بررسی پروتئین متصل شونده به پنی سیلین 2x در سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به بتالاکتام جدا شده از بیماران در بیمارستانهای شهر تهران

سامان نوبری[۱]، فاطمه رحمتی قزلجه[۲] ، مهوش اسکویی[۳]*

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
۲. کارشناس ارشد میکروب شناسی، محقق بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
۳. دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش میکروب شناسی. تلفکس: ۰۲۱۶۶۴۰۵۵۳۵ oskouii1@yahoo.com

دریافت مقاله: مهر نود **پذیرش برای چاپ: آذر نود**

چکیده

سابقه و هدف: *در سال های اخیر به علت شیوع سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های موثر در درمان عفونت های پنوموکوکی درمان این عفونت ها با ابهام مواجه گشته است. در سویه های مقاوم کاهش در پتانسیل اتصال به آنتی بیوتیک ها در پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین دیده می شود. هدف از این مطالعه تعیین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های بالینی استرپتوکوکوس پنومونیه و تعیین موتاسیون های رخ داده در pbp2x می باشد.*

روش کار: *۵۸ ایزوله پنوموکوکی از بیماران مبتلا به عفونت های پنوموکوکی جدا گردید. پس از شناسایی، الگوی حساسیت پذیری آنها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن برای آنتی بیوتیک های اگزاسیلین، سفوتاکسیم، اریترومایسین، تتراسایکلین و تری متوپریم - سولفامتوکسازول مورد ارزیابی قرار گرفت. MIC نسبت به پنی سیلین و سفوتاکسیم از طریق روش Broth Micro dilution تعیین شد. ژنهای pbp2x و lytA از طریق PCR تکثیر گردید و توالی های نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای آنها تعیین توالی گردید.*

یافته ها: *از ۵۸ سویه پنوموکوکی مورد بررسی، ۲۴ نمونه (۴۱/۳٪) دارای مقاومت حدواسط و ۱۴ نمونه (۲۴/۱٪) مقاومت کامل به پنی سیلین ($MIC \geq 2\mu g/ml$) داشتند. ۲۸ نمونه (۴۸/۲٪) مقاوم به تری متو پریم – سولفامتوکسازول، ۹ نمونه (۱۵/۵٪) مقاوم به اریترومایسین و ۱۰ نمونه (۱۷/۲٪) مقاوم به تتراسایکلین بودند. ۸ نمونه (۱۳/۸٪) مقاومت به سفوتاکسیم را نشان می دادند. اغلب سویه های مقاوم به پنی سیلین و سفوتاکسیم مقاومت به یک یا چند آنتی بیوتیک دیگر را نیز نشان می دادند. همه سویه های مقاوم به سفوتاکسیم دارای تغییرات در PBP2x بودند.*

نتیجه گیری: *شیوع بالای سویه های مقاوم به بتالاکتام نشان دهنده بحرانی جدی در درمان عفونت های پنوموکوکی می باشد. نتایج ما نشان می دهد که تغییرات درموتیف های متصل شونده به پنی سیلین در PBP2x مرتبط با مقاومت با سفوتاکسیم در استرپتوکوکوس پنومونیه می باشد.*

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس پنومونیه، مقاومت به بتالاکتام، PBP2x

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه بیش از صد سال است که به عنوان یکی از مهم ترین پاتوژن های انسانی در اغلب نقاط جهان محسوب می گردد که عامل اکثر عفونت های اکتسابی از اجتماع نظیر پنومون ی و نیز عفونت های مهاجم مانند مننژیت، سینوزیت ، عفونت گوش میانی و باکتریمی می باشد. همه ساله میزان بالایی از مرگ ومیر در میان کودکان وسال مندان به علت عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری رخ می دهد(۱). در اواخر قرن بیستم سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به آنتی بیوتی کهای بتالاکتام به ویژه پنی سیلین و سویه هایی با مقاومت چند گانه آنتی بیوتیکی از اغلب نقاط جهان گزارش شد. این در حالی است که پس از شناسایی پنوموکوک های مقاوم به پنی سیلین در دهه ۱۹۶۰، در اواخر دهه ۱۹۷۰ و اوایل ۱۹۸۰ تنها در تعداد معدودی از کشورها از جمله آفریقای جنوبی و اسپانیا سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به پنی سیلین گزارش شده بود(۲). امروزه ظهور سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به پنی سیلین و دیگر آنتی بیوتیک ها و نیز گسترش سویه های مقاوم به چند آنتی بیوتیک معالجه عفونت های ناشی از استرپتوکوکوس پنومونیه را با اشکال مواجه ساخته است.

