Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 4th 2018

BRIEF REPORT

Diagnosis of Streptococcus Pneumoniae based on cpsB, cpsD, and psaA Genes

Ali Asgari[1],
Ramezan Ali Ataee[2],
Mahdi Ghorbanalizadegan[3],
Ali Mehrabi Tavana[2]

[1] MSc in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hospital Research Development Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Health Management Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hospital Research Development Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received September 25, 2017 ; Accepted February 18, 2018)

Abstract

Background and purpose: Fast diagnosis of pneumococcal infections is of great importance in achieving successful outcomes. The aim of this study was to use PCR process based on capsular encoding genes of *Streptococcus pneumonia*.

Materials and methods: In this experimental study, specific primers were designed based on the reference sequences of the *Streptococcus pneumoniae cps*B, *cps*D, *aro*E, and *psa*A genes. All bacteria were subjected to DNA extraction separately. Then, the PCR protocol was performed. Sequencing of the PCR products was done and data was analyzed descriptively.

Results: The primer pairs against the *cps*B, *cps*D, *aro*E, and *psa*A genes amplified 159, 202, 254, and 286 bp fragments, respectively. The alignments and comparison of amplified sequences showed a high homology (100%) with the reference genes.

Conclusion: According to this study, it is possible to diagnose *Streptococcus pneumoniae* based on virulence genes, and differentiate the pathogenic *Streptococcus pneumoniae* from nonpathogenic strains and also viridans groups. Therefore, this method is suggested in diagnosis of pathogenic *Streptococcus pneumoniae* strains.

Keywords: PCR, *Streptococcus pneumoniae*, capsular genes

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (161): 121-126 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 4th 2018

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۱ خرداد سال ۱۳۹۷ (۱۲۶-۱۲۱)

تشخیص استرپتوکوکوس پنومونیه بر اساس ژن‌های *cps*B ، *cps*D و *psa*A

علی عسکری[۱]
رمضانعلی عطایی[۲]
مهدی قربانعلی زادگان[۳]
علی مهرابی توانا[۲]

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص سریع عفونت‌های پنوموککی به منظور درمان موفق و پیشگیری از عواقب آن بسیار مهم است. لذا، هدف ز این مطالعه راه اندازی روش PCR براساس ژن‌های رمزکننده کپسول استرپتوکوکوس پنومونیه بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، براساس سکانس رفرانس ژن‌های *CPS*B، *CPS*D، *ARO*E و *PSA*A استرپتوکوکوس پنومونیه پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید. هر باکتری به طور جداگانه مورد استخراج ژن قرار گرفت. پروتکل PCR طراحی و انجام شد. محصول PCR سکانس و نتایج به صورت توصیفی تحلیل گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، پرایمرهای طراحی شده علیه ژن های cpsB، cpsD، aroE و psaA قادر به تکثیر قطعات ۱۵۹، ۲۰۲، ۲۵۴ و ۲۸۶ جفت بازی هستند. مقایسه و همسان سازی قطعات تکثیر شده با ژن‌های رفرانس همولوژی ۱۰۰ درصدی را نشان داد.

استنتاج: نتایج حاکی از آن بود که می‌توان با استفاده از ژن‌های ویرولانس سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه بیماری زا را از سویه‌های غیر بیماری زا و نیز سویه های ویریدانس تشخیص داد. بنابراین، با استفاده از روش ارایه شده در این تحقیق احتمالاً بتوان سویه های بیماری زای استرپتوکوکوس پنومونیه را تشخیص داد و گزارش نمود.

واژه های کلیدی: زنجیره واکنش پلی‌مراز، استرپتوکوکوس پنومونیه، ژن‌های سازنده کپسول

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه یکی از علل عفونت‌های اکتسابی از جامعه است(۱) که ۳۷ درصد منتژیت‌های باکتریایی را در بزرگسالان به خود اختصاص داده است(۲). شباهت‌های این باکتری با سایر باکتری‌های گروه ویریدانس، شناسایی دقیق استرپتوکوکوس پنومونیه را از سایر باکتری‌های گروه ویریدانس با مشکل مواجه ساخته است(۳). با آن‌که حساسیت به اپتوشین، مقاومت به باسیتراسین و انحلال در صفرا از آزمایشات روتین تشخیص استرپتوکوکوس پنومونیه هستند؛ تنها ۷۳ درصد سویه‌ها به اپتوشین حساس بوده‌اند(۴). لذا، توسل به روش‌های مولکولی تشخیص باکتری در نمونه‌های مختلف پاتولوژیک بیش از پیش ضرورت یافته است(۵). برخی تحقیقات برای تشخیص استرپتوکوکوس پنومونیه از تکثیر ژن LYTA با استفاده از روش QUANTITATIVE-PCR

