مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
زمستان ۱۳۹۲؛۵(۴):۶۸۴-۶۷۷

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Winter2013;5(4): 677-684

مقاله پژوهشی

بررسی ارزش تشخیصی PCR در تشخیص عفونت استرپتوکوک گروه B در نوزادان مبتلا به سپسیس

محمد حسن اعلمی[۱]، غلامعلی معموری[۲]، محمدرضا لطفی[۱]، علی خاکشور[۳]، کیارش قزوینی[۴]، رضا سعیدی[۱]، معصومه سعیدی[۱]

[۱]استادیار گروه اطفال، مرکز تحقیقات نوزادان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
[۲]استاد گروه اطفال، مرکز تحقیقات نوزادان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
[۳]استادیار اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران.
[۴]استادیار میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
[*]**نویسنده مسئول**: کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
پست الکترونیک:Masumeh_saeedi@yahoo.com

وصول:۹۲/۴/۲۶اصلاح: ۹۲/۷/۱۷ پذیرش:۹۲/۹/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: *گروه ب استرپتوکوک علت اصلی عفونت نوزادی در کشورهای پیشرفته است. در ایران میزان بروز آن به طور دقیق مشخص نیست. این مطالعه با هدف تعیین ارزش تشخیصی PCR در تشخیص عفونت استرپتوکوک گروه B در نوزادان مبتلا به سپسیس انجام شد.*

مواد و روش کار: *در این مطالعه تمامی شیرخواران کوچکتر از سه ماه مبتلا به سپسیس بستری در NICU و اورژانس کودکان بیمارستان قائم (عج) به مدت یک سال وارد مطالعه شدند که تعداد آنان ۱۰۰ نفر بود. پس از اخذ رضایت کتبی از والدین این شیرخواران، سه نمونه خون این بیماران در ظروف درب دار استریل، دو نمونه جهت کشت در محیط معمولی و ارتقایافته و دیگری جهت انجام روش مولکولی PCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز) به آزمایشگاه منتقل گردید. آنالیز داده ها با SPSS نسخه۱۳ و با کمک آمار توصیفی-تحلیلی (کای دو-همبستگی) انجام شد.*

یافته ها: *روش مولکولی PCR برای شناسایی استرپتوکوک گروه ب در ۳ درصد شیرخواران مثبت بود. در محیط های کشت، در ۵ درصد از کشت معمولی (۲مورد کلبسیلا، ۱ مورد انتروباکتر و ۲ مورد ایکولای) و ۶ درصد در محیط کشت ارتقا یافته (۲ مورد کلبسیلا، ۱مورد انتروباکتر، ۲ مورد ایکولای و ۱ مورد استرپتوکوک آلفاهمولیتیک) میکروبهای دیگری رشد نموده و در هیچ کدام از این محیط ها استرپتوکوک گروه ب رشد نکرد. ۶۴ درصد ازمادران نوزادان مبتلا به سپسیس قبل از زایمان آنتی بیوتیک دریافت کرده بودند.*

نتیجه گیری: *با توجه به میزان بالای مصرف آنتی بیوتیک در مادران قبل از زایمان، جهت شناسایی استرپتوکوک گروه ب بایستی ضمن تقویت و ارتقای محیط های کشت، از روش های حساس تر نظیر PCR استفاده کرد.*

واژه های کلیدی: *سپسیس، نوزادان، استرپتوکوک گروه ب، PCR (Polymeras Chain Reaction)*

مقدمه

گروه ب استرپتوکوک علت اصلی عفونت نوزادی در کشورهای پیشرفته است و در مطالعات انجام شده در کشورهای آسیایی از گروه ب استرپتوکوک به عنوان شایع ترین عامل سپسیس زودرس نوزادی نام برده شده است [۱]. استرپتوکوک ها را اولین بار بیلروت در سال ۱۸۷۴ در ترشحات باد سرخ و عفونتهای زخم توصیف کرد و پاستور در سال ۱۸۷۹ باکتری مشابهی را در خون یک بیمار با سپسیس بعد از زایمان پیدا کرد [۲].

گروه ب استرپتوکوک مهم ترین عامل سپسیس نوزادان و مننژیت بوده و وقوع سپتی سمی باکتریال نوزادی متغیر و در کشورهای توسعه یافته ۴-۱ در ۱۰۰۰ نوزاد زنده متغیر

می باشد [۴-۳]. از آنجا که انتقال عفونت GBS از مادر آلوده به نوزاد حدود ۵۰ درصد می باشد، شناسایی ریسک فاکتورهایی که باعث افزایش ابتلا به عفونت زودرس GBS می شود لازم می باشد [۶-۵].