استرپتوکوکوس پنومونیه یکی از معدود گونه های باکتریایی است که بتا لاکتامازهای آن هنوز ناشناخته است و مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتامی در آن کاملا" وابسته به تغییرات در پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBP_S) می باشد که میل ترکیبی آنها به پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها را شدیدا" کاهش می دهد(۶-۳). اغلب باکتری های گرم مثبت پپتیدوگلیکان چند لایه ای تولید می کنند در حالی که باکتری های گرم منفی تنها دارای لایه نازکی از پپتیدوگلیکان می باشند. پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین از گروه سرین پپتیدازها هستند که پلیمریزاسیون و ترانس پپتیداسیون زنجیره های قندی را در طول مراحل نهایی بیوسنتز پپتیدوگلیکان بر عهده دارند. مکانیسمی که پنوموکوک ها این پروتئین های با میل ترکیبی کم خود را گسترش می دهند ناشناخته می باشد در حالی که آشکار شده است که تبادلات نوترکیبی بین گونه ای در آن دخیل می باشد(۱۱-۷).

ژنهای pbp1a، pbp2b، pbp2x در پنوموکوک های کاملا حساس به پنی سیلین از نظر توالی نوکلئوتیدی کاملا یک سان هستند. در حالی که در سویه های مقاوم به پنی سیلین دارای توالی های بسیار متفاوتی هستند و شامل نواحی کاملا" از هم دور شده می باشند که اغلب با ژنهای pbp همولوگ گونه های ویریدانس مثل استرپتوکوکوس میتیس و استرپتوکوکوس اورالیس مشابه می باشند(۸-۶). تبادلات نوترکیبی بین گونه ای و رویدادهای موتاسیون، هردو در گسترش پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین با میل ترکیبی کم دخیل می باشند(۶).

هدف از این مطالعه بررسی پروتئین متصل شونده به پنی سیلین 2x در سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به بتالاکتام جدا شده از بیماران جهت پی بردن به مکانیسم ایجاد مقاومت به بتالاکتامها در ایران می باشد.

روش کار

در طی سالهای ۱۳۸۰ الی ۱۳۸۹، ۳۰۰ نمونه مشکوک به استرپتوکوکوس پنومونیه از نمونه های مختلف بالینی از جمله خون و مایع مغزی نخاعی از بیمارستان های امام خمینی، حضرت رسول اکرم (ص) ، سینا، مرکز طبی کودکان و آزمایشگاه بهار جمع آوری شدکه پس از انجام آزمایش های تعیین هویت، ۵۸ ایزوله به عنوان استرپتوکوکوس پنومونیه شناسایی شد. به منظور تعیین هویت نمونه های جمع آوری شده، ابتدا سویه ها بر روی محیط بلاد آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده شدند و در $37^{\circ}C$ و $5\%\ CO_2$ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و کلنی های کوچک، براق و α همولیتیک حاصل از استرپتوکوکوس پنومونیه شناسایی گردید. جهت تعیین حساسیت به اپتوچین از دیسک اپتوچین(HiMedia Laboratoris Pvt. Ltd) استفاده شد و سویه هایی با هاله عدم رشد بیش از ۱۴ میلی متر در اطراف این دیسک به عنوان حساس به اپتوچین انتخاب شد. تست حلالیت در صفرا با استفاده از نمک دزوکسی کولات انجام شد و سوسپانسیون حاوی سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه در مجاورت آن پس از تقریبا" ۳۰ دقیقه شفاف شد. از سویه استرپتوکوکوس پنومونیه ATCC 49619 در کلیه تست های تشخیصی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جهت قطعیت در شناسایی سویه های پنوموکوکی از تکثیر ژن lytA که کد کننده اتولیزین پنوموکوکی می باشد استفاده گردید. پس از شناسایی، مقاومت سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های اگزاسیلین، اریترومایسین، تتراسایکلین، سفوتاکسیم، کوتریموکسازول(TMP-SMZ)، و آمپی سیلین که همگی از شرکت MAST انگلستان تهیه شده بودند به روش Kirby Bauer انجام گرفت. در این روش، سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولر- هینتون آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند تلقیح گردیدو پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای $37^{\circ}C$ و در حضور۵٪ CO_2 قطر هاله عدم رشد اندازه گیری و با جداول ارائه شده توسط CLSI مقایسه گردید و سپس MIC سویه ها نسبت به پنی سیلین و سفوتاکسیم با استفاده از روش Broth micro dilution بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین گردید(۱۲). از سویه استرپتوکوکوس پنومونیه ATCC 49619 جهت کنترل روش های آنتی بیوگرام و MIC استفاده گردید.

