مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره شانزدهم/ زمستان ۹۱/۱۳۹۰-۸۳

ارزیابی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به ماکرولیدها در نموکوک‌های جدا شده از بیمارستان‌های نمازی و شهید فقیهی شیراز

محمد کارگر[۱]، مریم باقرنژاد[۲]، صادق قربانی دالینی[۳]، زهرا هاشمی زاده[۴]

۱- دانشیار ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی ، جهرم، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۷۱۱-۶۴۷۵۶۹۷ mkargar@jia.ac.ir

۲- کارشناس ارشد، ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، جهرم، ایران

۳- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم ، باشگاه پژوهشگران جوان، جهرم، ایران

۴- کارشناس ارشد ،دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه میکروبیولوژی و ویروس شناسی ، شیراز ، ایران

چکیده

زمینه و هدف: دو مکانیسم اصلی مقاومت به ماکرولیدها در باکتری استرپتوکوکوس *نمونیه* متیلاسیون *23S rRNA* و پمپ یونی (افلوکس) می‌باشد. هدف از این پژوهش، ارزیابی مکانیسم‌های مولکولی یاد شده در سویه‌های *استرپتوکوکوس نمونیه* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه شهر شیراز می‌باشد.

روش بررسی: این پژوهش یک بررسی مقطعی-توصیفی است که بر روی ۵۰ سویه استرپتوکوکوس *نمونیه* جدا شده از بیماران بستر در بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های نمازی و شهید فقیهی شیراز از سال ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ انجام شد. در ابتدا کلنی‌های مشکوک با استفاده از تست‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی تعیین هویت مقدماتی شدند. تایید سویه‌های جداسازی شده بر اساس وجود ژن *lytA* انجام گرفت. مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) ارزیابی گردید. ژن‌های مقاومت به ماکرولیدها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ermB* و *mefA* شناسایی گردیدند. سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری مربع کای مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، کلاریترومایسین و آزیترومایسین به ترتیب ۱۸٪، ۴۸٪ و ۴۴٪ بود. از مجموع سویه‌های مورد پژوهش، ۲۵ سویه (۵۰٪) ژن *mefA* و ۲۱ سویه (۴۲٪) ژن *ermB* را داشتند. همچنین ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به اریترومایسین و هر دو ژن *ermB* و *mefA* وجود داشت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که غالب‌ترین مکانیسم مقاومت به ماکرولیدها در این منطقه ژن *mefA* می‌باشد. همچنین ضرورت توجه به الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در رژیم‌های درمانی به دلیل افزایش مقاومت به ماکرولیدها وجود دارد.

کلید واژه‌ها: *استرپتوکوکوس نمونیه*، ماکرولیدها، *mefA*، *ermB*

وصول مقاله: ۹۰/۱/۲۱ اصلاحیه نهایی: ۹۰/۶/۲۷ پذیرش مقاله: ۹۰/۷/۲۸

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه (پنوموکوک) مهم‌ترین پاتوژن ایجادکننده عفونت حاد گوش میانی، ذات الریه و شایع‌ترین ارگانیسم ایجادکننده عفونت‌های تهاجمی مانند گندخون (سپسیس) و منتژیت و همچنین اندوکاردیت، پری‌کاردیت و آبسه‌های مغزی می‌باشد (۱). عواملی مانند گروه سنی کمتر از دو سال و بالاتر از ۶۵ سال، جنسیت، کشیدن سیگار، اعتیاد به الکل، مدت بستری شدن در بیمارستان، نقص سیستم ایمنی و بیماری‌های قلبی با افزایش خطر عفونت‌های تهاجمی نموکوکی همراه می‌باشد (۳ و۲). تا قبل از پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمام سویه‌های *استرپتوکوکوس*