مولف مسئول: رمضانعلی عطایی– تهران: میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله E-mail: ataee216@gmail.com
۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، کمیته توسعه تحقیقات بیمارستان، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
۲. استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات مدیریت سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، کمیته توسعه تحقیقات بیمارستان، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۷/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۷/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 4th 2018

حساسیت تشخیص را به ۲۲ درصد رسانده‌اند ولی برخی سویه‌های بیماری زا فاقد ژن LYTA گزارش شده‌انـد(۶). علاوه براین‌ها، بروز استرپتوکوکوس پنومونیه با مقاومت چندگانه(۷) و نیز ظهور سویه‌های مقاوم بـه ونکومایسـین(۸) بر اهمیت تشخیص سریع و دقیق افزوده است. هم‌چنین، سـویه‌های اسـترپتوکوکوس پنومونیـه همزیسـت و غیـر بیماری‌زا در افراد سالم و افتراق آن‌ها از سویه‌های بیماری‌زا مشکلات فراوانی را ایجاد کرده است(۹). چون، مهم‌ترین عامل ویرولانس استرپتوکوکوس پنومونیه کپسول آن است، ردیابی‌ژن‌های دخیـل در سنتز کپسـول *استرپتوکوکوس پنومونیه* به‌عنوان عامل اصلی ویرولانس و بیمـاری‌زایـی بسیار حایز اهمیت است. هـدف ایـن تحقیـق راه‌انـدازی روش تشخیص استرپتوکوکوس پنومونیه بر اسـاس ژن‌هـای دخیل در سنتز کپسول و اتصال این باکتری بوده است.

مواد و روش ها

سویه باکتری

در این مطالعه ۲۰ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونیـه کـه در دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج) تعیین سروتیپ شده بودند(۱۰،۱۱)، *استرپتوکوکوس موتـانس*، *استرپتوکوکوس میتس*، *انتروکوکـوس فیکـالیس*، *اشریشـیا کـولی* و نیـز *استرپتوکوکوس پنومونیه* ATCC 6305 استفاده گردید.

محیط کشت

محیط کشت مایع (BHI-BROTH;Cat No.110493, Merk) و محیط ژلـوز خـون‌دار (Blood agar BASE; Cat No.110886, Merk حاوی ۵ درصد خون گوسفند از شرکت داروا‌ش- ایران) طبق پروتکل‌هـای اسـتاندارد تهیه و اسـتریل گردیـد. پـس از کنتـرل عـدم آلـودگی، محیط‌ها بسـته‌بنـدی و در یخچـال ۴ درجـه سـانتی‌گـراد حداکثر به مدت یک هفته نگهداری شدند.

کشت باکتری

در شرایط آسپتیک آمپول لیوفیلیزه را باز نمـوده، ۱ میلی‌لیتر محیط مایع استریل شده BHI broth بـه آمپـول وارد و چند بار به آرامی پمپ گردید تا پودر حل شـود. سپس ۵۰ میکرولیتر از ایـن سوسپانسـیون را روی محـیط Blood Agar منتقل و به صورت خطی گسـترش داده شـد. محیط تلقیح شده در شرایط ۳ تا ۵ درصد دی‌اکسـیدکـربن و دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

پس از گرمخانه‌گذاری، کلنی‌های *استرپتوکوکوس پنومونیـه* بـه صـورت کلنی‌هـای کوچـک، متمایـل بـه خاکستری، موکوئیدی و احاطه شده با هاله سبز همـولیز آلفا دیده شدند. هم‌چنین با انجـام رنـگ‌آمیـزی گـرم و مشـاهده اشـکال دیپلوکـوک‌هـای شـعله شـمعی و نیـز آزمون‌های کاتالاز، حساسیت به اپتوشین و حلالیـت در صفرا، وجود *استرپتوکوکوس پنومونیه* تأیید گردید.