در مطالعه ای که برای تعیین انسیدانس عفونت گروه ب استرپتوکوک و تظاهرات بالینی آن در قسمت شمال ایتالیا انجام شد یافته ها نشان داد انسیدانس عفونت گروه ب استرپتوکوک، ۰/۵در ۱۰۰۰ تولد زنده بوده و ۲۲ مورد از این مادران تحت اسکرینینگ عفونت واژینال گروه ب استرپتوکوک بوده اند که ۵ نفر مثبت بودند [۷]. در مطالعه ۱۰ ساله دیگری در هند نتیجه مطالعه گویای این حقیقت بود که انسیدانس عفونت گروه ب استرپتوکوک در غرب هندوستان پایین بوده است [۸]. در مطالعه ای که در امریکا انجام شد یافته ها نشان دهنده افزایش عفونت زودرس گروه ب استرپتوکوک (از بدو تولد تا ۷ روزگی) در زنان حامله بوده است [۴].

در مطالعات انجام شده در ایران میزان کلونیزاسیون واژینال گروه ب استرپتوکوک در اواخر سن حاملگی ۹ تا ۲۷ درصد و میزان انتقال به نوزاد ۶۰ درصد گزارش شده و نتایج نشان دهنده کشت مثبت از نظر گروه ب استرپتوکوک در واژن مادران باردار بوده است [۱۳-۹]. در این بررسی ها نقش کلونیزاسیون مثبت در واژن مادران باردار در ایجاد عفونت زودرس نوزادان تایید شده و نتایج حاکی از شیوع ۰/۹ تا۸/۷ درصد سپسیس ناشی از گروه ب استرپتوکوک در نوزادان این زنان بوده است [۱۳-۱۱و ۹].

با توجه به بررسی های مختلف مطالعات انجام شده در ایران، بر روی علل سپسیس عفونت گروه ب استرپتوکوک کم کار شده است. از طرفی با توجه به کلونیزاسیون واژینال نسبتا بالای گروه ب استرپتوکوک احتمالا انسیدانس واقعی گروه ب استرپتوکوک در سپسیس نوزادی بایستی بسیار بالاتر باشد، لذا این احتمال وجود دارد که تکنیک های کشت و روش میکروب شناسی برای شناسایی باکتری ناکافی باشد، لذا بر آن شدیم تا علاوه بر ارتقای محیط کشت از روشهای دقیق و سریع شناسایی باکتری مثلPCR استفاده کنیم تا حتی در صورت کشته شدن باکتری و عدم رشد آن به دلایل مختلفی مثل استفاده از آنتی بیوتیک در مادر حامله، وجود این باکتری مشخص شود. تکنیک PCR در سال ۱۹۸۴ توسط کری مولیس ارائه شده است. امروزه PCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز) بعنوان یک ابزار مهم در فعالیتهای تحقیقاتی و بالینی محسوب میشود. بعضی از کاربردهای PCR عبارتند از: کلونینگ DNA بمنظور تعیین توالی، فیلوژنی بر اساس DNA (آنالیزعملکردی ژنها)، تشخیص بیماریهای ارثی، انگشت نگاری ژنتیکی (در تعیین والدین و جرم شناسی) و تشخیص بیماریهای عفونی. حساسیت روشPCR ده هزار برابر روشهای معمول است. PCR را می توان بمنظور شناسائی میکروارگانیسمهایی بکار برد که قابل کشت نیستند و یا سرعت رشد آنها در محیط کشت خیلی کند است از جمله میکوباکتریها (mycobacteria)، باکتریهای غیر هوازی (anaerobic bacteria) و ویروسها (viruses). در مطالعات میکروبیولوژی از روش PCR برای شناسائی عوامل عفونت زا و تشخیص گونه های پاتوژن از غیر پاتوژن نیز استفاده می شود. بدین منظور ژنهای خاصی رهگیری و تعیین مقدار می شوند. بدلیل حساسیت بالای PCR، می توان بلافاصله پس از عفونت و قبل از ظهور بیماری، وجود میکروارگانیسمها را بررسی و اقدامات درمانی را آغاز کرد [۱۴].

لذا این تحقیق با هدف تعیین ارزش تشخیصی PCR در تشخیص عفونت گروه ب استرپتوکوک در نوزادان مبتلا به سپسیس انجام شد.

