مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره‌های ۱و۲، بهار و تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۱۶-۹

بررسی مولکولی PBP2b در ایزوله‌های بالینی*استرپتوکوکوس پنمونیه*

مهوش اسکویی[۱*]، سامان نوبری[۱]، فاطمه رحمتی قزلجه[۱]، بهاره شقاقی[۱]، نور امیر مظفری[۲]

۱) بخش میکرب شناسی، انستیتو پاستور ایران
۲) گروه میکرب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
نویسنده رابط: مهوش اسکویی، بخش میکرب شناسی، انستیتو پاستور ایران
تلفن: ۶۶۴۰۵۵۳۵-۰۲۱ **oskoui1@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۹/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله:۸۹/۶/۱

چکیده:

زمینه و اهداف: *استرپتوکوکوس پنمونیه* از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده پنمونی، منتژیت، سینوزیت و اوتیت میانی است. مقاومت این باکتری به بتالاکتام‌ها وابسته به تغییر در پروتئین‌های متصل شونده به پنی سیلین (Penicilin binding protein; PBP) است. هدف از این مطالعه تعیین میزان شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های پنموککی در ایزوله‌های جمع‌آوری شده از بیماران در تهران و تغییرات صورت گرفته در *PBP2b* بود.

روش بررسی: ۵۴ ایزوله‌ی بالینی *استرپتوکوکوس پنمونیه*(از ۱۳۷۹ الی ۱۳۸۷) از مراکز درمانی مختلف در تهران (از جمله بیمارستان‌های امام خمینی، حضرت رسول اکرم(ص)، سینا، شهدای تجریش، حضرت علی‌اصغر(ع)، مرکز طبی کودکان و آزمایشگاه بهار) جمع‌آوری شد و با آزمایش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت گردید. تست حساسیت به سفوتاکسیم، اریترومایسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین، آمپی‌سیلین، ونکومایسین و تری-متوپریم سولفامتوکسازول به روش انتشار از دیسک انجام گرفت. MIC برای پنی سیلین به روش broth microdilution تعیین شد. ژن *pbp2b* از طریق PCR تکثیر و تعیین توالی گردید.

یافته‌ها: از ۵۴ ایزوله، ۲۴ ایزوله(۴۴/۴٪) مقاومت حدواسط به پنی سیلین و ۱۴ ایزوله(۲۵/۹٪) مقاوم به پنی‌سیلین بودند. ۲ ایزوله(۳/۷٪) به سفوتاکسیم، ۹ ایزوله(۱۶/۶٪) به اریترومایسین، ۱۰ ایزوله(۱۸/۵۱٪) به تتراسایکلین، ۲۸ ایزوله(۵۱/۹٪) به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول مقاوم بودند. ۹ ایزوله(۱۶/۶٪) مقاومت چندگانه داشتند. تمام ایزوله‌های مقاوم به پنی-سیلین واغلب ایزوله‌ها با مقاومت حد واسط دارای موتاسیون در نواحی کاتالیتیکی pbp2b بودند.

نتیجه گیری: نتایج بیانگر شیوع سویه‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به پنی‌سیلین است. سویه‌های دارای مقاومت چندگانه، نشان دهنده بحران در درمان عفونت‌های پنموککی است. تغییرات در توالی اسید آمینهPBP2b عمدتا" با کاهش حساسیت به پنی‌سیلین همخوانی نشان داد.نتایج نشان می‌دهد که حساسیت یا مقاومت *این باکتری* به پنی‌سیلین می‌تواند با تعیین تغییرات صورت گرفته در ژنpbp2b ارزیابی شود.

کلید واژه‌ها: *استرپتوکوکوس پنمونیه*، مقاومت به پنی‌سیلین، مقاومت چندگانه، PBP2b

مقدمه:

استرپتوکوکوس پنمونیه همچنان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماریزای باکتریایی محسوب می‌شود که از علل اصلی عفونت‌ها نظیر پنمونی، منتژیت، سینوزیت و اوتیت میانی، به ویژه در میان کودکان و افراد سالخورده است(۱) از طرفی اغلب عفونت‌های پنموککی به‌ویژه پنمونی پنموککی در هنگام بروز اپیدمی‌های ویروسی، از جمله انفلوآنزا، به سرعت در میان مبتلایان به بیماری ویروسی گسترش می یابد و روند درمان را با مشکلات جدی مواجه می‌سازد. مقاومت به پنی‌سیلین در میان پنموککها اولین بار در دهه ۱۹۶۰ گزارش شد. در آن سال‌ها MIC سویه‌های مقاوم به پنی-سیلین ۰/۱ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و نگرانی عمده‌ای در مورد مقاومت به پنی‌سیلین تا زمانی که سویه‌هایی با MIC≥۱µg/ml و نیز سویه‌هایی با مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی، از آفریقای جنوبی در اواخر دهه ۱۹۷۰ و از اسپانیا در اوایل دهه ۱۹۸۰ گزارش شد، وجود نداشت(۲). در دهه ۱۹۹۰ سویه‌های مقاوم به پنی سیلین باMIC بالاتر از ۰/۱µg/ml تقریبا" در همه کشورها دیده شد. در سال‌های اخیر شیوع سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین در برخی کشورهای اروپایی بیش از ۵۰٪گزارش شده‌است(۳). در کشورهای آسیایی این میزان حدود ۷۰٪ گزارش شد(٤). در آمریکا بیش از ۳۰٪ایزوله ها مقاوم به پنی‌سیلین بوده‌اند (۵). در سال ۱۳۸۳ در مطالعات صورت گرفته در ایران بیش از ۳۰٪سویه‌های پنموکک جدا شده از بیماران عدم حساسیت به پنی‌سیلین را نشان دادند(٦).

