



بررسی الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک و پراکنش تایپ‌های کپسولی در ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده

حدیثه فرزانه^۱، مژگان فضلی^۲، حامد طهماسبی^۳، پیراسته نوروزی^۴، مجتبی نصیری^۵، مهدی میرزایی^{۵*}

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

۲- کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- کارشناس ارشد سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۴- پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۵- دانشیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۸

چکیده

مقدمه: یکی از عوامل عفونت‌زا در زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده، استرپتوکوک آگالاکتیه می‌باشد. کپسول این باکتری اهمیت ویژه‌ای در بیماری‌زایی دارد. هدف از این مطالعه، بررسی الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و پراکنش تایپ‌های کپسولی در ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه از از واژن و رکتوم زنان باردار و گوش و بینی نوزادان تازه متولد شده، جدا شد. تایپ‌های کپسولی *da db dl III dv V VI VII VIII* به ترتیب توسط ژن‌های *cps1A cps2k cps4N cps5O cps6I cps7M cps8J* شناسایی شدند. جهت تکثیر ژن‌ها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) استفاده گردید.

نتایج: در این مطالعه، ۷۳ ایزوله (۵۲/۸٪) از نمونه‌های رکتوواژینال مادران باردار و ۶۱ ایزوله (۴۴/۲٪) از گوش و بینی نوزادان تازه متولد شده جمع آوری گردید. در نمونه‌های رکتوواژینال، سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین (۸۲/۱٪) و اریتروماکسین (۸۳/۵٪) بیشترین فراوانی را داشتند. همچنین، در نمونه‌های حلق و بینی، سویه‌های مقاوم به ریفامپین (۸۳/۶٪)، اریتروماکسین (۹۸/۳٪)، تتراسایکلین (۹۳/۴٪) و کلیندامایسین (۸۳/۶٪)، فراوانی بالایی را نشان دادند. در هر دو گروه، تایپ کپسولی III (۱۴/۴٪) و بعد از آن به ترتیب تایپ‌های کپسولی II (۷/۹٪)، Ib (۷/۲٪) و V (۶/۵٪) بیشترین فراوانی را داشتند. تایپ‌های کپسولی VII Ia، VIII، VI و در هیچ یک از ایزوله‌ها تشخیص داده نشد. فراوانی تایپ‌های کپسولی III db II و V افزایش معنی‌داری را در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج ما مشخص کرد که فراوانی بالای تایپ‌های کپسولی استرپتوکوک آگالاکتیه در مادران باردار، نقش مهمی در افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دارد.

واژه‌های کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، استرپتوکوک آگالاکتیه، مقاومت به دارو، زنان باردار.

* نویسنده مسئول: شاهرود، میدان هفت تیر، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۵۴، نمابر: ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۰۹، Email: mirzaai1386@gmail.com

ارجاع: فرزانه حدیثه، فضلی مژگان، طهماسبی حامد، نوروزی پیراسته، نصیری مجتبی، میرزایی مهدی. بررسی الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک و پراکنش تایپ‌های کپسولی در ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۰؛ ۱۶(۴): ۹-۱.

مقدمه

استرپتوکوک آگالاکتیه (استرپتوکوک گروه ب) یا به اختصار GBS یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت‌های نوزادان و همچنین عامل عفونت‌های تهاجمی در بزرگسالان معرفی شده است (۱). در استرپتوکوک آگالاکتیه، کربوهیدرات اختصاصی گروه در دیواره‌ی سلولی و آنتی‌ژن‌های اختصاصی تیپ، در کپسول وجود دارند (۲). اولین قدم در بیماری‌زایی استرپتوکوک آگالاکتیه، اتصال باکتری به سطوح اپی تلیال انسان است. چسبیدن و اتصال این باکتری به اپی‌تلیوم واژن اولین مرحله در بیماری‌زایی است (۳). استرپتوکوک آگالاکتیه همچنین می‌تواند باعث عفونت مجاری ادراری، کوریوآمینیوت یا پارگی زودرس کیسه‌ی آب، آندومتریت یا عفونت مخاط رحم، استئومیلیت، ماستیت، عفونت‌های زخم به‌دنبال برش سزارین و اپیزیوتومی در زنان شود (۴).

عفونت‌های استرپتوکوک گروه ب، در نوزادان نارس در مقایسه با نوزادان رسیده بیشتر است. بررسی‌ها نشان داده است که سن نوزادان تأثیر زیادی در میزان تشکیل سلول‌های اولیه‌ی گرانولوسیت و منابع ذخیره‌ای میلوئید، که به سرعت می‌توانند عفونت استرپتوکوک آگالاکتیه را ریشه‌کن کنند، دارد (۵ و ۶). این باکتری همچنین نقش مهمی در نارس‌زایی دارد. به‌طوری‌که، عفونت‌های استرپتوکوک آگالاکتیه، یک مشکل عمده برای نوزادانی است که قبل از ۲۸ هفته متولد می‌شوند چون سطح آنتی‌بادی IgG سرم آنها پایین است (۶).

سویه‌هایی که بیماری‌زایی بیشتری دارند می‌توانند مقادیر بیشتری کپسول تولید کنند. کپسول پلی‌ساکاریدی توسط ژن‌های خوشه‌ای cps کد می‌شود و قسمت اسید سیالیک آن در ایجاد بیماری مهم‌ترین جزء است (۷). همچنین سویه‌های مهاجم خطرناک استرپتوکوک آگالاکتیه ظرفیت بیشتری برای پایبندی به اندوتلیوم و اپی‌تلیوم دارند که مخصوصاً در مورد تیپ III مشهود است (۸). این سروتیپ شایع‌ترین سروتیپ ناقل بدون علائم است. در حیوانات سویه‌های ویرولان‌ت استرپتوکوک آگالاکتیه، پلی‌ساکارید کپسولی بیشتری نسبت به سوش‌های غیر ویرولان‌ت دارند. در انسان‌ها سوسویه‌های همراه با تهاجم بیشتر، پلی‌ساکارید کپسولی زیادی نسبت به سوش‌های کلونیزه‌کننده ظاهر می‌کنند (۹ و ۱۰).