روش کار

این مطالعه یک بررسی بالینی، مقطعی و همگروهی می باشد. از آنجا که بر حسب مطالعات گذشته نگر فراوانی عفونت گروه ب استرپتوکوک در شیرخواران دارای علائم کلینیکی سپسیس حدود ۰/۳۵ درصد گزارش شده، تعداد ۹۶ نمونه برای این مطالعه تعیین و به همین دلیل ۱۰۰ شیرخوار کمتر از ۳ ماه دارای دو گروه از علائم کلینیکی بالینی مطرح کننده سپسیس در فاصله خرداد ۱۳۸۸ تا خرداد ۱۳۸۹ (در NICU نوزادان بیمارستان قائم عج مشهد) وارد مطالعه شدند: ۱- ناپایداری درجه حرارت به صورت هیپوترمی کمتر از ۳۶/۵ درجه سانتیگراد یا بالاتر از ۳۷/۸درجه سانتیگراد که به صورت ثابت باقی بماند.۲- مشکلات تنفسی به صورت گرانتینگ-رتراکسیون بین

دنده ای، تاکی پنه، سیانوز آپنه بیشتر از ^{sec} ۲۰ یا بیشتر از ^{sec} ۱۰ همراه با برادی کاردی یا تغییر تون عضلات.۳- مشکلات قلبی عروقی شامل تاکی کاردی بیشتر از ۱۷۰ یا برادی کاردی.۴- طولانی شدن زمان بازگشت وریدی بیشتر از ۳ثانیه.۵- کاهش فشار خون که به صورت کاهش فشار سیستولیک کمتر از ^{mmHg} ۴۰ که برای جبران آن احتیاج به سرم یا داروی وازوپرسور می باشد.۶- علائم عصبی شامل بی قراری، تشنج، خواب آلودگی یا کاهش رفلکس ها.۷- علائم گوارشی شامل دیستاسیون شکم، عدم تحمل تغذیه یا هپاتومگالی [۱۵].

کلیه شیرخواران مبتلا به آنومالی های مادرزادی نظیر بیماریهای سیانوتیک قلبی، نقایص لوله عصبی مثل میلومننگوسل آنانسفالی و غیره، آنومالی های دستگاه گوارش مثل فتق دیافراگماتیک، آنومالی های کلیه و مجاری ادراری مثل آژنزی کلیه و غیره از مطالعه کنار گذاشته شدند. همچنین تمامی موارد سپسیس بیمارستانی (ایجاد علائم سپسیس پس از ۴۸ ساعت از بستری) از مطالعه حذف شدند [۱۵].

پس از کسب رضایت کتبی از والدین بیماران مورد مطالعه، 2cc خون برای محیط کشت معمولی و ارتقایافته و ۰/۵cc خون برای PCR گرفته شد. در بیولوژی مولکولی، واکنش زنجیره ای پلی مراز یا PCR، بمنظور تکثیر یک قطعه DNA مورد استفاده قرار می گیرد.

پس از اضافه کردن خون، محیط کشت به آزمایشگاه منتقل شده و برای رشد و شناسایی باکتری مورد نظر در انکوباتور در دمای ۳۷درجه سانتی گراد قرار داده شد.محیط های کشت بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت از نظر رشد گروه ب استرپتوکوک بررسی شد. در صورتی که شواهدی مبنی بر رشد گروه ب استرپتوکوک دیده می شد با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی مناسب حضور باکتری مورد نظر تایید شد. در تمام این مراحل برای استاندارد سازی و اطمینان از کیفیت آزمایش اصول (standard operating procedure document) مد نظر قرار گرفته است. cc ۱ نمونه خون دیگر را در یخچال نگهداری و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه فریز شد. در زمان آزمایش نمونه ها برای یافتن گروه ب استرپتوکوک تحت PCR قرار گرفته و ابتدا برای استخراج DNA باکتری توسط Genef bio تحت DNA extraction قرار گرفته و برای یافتن DNA گروه ب استرپتوکوک توسط یک جفت پرایمر اختصاصی DNA Amplification انجام شد و سپس حضور اسید نوکلئیک باکتری مورد نظر توسط الکتروفروزیس ارزیابی گردید تا گروه ب استرپتوکوک شناسایی شود. برای انجام عمل PCR و تشخیص گروه ب استرپتوکوک ابتدا هرگونه DNA موجود در نمونه خون را به وسیله کیت Prime Prep TM جدا نموده و سپس با آزمایشهای تشخیصی مناسب گروه ب استرپتوکوک شناسایی می گردد. مراحل PCR شامل مراحل ذیل می باشد:

۱- **مرحله شروع** (Initialization step): به مدت ۱ تا ۹ دقیقه دمای محلول به ۹۴ تا ۹۶ درجه (یا ۹۸ درجه اگر پلیمرازها کاملا به حرارت مقاوم باشند) رسانیده می شود.