مکانیسم اصلی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در *استرپتوکوکوس پنمونیه* مربوط به تغییر در پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (Penicillin binding protein: PBP) است. *استرپتوکوکوس پنمونیه* دارای شش PBP می باشد که از میان آنها تغییرات در PBP1a,PBP2b,PBP2x در ایجاد مقاومت به بتالاکتام‌ها موثرتر تلقی شده‌است(۷). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که تغییر در PBP2b شاخص اصلی مقاومت به پنی سیلین است. این در حالی است که از تغییرات در PBP2x به عنوان شاخص مقاومت به سفالوسپورین‌ها ذکر می‌شود(۸). تغییرات در PBP2b میل ترکیبی آن را نسبت به پنی‌سیلین به شدت کاهش می‌دهد در حالی که بر روی میل ترکیبی آن به سفالوسپورین‌ها تاثیر چندانی ندارد(۹). از این رو، بررسی تغییرات PBP2b در سویه‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به پنی سیلین ضروری است.

اگرچه شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ظهور PBP-های تغییر یافته ناشی از تبادلات نوترکیبی با گروه *استرپتوکوکوس* ویریدانس است، اما ردیابی رویدادهایی که رخ داده تا مقاومت به پنی‌سیلین در پنموکک گسترش یابد، بسیار پیچیده می باشد. به هر حال، واضح است که تبادلات نوترکیبی بین گونه‌ای و نیز موتاسیون‌ها در ژن‌های کدکننده PBPها هردو در ایجادPBPهایی با میل ترکیبی کم به بتالاکتام‌ها دخیل می باشد(۱۰).

در این مطالعه میزان شیوع مقاومت به پنی‌سیلین و برخی دیگر از آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های پنموککی در ایزوله‌های جمع‌آوری شده از بیماران درتهران تعیین شد و تغییرات صورت گرفته درPBP2b به عنوان شاخص اصلی مقاومت به پنی‌سیلین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

۱- سویه های باکتریایی: از میان بیش از **۳۰۰** ایزوله بالینی مشکوک به پنموکوک، جمع آوری شده طی سال‌های **۱۳۷۹** الی **۱۳۸۷** از مراکز درمانی مختلف در تهران (از جمله بیمارستان‌های امام خمینی، حضرت رسول اکرم^{ص}، سینا، شهدای تجریش، حضرت علی اصغر^{ع}، مرکز طبی کودکان و آزمایشگاه بهار)، ٥٤ ایزوله پس از آزمایش‌های تعیین هویت به عنوان *استرپتوکوکوس پنمونیه* شناسایی شدند. جهت تعیین هویت ایزوله‌ها، ابتدا ایزوله‌ها بر روی محیط آگار خوندار حاوی۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند و در دمای۳۷°C و۵٪CO_2 به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. کلنی‌های کوچک، براق و آلفا همولیتیک شناسایی شدند. جهت تعیین حساسیت به اپتوچین از دیسک اپتوچین(16mm, HiMedia Laboratoris Pvt. Ltd) استفاده شد. هاله عدم رشد بیش از ١٤mm در اطراف دیسک به عنوان حساس به اپتوچین منظور شد. تست حلالیت در صفرا با استفاده از نمک دزوکسی‌کولات سدیم انجام شد. سوسپانسیون حاوی *استرپتوکوکوس پنمونیه* در مجاورت آن پس از تقریبا" ۳۰ دقیقه شفاف شد. در کلیه

آزمایش‌های تشخیصی از سویه *استرپتوکوکوس پنمونیه* ATCC 49619 به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

۲-آنتی‌بیوگرام: آزمایش آنتی بیوگرام با روش Kirby Bauer انجام شد. برای این منظور از دیسک‌های اگزاسیلین استفاده شد (از این دیسک جهت تعیین حساسیت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به پنی‌سیلین استفاده می‌شود.(۱۱))، اریترومایسین، تتراسایکلین، سفوتاکسیم، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، ونکومایسین و آمپی‌سیلین که همگی از شرکت MAST انگلستان تهیه شده بودند، استفاده شد. در این روش، سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولرهینتون آگار حاوی ۵٪خون گوسفند تلقیح گردید. پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷°C و در حضور ۵٪CO_2 قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و با جداول ارائه شده توسط CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) مقایسه گردید (۱۲). از سویه *استرپتوکوکوس پنومونیه* ATCC 49619 به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

۳- تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC)

برای تمام ایزوله‌ها آزمایشMIC جهت تعیین حساسیت به پنی‌سیلینبر اساس CLSI و به روش microdilutionbroth انجام شد. از سویه *استرپتوکوکوس پنمونیه* ATCC 49619(MIC,۰/۱µg/ml) به عنوان شاهد استفاده شد.