استخراج DNA *ژنومی*

استخراج DNA از *استرپتوکوکوس پنومونیـه* بـه طریق جوشاندن به قرار زیر انجام شد.

با افزودن یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل به کشـت خالص ۲۴ ساعته سوسپانسیون شد. ۲۰۰ میکرولیتر از آن به مدت ۵ دقیقه در حمام ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قـرار داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در فریـزر ۲۰°C- نگهـداری شد. این عمل سه بار تکرار گردید. پس از سه بـار ذوب و انجماد سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور و دمای ۴ °C به مدت ۵ دقیقه) گردید. مایع رویی به میکروتیوپ جدید منتقـل و هم حجم آن اتانل سرد افـزوده ویـک شـب در فریـزر منفی ۲۰ °C قرار داده شد. پس از آن سـانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور و دمای ۴ °C به مدت ۵ دقیقه) گردید و به رسـوب حاصل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اسـتریل افـزوده و پـس از تعیین غلظـت DNA جهـت مراحـل بعـدی در فریـزر ۲۰ °C- قرار داده شدند.

طراحی پرایمر

از بانـک ژنـی سـکانس ژن‌هـای EU798281.1، JN642323.1، HG799504.1 و CP007593.1 جهـت طراحی پرایمرهای تکثیر کننـده ژن‌هـای *Psa*A، *cps*B، *CPS*D،و *ARO*E انتخاب شدند و بـا اسـتفاده از نـرم افـزار

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 4th 2018

GenScript Primer Design جفت پرایمرها طراحی گردید. جهت سنتز از طریق شرکت ایرانی پیشگام توسط شرکت کره‌ای ماکروژن پرایمرها سنتز غلظت کاری ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر تهیه و موقع نیاز استفاده شد.

واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)

واکنش PCR با اضافه کردن اجزای واکنش دهنده (آب مقطر دی‌یونیزه ۱۰ میکرولیتر، mastermix ۱۲ میکرولیتر، پرایمر forward ۱ میکرولیتر حاوی ۱۰ پیکومول و پرایمر Revers نیز ۱ میکرولیتر حاوی ۸ پیکومول، DNA الگو ۱ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانومول و ۱ میکرولیتر آنزیم تک پلی مراز) انجام شد. میکروتیوب های حاوی ترکیبات مذکور در ترموسایکلر با چرخه دمایی مطابق پروتکل انجام گردید:

الکتروفورز محصول PCR

محصول PCR در کنار استاندارد وزن مولکولی، در آگارز ۰/۸ درصد، الکتروفورز و توسط دستگاه ژل داک مشاهده و تصویربرداری گردید.جداسازی قطعات DNA تکثیر شده با رنگ Cyber Green و تحت نور ماورای بنفش قابل مشاهده شدند.

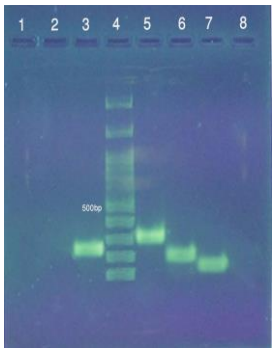
حساسیت و اختصاصیت پرایمرها

بررسی حساسیت PCR: از *استرپتوکوکوس پنومونیه* سویه ATCC 6305 رقت سریال تهیه گردید. از رقت‌های 10^{-8} و 10^{-9} استخراج ژنوم انجام و PCR اجرا گردید. با توجه به تعداد باکتری موجود در نمونه و میزان استخراج DNA حساسیت آزمایش محاسبه گردید.

بررسی اختصاصیت: اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده، در کنار ژن‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه*، از ژن‌های استخراج شده استافیلوکوکوس آرئوس، انتروکوکوس فیکالیس، انتروکوکوس فیسیوم و اشریشیا کولی هم زمان با پرایمرهای مورد نظر PCR انجام و نتایج بررسی گردید.

