

بررسی مولکولار اپیدمیولوژی استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه B کلونیزه شده در دستگاه تناسلی زنان باردار

دکتر محمد کاظم شریفی یزدی^۱، روناک بختیاری^۲، گلناز مبصری^۲
دکتر محمد مهدی سلطان دلال^۳، دکتر محمد باقر خلیلی^۴

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوک گروه B لانسفیلد از مهمترین عوامل ایجاد بیماری و مرگ و میر نوزادان و تب‌های بعد از زایمان مادران محسوب می‌شود. عفونت می‌تواند از مادر آلوده در حین زایمان به نوزاد منتقل شود. بنابراین یک روش سریع برای شناسایی ارگانیزم در زنان باردار در هنگام زایمان مورد نیاز است. هدف از این مطالعه بررسی مولکولار اپیدمیولوژی استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه B کلونیزه شده در فلور واژن زنان باردار می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع توصیفی بوده که از ۲۵۰ خانم باردار در هفته ۳۷-۳۵ بارداری بوسیله سواپهای استریل از ترشحات مخاط واژن و رکتوم نمونه برداری شد. نمونه‌ها از نظر وجود استرپتوکوک گروه B بوسیله کشت استاندارد در محیط بلاد آگار و Tood Hewitt Broth و آزمون PCR ژن Cfb مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در ۲۱ زن از ۲۵۰ نفر (۸/۴٪) نتایج کشت از واژن و رکتوم مثبت بود. در آزمون PCR کلونیزاسیون استرپتوکوک گروه B در ۲۴ نفر از ۲۵۰ (۹/۶٪) مورد خانم باردار از واژن و رکتوم مثبت بود. در مقایسه نتایج کشت حساسیت آزمون PCR و ارزش اخباری منفی آنها ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ بود. ویژگی و ارزش اخباری مثبت در آزمون PCR ۹۷٪ و ۸۲٪ بود. مدت زمان لازم برای حصول نتیجه در آزمون PCR حدوداً ۲ ساعت و در مورد کشت ۳۶ ساعت بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به داده‌های این مطالعه اینگونه می‌توان استنباط کرد که روش PCR دارای حساسیت و ویژگی بالایی هست و در نتیجه کلونیزاسیون استرپتوکوک گروه B را با اطمینان و به سرعت می‌توان تشخیص داد.

واژه‌های کلیدی: استرپتوکوک گروه B، عفونت‌های استرپتوکوکی، زنان باردار، آزمون PCR

* نویسنده مسئول :

دکتر محمد مهدی سلطان دلال ؛
دانشکده بهداشت دانشگاه علوم
پزشکی تهران

Email :
Soltanirad34@yahoo.com

- دریافت مقاله : اردیبهشت ۱۳۹۰ - پذیرش مقاله : مرداد ۱۳۹۰

مقدمه

GBS که به عنوان استرپتوکوکوس agalactia نیز شناخته شده است در واژن زنان کلونیزه شده و با بسیاری از مشکلات زنان مانند زایمان زودرس، پارگی کیسه آب و تب پس از زایمان مرتبط می‌باشد (۴).

تقریباً ۳۰-۱۰٪ از زنان باردار که باکتری GBS در بدن آنها کلونیزه شده، هم در رکتوم و هم در واژن خود حامل باکتری هستند و ۷۰-۵۰٪ این زنان GBS را به نوزادان خود منتقل می‌کنند (۵). بنابراین، شناسایی

مطالعات مختلف نشان داده‌اند طیف وسیعی از میکروارگانیزم‌های مختلف شامل استرپتوکوک‌های گروه B (GBS)، گاردنرلا واژینالیس، اشریشیا کلی، تریکوموناس و کاندیدا آلبیکانس در زایمان زودرس نقش دارند (۱-۳).

^۱ دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۲ کارشناس ارشد میکروب شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۴ دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی یزد

بیشتر سبب شناسایی باکتری و درمان به موقع و جلوگیری از درمان غیر ضروری در مواردی که کلونیزاسیون وجود ندارد، مورد نیاز می‌باشد (۱۶-۱۳). مطالعه حاضر با هدف بررسی مولکولی استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه B کلونیزه شده در فلور واژن زنان باردار انجام شده است.

روش بررسی

در این تحقیق که از نوع توصیفی است، ۲۵۰ نمونه از واژن و ۲۵۰ نمونه از مقعد ۲۵۰ زن باردار که در هفته ۳۵ تا ۳۷ بارداری بوده و تحت نظر جهت زایمان بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه گیری همزمان جهت آزمایش کشت و PCR با استفاده از سواب‌های استریل انجام گردید. دو سواب اول (یکی از واژن و یکی از مقعد) برای بررسی مستقیم نمونه‌ها بکار برده شد. ۲ سواب بعدی در داخل محیط ترانسپورت استوارت قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شد که هر ۲ سواب داخل بافر PBS جهت انجام آزمون PCR قرار داده شد (۱۷).