Archive of SID

www.SID.ir

پنومونیه حساس به پنی‌سیلین بودند. با ایجاد و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی درمان این باکتری نیز تغییر یافت و آنتی‌بیوتیک‌های دیگری مانند سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها، فلوروکینولون‌ها و ماکرولیدها جایگزین آن شدند. ماکرولیدها به ویژه اریترومایسین، از مهم‌ترین داروهای مورد استفاده در درمان عفونت‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* می‌باشند (۵ و۴). ماکرولیدها محصول متابولیسم ثانویه بسیاری از گونه‌های *اکتینومیست* هستند. اریترومایسین، آنتی‌بیوتیک شاخص این گروه می‌باشد که از یک حلقه لاکتون متصل به دو قند دیسوسامین (Dysosamin) و کلادینوز (Cladinose) تشکیل شده است. ماکرولیدهای دیگر از اریترومایسین مشتق شده‌اند و شامل کلاریترومایسین، آزیترومایسین، دیریترومایسین (Dirithromycin) و رکسیترومایسین (Roxithromycin) هستند. با ایجاد تغیرات ساختاری در اریترومایسین، گستره کینتیکی دارو و تحمل آن بهبود یافته است، اما با این وجود هنوز مقاومت مشترک (Cross resistance) بین اعضای این گروه مشاهده می شود. ماکرولیدها مراحل اولیه پروتئین سازی را متوقف می کنند (۶).

با اهمیت‌ترین مسأله در درمان عفونت‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. پژوهش‌های اخیر روال رو به رشد مقاومت به ماکرولیدها به ویژه اریترومایسین در نقاط مختلف دنیا را نشان می‌دهد (۸ و۷ و۳). در استرپتوکوکوس پنومونیه مقاومت به ماکرولیدها به واسطه دو مکانیسم اصلی ایجاد می‌گردد. اولین مکانیسم، متیلاسیون آدنین در ناحیه بسیار حفاظت شده ۲۰۵۸ در لوپ پپتیدیل ترانسفراز در دومین V 23S rRNA است. آنزیم متیلاز عامل متیلاسیون در این منطقه است که توسط ژن *ermB* کد می‌شود و موجب مقاومت مشترک به ماکرولیدها، لینکوزآمیدها و استرپتوگرامین B (فنوتیپ MLSB) می گردد. این فنوتیپ با مقاومت بالا به تمام این آنتی بیوتیک‌ها همراه می‌باشد. ژن‌های *erm*، استرپتوکوکوس *نمونیه* در بسیاری از ترانسپوزون ها شناسایی شده است. در نتیجه امکان انتقال این ژن‌ها از طریق ترانسفورماسیون (transformation) و یا هم‌یوغی (conjugation) وجود دارد (۹ و۶). یکی دیگر از مکانیسم‌های اصلی مقاومت به ماکرولیدها در *استرپتوکوکوس* پنومونیه پمپ یونی (Efflux) است. در باکتری‌ها ناقل‌های غشایی متعددی وجود دارد که تسهیل کننده خروج داروهای گوناگون به ویژه بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، از درون سلول به محیط است. ممکن است ناقل‌های یاد شده، یک داروی خاص یا در طیف وسیع‌تر به دلیل ماهیت هیدروفوبیک‌شان چند داروی خاص را انتقال دهند. با این که نقش اصلی ناقل‌های غشایی، محافظت باکتری‌ها از سموم خارجی و انتقال متابولیت‌های طبیعی سلول است، اما اهمیت کلینیکی آن‌ها ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌های پاتوژن می‌باشد (۱۰). در ابتدا ژن کد کننده پمپ یونی در نموکوک‌ها *mefE* و سپس *mefA* نامیده شدند. دلیل این تغییر نام ارتباط بسیار نزدیک‌شان با ژن *mefA* باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنس* بود. پمپ‌های یونی از دوازده بخش (domain) تشکیل شده‌اند که از عرض غشای سیتوپلاسمی عبور نموده و در ایجاد انرژی و نیروی محرکه پروتونی دخالت دارند. پمپ یونی *mefA* سوبستراهای متعددی مانند اریترومایسین و مشتقات آن مانند آزیترومایسین را دارد (۱۱و۶). هدف از این پژوهش، تعیین میزان شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی مکانیسم مقاومت به ماکرولیدها در سویه‌های *استرپتوکوکوس نمونیه* جدا شده از بخش مراقبت‌های

Archive of SID

www.SID.ir

ویژه (ICU) بیمارستان‌های نمازی و شهید فقیهی شهر شیراز می‌باشد.