۲- **مرحله واسرشت** (Denaturation step): این مرحله اولین قسمت از سیکل های حرارتی منظم است و شامل حرارت دادن محلول به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ تا ۹۸ درجه است. در این مرحله بعلت گسستن پیوندهای هیدروژنی (بین نوکلئوتیدها)، DNAی الگو و پرایمرها از هم جدا می شوند و تک رشته های DNA حاصل می گردد.

۳- **مرحله اتصال** (Annealing step): دمای محلول به مدت ۲۰ تا ۴۰ ثانیه به ۵۰ تا ۶۵ درجه کاهش می یابد. در این مرحله پرایمرها به تک رشتهای DNAی الگو متصل می شوند. بطور طبیعی، دمای اتصال (Annealing temperature) در حدود ۳ الی ۵ درجه پائین تر از نقطه ذوب پرایمرها است. آنزیم پلیمراز پس از اتصال به هیبرید پرایمر-الگو، همانند سازی DNA را آغاز می کند.

۴- **مرحله طویل شدن** (Extension/elongation step): دمای محلول در این مرحله باید متناسب با نوع DNA پلیمراز مورد استفاده باشد. دمای اپتیمم برای آنزیم Taq polymerase حدود ۷۵ الی ۸۰ درجه است که معمولا دمای ۷۲ درجه انتخاب می شود. در این مرحله آنزیم DNA پلیمراز با استفاده از dNTP های موجود در محلول، یک رشته DNAی جدید را در جهت ´۵ به ´۳ و در مقابل رشته های الگو می سازد.

۵- مرحله طویل شدن نهایی (Final elongation): این مرحله، پس از آخرین سیکل PCR، به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ الی ۷۴ درجه انجام میشود، تا اطمینان حاصل شود که همه تک رشته های DNA همانند سازی شده اند.

۶- نگهداری نهایی (Final hold): در این مرحله، محلول نهایی به مدت کوتاهی در دمای ۴ الی ۱۵ درجه قابل نگهداری است.

۷- **الکتروفورز در ژل آگارز**: نهایتا می توان محصولات PCR را بر روی ژل آگارز و همراه با مارکر وزن مولکولی(DNA lader که حاوی قطعات DNA با اندازه های مشجص است) الکتروفورز نمود، تا صحت انجام PCR بررسی شود.

آنالیز داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ و با استفاده از آزمونهای آماری توصیفی-تحلیلی (کای دو-همبستگی) مناسب انجام شد. P.V کمتر از ۰/۰۵معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

در این مطالعه ۱۰۰ شیرخوار ۱ روزه تا ۹۰ روزه به علت علائم کلینیکی سپسیس در بیمارستان قائم عج مشهد بستری شده بودند از خرداد ۱۳۸۸ تا خرداد ۱۳۸۹ وارد مطالعه شدند. از شیرخواران cc ۰/۵ خون برای کشت خون معمولی و cc ۰/۵خون برای کشت خون ارتقا یافته از نظر محیط کشت تهیه شد و cc ۰/۵ خون برای PCR کنارگذاشته شد تا از نظر عفونت گروه ب استرپتوکوک بررسی گردد. یافته ها نشان داد از ۱۰۰ شیرخوار مورد بررسی ۵۵ مورد به طریق سزارین متولد شده و ۴۱ مورد به روش زایمان طبیعی و ۴ شیرخوار هم از پرورشگاه ارجاع شده بودند. تمام موارد سزارین و ۹ نفر از مادران که زایمان طبیعی داشته اند سابقه مصرف انتی بیوتیک اخیر را ذکر کردند. ۹ مورد از این نوزادان فوت شدند که در ۵ مورد کشت معمولی و ارتقا یافته مثبت داشته اند و در ۶ مورد کشت معمولی و ارتقا یافته منفی بوده است.

یافته ها نشان داد نتیجه کشت معمولی در شیرخواران شامل ۲ مورد کلبسیلا، ۱ مورد انتروباکتر و ۲ مورد ایکولای بود. نوع عفونت رشد یافته در محیط ارتقا یافته شامل ۲ مورد کلبسیلا، ۱ مورد انتروباکتر و ۲ مورد ایکولای و ۱ مورد استرپتوکوک آلفاهمولیتیک بود. ۳ مورد از نوزادان دارای نتیجه PCR مثبت برای گروه ب استرپتوکوک بودند که هر ۳ حاصل زایمان دوم بوده و مادران آنها انتی بیوتیک نگرفته و در مورد اول سابقه پارگی کیسه آب ۱۵ ساعته و در دو مورد دیگر سابقه پارگی کیسه آب را نشان ندادند (جدول ۱).