٤- استخراج DNA کروموزومی

DNA باکتریایی پس از کشت خالص یک روزه، با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNAMetabion miniprep طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص گردید.DNA استخراج شده در ۲۰۰-۵۰ میکرولیتر محلول Tris-EDTA حاوی RNase و در C° ۲۰- نگهداری شد.

۵- آزمایش PCR

DNA تخلیص شده به‌عنوان الگو درواکنش PCR استفاده شد. کلیه مواد مورد استفاده درآزمایش PCR از شرکت GenetBio تهیه گردید و جهت PCR از دستگاه ترموسایکلر Eppendorf استفاده شد. برای تکثیر ژن pbp2b*استرپتوکوکوس پنمونیه* از جفت پرایمر pbp2b- F: 5´-GATCCTCTAAATGATTCTCAGGTGGG- 3´ و pbp2b-R:5´-CAATTAGCTTAGCAATAGGTGTTGG - 3´ استفاده شد. ترکیبات مخلوط واکنش (25µl) عبارتند بود از: 2.5µl PCR Buffer (10x)، 1 µl$MgCl_2$ (50mM)، 0.4µl dNTPs(1.2mM)، 0.5µl (100pm/µl) Forward primer، 0.5µl (100pm/µl) Reverse primer، 0.1µl (5U/µl) Taq DNA polymerase، 0.8µl Template DNA، 19.2µl Dd water.. بعد از انکوباسیون ابتدایی در C° 94 به مدت 7 دقیقه مخلوط واکنش در 35دور در C° 94 به مدت 2 دقیقه، 50°C به مدت1 دقیقه، 72°C به مدت 2 دقیقه و در نهایت در 72°C به مدت 7 دقیقه تکثیر گردید. جهت الکتروفورز محصول PCR ، از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. جهت تعیین سایز محصول از مارکر ۳۰۰۰bp تهیه شده از شرکت Fermentas استفاده شد. سایز محصول PCR ژن pbp2b ، ۱۵۰۰bp بود(۱۳).

٦- تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing)

پس از تکثیر ژن 2b از طریق PCR، محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت Macrogene Research در کشورکره فرستاده شد. عملیات Sequencing با استفاده از ABI Capillary System انجام گرفت. محصولات PCR در هر دو جهت تعیین توالی شدند.

۷- آنالیز توالی‌هایpbp2b

توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای pbp2b به‌دست آمده با استفاده از نرم افزارهای MEGA4, Chromas آنالیز شدند و با یکدیگرو با توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ایpbp2b سویه *استرپتوکوکوس پنمونیه* استاندارد حساس به پنی سیلینR6 (Gene Bank Accession Number X1622) مقایسه شدند (١٤).

یافته‌ها:

از مجموع بیش از ۳۰۰ ایزوله جمع آوری شده، پس از آزمایش‌های تعیین هویت، ٥٤ ایزوله به‌عنوان *استرپتوکوکوس پنمونیه شناسایی شدند*. ٤٦ ایزوله (۸۵/۲٪) با هاله عدم رشد بزرگتر از ١٤ میلی متر حساس به اپتوچین بودند. هاله عدم رشد در ۸ ایزوله(١٤/٨٪) کمتر از ١٤ میلی متر بود. این ایزوله‌های مشکوک پس از آزمایش حلالیت در صفرا و اثبات محلول بودن در صفرا هویت‌شان به‌عنوان پنموکک اثبات گردید. تمام ٥٤ایزوله(۱۰۰٪) پس از انجام آزمایش حلالیت در صفرا، محلول در صفرا بودند. در آزمایش آنتی-بیوگرام با دیسک اگزاسیلین، هاله عدم رشد ۱۲ ایزوله(۲۲/۲٪) بزرگتر از ۲۰میلی‌متر بود که به‌عنوان حساس به پنی‌سیلین شناسایی شدند. ٤۲ایزوله (۷۷/۸٪) با هاله عدم

رشد کمتر از ۲۰میلی‌متر غیر حساس به پنی‌سیلین شناخته شدند. در آزمایش تعیین MIC، ۱۶ایزوله(۲۹/۶٪) با MIC ≤۰/۰۶µg/ml، حساس به پنی‌سیلین (Penicillin (Susceptible *Streptococcus pneumoniae*:PSSP شناسایی شد. ۲٤ ایزوله (٤٤/٤٪) با ۰/۱≤MIC≤۱µg/ml مقاومت حدواسط به پنی‌سیلین داشتند (Penicillin Intermediate Resistant *Streptococcus pneumoniae*:PISP)، و ۱٤ ایزوله (۲۵/۹٪) با MIC≥۲µg/ml مقاوم به پنی سیلین (Penicillin (Resistant *Streptococcus pneumoniae*:PRSP بودند. مقایسه آزمایش‌های آنتی بیوگرام و MIC پنی‌سیلین نشان داد که تعداد ۸ (۱٤/۲٪) ایزوله که در آزمایش آنتی بیوگرام مقاوم محسوب شدند با آزمایش MIC در واقع حساس به پنی سیلین بودند. با این حال تمام ایزوله‌هایی که به دیسک اگزاسیلین حساس بودند پس از آزمایش تعیین MIC نیز در محدوده حساس به پنی‌سیلین قرار داشتند.