حساسیت نوزادان به استرپتوکوک آگالاکتیه ناشی از نابالغ بودن سیستم فاگوسیتی نوزاد و ایمنی همورال است. آنتی‌بادی‌های ایجاد شده علیه آنتی‌ژن‌های کپسولی اختصاصی تیپ استرپ گروه ب محافظتی هستند (۱۰). نوزادانی که به شکل زودرس به دنیا می‌آیند در خطر بیشتری برای ابتلا به بیماری قرار دارند چون دارای سطوح پایین‌تری از آنتی‌بادی‌های مادری اختصاصی تیپ هستند. علاوه بر این فعالیت مسیرهای آلترناتیو و کلاسیک کمپلمان برای کشتن استرپتوکوک آگالاکتیه نیز لازم است (۱۱). استرپتوکوک آگالاکتیه نسبت به پنی‌سیلین (G) به‌عنوان اولین داروی انتخابی حساس می‌باشد اما تحمل نسبت به پنی‌سیلین گزارش شده است.

همچنین مقاومت در برابر تتراسایکلین و اریترومایسین نیز گزارش شده است (۱۰ و ۱۲). افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و کلیندامایسین در زنان آلرژیک به پنی‌سیلین مسأله‌ی نگران‌کننده‌ای است. به همین دلیل نظارت بر حساسیت آنتی‌بیوتیکی استرپتوکوک آگالاکتیه باید به‌طور منظم انجام شود (۱۲). علاوه بر این، اهمیت این باکتری در نارس‌زایی و عفونت واژینال، نقش مهمی بر سلامت مادر و نوزاد تازه متولد شده می‌گذارد. لذا، شناسایی استرپتوکوک‌های گروه ب و بررسی تایپ کپسولی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک می‌تواند در جلوگیری از شیوع سویه‌های با بیماری‌زایی و مقاومت دارویی بالا، مؤثر باشد (۱۳).

از این‌رو، هدف از این مطالعه، بررسی الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و پراکنش تایپ‌های کپسولی در ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، تجربی طی یک دوره ۲۳ ماهه (مهر ۹۶ تا اردیبهشت ۱۳۹۸)، جمع‌آوری نمونه‌های باکتری استرپتوکوک آگالاکتیه (استرپتوکوک گروه ب) از واژن و رکتوم خانم‌های باردار پرخطری که برای زایمان به بیمارستان فاطمیه‌ی شاهرود مراجعه کرده بودند و مشکوک به این باکتری بودند، انجام گرفت. همچنین جمع‌آوری این باکتری از گوش و بینی نوزادان تازه متولد شده نیز انجام شد. نمونه‌ها داخل لوله‌های حاوی محیط کشت تات هویت (مرک، آلمان) که دارای آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید (Hi-Media، هند) به‌ترتیب به میزان ۸ و ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند استفاده شد (۱۴). کلیه مراحل با تأیید معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان صورت گرفت. معیار ورود به مطالعه بیمارستان بستری در بیمارستان و مشکوک به عفونت استرپتوکوک آگالاکتیه و معیار خروج از مطالعه، بیمارانی فاقد علائم باکتریایی و عفونی تعیین گردید. در نهایت، جهت جداسازی ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه، تمامی ایزوله‌ها با استفاده تست‌های بیوشیمیایی، تعیین گونه شدند. جهت تایید مولکولی ایزوله‌ها از ژن 16srRNA استفاده گردید.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت به متی‌سیلین: برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) استفاده گردید. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (Hi-media، هند) شامل کولیستین، جنتامایسین، کلیندامایسین، سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، پنی‌سیلین، تتراسایکلین، اریترومایسین، ونکومایسین، و ریفامپین استفاده شد. نتایج به‌دست آمده با استفاده از آخرین نسخه CLSI مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۵).

استخراج DNA ژنومیک و انجام واکنش PCR: برای انجام استخراج DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج شرکت کیاژن (Cat No./ID: 51304) استفاده شد. تمامی مراحل با توجه به پروتکل درج شده در کیت،

مطالعه، از توالی‌های نوکلئوتیدی جدول ۱ و تنظیمات دمایی ترموسایکلر BioRad MJ Mini (ساخت آمریکا) استفاده گردید (جدول ۱). در نهایت، حضور ژن‌ها بر روی آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵۷ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید.

پیش گرفته شد. سپس، با استفاده از پرایمرهای جدول ۱، مراحل آماده‌سازی واکنش PCR برای هر ژن در دامنه دمایی مشخص، انجام گرفت. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر که شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon آلمان) تعیین شد. برای تکثیر ژن‌های مورد

