآلودگی بعدی (Late-Onset Disease) LOD محسوب می‌گردد. این باکتری باعث ایجاد عفونت‌هایی نظیر سپسیس زایمان، اندومتریت، کوریوآمنیونیت و زایمان زودرس در زنان باردار می‌شود. همچنین شیوع عفونت ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه در بزرگسالان دارای شرایط زمینه ای از جمله افراد مسن، بیماران دچار

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

نقص سیستم ایمنی و بدخیمی ها رو به افزایش است.[۲و۳]

وقوع بیماری بلافاصله پس از تولد (EOD) در نوزادان طی سالیان اخیر به دلیل استفاده از تزریق درون وریدی آنتی بیوتیک پنی سیلین G حین بارداری به میزان ۷۰ الی ۷۵٪ کاهش یافته است، ولی کاهش مشابهی در نرخ وقوع بیماری ناشی از آلودگی بعدی (LOD) در نوزادان بزرگ تر، کودکان و بیماری‌های تهاجمی استرپتوکوکوس های گروه B در بزرگسالان دارای عوامل زمینه‌ای ملاحظه نشده است.

استرپتوکوکوس های گروه B انواعی از فاکتورهای ویرولانس نظیر C5a پپتیداز و بتاهمولیزین را تولید می‌کنند. آنزیم C5a پپتیداز با شکستن قطعه C5a کمپلمان و تأخیر در فعالیت ماکروفاژها و نوتروفیل‌های چندهسته ای باعث مقاومت استرپتوکوکوس آگالاکتیه به کشته شدن اپسونوفاگوسیتیک می‌گردد.[۲] توکسین بتاهمولیزین نیز با ایجاد منافذ در غشاء سلول هدف باعث آسیب سیتولیتیک به اندوتلیوم و اپیتلیوم ریه می‌گردد.[۲]

کپسول پلی‌ساکاریدی نیز جزء فاکتورهای ویرولانس مهم استرپتوکوکوس آگالاکتیه می‌باشد که باعث گریز باکتری از سیستم ایمنی میزبان می‌گردد و دارای عملکرد ضد فاگوسیتوز است. استرپتوکوکوس های گروه B از طریق آنتی‌ژن‌های کپسولی به ۹ سروتایپ (Ia, Ib, II تا VIII) تقسیم می‌شوند. تولید کپسول این باکتری به وسیله گروه ژن‌های *cps* (Capsular Polysaccharide Synthesis) کنترل می‌شود.[۴]

واکسیناسیون به عنوان روش با اهمیت برای پیش‌گیری از بیماری‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه مطرح می‌باشد و کوشش‌های قابل ملاحظه‌ای نیز در ایجاد واکسن‌های کونژوگه پلی‌ساکاریدی صورت گرفته است.[۵]

این امر نیازمند بررسی وسیع سروتایپ‌های کپسولی است؛ زیرا توزیع سروتایپ‌های کپسولی استرپتوکوکوس‌های گروه B در مناطق جغرافیایی و جمعیت های مختلف، متفاوت است. به عنوان مثال، براساس مطالعات انجام شده سروتایپ‌های III, Ia و V در کشورهای چین، آمریکا، آلمان، استرالیا، نیوزیلند، ایتالیا، فرانسه، زیمبابوه و لبنان شایع‌ترند.[۶-۸] در کشور ژاپن سروتایپ‌های VI و VIII در میان نمونه‌های به دست آمده از زنان باردار رایج‌ترند، در حالی‌که این سروتایپ‌ها در سایر نقاط جهان نادرند. در کشور کره نیز سروتایپ Ib شایع‌تر می‌باشد.[۶]

از آنجایی که سروتایپ‌های خاص در هر منطقه با بیماری‌زایی استرپتوکوکوس آگالاکتیه ارتباط دارند، نظارت دائم و بررسی‌های اپیدمیولوژیک گسترده بر توزیع سروتایپ‌های کپسولی به منظور طراحی فرمول بهینه آنتی‌ژن‌های واکسن که خاص هر منطقه جغرافیایی باشد، ضروری است. روش‌های متعددی جهت تعیین سروتایپ کپسولی استرپتوکوکوس های گروه B به کار رفته است. این روش‌ها اغلب پرزحمت و پرهزینه بوده و نیازمند تیتر بالایی از آنتی‌سرم اختصاصی سروتایپ است.[۹]