هاله عدم رشد ۲ایزوله(۳/۷٪) با دیسک سفوتاکسیم کمتر از ۲۵ میلی‌متر بود که مقاوم به سفوتاکسیم شناخته شدند.

۵۲ (۹٦/۳٪) ایزوله دیگر حساسبه سفوتاکسیم بودند. یک ایزوله (۱/۸٪) دارای مقاومت کامل به هر دو آنتی بیوتیک پنی‌سیلین و سفوتاکسیم بود. ۹ ایزوله(۱٦/٦٪) مقاوم به اریترومایسین و ٤۵ایزوله(۸۳/٤٪) به آن حساس بودند. ۳ (۵/۵٪) ایزوله مقاوم به اریترومایسین، به پنی‌سیلین هم مقاوم بود. ۱۰ ایزوله (۱۸/۵۱٪) مقاوم به تتراسایکلین و ٤٤ ایزوله(۸۱/٤۹٪) به آن حساس بودند. ۳ ایزوله(۳۰٪) مقاوم به تتراسایکلین به پنی‌سیلین نیز مقاوم بودند. ۲۸ ایزوله(۵۱/۹٪) مقاوم به تری‌متوپریم سولفامتوکسازولو ۲٦ ایزوله (٤۸/۱٪) به آن حساس بودند. ۹ ایزوله(۳۲/۲٪) مقاوم به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول دارای مقاومت به پنی‌سیلین نیز بودند. ۱ ایزوله (۱/۸٪) به دیسک آمپی‌سیلین مقاومت نشان داد. MIC_{pn} این سویه ۰/۸µg/ml بود. تمام ایزوله‌ها (۱۰۰٪) به دیسک ونکومایسین حساس بودند.

با توجه به استانداردهای CLSI و تعریف مقاومت چندگانه، ۹ایزوله(۱٦/٦٪) دارای مقاومت چندگانه بودند. ٤ ایزوله(٤٤/٤٪) از ایزوله‌های دارای مقاومت چندگانه، باMIC≥ ۲µg/ml مقاومت کامل به پنی‌سیلین را نشان دادند.

پس از الکتروفورز محصول PCR ژن pbp2b، در تمام ایزوله‌ها باند 1.5 Kb شناسایی گردید. پس از تعیین توالی محصولات PCR ژن pbp2b، توالی اسید آمینه‌ای ناحیه PBD از pbp2b ایزوله‌ها با استفاده ازنرم افزارهای Chromas و Mega 4 با سویه استاندارد حساس به پنی سیلین R6 مقایسه شد. به طور کلی ۵۱ تغیر اسیدآمیه‌ای در توالی اسید آمینه ای PBP2b مشاهده شد. توالی نوکلئوتیدی pbp2b با مشخصات Gene Bank Accession Number HM371130 ثبت گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای PBP2b در ایزوله-های غیر حساس به پنی‌سیلِن به ترتیب نشان دهنده حداکثر ۱۱/۸٪ و ۹/۲٪ عدم تشابه به توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای سویه استاندارد R6 بودند. از ٤۵٤ اسید آمینه ناحیه ترانس پپتیدازی PBP2b آنالیز شده به طور متوسط ۲ جایگاه در ایزوله‌های PSSP، ۱٦ جایگاه در ایزوله‌های PISP و ۳۰ جایگاه در ایزوله‌های PRSP نسبت به سویه استاندارد R6 تغییر یافته بود (جدول۱).

اغلب موتاسیون‌های یافت شده در ایزوله‌های مورد بررسی بین دو موتیف اسید آمینه‌ایKTG (در موقعیت ۱۷٤– ۱۷۲) و SSN(در موقعیت ۲۵۱–۲٤۹) قرار داشتند (جدول۲). هیچ موتاسیونی در مجاورت موتیف اسید آمینه‌ایSVVK در PBP2b مشاهده نشد. در توالی اسید آمینه‌ای PBP2b ایزوله‌ها به طور کلی ٤ موتاسیون جدید مشاهده گردید:

Ala 335 Gly , Ser 446 Phe , Met 332 Val, Asn 439Lsy.

جدول۱: ارتباط بین حساسیت به پنی‌سیلین با میانگین تغییرات مشاهده شده در توالی ٤۵٤ اسید آمینه‌ای *pbp 2b* در مقایسه با سویه استاندارد حساس R6.