DNA ژنومیک سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه از طریق کیت مخصوص استخراج DNA، Metabion miniprep طبق دستور العمل شرکت سازنده تخلیص گردید. DNA استخراج شده در ۵۰-۲۰۰ µl محلول Tris-EDTA حاوی RNase و در$-20^{\circ}C$ نگهداری شد.

آزمون PCR جهت تکثیر ژنهای lytA و pbp2x با استفاده از پرایمرها و برنامه های زمانی منتشر شده انجام گرفت(۱۳و ۱۴). به منظور انجام PCR، ۰/۵میکرولیتر از DNA استخراج شده به PCR Master Mix با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (هر ویال حاوی ۰/۸ میلی مول $Mgcl_2$، ۰/۲ میلی مول dNTP، ۰/۵ پیکومول از هر پرایمر و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase) اضافه گردید. محصول واکنش در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردیده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داکیومنت بررسی و عکس برداری گردید.

پس از تکثیر ژن pbp2x از طریق PCR، محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت Macrogene Research در کشور Korea فرستاده شد. عملیات Sequencing با استفاده از ABI Capillary System انجام گرفت. محصولات PCR در هر دو جهت تعیین توالی شد.

توالی های نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای pbp2x به دست آمده با استفاده از نرم افزار های Chromas ،MEGA4 ،Blast و DNA CIS آنالیز شد و با یکدیگر و با توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای pbp2x سویه استرپتوکوکوس پنومونیه استاندارد حساس به پنی سیلین R6 (Gene Bank Accession Number X16367) مقایسه شد(۱۵).

یافته ها

پس از انجام تست آنتی بیوگرام با استفاده از دیسک اگزاسیلین، ۱۶ نمونه (۲۷/۶٪) دارای هاله عدم رشد بزرگ تر از ۲۰ میلی متر بوده بنابراین با توجه به استانداردهای منتشر شده توسط CLSI به عنوان استرپتوکوکوس پنومونیه حساس به پنی سیلین (PSSP) شناسایی گردیدند. ۴۲ نمونه (۷۲/۴٪) دارای هاله عدم رشد کمتر از ۲۰ میلی متر بودند و به عنوان سویه های غیر حساس به پنی سیلین شناخته شدند.

از ۵۸ سویه پنوموکوکی مورد بررسی، ۸ نمونه (۱۳/۸٪) به سفوتاکسیم، ۹ نمونه (۱۵/۵٪) به اریترومایسین، ۱۰ نمونه (۱۷/۲٪) به تتراسایکلین و ۲۸ نمونه (۴۸/۲٪) به تری متوپریم- سولفامتوکسازول مقاوم بودند. در عین حال تمامی سویه های مورد بررسی به وانکومایسین حساس بودند. از مجموع سویه های مورد بررسی ۹ نمونه (۱۵/۵٪) به ۳ یا بیش از ۳ آنتی بیوتیک مقاوم (دارای مقاومت چندگانه) بودند. ۴ نمونه (۶/۸٪) از سویه های دارای مقاومت چند گانه مقاومت بالایی به پنی سیلین ($MIC \geq 2\mu g/ml$) را نشان می دادند.

پس از انجام تست MIC برای آنتی بیوتیک پنی سیلین بر اساس استانداردهای CLSI، ۲۰ نمونه (۳۴/۴٪) دارای MIC ≤۰/۰۶µg/ ml بودند و به عنوان حساس به پنی سیلین (PSSP) شناسایی شدند. ۲۴ نمونه (۴۱/۳٪) دارای MIC≤۱µg/ml ≤۰/۱بودند و مقاومت حد واسط به پنی سیلین (PISP) را نشان می دادند. ۱۴ نمونه (۲۴/۱٪) دارای MIC≥ ۲µg/ml بودند و به عنوان مقاوم به پنی سیلین (PRSP) شناسایی گردیدند. پس از انجام تست MIC برای آنتی بیوتیک سفوتاکسیم، ۵۰ نمونه (۸۶/۲٪) دارای MIC ≤۰/۵µg/ ml بودند و به عنوان حساس به سفوتاکسیم شناسایی شدند و ۸ نمونه (۱۳/۸٪) دارای MIC≥ ۴µg/ml بودند و به عنوان مقاوم به سفوتاکسیم شناسایی گردیدند که با نتایج به دست آمده از روش دیسک دیفیوژن کاملا" مطابقت داشت. تمامی سویه های مقاوم به سفوتاکسیم به پنی سیلین نیز مقاوم (MIC≥ ۲µg/ml) بودند.