جهت انجام آزمایش کشت نمونه‌های انتقالی از طریق محیط استورات به محیط انتخابی تادویت براث (Todd Hewith Broth) که حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر جنتامایسین و ۱۵ میکرو گرم در میلی لیتر نالیدیکسیک اسید می‌باشد، منتقل شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند (۸). بوسیله لوپ استریل مقداری از این محیط را در پلیت‌های بلاگ آگار حاوی ۰.۵٪ خون دفیبرینه گوسفند تلقیح و در Candle gar واجد ۰.۵٪ CO₂ در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

در این تحقیق کوکسی‌های گرم مثبتی که کاتالاز منفی بودند، از کشت اولیه بلاگ آگار انتخاب شده و بر روی آنها تست‌های اختصاصی همولیز B، واکنش CAMP، تولید پیگمان در شرایط بی‌هوازی، هیدرولیز هیپورات

کلونیزاسیون GBS در زنان، امری ضروری برای پیشگیری نوزادان از عفونت GBS می‌باشد.

در سال ۱۹۹۶، مرکز کنترل پیشگیری و بیمار (CDC) دستورالعمل‌هایی برای پیشگیری از بیماری استرپتوکوک گروه B پیش از تولد منتشر کرد که در آن توصیه به پروفیلاکسی آنتی بیوتیک در هنگام زایمان در زنان با فاکتورهای خطر (تب، زایمان زودرس در حاملگی زودتر از ۳۷ هفته و پارگی کیسه آب) و غربالگری کلونیزاسیون GBS در زنان پیش از تولد را توصیه نمود (۶).

اگرچه مطالعات نشان می‌دهد تا ۵۰٪ از نوزادان با بیماری GBS از مادران حامل بدون عوامل خطر به دنیا می‌آیند، اما در سال ۲۰۰۲ در دستورالعمل‌های CDC تجدید نظر شد و غربالگری باکتریولوژیک برای تمام زنان باردار در ۳۷-۳۵ هفته از بارداری اجباری گردید (۷-۸).

شیوع واژینوز باکتریایی در میان گروه‌های قومی و مکان‌های جغرافیایی به طور گسترده‌ای متفاوت است (۹-۱۰). لذا پیشنهاد شده است که رابطه آن با زایمان زودرس به طور جداگانه در هر کشور بررسی شود (۱۱). روش استاندارد برای تشخیص گروه B استرپتوکوک کلونیزه شده مبتنی بر کشت ترشحات واژن در محیط براث انتخابی که مهار رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها را دارد، می‌باشد (۱۲).

با این حال، این روش نیاز به حداقل ۳۶ ساعت زمان به دلیل انکوبه نمودن براث به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت و سپس subcultured در پلیت آگار و گروه B استرپتوکوک با استفاده از معیارهای مربوط به میکروب شناسی شناسایی دارد. روش استاندارد برای تشخیص شامل کشت از ترشحات واژن و مقعد می‌باشد. با توجه به مشکلات متعددی که از نظر طولانی بودن زمان کشت و تشخیص باکتری می‌باشد، روش‌هایی مانند PCR که در مدت کوتاهتر و با دقت

انجام گیرد. بعد از آن ۳۵ چرخه در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه جهت Denaturation و سپس ۳۵ چرخه در دمای ۴۳°C به مدت ۱ دقیقه برای مرحله Annealing و ۳۵ چرخه در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه برای Extension و نهایتاً یک چرخه در دمای ۷۲°C برای ۳ دقیقه انجام شد. متعاقباً ۱۰ میکرولیتر از مخلوط حاصله بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. کل این فرآیند ۱۰۵ دقیقه بطول انجامید. میزان کلونیزاسیون بر اساس نتایج کشت و آزمون PCR در مورد هر نمونه محاسبه شد و حساسیت و ویژگی و ارزش اخباری مثبت بر اساس روش STATA 8 (Stata corp LP, College station, روش TX) بر روی برنامه ویندوز XP و همچنین نتایج آماری با استفاده از نرم افزار SPSS محاسبه گردید (۲۱).