درصد تغییرات مشاهده شده	تعداد موتاسیون مشاهده شده	حساسیت به پنی سیلین
۰/٤	۲	حساس
۳/۵	۱٦	حدواسط
٦/٦	۳۰	مقاوم

جدول۲: ارتباط حساسیت به پنی‌سیلین و موتاسیون‌های رخ داده در مجاورت نواحی کاتالیتیکی *pbp 2b* بر حسب درصد.

حساسیت به پنیسیلین	Thr252Ala/Ser	Thr295Ala/Ser	Glu282Gly	AFSRPM (233-238)
حساس	٪٦/٢	٪٠	٪٠	٪٠
حد واسط	٪٩١/٦	٪١٠٠	٪١٠٠	٪٢٠/٨
مقاوم	٪١٠٠	٪١٠٠	٪١٠٠	٪١٠٠

بحث:

تغییرات قابل ملاحظه‌ای درباره حساسیت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به عوامل ضد میکروبی و اهمیت درمان صحیح عفونت‌های حاد آن، در جهان گزارش شده‌است(۱). در این مطالعه ۷۰/۳ درصد ایزوله‌ها به پنی‌سیلین عدم حساسیت نشان دادند (مقاوم به پنی‌سیلین و مقاومت حدواسط به آن). این میزان، شیوع بالای مقاومت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به پنی سیلین را در تهران نشان می دهد. تحقیقات در کره جنوبی(۱۵) نشان می‌دهد که به‌طور متوسط ۸۰ درصد از سویه‌های جدا شده به پنی‌سیلین عدم حساسیت دارند. در آمریکای لاتین این میزان بیش از ٦٠ درصد گزارش شده‌است(۱۵). در اواخر دهه ۱۹۸۰شیوع *استرپتوکوکوس پنمونیه* غیر حساس به پنی‌سیلین در آمریکا حدود ٤ درصد بود. اما، طی یک دهه به بیش از ۲۵ درصد افزایش پیدا کرد که در سال‌های ابتدایی قرن ۲۱ این میزان به۳۰ تا ۵۰ درصد رسید(١٦). در سال‌های اخیر در برخی کشورهای پیشرفته MIC پنی‌سیلین بسیار زیاد گزارش شده‌است. اما، در کشورهای در حال توسعه مقاومت حدواسط به پنی‌سیلین همچنان غالب می‌باشد. در اسپانیا میزان مقاومت زیاد و حد واسط به پنی‌سیلین تقریبا مشابه است (به ترتیب ۲۰ درصد و ٢٦ درصد) (۱۰). در کانادا، مطالعات ملی نشان می‌دهد شیوع و گسترش سویه‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* با مقاومت افزایش یافته به پنی سیلین، طی یک دوره پنج ساله (۱۹۹۷-۲۰۰۲)، تغییر چشمگیری نداشته و از ۲۱/۲ درصد به ٢٤ درصد افزایش یافته است. با این حال سویه‌هایی با مقاومت بالا به پنی-سیلین ($MIC\geq ۲\mu g/ml$) به طور شگفت آوراز ۲/٤ درصد در سال ۱۹۹۹ به ۱۳/۸ درصد در ۲۰۰۲ افزایش یافته است. میزان پنموکک مقاوم به چند دارو هم طی این دوره پنج ساله از۲/۷ درصد تا ۸/۸ درصد افزایش یافته است(۱۷). در یک مطالعه بین المللی در کشورهای آسیایی شیوع مقاومت به پنی‌سیلین از٤٤/٥ درصد تا ۷۱/٦ درصد متغیر گزارش شده است(٤).

سفوتاکسیم به‌ویژه در درمان بیماران مبتلا به مننژیت پنموککی کاربرد دارد و در کنار سفتریاکسون همچنان به - عنوان داروی انتخابی باقی مانده است. در مطالعه حاضر میزان مقاومت به سفوتاکسیم۳/۷ درصد بود. در این میان تنها ۱ ایزوله دارای مقاومت کامل به هر دو آنتی بیوتیک سفوتاکسیم و پنی سیلین بود. تمام ایزوله‌های حساس به پنی‌سیلین به سفوتاکسیم نیز حساس بودند. در حالی که هر دو ایزوله مقاوم به سفوتاکسیم، کاهش حساسیت به پنی-سیلین را نشان دادند. مطالعه اسکویی و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان می‌دهد که با افزایش MIC پنی‌سیلین، مقاومت به سفوتاکسیم نیز مشاهده می شود(٦). همسو با مطالعه حاضر، در بررسی‌های صورت گرفته در آمریکا، هیچ مورد مقاوم به سفوتاکسیم و حساس به پنی‌سیلین مشاهده نشده است(۱۸). در کانادا نشان داده شد که بیشترین موارد مقاومت به اریترومایسین در سویه‌هایی با مقاومت حدواسط به پنی‌سیلین مشاهده می شود(۱۹).یافته های ما نیز با این نتایج مطابقت دارد.