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ژن‌ها	توالی نوکلئوتیدی	تنظیمات دمایی	طول قطعه (جفت باز)	منابع
cps1Aa (Ia)	GGTCAGACTGGATTAATGGTATGC GTAGAAATAGCCTATATACGTTGAATGC	۹۴°C به مدت ۵ دقیقه	۵۲۱	(۱۶)
cps1Bj (Ib)	TAAACGAGAATGGAATATCACAAACC GAATTAACCTCAATCCCTAAACAATATCG	۳۰ سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۳۰ ثانیه ۵۶°C)	۷۷۰	(۱۶)
cps2k (II)	GCTTCAGTAAGTATTGTAAGACGATAG TTCTCTAGGAAATCAAATAATTCTATAGGG	۷۳°C به مدت ۵ دقیقه	۳۹۳	(۱۶)
cps1a/2/3I (III)	TCCGTACTACAACAGACTCATCC AGTAACCGTCCATACATTCTATAAGC	۹۴°C به مدت ۸ دقیقه ۳۰ سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۳۰ ثانیه ۵۹°C، ۴۵ ثانیه ۷۳°C)	۱۲۸۰	(۱۶)
cps4N (Iv)	GGTGGTAATCCTAAGAGTGAAGTGT CCTCCCAATTTTCGTCATAATGGT		۱۳۸	(۱۶)
cps5O (v)	GAGGCCAATCAGTTGCACGTAA AACCTTCTCTTCACACTAATCTT	۹۴°C به مدت ۵ دقیقه	۷۰۱	(۱۶)
cps6I (VI)	GGACTTGAGATGGCAGAAGGTGAA CTGTCCGACTATCCTGATGAATCTC	۲۵ سیکل (۶۰ ثانیه ۹۴°C، ۴۵ ثانیه ۵۷°C، ۴۵ ثانیه ۷۳°C)	۴۷۸	(۱۶)
cps7M (VII)	CCTGGAGAGAACAATGTCCAGAT GCTGGTCTGATTCTACACA	۷۳°C به مدت ۵ دقیقه	۳۷۱	(۱۶)
cps8j (VIII)	AGGTCAACCACTATATAGCGA TCTTCAAATTCGCTGACTT		۲۸۲	(۱۶)

جنتامایسین مقاوم نبودند. با این حال، در ایزوله‌های جدا شده از زنان بارداری، ۲/۳٪ مقاوم به جنتامایسین و ۱۶/۴٪ مقاوم به پنی‌سیلین بودند. علاوه، از ۷۳ ایزوله‌ی جدا شده از نمونه‌های رکتوواژینال (زنان بارداری)، ۳۰ ایزوله (۴۱/۲٪) به‌عنوان سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) و ۹ ایزوله (۱۲/۳٪) به‌عنوان سویه‌های دارای مقاومت به طیف وسیع آنتی‌بیوتیک (XDR) تشخیص داده شد. همچنین، از ۶۱ ایزوله‌ی جدا شده از نمونه‌های بینی و گوش (نوزادان تازه متولد شده)، ۴۹ ایزوله (۸۰/۳٪) به‌عنوان سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) و ۲ ایزوله (۳/۲٪) به‌عنوان سویه‌های دارای مقاومت به طیف وسیع آنتی‌بیوتیک (XDR) تشخیص داده شد.

پراکنش تایپ‌های مختلف کیسول در استرپتوکوک آگالاکتیه. براساس شکل ۲ و جداول ۲ و ۳، از مجموع ۷۳ ایزوله استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان بارداری، ژن cps1a/2/3I در ۱۳ ایزوله (۱۷/۸٪)، ژن cps2k در ۹ ایزوله (۱۲/۳٪)، ژن‌های cps1bj و cps5O در ۲ ایزوله (۲/۷٪)، و ژن cps4N در ۱ ایزوله (۱/۳٪) شناسایی شدند. همچنین، از مجموع ۶۱

بررسی کیفی داده‌ها، با استفاده از روش‌های آمار توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین)، نرم‌افزار GraphPad Prism و آزمون آماری χ^2 صورت گرفت. به‌منظور بررسی ارتباط بین متغیرهای مختلف از آزمون‌های آماری آنوا دوطرفه و آزمون-تی استفاده گردید. در این مطالعه مقدار $P \leq 0/001$ و $P \leq 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

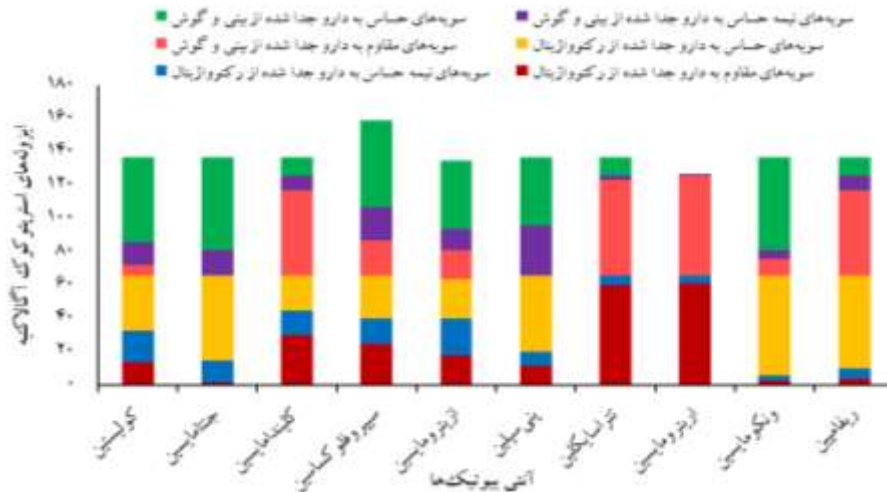
نتایج

طی مدت نمونه‌برداری در بازه زمانی مشخص شده، ۱۳۷ نمونه استرپتوکوک گروه B جمع‌آوری شد. از این میان، ۷۳ نمونه از رکتو-واژینال و ۶۱ نمونه از گوش و بینی نوزادان تازه متولد شده جمع‌آوری گردید.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های استرپتوکوک آگالاکتیه. با توجه به شکل ۱، در ایزوله‌های جدا شده از زنان بارداری و بینی و گوش نوزادان تازه متولد شده، سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین و اریترومایسین به‌ترتیب با ۸۲/۱٪، ۸۳/۵٪ و ۹۳/۴٪، ۹۸/۳٪ بیشترین فراوانی را داشتند. هیچ یک از ایزوله‌های جدا شده از نوزادان تازه متولد شده به پنی‌سیلین و

III بیشترین فراوانی را داشت. تایپ‌های کپسولی Ia, VI, VIII, VII در نمونه‌های رکتوواژینال و گوش‌بینی مشاهده نشد.