یافته ها همچنین نشان داد ۱۲ درصد از شیرخواران دارای پلاکت کمتر از صدهزار بوده و ۲۳ درصد دارای گلبول سفید بالای ۱۸۰۰۰ بوده اند. در ABG بیماران ۶۳ مورد اسیدوز تنفسی همراه با PCO2 بیشتر از ۶۰ و ۲۱ مورد اسیدوز متابولیک همراه با HCO3 کمتر از ۱۵ داشته اند.

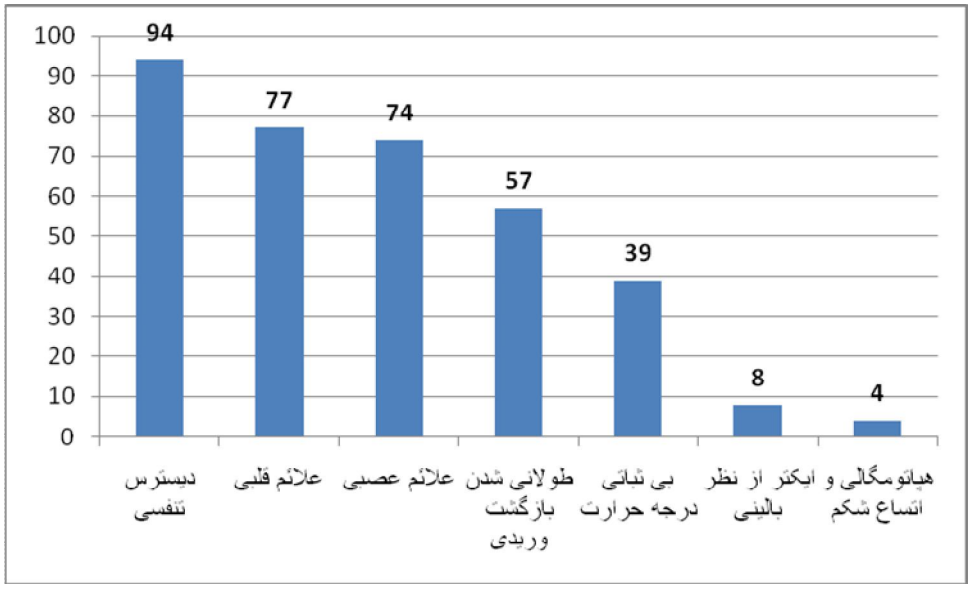
جدول۱: توزیع فراوانی نتایج PCR مثبت برای استرپتوکوک گروه B در شیرخواران بستری در NICU

متغیر جنسیت	وضعیت زایمان	وزن هنگام تولد(گرم)	زمان بستری شدن در NICU	علائم نوزاد	نتیجه PCR	مصرف آنتی بیوتیک توسط مادر
پسر	ترم	۳۵۵۰	روز سوم تولد	خوب شیر نخوردن-کاهش رفلکس های نوزادی	+	-
دختر	نارس(۳۵هفته)	۱۵۰۰	روز اول تولد	کاهش رفلکس های نوزادی- گرانتینگ	+	-
دختر	نارس(۳۵هفته)	۱۲۰۰	روز اول تولد	کاهش رفلکس های نوزادی- گرانتینگ-سیانوز اطراف دهان	+	-

جدول۲: توزیع فراوانی شکایت مادران شیرخواران بستری در NICU

علائم یا شکایت	+	-	نامشخص
سابقه پارگی کیسه آب حاملگی بیشتر از ۱۸ساعت	۱۶	۸۰	۴
وجود تب بیشتر از ۳۸درجه سانتیگراد در مادر	۴	۹۲	۴
مصرف آنتی بیوتیک قبل از زایمان در مادر	۶۴	۳۲	۴
سابقه مرده زایی یا سقط در مادر	۲۲	۷۴	۴

نمودار۱: توزیع فراوانی تظاهرات علائم بالینی در نوزادان بستری در NICU



یافته ها نشان داد ۱۹ نفر از شیرخواران بستری وزن موقع تولدشان کمتر از ۱۵۰۰ گرم، ۳۵ نفر بین ۱۵۰۰ تا ۲۵۰۰ گرم و ۴۲ نفر هم وزن بالای ۲۵۰۰ گرم داشتند. نمره آپگار موقع تولد در ۴ نفر کمتر از ۵ ، ۱۶ نفر بین ۵ تا ۷ و ۷۸ نفر نیز بالای ۸ بوده است. تظاهرات علائم بالینی در شیرخواران بستری کمتر از ۳ ماه مطابق (نمودار۱) می باشد. عوامل خطر در مادران شیرخواران بستری در جدول ۲ آمده است.