پس از تکثیر ژن pbp2x در سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه مورد بررسی، محصول PCR تعیین توالی گردید و با استفاده از نرم افزار های Blast و DNA CIS، ناحیه متصل شونده به پنی سیلین (PBD) تعیین توالی شده در سویه های مقاوم با یک دیگر و با سویه استاندارد حساس به پنی سیلین R6 مقایسه شد. در مقایسه بین حساسیت به پنی سیلین با تعداد تغییرات مشاهده شده در ناحیه PBD از PBP2x در مقایسه با سویه حساس به پنی سیلین R6 مورد بررسی ۲ موتاسیون (۰/۳٪ تغییر) در میان سویه های حساس به پنی سیلین مشاهده گردید. در حالی که در میان سویه های مقاوم به پنی سیلین شناسایی شده به طور متوسط ۳۶ موتاسیون (۶/۸٪ تغییر) مشاهده گردید. در مورد سویه هایی با مقاومت حد واسط به پنی سیلین تغییرات مشاهده شده ۳/۵٪ بود که به طور متوسط شامل ۱۶ موتاسیون می گردید.

در تمامی سویه های مقاوم به پنی سیلین و سفوتاکسیم جانشینی Thr338Ala/Ser/Pro دیده شد. در ۸ سویه با مقاومت حد واسط به پنی سیلین و همگی سویه های مقاوم به سفوتاکسیم که به پنی سیلین نیز مقاوم بودند جانشینی Leu546Val مشاهده گردید. در حالی که در میان سویه های حساس به پنی سیلین هیچ یک از موتاسیون های نامبرده شده مشاهده نگردید.

موقعیت اسید آمینه ای Q254-V256 در PBP2x در تمامی نمونه های مقاوم به هر دو آنتی بیوتیک پنی سیلین و سفوتاکسیم مشاهده گردید. جانشینی Met339Phe داخل موتیف STMK در تمامی نمونه های مقاوم به سفوتاکسیم دیده شد. در جدول یک توزیع سویه های بررسی شده بر اساس موتاسیون های رخ داده در مجاورت جایگاه فعال pbp2x و مقاومت به پنی سیلین و سفوتاکسیم نشان داده شده است. مطابق جدول در هیچ یک از سویه های حساس به پنی سیلین (MIC ≤0.06µg/ml) موتاسیونی در مجاورت نواحی کاتالیتیکی دیده نشد در حالی که تمامی سویه های مقاوم به سفوتاکسیم دارای ۴ موتاسیون عمده ذکر شده بودند.

جدول۱. توزیع سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه بر اساس موتاسیون های رخ داده در مجاورت جایگاه فعال pbp2x و مقاومت به پنی سیلین و سفوتاکسیم

Mutations	MIC_{Pn}			Cef - Resistant
	/ml MIC ≤0.06µg	/ml MIC≤1µg 0.1 ≤	2µg/ml MIC≥	
Thr338Ala	٪۰	٪۹۵/۸	٪۱۰۰	٪۱۰۰
Leu546Val	٪۰	٪۳۳/۳	٪۵۷/۱	٪۱۰۰
Met339Phe	٪۰	٪۰	٪۵۷/۱	٪۱۰۰
Q524-V256	٪۰	٪۰	٪۵۷/۱	٪۱۰۰

بحث

در سال های اخیر مطالعات پراکنده صورت گرفته در ایران، همگی شیوع بالایی از مقاومت به پنی سیلین را در استرپتوکوکوس پنومونیه گزارش کرده اند(۱۶و۱۷). در این مطالعه ما تلاش کردیم تا با بررسی سویه های مقاوم به بتالاکتام ها از جمله پنی سیلین و سفوتاکسیم و سایر آنتی بیوتیک های رایج در درمان عفونت های پنوموکوکی، به جستجوی شاخص ملکولی برای تعیین مکانیسم مقاومت به آنتی بیوتیک ها به ویژه آنتی بیوتیک های بتالاکتام بپردازیم.