از اواسط دهه ۹۰ میلادی، تعداد نمونه‌هایی که با روش‌های مرسوم قابل تیپ بندی نیستند افزایش یافته و به ۲ تا ۱۸٪ می‌رسد.[۹]

روش‌های مولکولی ژنوتایپینگ استرپتوکوکوس آگالاکتیه اخیراً مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند، زیرا قابلیت تمایز و سرعت بالایی داشته و اختصاصی هستند. روش‌های ژنوتایپینگ مختلف از جمله روش‌های بر پایه PCR جهت شناسایی سروتایپ‌های کپسولی در نمونه‌های بالینی استرپتوکوکوس آگالاکتیه کاربرد زیادی دارند. از جمله مزایای روش PCR قابلیت تشخیص نمونه‌هایی است که با روش‌های مرسوم، غیرقابل تیپ بندی محسوب می‌شوند. هم‌چنین این روش در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیز قابل انجام است.[۱۰]

از آنجا که تاکنون در این زمینه مطالعه‌ای در کشور ایران صورت نگرفته است هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی سروتایپ‌های کپسولی و تعیین سروتایپ شایع در استرپتوکوکوس های گروه B جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران براساس ژنوتایپینگ گروه ژن‌های کپسولی بوده است.

روش کار

در این مطالعه مقطعی- تحلیلی که در مدت ۷ ماه از شهریور ۱۳۸۸ لغایت اسفند ۱۳۸۸ انجام گردید، تعداد ۵۰ نمونه استرپتوکوکوس گروه B از مراکز درمانی مختلف در سطح شهر تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌ها شامل: ادرار، ترشحات واژن، مایع منی و ترشحات مجرا در بیمار مرد بود.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

جدول شماره ۱- پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز و اندازه توالی‌های محصولات PCR

نام پرایمر	توالی (´۳ به ´۵)	ژن هدف	اندازه توالی (bp)
Ia-F	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC	cps1aH	۱۸۲۶و ۵۲۱
Ia-R	GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC	cps1aH	
Ib-F	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC	cps 1bJ	۷۷۰
Ib-R	GAATTAACTTCAATCCCTAAACAATATCG	cps 1bk	
II-F	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG	cps 2k	۳۹۷
II-R	TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG	cps 2k	
III-F	TCCGTACTACAACAGACTCATCC	cps 1a/2/3I	۱۸۲۶
III-R	AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC	cps 1a/2/3J	
IV-F	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAACTGT	cps 4N	۵۷۸
IV-R	CCTCCCCAATTTCGTCCATAATGGT	cps 4N	
V-F	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA	cps 5O	۷۰۱
V-R	AACCTTCTCCTTCACACTAATCCT	cps 5O	
VI-F	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA	cps 6I	۴۸۷
VI-R	CTGTCGGACTATCCTGATGAATCTC	cps 6I	
VII-F	CCTGGAGAGAACAATGTCCAGAT	cps 7M	۳۷۱
VII-R	GCTGGTCGTGATTTCTACACA	cps 7M	
VIII-F	AGGTCAACCACTATATAGCGA	cps 8J	۲۸۲
VIII-R	TCTTCAAATTCCGCTGACTT	cps 8J	
dltS-F	AGGAATACCAGGCGATGAACCGAT	dltS	۹۵۲
dltS -R	TGCTCTAATTCTCCCCTTATGGC	dltS	

جهت تشخیص، نمونه‌ها ابتدا بر روی محیط بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند و در دمای ۳۷°C و Co_2 ۵٪ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. کلنی‌های کوچک، موکوئیدی و دارای فعالیت همولیتیک با آزمایش کاتالاز، رنگ آمیزی گرم، آزمایش CAMP و مقاومت به دیسک باسیتراسین (۰/۰۴U) و دیسک SXT (سولفامتوکسازول ۲۳/۷۵µg – تری متوپریم ۱/۲۵ µg) تشخیص داده شدند. DNA ژنومی از کشت خالص یک روزه با استفاده از کیت استخراج DNA (Wizard SV Genomic DNA Purification system, Promega USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص گردید و سپس روش PCR برای تکثیر ژن *dlt*-S (باجفت پرایمر dltS-F و dltS-R) به منظور حصول اطمینان از اینکه نمونه‌ها استرپتوکوکوس آگالاکتیه می‌باشند و تأیید اینکه نمونه‌های استخراج شده عاری از بازدارنده‌های PCR هستند به کار رفته و جداسازی استرپتوکوکوس آگالاکیته تأیید گردید.