بحث

با توجه به بررسیهای انجام شده این اولین مطالعه در ایران است که برای شناسایی گروه ب استرپتوکوک در سپسیس نوزادان و شیرخواران کم سن از روش مولکولیPCR استفاده شده است و نتایج نشان داد که نمونه خون ۳ بیمار از ۱۰۰ شیرخوار زیر ۳ ماه مبتلا به سپسیس با روش PCR از نظر گروه ب استرپتوکوک مثبت شد. در سایر کشورها شناسایی گروه ب استرپتوکوک به طور عمده بر اساس کشت باکتری است و روش های مولکولی در تعداد اندکی از مطالعات برای شناسایی این باکتری استفاده شده است [۱۹-۱۶].

در مطالعات کنگ و جردن از روش PCR مولتی پلکس برای شناسایی سروتیپ های گروه ب استرپتوکوک استفاده شد. نتایج حاکی از همخوانی بالای گروه ب استرپتوکوک جدا شده از محیط کشت و PCR بود [۱۷-۱۶]. در مطالعه ما نتایج کشت و PCR گروه ب استرپتوکوک همخوانی بالایی داشت (۹۷درصد) و روش PCR تنها باعث شناسایی ۳ مورد گروه ب استرپتوکوک گردید. این نتایج با یافته های جردن هماهنگ می باشد [۱۷].

در مطالعه گلدن که در مورد حساسیت و ویژگی Real-time PCR انجام شد، حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد بدست آمد و تمامی ۲۶ باکتری غیر گروه ب استرپتوکوک، PCR منفی داشتند [۱۸]. این نتایج تقریبا با یافته های ما در این بررسی هماهنگ می باشد و تمامی ۱۱باکتری غیر گروه ب استرپتوکوک، PCR منفی داشتند.

نتایج کشت در مطالعه ما با استفاده از محیط کشت ارتقا یافته شامل ۲ مورد کلبسیلا، ۲ مورد اشراشیاکولی، ۱ مورد انتروباکتر و ۱ مورد استرپتوکوک آلفاهمولتیک بود و هیچ مورد از گروه ب استرپتوکوک بدست نیامد. بر اساس نتایج کشت باکتریایی در مطالعه ما باکتری های گرم منفی ۸۳ درصد موارد مثبت را تشکیل می دادند که با یافته های مصیبی همخوانی دارد [۱۳]. یافته های موحدیان نشان داد که بر خلاف مطالعه ما ارگانیزم های گرم مثبت اکثریت کشت های مثبت را تشکیل می دادند [۲۰]. در خصوص پاسخ به این سوال که چرا در مطالعه ما کشت های انجام شده برای استرپتوکوک گروه ب منفی شده موارد ذیل مطرح است: استفاده زیاد مادر از آنتی بیوتیک در مادر حامله و استفاده از رژیم غذایی حاوی مواد آنتی بیوتیکی به خصوص ماه آخر حاملگی جلوی رشد استرپتوکوک گروه ب را می گیرد. رشد سایر پاتوژن ها نیز می تواند جلوی رشد استرپتوکوک گروه ب را بگیرد. عدم استفاده از سیستم های پیشرفته کشت خون نظیر Bactec حاوی رزین های جاذب آنتی بیوتیک نیز می تواند جزو این علل مورد بررسی قرار گیرد.

در مطالعه سرافرازی [۱۱] و جهرمی [۲۱] کشت مثبت گروه ب استرپتوکوک از مادران کشت مثبت واژینال گزارش شده و در مطالعه سرافرازی تنها ۲ مورد و در مطالعه جهرمی حدود ۶۰ درصد نوزادان این مادران دارای کشت خون گروه ب استرپتوکوک مثبت بوده و فقط ۱ نفر از نوزادان به سپسیس گروه ب استرپتوکوک مبتلا شده اند. در مطالعه موحدیان هیچ موردی از عفونت با گروه ب استرپتوکوک گزارش نگردید. در این مطالعه ۱۸۰ نوزاد بستری با تشخیص سپتی سمی در طی ۲سال مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج نشان داد ۱۱درصد از کشت های خون نوزادان مثبت بوده که شایع ترین ارگانیسم های کشت داده شده شامل استافیلوکوک اپیدرماتیس، استافیلوکوک اورئوس سودومونا و اشرشیاکلی بود [۲۰]. نتایج بررسی ما نیز نشان داد ۳ نفر از نوزادان به سپسیس گروه ب استرپتوکوک مبتلا شده اند.