در این بررسی از مجموع ۵۸ سویه استرپتوکوکوس پنومونیه مورد بررسی ۱۴ نمونه (۲۴/۱٪) دارای MIC≥ ۲µg/ml بودند و مقاومت کامل به پنی سیلین را نشان می دادند. در حالیکه ۲۰ نمونه (۳۴/۴٪) استرپتوکوکوس پنومونیه حساسیت به پنی سیلین را داشتند (MIC ≤۰/۰۶µg/ml). بنابراین با توجه به شناسایی ۲۴ سویه که مقاومت حد واسط به پنی سیلین را داشتند به طور کلی ۳۸ نمونه (۶۵/۴٪) حساسیت کاهش یافته به پنی سیلین را نشان می دادند که بیان گر چالشی بزرگ برای درمان عفونت های پنوموکوکی از طریق تجویز پنی سیلین می باشد. در بررسی های صورت گرفته در برخی کشورهای آسیایی نیز میزان مقاومت به پنی سیلین به طور متوسط حدود ۷۰٪ گزارش شده است(۱۸). در برخی کشورهای اروپایی شیوع سویه های مقاوم به پنی سیلین بیش از ۵۰٪ گزارش شده است(۱۹). در اسپانیا میزان مقاومت به بتالاکتام ها در استرپتوکوکوس پنومونیه ۲۰٪ و میزان مقاومت حدواسط به پنی سیلین ۲۶٪ می باشد. در انگلستان و چند کشور اروپای شمالی در طی دهه ۱۹۹۰ و اوایل قرن بیست و یکم میزان مقاومت به پنی سیلین در میان نمونه های پنوموکوکی پایین بوده است در حالی که در همین ناحیه در کشور ایسلند سروتیپ پنوموکوکی 6B که در اسپانیا شایع بوده و مقاومت بالایی از این سویه ها گزارش شده دیده شده و این سروتیپ مسئول بیش از ۲۰٪ از عفونت های پنوموکوکی بوده است و اغلب این سویه ها دارای مقاومت چند گانه بوده اند(۲۰). در آمریکا و هنگ کنگ نیز مشابه ایسلند نشان داده شده است که افزایش در شیوع مقاومت به پنوموکوک ها ناشی از سروتیپ های شایع در اسپانیا می باشد. در کشور ما با وجود بررسی های صورت گرفته در مورد مقاومت به آنتی بیوتیکها در میان پنوموکوک ها، تا به حال در زمینه ارتباط میان مقاومت به پنوموکوک ها و سروتایپ های شایع اطلاعات دقیقی منتشر نشده است.

نکته جالب توجه این است که در میان سویه های مورد بررسی در این مطالعه، میزان مقاومت به پنی سیلین در میان نمونه هایی که طی سالهای ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۳ جدا شده بودند ۱۶٪ (۴نمونه از ۲۵ نمونه) بود در حالی که طی بازه زمانی ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۹ این میزان به ۳۰/۳٪ (۱۰ نمونه از ۳۳ نمونه) افزایش پیدا کرده است که به خوبی نشان دهنده افزایش مقاومت به پنی سیلین در طی بازه زمانی ذکر شده می باشد. قابل ذکر است که از ۹ نمونه دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی در این مطالعه، ۸ نمونه در طی سالهای ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۹ شناسایی شده اند. در بررسی های ما در بازه زمانی ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۳ تنها ۲ نمونه مقاوم به سفوتاکسیم شناسایی شد در حالی که در طی بازه زمانی ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۹، ۶ نمونه مقاوم به سفوتاکسیم شناسایی گردید که نشان می دهد میزان مقاومت به سفوتاکسیم از ۸٪ به ۱۸/۱٪ افزایش پیدا کرده است. در کانادا در بررسی هایی که از طرف یک گروه مطالعات شیوع پنوموکوک طی سالهای ۱۹۹۷ الی ۲۰۰۲ صورت گرفت نشان داده شد که شیوع مقاومت به پنی سیلین از ۲/۴٪ در ۱۹۹۹ به ۱۳/۸٪ در ۲۰۰۲ افزایش یافته و در طی همین دوره میزان مقاومت چندگانه از ۲/۷٪ به ۸/۸٪ افزایش یافته نشان می دهد(۲۱). در مطالعات ما همگی سویه های مقاوم به سفوتاکسیم به پنی سیلین نیز مقاوم بودند که هم سو با نتایج به دست آمده از سایر مطالعات می باشد(۲۴-۲۲). در بررسی ما مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها بیشتر در میان سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به بتالاکتام ها دیده شد. با وجود گزارش تحمل وانکومایسین در استرپتوکوکوس پنومونیه در سالهای اخیر (۲۵)، تا به حال مقاومت به این آنتی بیوتیک در جهان گزارش نشده است که احتمالا ناشی از عدم گسترش شاخص های مقاومت به این آنتی بیوتیک در میان پنوموکوک ها می باشد. در بررسی های قبلی ما نیز همگی سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه به وانکومایسین حساس بودند (۱۶).