ایزوله استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از نوزادان تازه متولد شده، ژن cps1a/2/3I در ۷ ایزوله (۱۱/۴٪)، ژن cps2k در ۳ ایزوله (۴/۹٪)، ژن cps1bj در ۸ ایزوله (۱۳/۱٪)، ژن cps5O در ۷ ایزوله (۱۱/۴٪) و ژن cps4N در ۴ ایزوله (۶/۵٪)، شناسایی شدند. در هر دو گروه، تایپ کپسولی

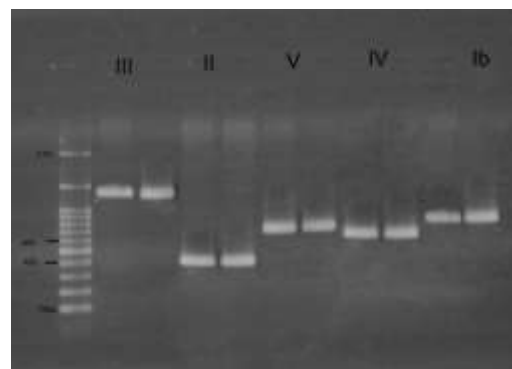


جدول ۱- الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از نمونه‌های رکتوواژینال (زنان باردار) و گوش-بینی (نوزادان تازه متولد شده)

جدول ۲- الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و فراوانی تایپ‌های مختلف کپسولی در ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از نمونه‌های نازال و گوش نوزادان تازه متولد شده

تعداد کل سوبه‌های مقاوم	تایپ‌های مختلف کپسولی								پروفایل مقاومت به آنتی‌بیوتیک	
	cps1Ah (Ia)	cps1bj (Ib)	cps2k (II)	cps1a/2/3I (III)	cps4N (IV)	cps5O (V)	cps6I (VI)	cps7M (VII)		cps8J (VIII)
۶	کولیستین
.	جتنامیسین
۵۱	.	(۱/۹٪)	.	(۱/۹٪)	.	(۱/۹٪)	.	.	.	کلیندامیسین
۲۱	سیپروفلوکساسین
۱۷	ازیترومایسین
.	پنی‌سیلین
۵۷	.	(۳/۵۲٪)	(۱/۷٪)	(۲/۵٪)	(۲/۵٪)	(۴/۲٪)	.	.	.	تتراسایکلین
۶۳	.	(۲/۱۶٪)	(۲/۱۶٪)	(۲/۱۶٪)	(۲/۱۶٪)	(۲/۱۶٪)	.	.	.	اریترومایسین
۱۰	کولیستین
۵۱	.	(۲/۳۹٪)	.	(۲/۳۹٪)	جتنامیسین
	.	۸	۳	۷	۴	۷	.	.	.	تعداد کل

طول محصولات سنتز شده برای ژن cps1a/2/3I (تایپ III) ۱۲۸۰ جفت باز، برای ژن cps2k (تایپ II) ۳۹۳ جفت باز، برای ژن cps1bj (تایپ Ib) ۷۷۰ جفت باز، برای ژن cps5O (تایپ V) ۷۰۷ جفت باز، برای ژن cps4N (تایپ IV) ۱۳۸ جفت باز. M: مارکر ۱۰۰-جفت بازی تجزیه و تحلیل داده‌ها: با توجه به جدول ۴ و سطح معنی‌دار بودن مقادیر $P \leq 0/05$ و $P \leq 0/001$ ، اختلاف معنی‌داری بین حضور الگوی ژن‌های cps1a/2/3I، cps2k، cps1bj، cps5O و cps4N و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، جنتامیسین و کلیندامیسین دیده شد ($P \leq 0/05$). همچنین، تفاوت معنی‌داری بین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک در سوبه‌های حامل ژن‌های cps1a/2/3I، cps2k، cps1bj، cps5O



شکل ۲- الکتروفورز ژن‌های مربوط به تایپ‌های مختلف کپسولی در ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از رکتوواژینال و گوش‌بینی

سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نوزادان تازه متولد شده. INC: سویه‌های نیمه حساس به آنتی‌بیوتیک در نوزادان تازه متولد شده. SNC: سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک در نوزادان تازه متولد شده. TRS: سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین. ERS: سویه‌های مقاوم به اریترومايسين.