یافته ها

از میان ۲۵۰ خانم باردار با استفاده از روش کشت، ۲۱ نفر حامل استرپتوکوک های گروه B بودند (۸/۴٪) که با استفاده از آزمون PCR ۲۴ نفر حامل بودند (۹/۶٪). این نتایج بر اساس کشت و آزمون PCR برای نمونه های واژینال و مقعدی (هر دو) بوده است. بر اساس نتایج PCR، ۳ نفر حامل GBS تشخیص داده شدند که بوسیله روش کشت نتیجه منفی داشتند (جدول ۱، شکل ۱).

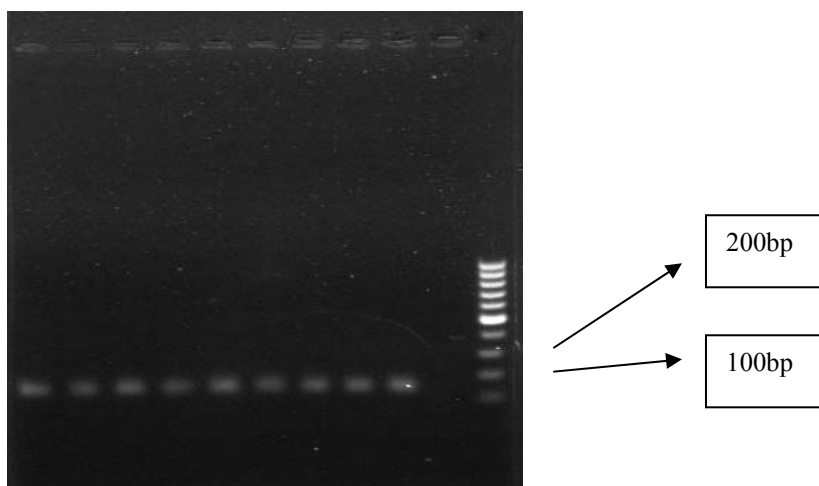
سردیم، حساسیت به دیسک های باسیتراسین ۳٪ واحد، SXT (تری متوپریم سولفامتوکسازول)، رشد در محیط حاوی ۶/۵ درصد کلروسدیم برای تمایز گونه های مختلف جنس استرپتوکوک انجام گردید (۱۸). روش کار جهت آزمون PCR: سوآپ هایی که در لوله های حاوی PBS قرار داشت را به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در ۷۰°C- قرار داده شدند. جهت استخراج DNA از کیت Bioneer (ساخت کره) استفاده شد. ابتدا نمونه هایی که در ۷۰°C- ذخیره شده بود از فریزر خارج نموده و بر اساس پروتکل کیت مراحل استخراج DNA انجام گرفت. بعنوان کنترل مثبت DNA، ژنومی خالص شده از استرپتوکوک گروه B که از آزمایشگاه رفرنس تهیه شده بود استفاده شد. در این مطالعه یک قطعه اختصاصی از ژن cfb استرپتوکوک گروه B به اندازه 153bp را تکثیر شد که توالی پرایمرهای اختصاصی شامل Sag^{059} , Sag^{190} بودند که جهت تکثیر DNA ژنومی بعنوان الگو انتخاب شدند (۲۰-۱۹).

Sag⁵⁹: 5-TTTCACC AGCTGTATTA GAATA-3'
Sag¹⁹⁰: 5-GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT-3'
آزمون PCR: نمونه های DNA استخراج شده زنان باردار و DNA سوش استاندارد را از یخچال خارج نموده و به ترتیب در هر run تعدادی از نمونه ها، یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت مورد آزمایش قرار گرفت. جهت تکثیر ابتدا Master mix را به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C قرار داده تا مرحله initial cycle

جدول ۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی موارد بر اساس نتایج کشت و PCR (رکتال و واژینال)

محل نمونه گیری	نوع کشت نتیجه	PCR		کشت	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد
واژن	مثبت	۲۴	۹/۶	۲۱	۸/۴
	منفی	۲۲۶	۹۰/۴	۲۲۹	۹۱/۶
	جمع	۲۵۰	۱۰۰	۲۵۰	۱۰۰
	مثبت	۲۴	۹/۶	۲۱	۸/۴
مقعد	منفی	۲۲۶	۹۰/۴	۲۲۹	۹۱/۶
	جمع	۲۵۰	۱۰۰	۲۵۰	۱۰۰
	مثبت	۲۴	۹/۶	۲۱	۸/۴

11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



شکل (۱): الکتروفورز حاصل از PCR

ردیف ۱: سایز مارکر ردیف ۲: کنترل منفی ردیف ۳: کنترل مثبت ردیف ۴-۱۱: نمونه های بالینی

میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن و رکتوم در افرادی که سابقه بیماری تناسلی نداشتند، در حد مطلوب با ضریب کاپای ۸۴٪ که از نظر آماری در سطح معناداری ۵٪ با P-value کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار بود بدست آمد و میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن در افرادی که سابقه بیماری تناسلی داشتند در حد مطلوب با ضریب کاپای ۱۰۰٪ که از نظر آماری در سطح معناداری ۵٪ با P-value کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار می باشد. میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن و رکتوم در افرادی که اخیراً سابقه مصرف آنتی بیوتیک نداشتند، در حد مطلوب با ضریب کاپای ۸۷٪ که از نظر آماری در سطح معناداری ۵٪ با P-value کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار بوده و میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن در افرادی که سابقه مصرف اخیر آنتی بیوتیک داشتند در حد مطلوب با ضریب کاپای ۱۰۰٪ که از نظر آماری در سطح معناداری ۵٪ با P-value کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار بدست آمد (جدول ۲).

میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن و رکتوم، در افرادی که سابقه سقط نداشتند در حد مطلوب با ضریب کاپای ۸۶٪ که از نظر آماری در سطح معناداری ۵٪ با P-value کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار می باشد و میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن در افرادی که سابقه سقط داشتند توافق کامل با ضریب کاپای ۱۰۰٪ که از نظر آماری در سطح معناداری ۵٪ با P-value کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار می باشد بدست آمد. همچنین، میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن و رکتوم، در افرادی که سابقه سزارین نداشتند در حد مطلوب با ضریب کاپای ۸۶٪ که از نظر آماری در سطح معناداری ۵٪ با P-value کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار می باشد و میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن در افرادی که سابقه سزارین داشتند توافق کامل با ضریب کاپای ۱۰۰٪ که از نظر آماری در سطح معناداری ۵٪ با P-value کمتر از ۰/۰۰۱ معنادار می باشد، حاصل شد.

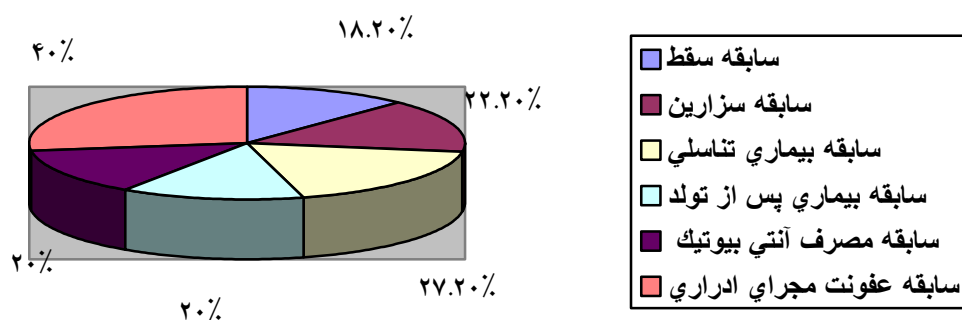
جدول ۲ : میزان توافق دو روش PCR و کشت برای نمونه گرفته شده از واژن و رکتوم بر حسب متغیرهای مختلف

واژن		رکتوم		نوع کشت	متغیر
کاپا	P-value	کاپا	P-value		
۱	<۰/۰۰۱	۱	<۰/۰۰۱	دارد	سابقه سقط
۰/۸۶	<۰/۰۰۱	۰/۸۶	<۰/۰۰۱	ندارد	
۱	<۰/۰۰۱	۱	<۰/۰۰۱	دارد	سابقه بیماری تناسلی
۰/۸۴	<۰/۰۰۱	۰/۸۴	<۰/۰۰۱	ندارد	
۱	<۰/۰۰۱	۱	<۰/۰۰۱	دارد	سابقه بیماری پس از تولد
۰/۸۸	<۰/۰۰۱	۰/۸۸	<۰/۰۰۱	ندارد	
۱	<۰/۰۰۱	۱	<۰/۰۰۱	دارد	سابقه مصرف آنتی بیوتیک
۰/۸۷	<۰/۰۰۱	۰/۸۷	<۰/۰۰۱	ندارد	
۱	<۰/۰۰۱	۱	<۰/۰۰۱	دارد	سابقه عفونت مجرای ادراری
۰/۸۴	<۰/۰۰۱	۰/۸۴	<۰/۰۰۱	ندارد	
۱	<۰/۰۰۱	۱	<۰/۰۰۱	دارد	سزارین
۰/۸۶	<۰/۰۰۱	۰/۸۶	<۰/۰۰۱	ندارد	

نمونه سابقه مصرف آنتی بیوتیک داشتند. ۴۶٪ از کل افراد از IUD جهت جلوگیری از بارداری استفاده می‌کردند. ۲۰٪ افراد سابقه عفونت مجرای ادراری داشتند(نمودار ۱).