به علاوه DNA تخلیص شده به عنوان الگو در واکنش Multiplex PCR به همراه پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی به کار رفته و منتشر شده در مطالعات Poyart و همکاران جهت تعیین سروتایپ کپسولی مورد استفاده قرار گرفت (جدول شماره ۱).[۱۱]

کلیه مواد مصرفی از شرکت‌های Cinnagen، Sigma، Bioflux و Invitrogen تهیه گردید. در این روش ۲ مخلوط پرایمر شامل mix I حاوی جفت پرایمرهای اختصاصی سروتایپ‌های Ia، Ib، II، III و IV و mix II حاوی جفت پرایمرهای اختصاصی برای سروتایپ های V، VI، VII و VIII در واکنش Mulitplex PCR به کار برده شد.

به منظور تکثیر ژن *dltS* جهت تشخیص استرپتوکوکوس‌های گروه B با روش PCR مواد زیر با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر(µM) به کار برده شد: بافر PCR (۱۰X) ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰mM) ۱ میکرولیتر، dNTPs (۱۰mM) ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر (dltS-F) ۰/۵میکرولیتر، پرایمر (dltS-R) ۰/۵ میکرولیتر، Taq DNA polymerase (۵ u/µl) ۰/۲ میکرولیتر، DNA الگو ۵ میکرولیتر و آب مقطر دوبار تقطیر (Dd water) ۱۵میکرولیتر.

همچنین جهت تعیین سروتایپ کپسولی نمونه‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه با روش Mulitplex PCR مواد زیر با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت: بافر PCR (۱۰X) ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

(۵۰mM) ۱ میکرولیتر، dNTPs (۱۰mM) ۰/۵میکرولیتر، پرایمر میکس I (۰/۲µM) ۵ میکرولیتر، پرایمر میکس II (۰/۱ µM)۴ میکرولیتر، Taq ۵u/µl) polymeras) ۰/۲ میکرولیتر، DNA الگو ۵ میکرولیتر و آب مقطر دو بار تقطیر(میکس I) ۱۱میکرولیتر، آب مقطر دوبار تقطیر (میکس II) ۱۲ میکرولیتر.

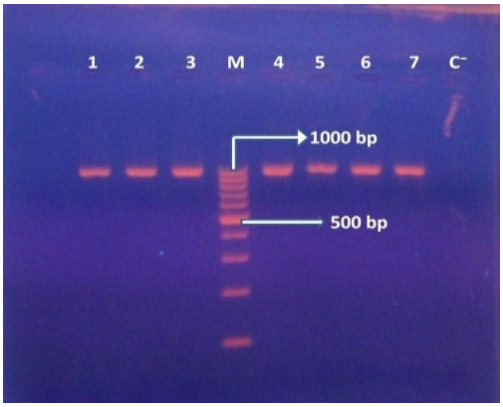
واکنش آمپلیفیکاسیون ژن *dlt-S* بر روی دستگاه ترموسایکلر Techne-TC-512 و مطابق برنامه زیر اجرا شد:

دناتوراسیون اولیه DNA در ۹۴°C برای ۳ دقیقه، سیکل اصلی با ۳۰ بار تکرار شامل: دناتوراسیون در ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۸°C برای ۳۰ ثانیه و تکثیر در ۷۲°C برای ۱ دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی در ۷۲°C برای ۵ دقیقه.

جهت PCR تعیین سروتایپ کپسولی نیز برنامه زیر برروی دستگاه ترموسایکلر اجرا شد:

دناتوراسیون اولیه DNA در ۹۴°C برای ۵ دقیقه، سیکل اصلی با ۳۰ بار تکرار شامل دناتوراسیون در ۹۴°C برای ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۸ °C برای ۳۰ ثانیه و تکثیر در ۷۲ °C برای ۲ دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی در ۷۲°C برای ۵ دقیقه.

جهت بررسی نتیجه واکنش، محصول به دست آمده از فرآیند Multiplex PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ در X ۱۰TBE و ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز گردید. ژل آگاروز با استفاده از رنگ SYBR safe (Invitrogen) رنگ‌آمیزی شده و باندهای اختصاصی بدست آمده در کنار سایز مارکر, DNA ladder,Fermentas) ۳۰۰۰bp) شناسایی شدند.