یافته ها و بحث

نتایج اندازه‌گیری غلظت DNA استخراج شده از یک میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی 10^7 عدد باکتری حدود ۸ میکروگرم DNA با ضریب جذب ۱/۸ حاصل نمود. نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن‌های فوق در شرایط بهینه‌سازی شده در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن های *psa*A، *cps*B، *cps*D و *aro*E. چاهک ۴ مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. چاهک ۳ نتیجه PCR ژن *psa* A با ۲۵۴ جفت باز و چاهک های ۵، ۶ و ۷ نتیجه PCR ژن های *aro*E، *cps*B و *cps*D به ترتیب با ۲۸۶، ۲۰۲ و ۱۹۵ جفت باز را نشان داده است. چاهک ۱ و ۲ و ۸ PCR پرایمر تکثیر کننده ژن *psa* A با ژن استخراج شده از استرپتوکوکوس میتیس، انتروکوکوس فیکالیس و اشریشیا کولی بوده است

دراین مطالعه، روش مولکولی تشخیص *استرپتوکوکوس پنومونیه* طراحی و اجرا شد. زیرا برخی سویه‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* بیماری‌زا اپتوشین منفی و دارای همولیز آلفا مورد توجه قرار نمی‌گیرند(۱۲). لذا ممکن است حدود ۳۰ درصد *استرپتوکوکوس پنومونیه‌های* بیماری‌زای انسانی نادیده گرفته شوند(۱۳). با آن‌که تغییر خاصیت آنتی‌ژنی کپسول *استرپتوکوکوس پنومونیه* منجر به ظهور بیش از ۹۰ تیپ سرومی از آن‌ها شده است(۱۴)، اما ژن‌های رمزکننده همه آن‌ها ثابت و محدود است. با روش‌های روتین افتراق سویه‌های بدون کپسول از سویه‌های بیماری‌زا مشکل است(۱۵) لذا ضرورت تشخیص دقیق باکتری اجتناب ناپذیر شده است. به این ترتیب، توسل به روش‌های نوین مولکولی

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 4th 2018

شاید بتواند باعث ارتقای سیستم تشخیص و درمان گردد. از این رو جستجوی ژن‌های رمزکننده کپسول در سویه‌های حامل لوکوس‌های ژنی cps و نیز ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های اتصالی *psa* A(۱۶)، احتمالاً بتواند روشی مناسب جهت تشخیص باکتری باشد. نشان داده شده است که تشخیص ژن psa به تنهایی از حساسیت لازم برخوردار نبوده است(۱۷). در مطالعه حاضر تشخیص ۳ ژن *psa*A، *cps*B، *cps*D ویرولانس و بیماری‌زا و یک ژن *aro*E به عنوان Housekeeping در ۲۱ سویه *استرپتوکوکوس پنومونیه* هدف تشخیص قرار گرفت و حساست ۱۰۰ درصدی را نشان داد. با این حال ممکن است روش استخراج ژنوم و نیز پروتکل PCR بر میزان حساسیت این روش مؤثر باشد. علاوه براین، مقرون به صرفه بودن روش ارایه شده می‌تواند ضمن ارتقای سطح علمی آزمایشگاه‌ها، تشخیص سریع و دقیق *استرپتوکوکوس پنومونیه* بیماری‌زا را فراهم نماید. به منظور تشخیص *استرپتوکوکوس پنومونیه* بیماری‌زا براساس ژن‌های ویرولانس و افتراق آن از سویه‌های غیر بیماری‌زا این مطالعه طراحی و اجرا گردید. تأیید وجود ژن های *cps*B و *cps*D که در سنتز کپسول باکتری دخالت دارند و نیز ژن *psa* A که یکی از ژن‌های مهم رمزکننده پروتئین‌های اتصال باکتری به سطوح به شمار می‌رود، می‌تواند ضمن تشخیص باکتری، بیماری‌زایی آن را نیز نشان دهد.