در سال‌های اخیر، مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی که در درمان عفونت‌های پنموککی به مشکل جدی تبدیل شده-است، اولین بار در آفریقای جنوبی گزارش شد(۲۰). در مطالعه حاضر١٦/٦ درصد ایزوله‌ها مقاومت چندگانه داشتند که می‌تواند درصدی قابل توجه و هشدار دهنده در درمان عفونت‌های پنموککی محسوب گردد. این در حالی است که شیوع مقاومت به چند دارو در اسپانیا بسیار زیاد و بیش از ٦٥ درصد گزارش شده‌است(۲۰). مقاومت چنددارویی درآفریقای جنوبی۱۵ درصد است و در آمریکا بین۲۰ درصدتا۳۰ درصد متغیر می‌باشد(۱۹). نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که ٤۲/۸ درصد از ایزوله‌هایی که مقاومت بالا به پنی‌سیلین دارند، دارای ویژگی مقاومت چندگانه هم هستند. در میان ایزوله‌هایی هم که مقاومت حدواسط به پنی سیلین دارند، ١٦/٦ درصد مقاومت چندگانه نشان دادند. تحقیقات نشان داده است که مقاومت به داروهای غیر بتالاکتام در میان سویه‌های غیر حساس به پنی‌سیلین نسبت به سویه‌های حساس به پنی‌سیلین بیشتر

است (۱۵). نتایج ما نیز چنین امری را تایید می کند. خوشبختانه، کلیه ایزوله‌های بررسی شده به ونکومایسین حساس بودند. این در حالی است که در سال‌های اخیر گزارش‌هایی مبنی بر تحمل ونکومایسین در سویه های *استرپتوکوکوس پنمونیه* منتشر شده است(۲۱).

مطالعات مولکولی سویه‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به پنی‌سیلین نشان داده‌است که مقاومت پنی‌سیلین و دیگر بتالاکتام‌ها با تغییرات در ژن‌های کد کننده PBP ها به‌ویژه PBP1a، PBP2b، PBP2x مرتبط می باشد. در این میان از تغییرات در PBP2b به عنوان شاخص مهم مقاومت به پنی‌سیلین نام برده شده است(۷). توالی اسید آمینه‌ای در ناحیه متصل شونده PBP2b به پنی‌سیلین، در سویه‌های غیر حساس به پنی‌سیلین تفاوت زیادی باسویه-های حساس به پنی‌سیلین دارد(۲۲). در مطالعه حاضر بر روی توالی اسید آمینه‌ای ناحیه PBD از PBP2b، به طور متوسط ۲۳ جایگاه در ایزوله‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* غیر حساس به پنی‌سیلین نسبت به سویه استاندارد حساس به پنی‌سیلین R6 تغییر یافته بود. توالی‌های PBP2b در ایزوله‌های غیر حساس به پنی‌سیلین، نسبت به توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای سویه R6، حداکثر ۱۱/۸ درصد و ۹/۲ درصد عدم تشابه نشان دادند. در حالی که توالی اسید آمینه‌ای و نوکئوتیدی اغلب ایزوله‌های حساس به پنی‌سیلین مشابه توالی pbp2b در سویه R6 بود. تغییرات اسید آمینه‌ای Thr 252→ Ala، Glu 282→ Gly , Thr 295→Ala در همه ایزوله‌های PRSP و اغلب ایزوله‌های PISP دیده شد. تغییر Thr 252→ Ser وThr 295→ Ser نیر در برخی ایزوله‌های غیر حساس دیده شد.

در سال 1993توالی موزائیک مشخصی در توالی اسید آمینه‌ای *pbp2b* شناسایی شد که نتیجه جانشینی ٦ باز متوالی می‌باشد: AFSRPM یا AFSVPM. این توالی در بین کدون‌های ۲۳۳ تا ۲۳۸ قابل شناسایی است. این جانشینی‌ها که در جایگاه فعال PBP2b قرار دارد موجب کاهش میل ترکیبی پنی‌سیلین با PBP2b می‌گردد. موتاژنزیس در این ناحیه این پدیده را اثبات کرده-است(۲۳). ۱۲ ایزوله غیر حساس (۳۱/۵ درصد) دارای این جانشینی‌ها بودند.

در بررسی Beak و همکاران در کره یک Blockدر توالی اسید آمینه‌ای *pbp 2b*(Block B، در موقعیت ٤٨٢ تا ٣٦٧) شناسایی شده است(۲۳). توالی Block B بسیار مرتبط با توالی مشابه در سویه‌های *استرپتوکوکوس اورالیس* مقاوم به پنی‌سیلین (MIC= ٤μg/ml) می-باشد(٢٤). این Block در ۲ ایزوله مطالعه حاضر نیز دیده شد.

مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تغییرات در ژن‌های PBP2b *استرپتوکوکوس پنمونیه* از طریق نوترکیبی بین گونه‌ای با *استرپتوکوکوس اورالیس* و *استرپتوکوکوس میتیس* ایجاد می شود(۸).