در این مطالعه، تمامی سویه های حساس به پنی سیلین دارای توالی اسید آمینه ای و نوکلئوتیدی مشابه با یکدیگر و با توالی pbp2x سویه استاندارد R6 بودند، در حالی که در سویه های غیر حساس به پنی سیلین و به ویژه با مقاومت بالا به پنی سیلین (MIC≥ ۲µg/ml) و تمامی سویه های مقاوم به سفوتاکسیم توالی اسید آمینه ای و نوکلئوتیدی pbp2x بسیار متغیر بود. یافته های ما در مورد بررسی توالی اسید آمینه ای PBP2X در سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه نشان می دهد که میزان تغییرات در PBP2X با افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مرتبط می باشد. به ویژه باید توجه داشت که همگی سویه های مقاوم به سفوتاکسیم دارای بیش ترین تغییییر در توالی اسید آمینه PBP2x بودند(جدول۲). آنالیز توالی های pbp2x در نمونه های ما نشان می دهد که جانشینی های رخ داده در موتیف Thr338 در اغلب سویه های غیر حساس به پنی سیلین وجود دارد. این جانشینی به صورت Thr338Ala/Ser/Pro در مجاورت سرین جایگاه فعال آنزیم و در موتیف STMK رخ می دهد که در مطالعات قبلی نیز به عنوان شاخصی مهم در مقاومت به پنی سیلین مورد بررسی قرار گرفته است(۲۶و۲۷). اگرچه موتیف Thr338 به طور مستقیم در تماس با آنتی بیوتیک نمی باشد (۲۸و۲۹)، جانشینی Thr338Ala منجر به حذف گروه هیدروکسیل در این جایگاه شده و به شدت عملکرد اسیلاسیون PBP2X را برای بتالاکتام ها کاهش می دهد (۲۸و۳۰). همگی نمونه های مقاوم به سفوتاکسیم مورد بررسی، دارای جانشینی Met339Phe بودند. در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که این جانشینی فعالیت اسیلاسیون را ۳ تا ۱۰ برابر نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام کاهش می دهد (۳۱). با توجه به اینکه این موتاسیون بر خلاف Thr338Ala در هیچ نمونه حساس به سفوتاکسیم مشاهده نشد اهمیت آن برای ایجاد مقاومت به سفوتاکسیم مشخص می گردد. در فرانسه (۳۲)، آمریکا (۳۳) و ژاپن (۳۴) نیز این موتاسیون در تمامی نمونه های مقاوم به سفوتاکسیم و نیز نمونه هایی با MIC≥ 4µg/ml دیده شده است. در مطالعات ما اغلب نمونه های غیر حساس به پنی سیلین و همگی نمونه های مقاوم به سفوتاکسیم دارای جانشینی Leu546Val بودند. به نظر می رسد این جانشینی به تنهایی برای ایجاد مقاومت به بتالاکتام ها کافی نمی باشد اما در هر صورت نقش مهمی در ایجاد مقاومت به سفالوسپورین ها ایفا می کند. موتیف Q254-V256 در PBP2x اولین بار توسط Granger و همکارانش معرفی شد (۱۴).