شکل شماره ۱- واکنش PCR اختصاصی جهت شناسایی استرپتوکوکوس های گروه B .
ستون های ۱ تا ۷ شامل نمونه های استرپتوکوکوس گروه B می باشد که قطعه ۹۵۲ bp را تولید کرده اند وستون M حاوی سایز مارکر وزن مولکولی (۱۰۰۰bp, DNA ladder ,Fermentas) است.

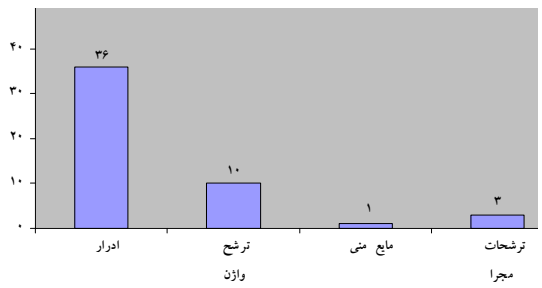
یافته ها

۵۰ مورد استرپتوکوکوس گروه B جدا شده در دوره زمانی ۷ ماهه شامل ادرار، ترشح واژن، مایع منی و ترشحات مجرای ادرار در بیمار مرد بود (نمودار شماره ۱).

از نظر توزیع سنی بیماران در محدوده ۵ ماهه تا ۷۱ ساله قرار داشتند و میانگین سنی ۳۶ سال بود. از نظر جنسیت نیز ۴۴ بیمار زن و ۶ بیمار مرد بودند.

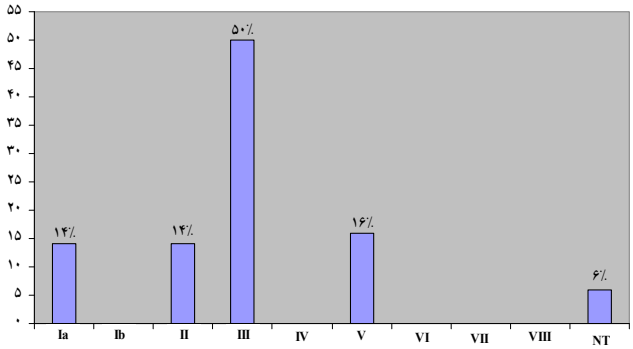
استرپتوکوکوس‌های گروه B به دست آمده همگی کاتالاز منفی، همولیز بتا و واکنش CAMP مثبت داشته و مقاوم به دیسک باسیتراسین (۰/۰۴U) و دیسک SXT (سولفامتوکسازول ۲۳/۷۵ µg، تری‌متوپریم ۱/۲۵ µg) بودند. همچنین تشخیص تمامی ۵۰ نمونه به عنوان استرپتوکوکوس آگالاکتیه با واکنش PCR ژن *dltS* تأیید گردید و تمام نمونه‌ها قطعه ۹۵۲ bp را پس از الکتروفورز محصول در ژل آگارز ۱٪ ایجاد کردند (شکل شماره ۱).

با استفاده از روش Multiplex PCR سروتایپ کپسولی برای ۴۷ مورد (۹۴٪) از ۵۰ نمونه مورد آزمایش تعیین گردید (شکل شماره ۲). سروتایپ غالب در نمونه‌های استرپتوکوکوس گروه B، سروتایپ III ۲۵ مورد (۵۰٪) و سپس سروتایپ V ۸ مورد (۱۶٪) بود. سروتایپ‌های بعدی سروتایپ Ia ۷ مورد (۱۴٪) و سروتایپ II ۷ مورد (۱۴٪) بود. سروتایپ‌های Ib، IV، VI، VII و VIII نیز به دست نیامد. ۳ نمونه (۶٪) نیز غیرقابل تیپ بندی (nontypeable, NT) بودند (نمودار



نمودار شماره ۱- نمونه های بالینی مورد آزمایش.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

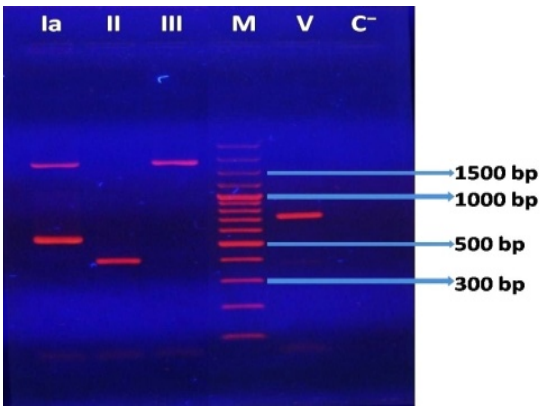


نمودار شماره ۲- فراوانی سروتایپ‌های کپسولی استرپتوکوکوس گروه B.