بحث

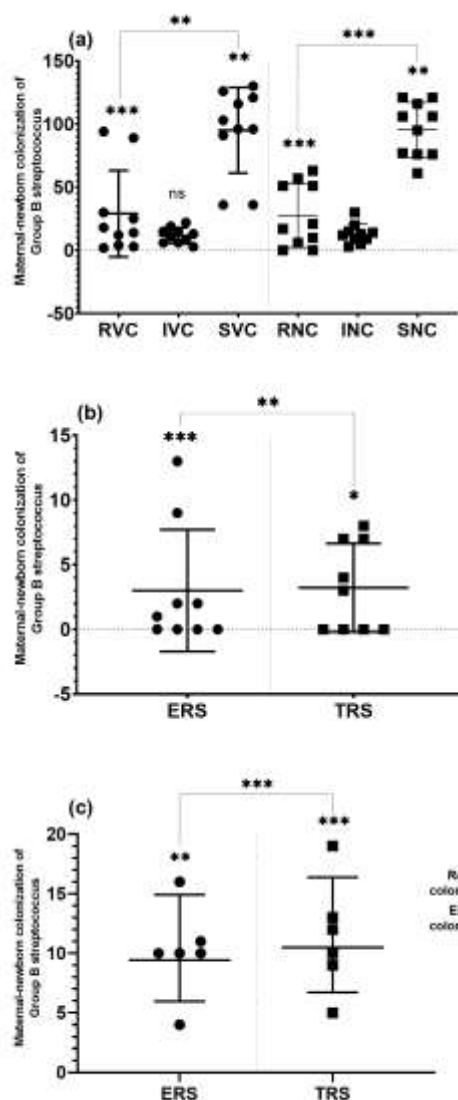
بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، درصد فراوانی رکتوواژینال استرپتوکوک آگالاکتیه ۴۴/۲٪ گزارش شد. همچنین، درصد فراوانی این باکتری در نوزادان تازه متولد شده، ۵۲/۸٪ بود. مطالعاتی در ایتالیا (۱۲) و آرژانتین (۲) فراوانی رکتوواژینال استرپتوکوک آگالاکتیه را کمتر از ۲۰ درصد گزارش کردند. با این حال، مطالعات ساداگا و همکاران فراوانی ۱۰۰ درصدی رکتوواژینال استرپتوکوک آگالاکتیه را در زنان باردار نشان داد (۱۷). همچنین، جی‌چاپو و همکاران، فراوانی استرپتوکوک آگالاکتیه در نوزادان تازه متولد شده را بیش از ۶۰ درصد گزارش کردند (۱۸). از عواملی همچون اختلاف در سطح بهداشت بارداری، امکانات بهداشتی و در دسترس و همچنین حجم نمونه جامعه مورد بررسی، می‌توان به عنوان مهمترین دلایل اختلاف نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات نام برد.

بر اساس مطالعه حاضر، فراوانی سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین و اریترومايسين به ترتیب با ۸۲/۱٪، ۸۳/۵٪ و ۹۳/۴٪، ۹۸/۳٪ در ایزوله‌های جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده، بدست آمد. از طرفی، هیچ یک از ایزوله‌های جدا شده از نوزادان تازه متولد شده به پنی‌سیلین و جنتامایسین مقاوم نبودند. با این حال، در ایزوله‌های جدا شده از زنان باردار، ۲/۳٪ مقاوم به جنتامایسین و ۱۶/۴٪ مقاوم به پنی‌سیلین بودند. نتایج مشابهی مبنی بر مقاومت حداکثری به تتراسایکلین و اریترومايسين در نمونه‌های رکتوواژینال و نوزادان تازه متولد شده در مطالعات مدزانا و همکاران گزارش شد. آنها نشان دادند که سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین، اریترومايسين و کلیندامایسین نقش مهمی در عفونت‌های رکتوماژینال در زنان باردار دارند (۱۳).

با این حال، مورالدا و همکاران نشان دادند که، فراوانی سویه‌های مقاوم به کلیندامایسین و تتراسایکلین در زنان باردار، کمتر از ۲۰ درصد می‌باشد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد (۱۹). مطالعات صورت گرفته در مصر (۱۷) و ایتالیایی (۱۸) نشان داد که سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین، اریترومايسين و پنی‌سیلین در ایزوله‌های رکتوواژینال فراوانی بالایی (بیش از ۶۰ درصد) دارند. الگوی مصرف دارو، در دسترس بودن آنتی‌بیوتیک و جهش‌های گوناگون در سویه‌های مقاوم به دارو براساس پراکنش جغرافیایی، از مهمترین مواردی که سبب ایجاد اختلاف در نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات شده است.

مطالعه جنویسی و همکاران فراوانی بالای سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین را ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه گزارش داد (۱۲). با این حال، عدم مشاهده سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین در مطالعه حاضر، یکی از

و cps4N و سویه‌های فاقد این ژن‌ها مشاهده شد ($P \leq 0.05$) و ($P \leq 0.001$).



شکل ۳- ارتباط الگوی فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیک و تایپ‌های مختلف کپسولی در استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده (a) ارتباط بین آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد. (b) ارتباط بین مقاومت به تتراسایکلین و اریترومايسين و پراکنش تایپ‌های کپسولی در استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار. (c) ارتباط بین مقاومت به تتراسایکلین و اریترومايسين و پراکنش تایپ‌های کپسولی در استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از نوزادان تازه متولد شده. RVC: سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در زنان باردار. IVC: سویه‌های نیمه حساس به آنتی‌بیوتیک در زنان باردار. SVC: سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک در زنان باردار. RNC: سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در زنان باردار. INC: سویه‌های نیمه حساس به آنتی‌بیوتیک در زنان باردار. SNC: سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک در زنان باردار. Recti coloniz: Recti coloniz. Ear. coloniz: Ear. coloniz.

استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده وجود دارد. مطالعات مختلف در آرژانتین (۲)، اسپانیا (۷) و ژاپن (۸) نتایج مشابهی را گزارش دادند. از طرفی، مطالعات لو و همکاران (۳۱) مشخص کردند تایپ‌های III و V کپسولی در استرپتوکوک آگالاکتیه فراوانی بیشتری در سوبه‌های مقاوم به کلیندامایسین دارند. آنها همچنین بیان کردند که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف افزایش معنی‌داری در سوبه‌های استرپتوکوک آگالاکتیه دارای کپسول دارد. جووو و همکاران یک ارتباط معنی‌دار بین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و شیوع تایپ‌های مختلف کپسولی در استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار را گزارش کردند (۳۲). ممکن است که لوکوس ژنی cps در ژنوم باکتری به‌صورت متحرک باشد که می‌تواند سبب ایجاد جهش‌های مخرب و یا سازنده شود. از این‌رو، لوکوس ژنی cps به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم می‌تواند بیماری‌زایی استرپتوکوک آگالاکتیه را تحت اثر خود قرار دهند. در مطالعه حاضر به دلیل محدودیت‌های حاکم در ارایه حجم نمونه بیشتر، عدم تمرکز بر روی فعالیت ژن‌های بیوفیلمی و عدم نمونه‌گیری در فصول مختلف، این نتایج ممکن است با نتایج سایر مطالعات متفاوت باشد (۳۳). این امر نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه را مطرح می‌کند.