اهمیت این موتیف که در تمامی نمونه های مقاوم به هر دو آنتی بیوتیک پنی سیلین و سفوتاکسیم ما نیز مشاهده گردید، با استفاده از موتاژن زایی در این ناحیه مورد تایید قرار گرفته است(۲۴). در بررسی های قبلی انجام شده بر روی توالی pbp2b سویه های استرپتوکوکوس پنومونیه در ایران(۱۶) تغییرات صورت گرفته در این pbp با مقاومت به پنی سیلین هم خوانی داشت. در این مطالعه که بر روی تغییرات در pbp2x صورت گرفت علاوه بر همسو بودن تغییرات در pbp2x با کاهش حساسیت پذیری به پنی سیلین، بیشترین میزان تغییرات در pbp2x در سویه های مقاوم به سفوتاکسیم مشاهده گردید. بنابراین می توان pbp2b و pbp2x را شاخص های ایجاد مقاومت اولیه در پنوموکوکها در ایران معرفی نمود. مطالعات قبلی نشان داده است که pbp2b با سفالوسپورین های وسیع الطیف واکنش ندارد (۳۵ و ۳۶) بنابراین می توان با توجه به نتایج ما و نتایج مطالعات قبلی (۲۰و۳۷) pbp2x را شاخصی مهم در ایجاد مقاومت به بتالاکتام ها به ویژه سفالوسپورین ها معرفی نمود. اگر چه شواهدی وجود دارد که تغییرات در pbp ها ناشی از تبادلات نوترکیبی با استرپتوکوک های ویریدانس می باشد اما پی بردن به مکانیسم گسترش مقاومت به بتالاکتام ها در میان استرپتوکوکوس پنومونیه پیچیده می باشد. در هر صورت، واضح است که تبادلات نوترکیبی بین گونه ای و نیز موتاسیون ها در ژنهای کد کننده PBP ها هر دو در گسترش مقاومت در استرپتوکوکوس پنومونیه نقش دارند. در مورد مقاومت بالا به پنی سیلین در میان نمونه های مورد بررسی در این مطالعه (MIC≥4µg/ml) هیچ یک از تغییرات مشاهده شده در PBP2x نمی تواند به عنوان عاملی قطعی در ایجاد مقاومت سطح بالا به پنی سیلین محسوب گردد. بنابراین به نظر می رسد که نیاز به بررسی های مولکولی بیشتری در مورد سویه هایی با مقاومت بالا به پنی سیلین می باشد.

نتیجه گیری

شیوع بالای سویه های مقاوم به بتالاکتام نشان دهنده بحرانی جدی در درمان عفونت های پنوموکوکی می باشد. نتایج ما نشان می دهد که تغییرات درموتیف های متصل شونده به پنی سیلین در PBP2x مرتبط با مقاومت با سفوتاکسیم در استرپتوکوکوس پنومونیه می باشد.

REFERENCES

1. Appelbaum PC. Resistance among Streptococcus pneumoniae: Implications for Drug Selection. Clin Infect Dis. 2002; 34:1613–20.

2. Brown RB, Harwell JI. Drug-Resistant Pneumococcus Clinical Relevance, Therapy, and Prevention. Chest. 2000; 117:530-541.

3. Crook DWM, Spratt BG. Multiple antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae. British Medical Bulletin. 1998; 54: 595-610.

4. Garcia Leoni EM, Cercenado AM. Susceptibility of Streptococcus pneumoniae to penicillin. Clin Infect Dis. 1992; 14: 427-435.

5. Davies TA, He W, Bush K, Flamm RK. Affinity of ceftobiprole for penicillin-binding protein 2b in Streptococcus pneumoniae strains with various susceptibilities to penicillin. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(10): 4510-4512

6. Dowson CG, Coffey TJ, Kell C, Whiley RA. Evolution of penicillin resistance in Streptococcus pneumoniae; the role of Streptococcus mitis in the formation of a low affinity PBP2B in S. pneumoniae. Mol. Microbiol. 1993; 9: 635–643.

7. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M. Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between Streptococcus pneumoniae and Streptococcus oralis. FEMS Microbiol Lett. 1993; 110: 335–340.

8. Potgieter E, Koornhof HJ, Chalkley LJ. Penicillin-binding proteins in Streptococcus mitis. Curr Microbiol. 1992; 24: 289–294.

9. 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.

10. Hakenbeck R, Coyette J. Resistant penicillin-binding proteins. CMLS Cell Mol Life Sci .1998; 54: 332-340.

11. Nichol KA, Adam HJ, Karlowsky JA, Zhanel GG, Hoban DJ. Increasing genetic relatedness of ciprofloxacin-resistant Streptococcus pneumoniae isolated in Canada from 1997 to 2005. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(3):1190-1194.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 8th ed. Approved standard M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009. And Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

13. Llull D, Lopez R, Garcia E. Characteristic signatures of the lytA gene provides a basis for rapid and reliable diagnosis of Streptococcus pneumoniae infections. J Clin Microbiol. 2006; 44(4): 1250-1256.