شماره ۲).

از نظر توزیع سروتایپ‌ها براساس نمونه کلینیکی از ۳۶ نمونه ادرار، ۲۰ مورد (۵۵/۵٪) سروتایپ کپسولی III، ۶ مورد (۱۶/۶٪) سروتایپ Ia، ۵ مورد (۱۳/۸٪) سروتایپ II و ۳ مورد (۸/۳٪) نیز سروتایپ V بودند. از ۱۰ نمونه ترشحات واژن، ۴ مورد (۴۰٪) سروتایپ III، ۳ مورد (۳۰٪) سروتایپ V، ۱ مورد (۱۰٪) سروتایپ Ia و ۱ مورد (۱۰٪) نیز سروتایپ II بود. همچنین در میان ۳ نمونه ترشحات مجرا ۲ مورد (۶۶/۶٪) سروتایپ V و ۱ مورد (۳۳/۳٪) سروتایپ II بود. ۱ نمونه مایع منی نیز سروتایپ III بود.

برای آنالیز آماری از روش Chi-square استفاده شد. این آزمون با در نظر گرفتن p-value≥۰/۰۵ نشان داد



شکل شماره ۲- واکنش Multiplex PCR جهت شناسایی سروتایپ کپسول.

ستون های Ia, II, III, V شامل سروتایپ های به دست آمده بوده و ستون M حاوی سایز مارکر وزن مولکولی bp, DNA ladder, (۳۰۰۰ Fermentas) می باشد.

که هیچ ارتباط معنی‌داری بین سروتایپ کپسولی با نوع نمونه بالینی، سن و جنس وجود نداشت.

بحث و نتیجه گیری

مخزن کلونیزاسیون بدون علامت استرپتوکوکوس های گروه B دستگاه تناسلی خانم‌ها و رکتوم است.[۱۲] تقریباً ۶۰٪ از نوزادانی که از مادران ناقل استرپتوکوکوس آگالاکتیه متولد می شوند به وسیله ارگانیسم های مادری خود کلونیزه می‌گردند. اگر میزان کلونیزاسیون مادر بالا باشد، احتمال وقوع کلونیزاسیون نوزاد در هنگام تولد و عبور از کانال زایمان (واژن) بالاتر خواهد بود.[۲]

با وجود به کارگیری تزریق آنتی‌بیوتیک حین زایمان بر طبق دستورالعمل CDC به منظور پیشگیری از انتقال استرپتوکوکوس های گروه B از مادر کلونیزه به نوزاد، میزان وقوع بیماری ناشی از آلودگی بعدی (LOD) هم‌چنان افزایش دارد.[۲] به علاوه موارد زیادی از عفونت‌های ناشی از استرپتوکوکوس های گروه B در بزرگسالان دچار نقص سیستم ایمنی گزارش می‌شود.[۳] از سوی دیگر، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور پیش گیری از بیماری‌هایی که توسط این باکتری ایجاد می‌شوند نیز نگرانی‌هایی را در رابطه با ظهور مقاومت میکروبی استرپتوکوکوس های گروه B برانگیخته است و این امر ضرورت طراحی واکسن مناسب برای استرپتوکوکوس آگالاکتیه را نمایان می‌سازد.