۷۷/۶٪ از نمونه‌ها از افراد ساکن تهران بودند. ۲۱٪ از کل نمونه‌ها سابقه سقط و سزارین داشتند. ۳٪ از کل نمونه سابقه دیابت داشته و از ۱۶/۸٪ نمونه‌ها سابقه بیماری تناسلی بدست آمد. ۵/۶٪ از نمونه نوزادها با سابقه بیماری پس از تولد همراه بودند. ۱۲/۸٪ از

میزان آلودگی به GBS در روش کشت بر حسب متغیرهای مختلف



نمودار ۱ : توزیع فراوانی GBS بر حسب متغیرهای مختلف

با در نظر گرفتن روش کشت بعنوان استاندارد حساسیت روش PCR (۱۰۰٪) و ویژگی آن ۹۸٪ می‌باشد. ارزش اخباری مثبت آزمون PCR، ۸۳٪ و ارزش اخباری منفی آن ۱۰۰٪ بدست آمد.

بحث

استرپتوکوک گروه ب (GBS) یکی از عوامل مهم عفونت در زنان باردار و نوزادان می‌باشد. ناقلین GBS به دلایل اجتماعی، اقتصادی، جغرافیایی و نژادی در سرتاسر جهان متفاوت و بستگی به دقت در روش آزمایشگاهی دارد (۲۸-۲۲).

طبق نظر McGregor و همکاران تمامی زنان باردار می‌بایستی در هفته‌های اول بارداری برای تشخیص واژینوز باکتریایی و درمان به موقع آن اقدام نمایند (۲۹). Leitich و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که واژینوز باکتریایی یک فاکتور خطر برای زایمان زودرس و سقط جنین است (۳۰).

Stoll و همکاران در ۱۹۹۸ طی گزارشی شیوع GBS را در کشورهای مختلف جغرافیایی دنیا نشان دادند، بطوریکه در خاورمیانه و شمال آفریقا ۲۲٪، آسیا و اقیانوسیه ۱۹٪، صحرای آفریقا ۱۹٪، هند و پاکستان ۱۲٪ و آمریکا ۱۴٪ (۳۱). همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داد که کلونیزاسیون GBS در میان زنان ایرانی از ۹/۱ تا ۲۶/۷٪ می‌باشد (۳۲-۳۶).

اختلاف گسترده در درصد حاملین GBS در ایران ممکن است ناشی از سایت‌های مختلف جمع آوری نمونه، بار باکتریایی در نمونه سوپ، سن بارداری در زمان نمونه گیری و تفاوت در روش تشخیصی باشد. برای شناسایی سریع GBS با استفاده از روش کشت بر اساس تولید پیگمان چندین محیط کشت معرفی شده است (۳۶-۳۸).

حساسیت روش استاندارد با استفاده از محیط انتخابی تادویت برات (Todd-Hewitt broth) برای شناسایی ناقلین واژینال و رکتال از نظر GBS ۹۷٪ و ۹۰/۹٪ بوده و مقادیر مشابه برای محیط GBS آگار ۹۳/۹٪ و ۹۲/۲٪ و این مقادیر برای آبگوشته GBS برات کمی کمتر به ترتیب ۸۹/۴٪ و ۸۷٪ بوده است (۱۷).

با توجه به اهمیت کوتاه نمودن زمان در تشخیص، روش‌های مولکولی رایج مانند PCR به طور گسترده‌ای برای شناسایی باکتری‌ها از جمله GBS استفاده شده‌اند. صحت سنجش PCR به طراحی جفت پرایمرهای مخصوص به گونه بستگی دارد. بنابراین در این تحقیق از پرایمرهای الیگونوکلوئوتیدی بسیار خاص طراحی شده برای ناحیه بسیار متغیر ژن ۱۶SrRNA استفاده گردید (۳۹).

استفاده از روش مولکولی در تحقیق ما سبب شد که نتایج شناسایی GBS از ۸/۴٪ به ۹/۶٪ افزایش پیدا کند. در این مطالعه در ۳ زن GBS مثبت را به وسیله‌ی PCR و نه به واسطه کشت آشکار گردید. در مقایسه نتایج کشت حساسیت آزمون PCR و ارزش اخباری منفی آنها ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ بود. ویژگی و ارزش اخباری مثبت در آزمون PCR ۹۷٪ و ۸۲٪ بود.