نتایج مطالعه حاضر فراوانی بالای سوبه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده را گزارش داد. هیچ یک از ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از نوزادان تازه متولد شده به جنتامایسین و پنی‌سیلین مقاوم نبودند که نشان‌دهنده مصرف پایین این آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. همچنین، ارتباط معنی‌دار بین مقاومت به تتراسایکلین و کلیندامایسین با پراکنش تایپ‌های کپسولی در استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده، نقش فاکتورهای بیماری‌زایی را در افزایش مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها روشن کرد. از این‌رو، مصرف آنتی‌بیوتیک در زنان باردار باید با دقت بیشتری صورت گیرد تا سبب ظهور سوبه‌های با بیماری‌زایی بیشتر نشود. همچنین، در تشخیص عفونت‌های استرپتوکوک گروه B، شناسایی تایپ‌های کپسولی نقش مهمی در کوتاه کردن مسیر درمان دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد مصوب به شماره ۱۴۲۳۰۵۰۷۹۲۲۰۲۰ و با حمایت‌های معاونت محترم پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان به سرانجام رسید. لذا، نویسندگان این مقاله قدردانی و سپاس خود را از این معاونت به‌دلیل حمایت‌های مادی و معنوی، اعلام می‌دارند.

References

1. Rolland K, Marois C, Siquier V, Cattier B, Quentin R. Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis and hylB gene analysis. J Clin Microbiol 1999;37:1892-8. doi:10.1128/jcm.37.6.1892-1898.1999.

مهمترین نکاتی است که الگوی صحیح مصرف دارو را مشخص می‌کند. سوبه‌های MDR و XDR به‌ترتیب در ۴۱/۲٪ و ۱۲/۳٪ از ایزوله‌های رکتوواژینال گزارش شد. همچنین، ۸۰/۳٪ و ۳/۲٪ از ایزوله‌های جدا شده از نوزادان تازه متولد شده به‌ترتیب به‌عنوان MDR و XDR در نظر گرفته شدند. مطالعات صورت گرفته توسط چنگ و همکاران (۲۰) و گاوو و همکاران (۲۱) گزارشات مشابهی را از شیوع سوبه‌های MDR و XDR در نمونه‌های رکتوواژینال و نوزادان بیان کردند. گرچه طیف وسیعی از سوبه‌های MDR در مطالعه حاضر گزارش شد، اما آنتی‌بیوتیک انتخابی جهت درمان این سوبه‌ها، کماکان پنی‌سیلین می‌باشد.

براساس مطالعه حاضر، ژن cps1a/2/3I در ۱۷/۸٪، ژن cps2k در ۱۲/۳٪، ژن‌های ps1bj و cps5O در ۲/۷٪ و ژن cps4N در ۱ ایزوله ۱/۳٪ از ایزوله‌های رکتوواژینال، شناسایی شدند. نتایج مشابه به مطالعه حاضر در گزارشات شریشتا و همکاران (۲۲)، لویزا و همکاران (۲۳) و دشتی زاد و همکاران (۲۴) دیده شد. همچنین، در ایزوله‌های جدا شده از گوش‌بینی نوزادان تازه متولد شده، ۱۱/۴٪ حامل ژن cps1a/2/3I، ۹/۴٪ حامل ژن cps2k، ۱۱/۳٪ حامل ژن cps1bj، ۴/۱۱٪ حامل ژن cps5O، و ۶/۵٪ حامل ژن cps4N بودند. این فراوانی با نتایج گزارش شده در مطالعه مادرید و همکاران (۲۵) و ابوترابی و همکاران (۲۶) همخوانی داشت.

با این حال، در هر دو گروه مطالعه حاضر، تایپ کپسولی III بیشترین فراوانی را داشت و تایپ‌های کپسولی VIII, VII Ia, VI, در نمونه‌های رکتوواژینال و گوش‌بینی مشاهده نشدند. همچنین، حدود ۷٪ از نمونه‌ها قابل تایپ‌بندی نبودند. در مطالعات دیگر هم تعدادی از نمونه‌های GBS جدا شده از مادر و نوزاد قابل تایپ‌بندی از لحاظ کپسولی نبودند (۲۷) و علت وجود استرپتوکوک‌های B غیرقابل تایپ‌بندی از لحاظ کپسولار تایپینگ ممکن است به این دلیل باشد که دارای اپرون cps معیوب باشند و بنابراین فاقد کپسول بوده و یا این باکتری‌ها قابلیت ایجاد کپسول غیرعادی را دارا می‌باشند. همچنین گزارش‌هایی مبنی بر وجود سوبه‌های نادری از GBS که با روش‌های مولکولی قابل تیپ‌بندی نیستند بیانگر آن است که کلون‌هایی در جمعیت‌های این باکتری وجود دارند که در مناطق حفاظت شده cps Locus دچار واگرایی شده‌اند.