براساس نتایج این مطالعه، سروتایپ کپسولی III (۵۰٪) به عنوان شایع‌ترین سروتایپ به دست آمد که این امر با نتایج به دست آمده از سایر منابع نیز هماهنگی دارد. در بررسی Poyart و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی نمونه‌های نوزادان دچار عفونت تهاجمی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

استرپتوکوکوس‌های گروه B در فرانسه، سروتایپ III و سپس سروتایپ Ia، شایع‌ترین سروتایپ‌های به دست آمده بودند.[۷]

در مطالعه‌ای که توسط Kong و همکاران در سال ۲۰۰۵ در استرالیا انجام شد، روش Multiplex PCR و reverse line blot hybridization به منظور ژنوتایپینگ نمونه‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه به کار رفت.[۱۳] نتایج آن ها نشان داد که سروتایپ III شایع‌ترین سروتایپ کپسولی بود و پس از آن سروتایپ‌های Ia و V قرار داشتند.[۱۳]

شیوع بالاتر یک سروتایپ کپسولی خاص در میان نمونه‌های بیماریزای استرپتوکوکوس گروه B می‌تواند به عنوان قابلیت بیماری زایی بیشتر آن سروتایپ در نظر گرفته شود. سروتایپ III به عنوان عامل غالب عفونت‌های تهاجمی شدید و EOD و LOD مطرح است و مطالعات مختلف اشاره دارند که بیشترین بیماری تهاجمی در نوزادان و تقریباً تمام موارد مننژیت توسط این سروتایپ ایجاد می شوند.[۱۴و۱۵]

در بررسی که توسط خانم هما فروهش تهرانی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تهران انجام گرفت، ۵۵ نمونه استرپتوکوکوس گروه B به دست آمده از عفونت ادراری خانم‌های غیربارادر با روش اسلاید آگلوتیناسیون تعیین سروتایپ شدند.[۱۶] سروتایپ غالب به دست آمده سروتایپ Ia ۱۸ مورد (۳۲/۷۲٪) و سپس سروتایپ III ۱۲ مورد (۲۱/۸۱٪) بود؛ در حالی که در بررسی حاضر، سروتایپ III سروتایپ غالب بود و پس از آن سروتایپ V قرار داشت. به نظر می‌رسد علت این تفاوت به دلیل نوع نمونه مورد مطالعه، جمعیت و دوره زمانی متفاوت بوده است.

سروتایپ کپسولی V در اوایل دهه ۹۰ میلادی چندان شایع نبود، اما از اواسط این دهه افزایش قابل توجهی در شیوع این سروتایپ مشاهده شده است، به‌طوری‌که تخمین زده می‌شود بین ۲۴ تا ۳۱٪ از موارد بیماری تهاجمی استرپتوکوکوس‌های گروه B در بزرگسالان در ایالات متحده توسط این سروتایپ ایجاد می‌شوند.[۱]

در مطالعه‌ای که توسط Hannoun و همکاران در سال ۲۰۰۹ در لبنان صورت گرفت، ۷۶ نمونه استرپتوکوکوس آگالاکتیه به دست آمده از ترشحات واژینال زنان باردار با استفاده از تکنیک RAPD PCR تعیین سروتایپ شدند.[۸] نتایج تحقیق فوق نشان داد که شایع‌ترین سروتایپ، سروتایپ III و نادرترین سروتایپ نیز سروتایپ IV بود.[۸]

سروتایپ IV غالباً با ناقلین استرپتوکوکوس آگالاکتیه در آسیا و خاورمیانه مرتبط دانسته شده است و به ندرت نیز به عنوان عامل عفونت نوزادان در کشورهای غربی شناخته شده است.[۱۷]

براساس نتایج پژوهش حاضر، سروتایپ‌های کپسولی VI، VIII به دست نیامد که با نتایج مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط جهان هماهنگی دارد، زیرا سروتایپ‌های VIو VIII در کشور ژاپن شایع هستند و در سایر کشورها به ندرت یافت می‌شوند.[۶]

طبق نتایج بررسی حاضر ۳ نمونه غیرقابل تیپ بندی به دست آمد. در بررسی که در سال ۲۰۰۴ توسط Borchardt و همکاران در ایالات متحده انجام شد، ژنوتایپینگ ۳۰۶ نمونه استرپتوکوکوس آگالاکتیه با استفاده از روش DNA Dot Blot Hybridization صورت گرفت که براساس نتایج، ۳۰۳ نمونه (۹۹٪) تعیین سروتایپ شدند و ۳ نمونه نیز غیرقابل تیپ بندی بودند.[۳]

در بررسی که توسط Poyart و همکاران در سال ۲۰۰۷ در فرانسه انجام شد نیز از ۴۲۶ نمونه بالینی استرپتوکوکوس گروه B، ۴۲۵ نمونه (۹۹/۷٪) با روش Multiplex PCR تعیین سروتایپ شدند و ۱ نمونه نیز nontypeable بود.[۱۱] همچنین در بررسی انجام شده توسط Manning و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ایالات متحده که از تکنیک PCR و Enzymatic digestion برای ژنوتایپینگ استرپتوکوکوس های گروه B استفاده شد، ۲ نمونه غیرقابل تیپ بندی شدند.[۹]