Eren A و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ترکیه مطالعه‌ای انجام داده اند که ۵۰۰ نمونه خانم‌های حامله را مورد بررسی قرار داده که درصد آلودگی را ۹/۲٪ گزارش نموده‌اند و با توجه به همسایگی آن با کشور ما نتایج تحقیق ما نیز از نزدیکی درصد آلودگی به GBS در دو کشور خبر می‌دهد (۴۰).

Uhi JR و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای تعیین ناقلین GBS، نمونه‌های گرفته شده از رکتوم و واژن را بدو روش Real-time PCR مورد بررسی قرار دادند که نتایج بدست آمده حاکی از حساسیت (۱۰۰٪) و ویژگی (۹۷٪) و ارزش اخباری مثبت (۹۰٪) و ارزش

نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر در شهر تهران در تهران (۸٪) و عبداللهی فرد در تبریز (۹/۶٪) نشان داد که میزان شیوع استرپتوکوک گروه B در واژن و رکتوم زنان باردار به یک میزان است، درحالی که نتایج نخعی مقدم در مشهد ۱۱٪ در نمونه‌های واژن و ۱۲٪ در رکتال، در تبریز کلونیزاسیون واژینال و رکتال مشابه ۹/۶٪ و در مطالعه El-Kersh در عربستان، ۳۳٪ نمونه‌های واژن در مقابل ۱۷٪ نمونه‌های رکتال مثبت بوده‌اند (۴۴-۴۳ و ۳۵).

نتیجه گیری

در نهایت با توجه به پیشنهاد CDC در خصوص تمامی زنان باردار که می‌بایستی بین هفته ۳۵-۳۷ بارداری از نظر حامل بودن GBS بررسی و آنتی بیوتیک درمانی شوند و به منظور استفاده به جا و به موقع آنتی بیوتیک و جلوگیری از مصرف بی مورد آنتی بیوتیک در غیر ناقلین، کوتاه شدن زمان تشخیص توسط تکنیک PCR و حساس و دقیق بودن این تکنیک استفاده از آن پیشنهاد می‌شود.

اخباری منفی (۱۰۰٪) بود که با نتایج بدست آمده از تحقیق ما هم‌خوانی دارد (۴۱). مطالعه دیگری توسط Fabien Rallu و همکاران در سال ۲۰۰۶ که از روش PCR و کشت و شناسایی آنتی ژن جهت حاملین GBS استفاده نمودند که ۶۰۵ نمونه تست شده بوسیله این روشها با روش کشت ۹۶ نمونه (۱۶٪) و با روش PCR (ژن Cfb) ۱۷۱ نمونه (۲۸٪) و با استفاده از PCR (ژن SCP B) ۲۲۶ نمونه مثبت (۳۷٪) بدست آوردند. در مطالعه فوق حساسیت و ویژگی PCR با ژن SCP D به ترتیب ۹۹/۶٪ و ۱۰۰٪ بوده در مورد PCR با ژن Cfb به ترتیب ۷۵/۳٪ و ۱۰۰٪ بود و حساسیت و ویژگی شناسایی آنتی ژن ۵۷/۳٪ و ۹۹/۵٪ و برای کشت ۴۲/۳٪ و ۱۰۰٪ گزارش گردید. در این تحقیق ارزش اخباری منفی برای PCR (ژن Cfb) ۱۰۰٪ (۹۸-۱۰۰) و برای کشت ۱۰۰٪ (۹۶-۱۰۰) بوده و ارزش اخباری مثبت برای PCR (ژن Cfb) ۸۷/۱٪ (۸۴-۹۰) و برای کشت ۷۴/۳٪ (۷۰-۷۸) می‌باشد (۴۲).

منابع

1. Wilk K, Sikora J, Bakon I, Kossowski P, Szymanska-Toczek Z, Szkodny E, et al. Significance of group B Streptococcus (GBS) infections in parturient women. *Ginekol Pol* 2003; 74(6): 463-7.
2. Meis PJ, Goldenberg RL, Mercer B, Moawad A, Das A, McNellis D, et al. The preterm prediction study: significance of vaginal infections. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173(4): 1231-5.
3. Heimrath J, Pajak J, Panczak K, Lados A. Analysis of bacterial flora in the uterine cervix in women during preterm labor. *Ginekol Pol* 2000; 71(4): 263-7.
4. Lopez Sastre JB, Fernandez Colomer B, Coto Cotallo GD, Ramos Aparicio A, Grupo de Hospitales Castrillo. Trends in the epidemiology of neonatal sepsis of vertical transmission in the era of group B streptococcal prevention. *Act Paediatr* 2005; 94(4): 451-7.
5. Cunningham FG, Williams JW. *Williams Obstetrics*. 22nd ed. New York: McGraw-Hill: Medical Pub Division; 2005 : 39-90.

