

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

Ali Asgari¹,
Ramezan Ali Ataee²,
Mahdi Ghorbanalizadegan³,
Ali Mehrabi Tavana²

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 pneumoniae*.

Materials and methods: In this experimental study, specific primers were designed based on the reference sequences of the *Streptococcus pneumoniae cpsB*, *cpsD*, *aroE*, and *psaA* 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 *cpsB*, *cpsD*, *aroE*, and *psaA* 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).

تشخیص استرپتوکوکوس پنومونیه بر اساس ژن‌های *cpsB*، *cpsD* و *psaA*

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 از 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 *cpsB*، *cpsD*، *ARO* و *PSAA* 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 ژن‌های *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 ویروالانس سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه بیماری را از سویه‌های غیر بیماری زا و نیز سویه های ویریدانس تشخیص داد. بنابراین، با استفاده از روش ارائه 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

باسیتراسن 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

استرپتوکوکوس پنومونیه یکی از علل عفونت‌های اکتسابی از جامعه است (۱) که ۳۷ درصد مننژیت‌های 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

E-mail: ataee216@gmail.com

مؤلف مسئول: رمضانعلی عطایی - تهران: میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

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

حساسیت تشخیص را به ۲۲ درصد رسانده‌اند ولی برخی سویه‌های بیماری را فاقد ژن LYTA گزارش شده‌اند (۶). علاوه بر این‌ها، بروز استرپتوکوکوس پنومونیه با مقاومت چندگانه (۷) و نیز ظهور سویه‌های مقاوم به ونکومايسين (۸) بر اهمیت تشخیص سریع و دقیق افزوده است. هم‌چنین، سویه‌های استرپتوکوکوس پنومونیه همزیست و غیر بیماری‌زا در افراد سالم و افتراق آن‌ها از سویه‌های بیماری‌زا مشکلات فراوانی را ایجاد کرده است (۹). چون، مهم‌ترین عامل ویروالانس استرپتوکوکوس پنومونیه کپسول آن است، ردیابی ژن‌های دخیل در سنتز کپسول/استرپتوکوکوس پنومونیه به‌عنوان عامل اصلی ویروالانس و بیماری‌زایی بسیار حایز اهمیت است. هدف این تحقیق راه‌اندازی روش تشخیص استرپتوکوکوس پنومونیه بر اساس ژن‌های دخیل در سنتز کپسول و اتصال این باکتری بوده است.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری

در این مطالعه ۲۰ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونیه که در دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) تعیین سروتیپ شده بودند (۱۱، ۱۰)، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس میتس، اتروکوکوس فیکالیس، اش‌ریشیا کولی و نیز استرپتوکوکوس پنومونیه ATCC 6305 استفاده گردید.

محیط کشت

محیط کشت مایع (BHI-BROTH; Cat No. 110493, Merk) و محیط ژلوز خون‌دار (Blood agar BASE; Cat No. 110886, Merk) از شرکت دارواش - ایران) طبق پروتکل‌های استاندارد تهیه و استریل گردید. پس از کنترل عدم آلودگی، محیط‌ها بسته‌بندی و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد حداکثر به مدت یک هفته نگهداری شدند.

کشت باکتری

در شرایط آسپتیک آمپول لیوفیلیزه را باز نموده، ۱ میلی‌لیتر محیط مایع استریل شده BHI broth به آمپول

وارد و چند بار به آرامی پمپ گردید تا پودر حل شود. سپس ۵۰ میکرولیتر از این سوپانسیون را روی محیط Blood Agar منتقل و به صورت خطی گسترش داده شد. محیط تلقیح شده در شرایط ۳ تا ۵ درصد دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه‌گذاری، کلنی‌های استرپتوکوکوس پنومونیه به صورت کلنی‌های کوچک، متمایل به خاکستری، موکوتیدی و احاطه شده با هاله سبز همولیز آلفا دیده شدند. هم‌چنین با انجام رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده اشکال دیپلوکوک‌های شعله شمعی و نیز آزمون‌های کاتالاز، حساسیت به اپتوشین و حل‌الیت در صفرا، وجود استرپتوکوکوس پنومونیه تأیید گردید.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA از استرپتوکوکوس پنومونیه به طریق جوشاندن به قرار زیر انجام شد.