از آنجایی که روش Multiplex PCR به کار رفته در این بررسی، سروتایپ‌های کپسولی را به طور غیرمستقیم با تعیین ویژگی ژنوتایپ *cps* (capsular polysaccharide synthesis) شناسایی می‌کند، نمونه‌هایی که اپرون *cps* معیوب داشته و بنابراین فاقد کپسول بوده و یا قابلیت ایجاد کپسول غیرعادی را دارا می‌باشند، غیرقابل تیپ بندی خواهند بود. همچنین گزارش هایی مبنی بر وجود سویه‌های نادری از استرپتوکوکوس آگالاکتیه که با روش‌های مولکولی قابل تیپ بندی نیستند بیانگر آن است که کلون‌هایی در جمعیت‌های این باکتری وجود دارند که درمناطق حفاظت شده locus *cps* دچار واگرایی شده‌اند.[۱۳]

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

محدودیت عمده این مطالعه، کم بودن زمان بررسی و تعداد نمونه‌ها می‌باشد. در مطالعات انجام شده در سایر نقاط دنیا، تعداد نمونه‌ها بیشتر و زمان بررسی طولانی‌تر بوده و به صورت طرح ملی در سراسر آن کشورها انجام گرفته است. بنابراین جهت پایش و نظارت بر شیوع سروتایپ‌های کپسولی استرپتوکوکوس های گروه B، انجام یک طرح ملی، لازم و ضروری است.

نتیجه کلی حاصل از این مطالعه نشان داد که سروتایپ‌های III و V رایج‌ترین سروتایپ کپسولی در میان نمونه‌های بالینی استرپتوکوکوس آگالاکتیه بودند. با توجه به اهمیت این باکتری در ایجاد عفونت و مرگ و میر در نوزادان لزوم طرح ملی جهت تعیین سروتایپ و سپس تهیه واکسن ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

در این مطالعه از مساعدت و همکاری جناب آقای دکتر سعید مهدوی، جناب آقای دکتر سعید صباغی و خانم فائزه فتحی برخوردار بودیم که بدین وسیله از آنان تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

1. Ramaswamy SV, Ferrieri P, Madoff LC, Flores AE, Kumar V, Tettelin H, et al. Identification of a novel *cps* locus polymorphisms in nontypeable group B *Streptococcus*. J Med Microbiol; 2006. 55: 775-83.

2. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Koneman's color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkin; 2006.p.684-88.

3. Borchardt SM, Foxman B, Chaffin DO, Rubens CE, Tallman PA, Manning SD, et al. Comparison of DNA Dot Blot Hybridization and Lancefield capillary precipitin methods for group B Streptococcal capsular typing. J Clin Microbiol; 2004. 42(1): 146-50.

4. Cieslewicz MJ, Chafin D, Glusman G, Kasper D, Madan A, Rodrigues S, et al. Structural and genetic diversity of group B Streptococcal capsular polysaccharides. Infect Immun; 2005. 73(5): 3096-3103.

5. Kong F, Lambertsen LM, Slotved HC, Ko D, Wang H, Gilbert GL. Use of a phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B *Streptococcus*. J Clin Microbiol; 2008. 46(8): 2745-50.

6. Wen L, Wang Q, Li Y, Kong F, Gilbert GL, Cao B, et al. Use of a serotype-specific DNA microarray for identification of group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*) J Clin Microbiol; 2006. 44(4): 1447-52.

7. Poyart C, Reglier-Poupet H, Tazi A, Billoet A, Dmytruk N, Bidet P, et al. Invasive group B Streptococcal infections in infant, France. Emerg Infect Dis; 2008. 14(10): 1647-49.

8. Hannoun A, Shehab M, Khairallah M, Sabra A, Abi-Rached R, Bazi T, et al. Correlation between group B Streptococcal genotypes, their antimicrobial resistance profiles, and virulence genes among pregnant women in Lebanon. Int J Microbiol; 2009. 13: 1-10.

9. Manning SD, Lacher DW, Davies HD, Foxman B, Whittam TS. DNA polymorphism and molecular subtyping of the capsular gene cluster of group B *Streptococcus*. J Clin Microbiol 2005. 43(12): 6113-16.