6. CDC. Prevention of perinatal group B Streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 1996; 45(7): 1-24.
7. Schuchat A. Epidemiology of group B Streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(3): 497-513.
8. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51(11): 1-22.
9. Campbell JR, Hillier SL, Krohn MA, Ferrieri P, Zaleznik DF, Baker CJ, et al. Group B Streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obst Gynecol* 2000; 96(4): 498-503.
10. Tolosa JE, Chaithongwongwatthana S, Daly S, Maw WW, Gaitan H, Lumbiganon P, et al. The International Infections in Pregnancy (IIP) study: variations in the prevalence of Bacterial Vaginosis and distribution of morphotypes in vaginal smears among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195(5): 1198-204.
11. Goffinet F, Maillard F, Mihoubi N, Kayem G, Papiernik E, Cabrol D, et al. Bacterial Vaginosis: prevalence and predictive value for premature delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108(2): 146-51.
12. Baker C. Summary of the workshop on perinatal infections due to group B Streptococcus. *J Infect Dis* 1977 Jul; 136(1): 137-52.
13. Rosa-Fraile M, Sampedro A, Varela J, Garcia-Pena M, Gimenez-Gallego G. Identification of a peptide from mammal albumins responsible for enhanced pigment production by group B Streptococci. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999 May; 6(3): 425-6.
14. Rosa-Fraile M, Rodriguez-Granger J, Cueto-Lopez M, Sampedro A, Gaye EB, Haro JM, et al. Use of Granada medium to detect group B Streptococcal colonization in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999 Aug; 37(8): 2674-7.
15. Gil EG, Rodriguez MC, Bartolome R, Berjano B, Cabero L, Andreu A. Evaluation of the Granada agar plate for detection of vaginal and rectal group B Streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999 Aug; 37(8): 2648-51.
16. De la Rosa M, Perez M, Carazo C, Pareja L, Peis JI, Hernandez F. New Granada Medium for detection and identification of group B Streptococci. *J Clin Microbiol* 1992 Apr; 30(4): 1019-21.
17. Votava M, Tejkalova M, Drabkova M, unzeitig V, Braveny I. Use of GBS media for rapid detection of group B Streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labor. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(2): 120-2.
18. Ke D, Menard C, Picard FJ, Boissinot M, Ouellette M, Roy PH, et al. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B Streptococci. *Clin Chem* 2000; 46(3): 324-31.
19. Bergeron M, Ke D, Menard CH, Francois F, Ggnon M, Bernier M, et al. Rapid Detection of Group B Streptococci in Pregnant Women at Delivery. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343(1): 175-9.
20. Dmitriev AA, Suvorov AD, Shen Y, Yang H. Clinical diagnosis of group B Streptococci by sepB gene based PCR. *Indian J Med Res* 2004; 119(1): 233-6.
21. Seed PT. Summary Statistics For Diagnostic Test. *Stata Technical Bull* 2001; 59(1): 9-12.

22. Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R. Prevalence of maternal group B Streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87(3): 260-71.
23. Valkenburg-van den Berg AW, Sprij AJ, Oostvogel PM, Mutsaers JA, Renes WB, Rosendaal FR, et al. Prevalence of colonisation with group B Streptococci in pregnant women of a multi-ethnic population in The Netherlands. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 124(2):178-83.
24. Elkhoja H, Arebi A, Hwewi S, Saif AnserN, Zorgani A, Elbadri A. Group B Streptococcus colonization risk factors among Libyan pregnant women. *The Libyan Journal of Infectious Diseases* 2010; 4(1): 34-40.
25. Chan KL, Levi k, Towner KJ, Weston VC, Ramsay MM, Kean LH. Evaluation of the sensitivity of a rapid polymerase chain reaction for detection of group B streptococcus. *J Obstet Gynaecol* 2006; 26(5): 402-6.
26. Artz IA, Kempf VAJ, Autenrieth IB. Rapid screening for Streptococcus agalactiae in vaginal specimens of pregnant women by fluorescent in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2003 May; 41(5): 2170-3.
27. 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(1-3): 488-91.
28. Anukam KC, Reid G. Organisms associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequence. *Afr Health Sci* 2007; 7(2): 68-72.
29. McGregor JA, French JI. Bacterial Vaginosis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55(1-5): 1-19.
30. Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial Vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(1): 139-47.
31. Stoll BJ, Schuchat A. Maternal carriage of group B Streptococci in developing countries. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(6): 499-503.
32. Rabiee S, Arab M, 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): 106-68.
33. Aali BS, Abdollahi H, Nakhaee N, Davazdahemami Z, Mehdizadeh A. The association of preterm labor with vaginal colonization of group B streptococci. *IJRM* 2007; 5(4): 191-4.
34. Namavar Jahromi B, Poorarian S, Poorbarfehee S. The prevalence and adverse effects of group B Streptococcal colonization during pregnancy. *Arch Iran Med* 2008; 11(6): 654-7.
35. Nakhaei Moghaddam M. Recto-Vaginal colonization of Group B Streptococcus in pregnant women referred to a hospital in Iran and its effect on Lactobacillus normal flora. *J Biol Sci* 2010; 10(1):166-9.
36. Fatemi F, Pakzad P, Zeraati H, Talebi S, Asgari S, Akhondi MM. Comparative Molecular and Microbiologic Diagnosis of Vaginal Colonization by Group B Streptococcus in Pregnant Women during Labor. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2010; 13(4): 183-8.
37. Gil EG, Rodriguez MC, Bartolome R, Berjano B, CaberoL, Andreu A. Evaluation of the Granada agar plate for detection of vaginal and rectal group B streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol* 1999 Aug; 37(8): 2648-51.
38. Islam AK. Rapid recognition of group-B Streptococci. *Lancet* 1977 Jan; 1(8005): 256-7.

39. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7): 2584-9.
40. Eren A, Kucukercon M, Oguzoglu N, Unal N, Karateke A. The carriage of group B streptococci in Turkish pregnant women and its transmission rate in newborns and serotype distribution. *Turk J Pediatr* 2005; 47(1): 28-33.
41. Uhl JR, Vetter EA, Boldt KL, Johnston BW, Ramin KD, Adams MJ, et al. Use of the Roche LightCycler Strep B assay for detection of group B Streptococcus from vaginal and rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2005. 43(8): 4046-51.
42. 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. *Canada Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44(3): 725-8.
43. Abdolhhahi Fard S, Ghotaslloo R, Zafardoost S. Study on colonization of group B streptococcus (GBS) and relationship with perinatal complication in pregnant women referred to Alzahra hospital. *Research Journal of Biological Sciences* 2008; 3(7): 726-8.
44. EL-Kersh TA, Al-Nuaim LA, Kharfy TA, Al-Shammary FJ, Al-Saleh SS, Al-Zamel FA. Detection of genital colonization of group B Streptococci during late pregnancy. *Saudi Med J* 2002; 23(1): 56-61.

Study of Molecular Epidemiologic of Group B Streptococcus Colonization in Pregnant Women by PCR Method

Sharifi Yazdi Mohammad Kazem¹(PHD) - Bakhtiari Ronak²(MSc.)
Mobasseri Golnaz²(MSc.) - Soltan Dallal Mohammad Mahdi³(PHD)
Khalili Mohammad Bagher⁴(PHD)

1 Associated Professor, Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Master of Sciences in Microbiology, Pathobiology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Professor, Pathobiology Department, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 Associate Professor, Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Abstract

Received : May 2011
Accepted : Jul 2011

Background and Aim: Group B streptococcus(GBS)(Streptococcus agalactiae) is the leading cause of morbidity and mortality of the newborn infant and accounted as a factor leading septicemia after birth in mothers. Infections in infants are usually acquired by contact with the genital tract of the mother during labor and delivery. So a rapid screening test for group B streptococcus that could accurately identify pregnant women who are carrying the bacteria at the time of delivery would obviate the need for prenatal screening. The goal of this study was molecular epidemiology of group B beta Hemolytic Streptococcal(GBS) colonization in the vaginal flora of pregnant women.

Materials and Methods: Samples were taken from mucus of anal and vaginal of 250 pregnant women during 35-37 week's gestation by swab. Samples were tested by standard culture using Todd Hewitt Broth and Blood Agar and also by PCR using *cfb* gene.

Results: Culture identified 21(8.4%) women as carriage of GBS from 250 women but PCR assay could identify 24(9.6%) women. In comparison to culture results, sensitivity, NPV Specificity PPV of PCR Were(100%, 100% and 97%, 82%) respectively. The times that used for PCR assay and culture were 2h and 36h respectively.

Conclusion: In conclusion, we found that group B streptococci can be detected rapidly and reliably by a PCR assay of combined vaginal and anal secretions from pregnant women at the time of delivery. Also this study shows that incidence of GBS is at high rate in Iranian pregnant woman, so we recommend screening of pregnant woman for detecting of GBS emphatically.

Key words: Group B Streptococcus, Streptococcal Infection, Pregnant Women, PCR Assay

* Corresponding author:

Soltan dallal MM;

E-mail:

Soltanirad34@yahoo.com