14. 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: 832–9.

15. Linars J, Alonso T. Decreased susceptibility of penicillin resistant Pneumococci to twenty four betalactam antibiotics. J Antimicrob Chemother. 1992; 30: 279-288.

16. Oskoui M, Nobari S, Rahmati Ghezelgeh F, Shaghaghi B, Amirmozaffari N. Molecular characterization of PBP2b in clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. Iranian J Med. Microbiology. 2010; 4(1): 1-9.

17. Bakhshaee M, Ghazvini K, Naderi HR, Zamanian A, Haghighi J, Boghrabadian M. The prevalence of nasopharyngeal streptococcal pneumonia carriers in Mashhad day care children and their antibiotic resistance pattern. The Iranian Journal of Otorhinolaryngology. 2006; 18(45): 119-126.

18. 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.

19. 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.

20. Coffey TJ, Daniels M, McDougal LK, Dowson CG, Tenover FC, Spratt BG. Genetic analysis of clinical isolates of Streptococcus pneumoniae with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 1306–1313.

21. Chalkley LJ, Schuster C, Potgieter E, Hakenbeck R. Relatedness between Streptococcus pneumoniae and viridans streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin- binding proteins. FEMS Microbiol Lett. 1991; 90: 35–41.

22. 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.

23. Baquero F. Pneumococcal resistance to ß-lactam antibiotics. Microb Drug Resist. 1995; 1: 115–120.

24. Chesnel L, Carapito R, Croizé J, Dideberg O, Vernet T, Zapun A. Identical Penicillin-Binding Domains in Penicillin-Binding Proteins of Streptococcus pneumoniae Clinical Isolates with Different Levels of β-Lactam Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 2895-2902.

25. Coffey TJ, Berron S, Daniels M, Garcia-Leoni ME, Cercenado E, Bouza E, et al. Multiply antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae recovered from Spanish hospitals (1988–1994): novel major clones of serotypes 14, 19F, and 15F. Microbiology. 1996; 142: 2747–2757.

26. Dowson CG, Hutchison A, Branningan JA, et al. 1989. Horizontal transfer of penicillin- binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8842–8846.

27. Laible G, Spratt BG, Hakenbeck R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. Mol Microbiol. 1991; 5: 1993–2002.

28. Mouz N, Gordon E, Di Guilmi AM, Petit I, Petillot Y, Dupont Y, et al. Identification of a structural determinant for resistance to ß-lactam antibiotics in gram-positive bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 13403–13406.

29. Pares S, Mouz N, Pétillot Y, Hakenbeck R, Dideberg O. X-ray structure of Streptococcus pneumoniae PBP2x, a primary penicillin target enzyme. Nat Struct Biol. 1996; 3: 284–9.

30. 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.

31. Chesnel L, Pernot L, Lemaire D, Champelovier D, Croizé J, Dideberg O, et al. The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from Streptococcus pneumoniae further decreases the susceptibility to b-lactams of resistant strains. J Biol Chem. 2003; 278: 44448–44456.

32. Du Plessis M, Bingen E, Klugman KP. Analysis of penicillin binding protein genes of clinical isolates of Streptococcus pneumoniae with reduced susceptibility to amoxicillin. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 2349–2357.

33. Ferroni A, Berche P. Alterations to penicillin-binding proteins 1A, 2B, and 2X amongst penicillin-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae serotype 23F from the nasopharyngeal flora of children. J Med Microbiol. 2001; 50: 828–832.

34. 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: 1273–1280.

35. Contreras-Martel C, Job V, Di Guilmi AM, Vernet T, Dideberg O, Dessen A. Crystal Structure of Penicillin-binding Protein 1a (PBP1a) Reveals a Mutational Hotspot Implicated in b-Lactam Resistance in Streptococcus pneumoniae. J Mol Biol. 2006; 355: 684–696.

36. Hakenbeck R, Tornette S, Adkinson NF. Interaction of nonlytic b-lactams with penicillin-binding proteins in Streptococcus pneumoniae. J Gen Microbiol. 1987; 133: 755–760.

37. Munoz R, Dowson CG, Daniels M, Coffey TJ, Martin C, Hakenbeck R, et al. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. Mol Microbiol. 1992; 6: 2461–2465.