ارتباط بین فاکتورهای بیماری‌زا و مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های مختلف مطرح شده است (۲۹ و ۳۰). با این حال، برخی فاکتورهای بیماری‌زا مانند کپسول پلی‌ساکاریدی ارتباط مبهمی با مقاومت به دارو دارد. مطالعه حاضر، ارتباط مستقیمی بین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک و وجود کپسول پلی‌ساکاریدی در ایزوله‌های استرپتوکوک آگالاکتیه جدا شده از زنان باردار و نوزادان تازه متولد شده را گزارش کرد. همچنین، در این مطالعه همچنین مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین افزایش مقاومت به تتراسایکلین و جنتامایسین و شیوع تایپ‌های مختلف کپسولی در

2. Bobadilla FJ, Novosak MG, Cortese IJ, Delgado OD, Laczkeski ME. Prevalence, serotypes and virulence genes of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women with 35–37 weeks of gestation. *BMC Infect Dis* 2021; 21:73. doi:10.1186/s12879-020-05603-5
3. Botelho ACN, Oliveira JG, Damasco AP, Santos KTB, Ferreira AFM, Rocha GT, et al. Streptococcus agalactiae carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years. *PLOS ONE* 2018;13:e0196925. doi:10.1371/journal.pone.0196925
4. Borger I, d'Oliveira R, Castro A, Mondino S. Streptococcus agalactiae in pregnant women: Prevalence of colonization and antimicrobial susceptibility evaluation. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2005;27:575-9
5. Sahuquillo-Arce JM, Hernández-Cabezas A, Castaño-Aroca MJ, Chouman-Arcas R, Díaz-Aguirre E, Acosta-Boga B, et al. Streptococcus agalactiae in childbearing age immigrant women in Comunitat Valenciana. *Sci Rep* 2020;10:9904. doi:10.1038/s41598-020-66811-2
6. Huang J, Lin X-Z, Zhu Y, Chen C. Epidemiology of group B streptococcal infection in pregnant women and diseased infants in mainland China. *Pediatr Neonatol* 2019;60:487-95. doi:10.1016/j.pedneo.2019.07.001.
7. Rojo-Bezares B, Azcona-Gutiérrez JM, Martín C, Jareño MS, Torres C, Sáenz Y. Streptococcus agalactiae from pregnant women: antibiotic and heavy-metal resistance mechanisms and molecular typing. *Epidemiol Infect* 2016;144:3205-14. doi:10.1017/S0950268816001692
8. 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;142:812-9. doi:10.1017/S0950268813001647
9. Toresani I, Limansky A, Bogado I, Guardati MC, Viale A, Sutich EG. Phenotypic and genotypic study of Streptococcus agalactiae in vagina of pregnant women in Argentina. *Medicina (B Aires)*. 2001;61:295-300.
10. Sama LF, Noubom M, Kenne C, Tchouangueu TF, Ngouateu OB, Atsamo AD, et al. Group B Streptococcus colonisation, prevalence, associated risk factors and antimicrobial susceptibility pattern among pregnant women attending antenatal care at Dschang District Hospital, West Region of Cameroon: A hospital-based cross-sectional study. *Int J Clin Pract* 2021;75:e14683. doi:10.1111/ijcp.14683
11. Kashosi TM, Steve N, Achippe MB, Ntakwinja M, John MK, Kibendelwa T, et al. Prevalence of colonization by Streptococcus agalactiae among pregnant women in Bukavu, Democratic Republic of the Congo. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2014;8. doi:10.3855/jidc.5030
12. Genovese C, D'Angeli F, Di Salvatore V, Tempera G, Nicolosi D. Streptococcus agalactiae in pregnant women: serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2020;39:2387-96. doi:10.1007/s10096-020-03992-8
13. Mudzana R, Mavenyengwa RT, Gudza-Mugabe M. Analysis of virulence factors and antibiotic resistance genes in group B streptococcus from clinical samples. *BMC Infect Dis* 2021;21:125. doi:10.1186/s12879-021-05820-6.
14. Connie R, Mahon DCL, George Manuselis Jr. *Textbook of Diagnostic Microbiology* (5th Edition). U.S.A: Saunders; 2014.
15. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 30nd Informational Supplement CLSI M100-S30*. Wayne, PA: CLSI; 2020.
16. Mukesi M, Iweriebor BC, Obi LC, Nwodo UU, Moyo SR, Okoh AI. Prevalence and capsular type distribution of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Namibia and South Africa. *BMC Infect Dis* 2019;19:179. doi:10.1186/s12879-019-3809-6
17. Mohamed Sadaka S, Abdelsalam Aly H, Ahmed Meheissen M, Orif YI, Mohamed Arafa B. Group B streptococcal carriage, antimicrobial susceptibility, and virulence related genes among pregnant women in Alexandria, Egypt. *Alexandria Journal of Medicine* 2018;54:69-76. doi:10.1016/j.ajme.2017.01.003
18. Gizachew M, Tiruneh M, Moges F, Adefris M, Tigabu Z, Tessema B. Newborn colonization and antibiotic susceptibility patterns of Streptococcus agalactiae at the University of Gondar Referral Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatrics* 2018;18:378. doi:10.1186/s12887-018-1350-1
19. Moraleda C, Benmessaoud R, Esteban J, López Y, Alami H, Barkat A, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of group B streptococcus isolated among pregnant women and newborns in Rabat, Morocco. *J Med Microbiol* 2018;67:652-61. doi:10.1099/jmm.0.000720
20. Cheng Z, Qu P, Ke P, Yang X, Zhou Q, Lan K, et al. Antibiotic Resistance and Molecular Epidemiological Characteristics of Streptococcus agalactiae Isolated from Pregnant Women in Guangzhou, South China. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2020;2020:1368942. doi:10.1155/2020/1368942
21. Gao K, Guan X, Zeng L, Qian J, Zhu S, Deng Q, et al. An increasing trend of neonatal invasive multidrug-resistant group B streptococcus infections in southern China, 2011-2017. *Infect Drug Resist* 2018;11:2561-9. doi:10.2147/IDR.S178717
22. Shrestha K, Sah AK, Singh N, Parajuli P, Adhikari R. Molecular Characterization of Streptococcus agalactiae Isolates from Pregnant Women in Kathmandu City. *J Trop Med* 2020;2020:4046703. doi:10.1155/2020/4046703
23. López Y, Parra E, Cepas V, Sanfeliú I, Juncosa T, Andreu A, et al. Serotype, virulence profile, antimicrobial resistance and macrolide-resistance determinants in Streptococcus agalactiae isolates in pregnant women and neonates in Catalonia, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2018;36:472-7. doi:10.1016/j.eimc.2017.08.006
24. Dashtizade M, Zolfaghari MR, Yousefi M, Nazari-Alam A. Antibiotic Susceptibility Patterns and Prevalence of Streptococcus Agalactiae Rectovaginal Colonization Among Pregnant Women in Iran. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2020;42:454-9. doi:10.1055/s-0040-1710299
25. Madrid L, Seale AC, Kohli-Lynch M, Edmond KM, Lawn JE, Heath PT, et al. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis* 2017;65:S160-S72. doi:10.1093/cid/cix656
26. Seyed Aboutorabi SSJ RZ, Pakniat H, Baloo F. Molecular characterization of prevalence, serotypes, virulence factors, and antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae in a maternity hospital, Iran. *Integr Cancer Sci Therap* 2021;8. doi:10.15761/ICST.1000356
27. Johri AK, Lata H, Yadav P, Dua M, Yang Y, Xu X, et al. Epidemiology of Group B Streptococcus in developing countries. *Vaccine* 2013;31:D43-D5. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.094
28. Andrade P, Russo J, Gouveia J, Costa C, Oliveira K, Gianetti M, et al. Molecular Characterization of Group B Streptococcus Serotypes By Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Medical Express* 2017;4. doi:10.5935/MedicalExpress.2017.04.06
29. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Prevalence and Molecular Typing of Colistin-Resistant Pseudomonas aeruginosa (CRPA) Among β -Lactamase-Producing Isolates: A Study Based on High-Resolution Melting Curve Analysis Method. *Infect Drug Resist* 2020;13:2943-55. doi:10.2147/idr.s264796
30. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Co-harboring of mcr-1 and β -lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa by high-resolution melting curve analysis (HRMA): Molecular typing of superbug strains in bloodstream infections (BSI). *Infection, Genetics and Evolution* 2020:104518. doi:10.1016/j.meegid.2020.104518