10. Kong F, Gowan S, Martin D, James G, Gilbert GL. Serotype identification of group B Streptococci by PCR and sequencing. J Clin Microbiol; 2002. 40(1): 216-26.

11. Poyart C, Tazi A, Reglier-Poupet H, Billoet A, Tavares N, Raymond J, et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B *Streptococcus*. J Clin Microbiol; 2007. 45(6): 1985-88.

12. Dermer P, Lee C, Eggert J, Few B. A History of neonatal group B *Streptococcus* with its related morbidity and mortality rates

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

in the United States. J Ped Nurs; 2004. 19(5): 357-63.

13. Kong F, Ma L and Gilbert GL. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using Multiplex PCR and reverse line blot hybridization. J Med Microbiol; 2005. 54: 1133-38.

14. Lamy MC, Dramsi S, Billoet A, Reglier- Poupet H, Tazi A, Raymond J, et al. Rapid detectin of the "highly virulent" group B *Streptococcus* ST-17 clone. Microbes Infect; 2006. 8: 1714-22.

15. Sellin M, Olofsson C, Hakansson S, Norgren M. Genotyping of the capsule gene cluster (*cps*) in nontypeable group B *Streptococcus* reveals two major allelic variant of serotypes III and VII. J Clin Microbiol; 2000. 38(9): 3420-28.

16. Forouhesh Tehrani H, Abdollahi A, Tavvaf Z, Shamkhali L, Mashatan M. Serotype and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* is the cause of UTI. 9th Iranian Congress of Microbiology, Kerman-Iran. 2007; 466. Persian.

17. Martins ER, Pessanha MA, Ramires M, Melo-Cristino J and the Portuguese group for the study of Streptococcal infections. Analysis of group B Streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness. J Clin Microbiol; 2007. 45(10): 3224-29.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]

Original Article

Distribution of capsular serotypes in group b *streptococci* clinical isolates based on genotyping

***S. Rahnama, MSc** in Microbiology, Islamic Azad University-Karaj Branch, Karaj, Iran (*Corresponding author).
H. Forouhesh Tehrani, MSc in Microbiology, Instructor and Faculty member, Microbiology Department, Tehran University of Medical Science and Health Services, Tehran, Iran.
N. Amirmozafari, PhD, Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Science and Health Services, Tehran, Iran.
K. Azadmanesh, PhD, Assistant Professor of Biotechnology, Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
Sh. Biglari, MSc in Microbiology, Saeed Medical Laboratory, Tehran, Iran.

*This article is extracted from the MSc thesis of S. Rahnama, 2010.

Abstract

Background: Group B Streptococci (GBS*)* or *Streptococcus agalactiae* is one of the most common causes of sepsis and meningitis in neonates and of invasive diseases in pregnant women. It can also cause infectious disease among adults with underlying medical conditions like immunocompromised individuals. Polysaccharide capsule is an important virulence factor. Nine GBS serotypes (Ia, Ib, II to VIII) based on capsular polysaccharide antigens have been described. Distribution of capsular serotypes varies over time and by geographic location. The aim of this study was to detect the capsular serotype distribution in GBS clinical isolates based on genotyping of *cps*-gene cluster and to determine the predominant serotypes of GBS.
Methods: In this cross sectional study a total of 50 GBS strains were isolated from various clinical sources including: urine, vagina, semen and urethral secretions. GBS was identified by Gram stain, catalase test, CAMP test and also resistance to 0.04 U Bacitracin and SXT disks. DNA was extracted from all the isolates using the wizard SV Genomic DNA Purification system, Promega, USA. The capsular serotype of the isolates was assigned by using a specific-two Multiplex PCR assay. For statistical analysis, Chi-square method was used. SPSS V.13 was also used.
Results: In the 50 GBS isolates, the predominant serotypes were III with 25 isolates (50%) and serotype V with 8 isolates (16%). Seven isolates (14%) belonged to serotype Ia and 7 isolates (14%) belonged to serotype II, respectively. Serotypes Ib, IV, VI, VII and VIII were not found and 3 strains were classified as nontypeable.
Conclusion: Based on the results of this study, serotypes III and V were the predominant serotypes in GBS clinical isolates.

Keywords: Group B streptococci (GBS), Capsular serotypes, Genotyping

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-22]