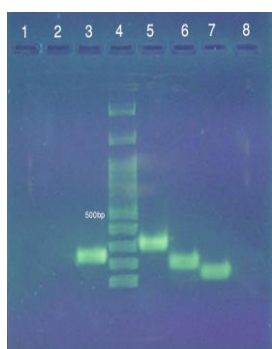
با افزودن یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل به کشت خالص ۲۴ ساعته سوپانسیون شد. ۲۰۰ میکرولیتر از آن به مدت ۵ دقیقه در حمام ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰°C - نگهداری شد. این عمل سه بار تکرار گردید. پس از سه بار ذوب و انجماد سانتی‌فیوژ (۱۰۰۰ دور و دمای ۴°C به مدت ۵ دقیقه) گردید. مایع رویی به میکروتیوپ جدید منتقل و هم حجم آن اتانل سرد افزوده و یک شب در فریزر منفی ۲۰°C قرار داده شد. پس از آن سانتی‌فیوژ (۱۲۰۰ دور و دمای ۴°C به مدت ۵ دقیقه) گردید و به رسوب حاصل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده و پس از تعیین غلظت DNA جهت مراحل بعدی در فریزر ۲۰°C - قرار داده شدند.

طراحی پرایمر

از بانک ژنی سکانس ژن‌های EU798281.1، JN642323.1، HG799504.1 و CP007593.1 جهت طراحی پرایمرهای تکثیر کننده ژن‌های *cpsB*، *PsaA*، *CPSD*، و *ARO*E انتخاب شدند و با استفاده از نرم افزار

یافته ها و بحث

نتایج اندازه گیری غلظت DNA استخراج شده از یک میلی لیتر 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 بهینه سازی شده در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *cpsB*، *cpsA*، *aroE* و *psaA*. چاهک ۴ مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. چاهک ۳ نتیجه PCR ژن *psaA* با ۲۵۴ جفت باز و چاهک های ۵، ۶ و ۷ نتیجه PCR ژن های *cpsB*، *aroE* و *cpsD* به ترتیب با ۲۸۶، ۲۰۲ و ۱۹۵ جفت باز را نشان داده است. چاهک ۱ و ۲ و ۸ PCR پرایمر تکثیر کننده ژن *psaA* با ژن استخراج شده از استرپتوکوکوس میتیس، اتروکوکوس فیکالیس و اشریشیا کولی بوده است

در این مطالعه، روش مولکولی تشخیص/استرپتوکوکوس پنومونیه طراحی و اجرا شد. زیرا برخی سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه بیماری زا اپتوشین منفی و دارای همولیز آلفا مورد توجه قرار نمی گیرند (۱۲). لذا ممکن است حدود ۳۰ درصد استرپتوکوکوس پنومونیه های بیماری زای انسانی نادیده گرفته شوند (۱۳). با آن که تغییر خاصیت آنتی ژنی 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 روش های روتین افتراق سویه های بدون کپسول از سویه های بیماری زا مشکل است (۱۵) لذا ضرورت تشخیص دقیق باکتری اجتناب ناپذیر شده است. به این ترتیب، توسل به روش های نوین مولکولی

GenScript Primer Design جفت پرایمرها طراحی گردید. جهت سنتز از طریق شرکت ایرانی پیشگام توسط شرکت کره ای ماکروژن پرایمرها سنتز غلظت کاری 10^7 پیکومول بر میکرولیتر تهیه و موقع نیاز استفاده شد.

واکنش زنجیره پلیمرز (PCR)

واکنش PCR با اضافه کردن اجزای واکنش دهنده (آب مقطر دی یونیزه 10 میکرولیتر، mastermix 12 میکرولیتر، پرایمر forward 1 میکرولیتر حاوی 10 پیکومول و پرایمر Revers 1 میکرولیتر حاوی 8 پیکومول، DNA الگو 1 میکرولیتر حاوی 50 نانومول و 1 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 0.8% 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 رقت های 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 ژن های استرپتوکوکوس پنومونیه، از ژن های استخراج شده استافیلوکوکوس آئروس، اتروکوکوس فیکالیس، اتروکوکوس فیسایوم و اشریشیا کولی هم زمان با پرایمرهای مورد نظر PCR انجام و نتایج بررسی گردید.

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 ژن‌های *cpsB* و *cpsD* 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

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

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 اتصال *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 ژن *psaA*، *cpsB*، *cpsD* و ویرولانس و بیماری‌زا و یک ژن *aroE* به عنوان Housekeeping در ۲۱ سویه / استرپتوکوکوس پنومونیه هدف تشخیص قرار گرفت و حساسیت 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

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

- 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 pneumoniae* 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.