31. Lu B, Li D, Cui Y, Sui W, Huang L, Lu X. Epidemiology of Group B streptococcus isolated from pregnant women in Beijing, China. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O370-3. doi:10.1111/1469-0691.12416
32. Joao EC, Gouvêa MI, Menezes JA, Matos HJ, Cruz ML, Rodrigues CA, et al. Group B Streptococcus in a cohort of HIV-infected pregnant women: prevalence of colonization, identification and antimicrobial susceptibility profile. *Scand J Infect Dis* 2011;43:742-6. doi:10.3109/00365548.2011.585178
33. 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. doi:10.4414/smw.2014.13935



Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern and Distribution of Capsule Types in Streptococcus Agalactiae Isolates Collected from Maternal-Newborn

Hadiseh Farzan (M.Sc.)¹, Mojgan Fazli (M.Sc.)², Hamed Tahmasebi (M.Sc.)², Pirasteh Norouzi (M.Sc.)²,
Mojtaba Nasiri (M.D.)³, Mehdi Mirzaei (Ph.D.)^{2*}

1- Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

2- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

3- School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 17 October 2021, Accepted: 29 December 2021

Abstract:

Introduction: *Streptococcus agalactiae* is one of the infectious agents in pregnant women and newborns. The capsule of this bacterium is important in pathogenesis. This study aimed to investigate antibiotic resistance patterns and distribution of capsule types in *S. agalactiae* isolates collected from maternal-newborn.

Methods: First, using biochemical tests, *S. agalactiae* isolates were collected from the vagina and rectum of pregnant women and the ears and nose of newborns. Capsule types Ia, Ib, II, III, Iv, V, VI, VII, and VIII were identified by the *ps1Ah*, *cps1bj*, *cps2k*, *cps1a / 2 / 3I*, *cps4N*, *cps5O*, *cps6I*, *cps7M* and *cps8j* genes. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the genes.

Results: In this study, 73 isolates (52.8%) were collected from rectovaginal, and 61 isolates (44.2%) were collected from the ear and nose. In rectovaginal specimens, tetracycline (82.1%) and erythromycin (83.5%) resistant strains were most common. Also, in nose and ear samples, resistance to rifampin (83.6%), erythromycin (98.3%), tetracycline (93.4%), and clindamycin (83.6%) showed high frequency. In both groups, capsule type III (14.4%), followed by capsule type II (7.9%), Ib (7.2%), and V (6.5%) had the highest frequency, respectively. Capsule types VIII, VII Ia, and VI were not detected in any of the isolates. The frequency of capsule types III, Ib, II, and V significantly increased antibiotic-resistant strains.

Conclusion: Our results showed that the high frequency of *S. agalactiae* capsule types in pregnant women has an essential role in increasing resistance to various antibiotics.

Keyword: Polymerase chain reaction (PCR), *Streptococcus agalactiae*, Drug resistance, Pregnant women.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Mirzaei, Email: mirzaei1386@gmail.com

Citation: Farzan H, Fazli M, Tahmasebi H, Norouzi P, Mirzaei M. Evaluation of antibiotic resistance pattern and distribution of capsule types in *Streptococcus agalactiae* isolates collected from maternal-newborn. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2022;16(4):1-9.