مطالعه دنگ در چین مشخص نمود از ۲۰۰ نوزاد فوت شده به علت پنومونی، PCR ۵۲ نمونه (۲۶درصد) برای گروه ب استرپتوکوک مثبت بوده است [۲۰]. نتایج مطالعه ما حاکی از مثبت شدن PCR برای ۳درصد از شیرخواران مبتلا به سپسیس بود. نتایج مطالعات زمانزاد[۱۰]، سرافرازی[۱۱]، جهرمی[۲۱] و ربیعی[۱۲] نشان می

دهند زنان باردار در کشور ما با گروه ب استرپتوکوک کلونیزه هستند. نتایج بررسی ما حاکی از مصرف آنتی بیوتیک در ۶۴ درصد مادران شیرخواران بستری در NICU بود که می تواند به دلیل وجود عفونت در این مادران باشد.مطالعات مختلف نشان می دهند در کشورهای دیگر گروه ب استرپتوکوک گروه ب جزو علل مهم سپسیس نوزادی می باشد[۴].

مطالعه حاضر نشان داد که تظاهرات علائم بالینی در شیرخواران بستری به ترتیب شیوع شامل علائم تنفسی، علائم قلبی و علائم عصبی بوده که با یافته های اندرسون [۲۲] همخوانی دارد.

نتیجه گیری و پیشنهادات

عفونت استرپتوکوک گروه ب در شیرخواران بستری وجود داشت، اما محیط کشت معمولی و ارتقایافته نتوانستند وجود استرپتوکوک گروه ب را تشخیص دهند. اما باروش مولکولی PCR استرپتوکوک گروه ب مشخص گردید. لذا با توجه به نامساعد بودن محیط های کشت، نیاز به ارتقا و تقویت محیط کشت احساس شده و حساسیت روش PCR برای تشخیص عفونت استرپتوکوک گروه ب تایید گردید. حجم کم نمونه پژوهش و نیز محدودیت مکانی از محدودیت های این بررسی بود. مطالعات بیشتر با تعداد نمونه بیشتر در مراکز مختلف می تواند انسیدانس واقعی عفونت استرپتوکوک گروه ب را در کشور مشخص و حساسیت روش PCR و محیط های کشت را مشخص نماید.

تشکر و قدردانی

از کلیه پرسنل و پزشکان محترم در بخش NICU و آزمایشگاه در بیمارستان قائم (عج) که صمیمانه ما را در انجام این بررسی یاری نمودند کمال تشکر و امتنان را داریم. این مقاله حاصل پایان نامه با شماره (۲۳۱۷-ت) دکتر محمدرضا لطفی جهت اخذ درجه دکترای تخصصی در رشته اطفال می باشد.

References

1. Tiskumara R, Fakharee SH, Liu CQ, Nuntnarumit P, Lui KM, Hammoud M, et al. Neonatal infections in Asia. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2009 Mar;94(2):F144-8. Epub 2008 Sep 19.

2.Infection in newborn babies availabe at: http://www.about kids health.ca/Pregnancy/Infection-in-Newborn-Babies.aspx/ article ID=7680&category ID=PG-nh4-10g. Accessed Apr 18,2010.

3. Daley AJ, Isaacs D. Ten-year study on the effect of intrapartum antibiotic prophylaxis on early onset group B streptococcal and Escherichia coli neonatal sepsis in Australasia. Pediatr Infect Dis J. 2004 Jul;23(7):630-4.

4.Trends in perinatal group B streptococcal disease. 2009.MMWR.Available at: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5805a2.htm. Accessed Jul25,2010.

5. Shet A, Ferrieri P. Neonatal and maternal group B streptococcal infections: a copprehensive review. Indian J Med Res 2004;141-150.

6. Elsaid MF, Flamerzi AA, Bessisso MS, Elshafie SS. Acute bacterial meningitis in Qatar. Saudi Med J. 2006 Feb;27(2):198-204.

7. Trotman H, Bell Y. Neonatal group B streptococcal infection at the University Hospital of the West Indies, Jamaica: a 10-year experience.Ann Trop Paediatr. 2006 Mar;26(1):53-7.

8. Robinson TD, Kumar p,Cadichon BS.Sepsis in the emergency department.CPEM 2008;9:160-8.

9. Namavar Jahromi B, Poorarian S, Poorbarfehee S. The prevalence and adverse effects of group B streptococcal colonization during pregnancy. Arch Iran Med. 2008 Nov;11(6):654-7.

10.Zamanzad B. Prevalence of vaginal strep B carrier in pregnant women attending the hospital's maternity ward Shahre cord city. Journal of Shaeed Sdoughi University of Medical Sciences Yazd 2002,Jun;10(3):27-31.

11. Sarafrazi N, Mesdaghi nia E,Moniri R,Mosavi GA. Prevalence of group B beta-hemolytic Streptococcus of vaginal flora in pregnancy and its relation to early neonatal infections and infections during pregnancy.Feyz 2001Feb;4(18):22-27.