سپاسگزاری

ازحمایت مالی، راهنمایی‌ها ومشاوره‌های ارزشمند واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان بقیه‌الله(عج) در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Gillis HD, Lang ALS, ElSherif M, Martin I, Hatchette TF, McNeil SA, et al. Assessing the diagnostic accuracy of PCR-based detection of Streptococcus pneumoniae from nasopharyngeal swabs collected for viral studies in Canadian adults hospitalised with community-acquired pneumonia: a Serious Outcomes Surveillance (SOS) Network of the Canadian Immunization Research (CIRN) study. BMJ Journal 2017; 7(6): e015008.
2. Ataee RA, Mehrabi Tavana A, Ghorbani GH, Karimi Zarchi AA, Hajia M, Hosseini SMJ, Mousavi SA, et al. Determination of bacterial Etiology of CSF of Patients with meningitis at four Military Hospital in Tehran between 2003 and 2005. J Mil Med 2005; 7(1): 49-56 (Persian).
3. Varghese R, Jayaraman R, Veeraraghavan B. Current challenges in the accurate identification of Streptococcus pneumoniae and its serogroups/serotypes in the vaccine era. J Microbiol Methods 2017; 141: 48-54.
4. Ing J, Mason EO, Kaplan SL, Lamberth LB, Revell PA, Luna RA, et al. Characterization of nontypeable and atypical Streptococcus pneumoniae pediatric isolates from 1994 to 2010. J Clin Microbiol 2012; 50(4): 1326-1330.
5. Wyllie AL, Wijmenga-Monsuur AJ, Van Houten MA, Bosch AA, Groot JA, Van Engelsdorp Gastelaars J, et al. Molecular surveillance of nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae in children vaccinated with conjugated polysaccharide pneumococcal vaccines. Sci Rep 2016; 6: 23809.
6. van Deursen AM, van den Bergh MR, Sanders EA, Carriage Pilot Study Group. Carriage of Streptococcus pneumoniae in asymptomatic, community-dwelling elderly in the Netherlands. Vaccine 2016; 34(1): 4-6.
7. Golden AR, Rosenthal M, Fultz B, Nichol KA, Adam HJ, Gilmour MW, et al. Characterization

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:31 +0430 on Wednesday July 4th 2018

of MDR and XDR Streptococcus pneumoniae in Canada, 2007-2013. J Antimicrob Chemoth 2015; 70(8): 2199-2202.

8. Ataee RA, Habibian S, Mehrabi-Tavana A, Ahmadi Z, Jonaidi N, Salesi M. Determination of vancomycin minimum inhibitory concentration for ceftazidime resistant Streptococcus pneumoniae in Iran. Ann Clin Microb Antimicrob 2014; 13: 53.
9. Pholwat S, Sakai F, Turner P, Vidal JE, Houpt ER. Development of a TaqMan Array Card for Pneumococcal Serotyping on Isolates and Nasopharyngeal Samples. J Clin Microbiol 2016; 54(7): 1842-1850.
10. Habibian S, Mehrabi-Tavana A, Ahmadi Z, Izadi M, Jonaidi N, Darakhshanpoure J, et al. Serotype distribution and antibiotics susceptibility pattern of Streptococcus pneumonia in Iran. Iran Red Crescent Med J 2013; 15(10): e8053 (Persain).
11. Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Esmaili D. Serotyping Distribution of Invasive Pneumococcal Disease (IPD) in Iranian patients. J Pure Appl Microb 2012; 6(1): 155-160.
12. Aguiar SI, Frias MJ, Santos L, Melo-Cristino J, Ramirez M. Portuguese Surveillance Group For Study Of Respiratory Pathogens. Emergence of optochin resistance among Streptococcus pneumoniae in Portugal. Microb Drug Resist 2006; 12(4): 239-245.
13. Burckhardt I, Panitz J, Burckhardt F, Zimmermann S. Identification of Streptococcus pneumoniae: Development of a Standardized Protocol for Optochin Susceptibility Testing Using Total Lab Automation. Biomed Res Int 2017; 2017: 4174168.
14. Geno KA, Saad JS, Nahm MH. Discovery of novel pneumococcal serotype, 35D: a 432 natural WciG-deficient variant of serotype 35B. J Clin Microbiol 2017; 55(5): 1416-1425.
15. Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Esmaili D. Serotyping Distribution of Invasive Pneumococcal Disease (IPD) in Iranian patients. J Pure Appl Microbiol 2012; 6(1): 155-160.
16. Kolkman MA, Wakarchuk W, Nuijten PJ, van der Zeijst BA. Capsular polysaccharide synthesis in Streptococcus pneumoniae serotype 14: molecular analysis of the complete cps locus and identification of genes encoding glycosyltransferases required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. Mol Microbiol 1997; 26(1): 197-208.
17. Yahiaoui RY, den Heijer CD, Wolfs P, Bruggeman CA, Stobberingh EE. Evaluation of phenotypic and molecular methods for identification of Streptococcus pneumoniae. Future Microbiol 2016; 11(1): 43-50.

Archive of SID

www.SID.ir