در سال ۲۰۰٦ ، Granger و همکاران سویه‌هایی که دارای موتاسیون‌های Leu261→ Ile , Gly273→ Leu ,Ser275 →Asn ,Gly289→ Ala , Thr295→ AlaAla296→Ser بودند را شناسایی کردند(٢٤). تعداد ۱۱ ایزوله مطالعه حاضر و سویه استاندارد حد واسط ATCC49619 می توانند در این گروه طبقه بندی شوند.

تجزیه و تحلیل موتیف‌های متصل شونده PBP2b در ایزوله‌های ما نشان دهنده عدم وجود موتاسیون در، یا در نزدیکی، جایگاه فعال سرین از موتیف SVVK می باشد. مشابه نتایج ما در سایر مطالعات نیر منتشر گردیده است.جانشینی Thr 252→ Ala/Ser در مجاورت موتیف SSN در PBP2b که در همه ایزوله‌های غیر حساس به پنی‌سیلین یافت شد، تائیدی بر اهمیت آن در مقاومت به بتالاکتام‌ها به‌ویژه به پنی‌سیلین است. تحقیقات نشان می دهد که این جانشینی میل ترکیبی به پنی‌سیلین را تا ٦۰ درصد کاهش می دهد. نقش این جانشینی بارها در سایر تحقیقات مورد تاکید قرار گرفته است(٢٤-٢٢).

آسپاراژین (Asn) در موتیف SSN با گروه کربونیل زنجیره جانبی R1 پنی سیلین پیوند هیدروژنی تشکیل می دهد، جانشینی Thr 252→ Ala/Ser احتمالا" این پیوند هیدروژنی را تخریب می‌کند و منجر به کاهش میل ترکیبی PBP2b می گردد(۲۲). شگفت آور است که این موتاسیون، که نقش آن در ایجاد مقاومت به پنی سیلین بارها تائید شده است، در۱ ایزوله حساس به پنی سیلین در مطالعه حاضر و چند ایزوله حساس از کره (۲۳)، آمریکا (۲۵)و کانادا (٢٤) نیز دیده شده است.

جانشینی Ala 232 Gly در مجاورت موتیف KTG در PBP2b در هیچ یک از ایزوله‌های مقاوم مطالعه حاضر دیده نشد. در حالی که این موتاسیون در برخی مطالعات در سویه‌هایی با مقاومت زیاد به پنی سیلین با MICهای

بین µg/ml۸-۲ از دیگر کشورها گزارش شده است(۱۰). دو موتاسیون Glu 282 Gly و Thr 252 Ala/Ser که در همه ایزوله‌های غیر حساس به پنی‌سیلین در مطالعه حاضر مشاهده شدند، قبلا نیر به عنوان شاخص‌های مهم مقاومت پنموکک به پنی‌سیلین معرفی شده‌اند (۲۴-۲۲و ۲۶).

مطالعات نشان می دهد که ظهور و گسترش مقاومت به بتالاکتام‌ها در *استرپتوکوکوس پنمونیه* فرایندی پیچیده است و شامل پخش کلونال، انتقال افقی DNA و موتاسیون‌های نقطه ای در PBPها به ویژه PBP2b می‌باشد(۱۷). توالی‌های DNA مشابه یا مرتبط با هم ژن‌هایPBP در مقاومت به پنی‌سیلین در *استرپتوکوکوس پنمونیه*، *استرپتوکوکوس میتیس* ، *استرپتوکوکوس اورالیس* و *استرپتوکوکوس سنگوئیس* دخیل می‌باشد. ترانسفورماسیون ژن‌های تغییر یافته PBP ها از یک سویه استرپتوکوک به سویه استرپتوکوک دیگر در تحقیقات مختلف گزارش گردیده است(۸).در تحقیقات انجام گرفته در سال ۱۹۹۳ از *استرپتوکوکوس میتیس* و *استرپتوکوکوس اورالیس* به عنوان منابع اولیه ژنی برای PBP2b و PBP2x، که شاخص-های اصلی مقاومتی در *استرپتوکوکوس پنمونیه* می باشند، نام برده شده است (۲۴).

با توجه به اهمیت تغییرات صورت گرفته در PBP ها در ایجاد مقاومت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به بتالاکتام‌ها لازم است که بررسی‌های مشابهی بر روی ژن‌های کد کننده PBP2b و PBP2x و PBP1a نیر در ایران صورت گیرد. در سال‌های اخیر نشان داده شد که علاوه بر PBP2b وPBP2x و PBP1a احتمالا" دو PBPدیگر (PBP2a و PBP1b)نیر ممکن است در مقاومت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به بتالاکتام‌ها دخیل باشد. نقش PBP2a در مقاومت به سفوتاکسیم در موتان‌های آزمایشگاهی اثبات شده است(۲۴).

نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر بیانگر افزایش تعداد ایزوله‌های *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به پنی‌سیلین است. در عین حال افزایش تعداد ایزوله‌هایی با مقاومت چندگانه، می تواند نشان دهندهبحران در درمان عفونت‌های پنموککی باشد. خوشبختانه هیچ موردی از مقاومتونکومایسین مشاهده نشد و این دارو همچنان می‌تواند در درمان *استرپتوکوکوس پنمونیه* مقاوم به آنتی بیوتیک گزینه جایگزین محسوب شود. در مطالعه حاضر تغییرات در توالی اسید آمینه‌ایPBP2b عمدتا" با کاهش حساسیت به پنی‌سیلین همخوانی نشان داد. به این ترتیب نقش تغییرات در ژن ***pbp2b***به عنوان شاخصی مهم ایجاد مقاومت به پنی سیلین آشکار می‌گردد. نتایج نشان می‌دهد که حساسیت یا مقاومت *استرپتوکوکوس پنمونیه* به پنی‌سیلین می‌تواند با تعیین تغییرات صورت گرفته در ژن ***pbp2b*** ارزیابی شود..

فهرست منابع:

1. Appelbaum PC. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Drug Selection. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:1613–1620
2. Harwell JI, Brown RB. The Drug- Resistant *Pneumococcus* Clinical Relevance, Therapy, and Prevention. *Chest.* 2000; 117:530-541.
3. Perez-Trallero E, Garcia-de-la-Fuente C, Garcia-Rey C. Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 1965–1972.
4. Song JH, Lee NY, Ichiyama S. Spread of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Clin Infect Dis.* 1999; 28: 1206–1211.
5. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A. *et al*. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med.* 2000; 343: 1917–1924.
6. Oskoui M, Feizabadi MM, Amirkhani A. Drug susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in TEHRAN, IRAN. *Arch Iranian Med.* 2003; 6(3): 192-195.
7. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30:673-691.
8. Chi F, Nolte O, Bergmann C, Ip M, Hakenbeck R. Crossing the barrier: Evolution and spread of a major class of mosaic pbp2x in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and

S.oralis. *Int J Med Microbiol.* 2007; 297:503–512.
9. Pagliero E, Chesnel L, Hopkins J, Croize J, Dideberg O, Vernet T. *et al*. Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 2b and Its Implication in β-Lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1845–1855.
10. Soriano F, Cafini F, Aguilar L, Tarrago D, Alou L, Gimenez MJ. *et al*. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 1234-1240
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard M7-A6. CLSI 2005, Wayne, PA, USA & Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twelfth Informational Supplement M100-S12. CLSI 2005, Wayne, PA, USA
12. Garcia Leona EM, Cercenado AM. Susceptibility of *Streptococcus Pneumoniae* to penicillin*Clin Infect Dis*. 1992;14 427-435.
13. Sogstad MKR, Hoiby EA, Cagant DA, Molecular characterization of non-penicilin-susceptible *Streptococcus pneumonia* in Norway. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:3225-323.
14. Izdebski R, Rutschmann J, Fiett J, Sadowy E, Gniadkowski M, Hryniewicz W. et al. Highly variable penicillin resistance determinants PBP 2x, PBP 2b,and PBP 1a in isolates of two *Streptococcus pneumoniae* clonal groups, Poland23F-16 and Poland6B-20. *Antimicrob Agents Chemother.*2008; 52:1021-1027.
15. Adam D. Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.*2002; 50:1-5.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Geographic variation in penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: selected sites, United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*1999; 48:656–661.
17. Granger D, Boily-Larouche G, Turgeon P, Weiss K, Roger M. Genetic analysis of *pbp2x* in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Quebec, Canada. *J Antimicrob Chemother.*2005; 55: 832–839.
18. Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, Rhomberg PR, Coffman SL, Brueggemann AB. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999–2000, Including a comparison of resistance rates since 1994–1995. *Antimicrob Agents Chemother.*2001; 45: 1721–1729.
19. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM. The prevalence of drug resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta.*N Engl J Med.* 2008; 333: 481–486.
20. Oteo J, Alos JI, Gomez-Garces JL. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates in 1999 and 2000 in Madrid, Spain: a multicentre surveillance study. *J Antimicrob Chemother.*2001; 47: 215–218.
21. Normark BH, Novak R, Ortqvist A, Kallenius G, Tuomanen E, Normark S. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that exhibit tolerance of vancomycin. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 552-558.
22. Nichol KA, Zhanel GG, Hoban DJ. Penicillin-binding protein 1A, 2B, and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.*2002; 46:3261–3264.
23. Beak JY, Ko SK, Oh WS, Jung SI, Kim YS, Chang HH. *et al*. Unique variations of pbp2b sequences in Penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates from Korea. *J Clin Microbiol.*2004; 42:1746-1750.
24. Granger D, Boily-Larouche G, Turgeon P, Weiss K, Roger M. Molecular characteristics of *pbp1a* and *pbp2b* in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Quebec, Canada. *J Antimicrob Chemother.*2006; 57:61-70.
25. Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(5): 1273–80.
26. Sanbongi Y, Ida T, Ishikawa M, Osaki Y, Katoka H, Suzuki T. *et al*. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6): 2244–50.