12.Rabiee S, Arab M, Yousefi Mashouf R. Epidemiologic Pattern of Vaginal colonization by group B streptococcus in pregnant women in Hamadan, central west of Iran. Iran J Med Sci 2006Jun;31(2): 106-108.

13.Mosayebi Z, Movahedian AH, Moniri R. Profile of bacterial sepsis in neonates from

Kashan in Iran. J Infect Dis Antimicrob Agents 2003;20:97-102.
14.Kasper DC, Altiok I, Mechtler TP, Böhm J, Straub J, Langgartner M, Pollak A, Herkner KR, Berger A.Molecular detection of late-onset neonatal sepsis in premature infants using small blood volumes: proof-of-concept. Neonatology. 2013;103(4):268-73. doi: 10.1159/000346365. Epub 2013 Mar 12.
15.Gharebaghi MM, Maamuri GA,Peirovifar A,Boskabadi H,Afshari JT. Immediate diognosis of early onset in premature newborns by measurment of cold C-Reactive protein and interlukin-6.IJMS 2007;132:217-221.
16. Kong F, Ma L, Gilbert GL. Simultaneous detection and serotype identification of Streptococcus agalactiae using multiplex PCR and reverse line blot hybridization. J Med Microbiol. 2005 Dec;54(Pt 12):1133-8.
17.Jordan JA, Durso MB. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detecting Bacterial DNA Directly from Blood of Neonates Being Evaluated for Sepsis. J Mol Diagn. 2005 November; 7(5): 575–581
18. Golden SM, Stamilio DM, Faux BM, dela Cruz WP, Shoemaker CT, Blackmon CL,et al. Evaluation of a real-time fluorescent PCR assay for rapid detection of Group B Streptococci in neonatal blood. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004 Sep;50(1):7-13.
19. Deng JH, Yao KH, Hu HL, Yu SJ, Gao W, Fu LB,et al. Detection of group B streptococcus in the cases died of neonatal pneumonia. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2006 Nov;44(11):850-4.
20.Movahedian AH, Moniri R, Mosayebi Z. Bacterial culture of neonatal sepsis. Iranian J Publ Health 2006;35:84-89.
21.Jahromi BN, Poorarian S, Poorbarfehee S. The Prevalence and adverse effects of group B streptococal colonization during pregnancy. Arch Iranian Med 2008;11:654-657.
22. Andersen J, Christensen R, Hertel J. Clinical features and epidemiology of septicaemia and meningitis in neonates due to Streptococcus agalactiae in Copenhagen County, Denmark: a 10 year survey from 1992 to 2001. Acta Paediatr. 2004 Oct;93(10):1334-9.

Original Article

Diagnostic value of PCR for detection of infection group B streptococcal in neonates with sepsis

*Aelami MH[1], Maamouri Gh[2], Lotfi MR[1], Khakshour A[3], Ghazvini K[4], saeidi R[1], Saeidi M [1]**

[1] Associate Professor of Pediatrics, Neonatal research center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
[2] Professor of Pediatrics, Neonatal research center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
[3] Associate Professor of Pediatrics, Faculty of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran.
[4] Associate Professor of Microbiology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

***Corresponding Author :**, Students Research Committee ,Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Email: Masumeh_saeedi@yahoo.com

Abstract

Backgrouynd & Objectives: *Group B streptococcus is the main reason of neonatal infection in developed countries. Its rate of outbreak has not been determined in Iran. This study aimed to determine diagnostic value of PCR for detection of group B streptococcal infection in neonates with sepsis.*

Material & Methods: *In the present study, 100 below three months infants with sepsis hospitalized in NICU and ICU division of Ghaem hospital were studied for one year. After getting consent from the infants' parents, three blood samples of the patients in the sterile container with lid were transferred to the laboratory (two samples for culturing in normal environment and the other for PRC). Data were analyzed by SPSS (version 11.5) and presented with descriptive and analytical test (Chi-square and correlation)*

Results: *PCR method was positive in 3% of infants for detection of group B streptococcal. Other germs grew in 5% (two Klbsya,one Enterobacter and two E.coli)of normal culture and 6% (two Klbsya,one Enterobacter , two E.coli and one Alpha hemolytic) of developed culture and in none of cultures group B streptococcal did not grow .Findings also showed that 64 % of mothers took antibiotic before delivery.*

Conclusions*: Regarding to the high rate of anti-biotic consumption by mothers before delivery, it is necessary to use more sensitive methods such as PCR to identify the group B Streptococcus . it is also recommend to strengthen and promote the culture media*

Keywords: *Sepsis; Infants; Group B Streptococcus; PCR (Polymeras Chain Readins)*

Submitted:17 July 2013
Revised:9 Oct 2013
Accepted: 7 Dec 2013