روش بررسی

این پژوهش به صورت مقطعی (توصیفی- تحلیلی)، بر روی تمامی سویه‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* (۵۰ سویه) جدا شده از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه (ICU) بیمارستان‌های نمازی و شهید فقیهی شیراز از بهمن ماه ۱۳۸۸ تا بهمن ماه ۱۳۸۹ به مدت یک سال انجام گردید. در تمامی موارد داده‌های مربوط به سن، جنس، نوع نمونه و مدت بستری شدن در بیمارستان در پرسشنامه تنظیمی ثبت گردید. این بیماران به خاطر عفونت‌هایی مانند ذات الریه، باکتریمی و مننژیت در این بخش‌ها بستری شده بودند. نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل مایع مغزی نخاعی (CSF)، خلط، خون، گلو و مایع ششی بودند. به منظور کشت *استرپتوکوکوس پنومونیه* نمونه‌ها بر روی محیط blood agar حاوی ۵٪ خون گوسفند و سپس محیط انتخابی شکلات آگار واجد ۵ میکروگرم در لیتر جنتامیسین کشت و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ۵٪ CO_2 گرمخانه‌گذاری گردید.

شناسایی مقدماتی کلنی‌های رشد یافته با استفاده از مشخصات کلنی، کاتالاز، همولیز آلفا در شرایط هوازی، دیپلوکوک‌های لانست شکل در رنگ‌آمیزی گرم، ارزیابی نمولیزین در شرایط بی‌هوازی، حساسیت به اپتچین و حلالیت در صفرا انجام شد. سپس کشت خالص سویه‌های تایید شده تا قبل از انجام آزمون‌های مولکولی در محیط واجد گویچه‌های شیشه‌ای واجد گلیسرول در حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی گردیدند. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت DNP^{TM} شرکت سیناژن انجام شد. یکی از ویژگی‌های تمامی سویه‌های نموکوک، داشتن ژن بیماری‌زایی به نام *lytA* است که مسئول متلاشی کردن باکتری می‌باشد (۲و۱). به منظور تکثیر ژن *lytA* و تایید سویه‌های جدا شده آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F : 5'- CAACCGTACAGAATGAAGCGG-3 و -'5 : R[1] انجام شد (۱۲ و ۱۳). از پرایمرهای اختصاصی F: 5'- CGTACCTTGGATATTCACCG-3' و R:5'GTAAACAGTTGACGATATTCTCG-3' برای تکثیر یک قطعه ۲۲۴ جفت بازی به منظور شناسایی ژن *ermB* و از پرایمرهای اختصاصی F: 5'- CTGTATGGAGCTACCTGTCTGG-3' و R: 5'-CCCAGCTTAGGTATACGTAC-3' برای تکثیر یک آمپلیکون ۲۹۴ جفت بازی به منظور شناسایی ژن *mefA* استفاده شد (۱۴). روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra) با شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (Hot start) و در ادامه ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (Denaturation)، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (Annealing) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه (Extension) و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای این منظور ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میلی مولار) و ۱۶/۷ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. در مرحله آخر ۱۰ میکرولیتر محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ترانس الیمیناتور مورد بررسی قرار گرفت.

پس از شناسایی و تایید هویت کلنی‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد CLSI انجام گردید. میزان حساسیت کلنی‌ها به

[1]- TTATTCGTGCAATACTCGTGCG-3'

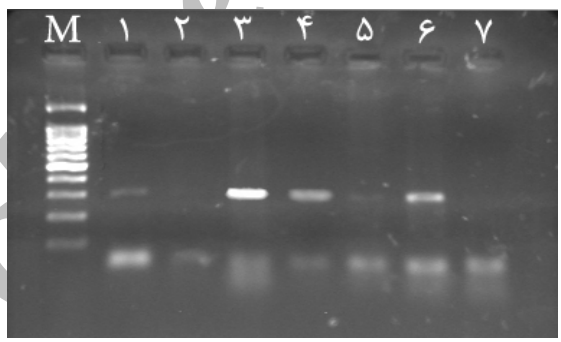
Archive of SID

www.SID.ir

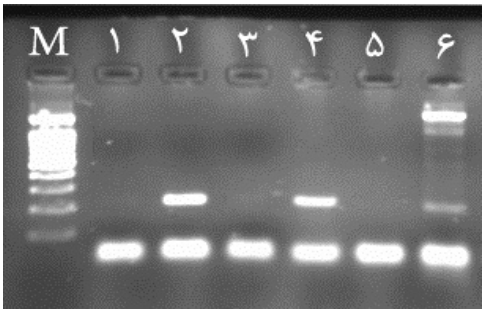
آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین (۱۵µg)، کلاریترومایسین (۱۵µg) و آزیترومایسین (۱۵µg) با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده رشد با توجه به دستور شرکت سازنده دیسک (Himedia, India) ارزیابی شد. سپس داده‌های بدست آمده با استفاده از نسخه چهاردهم نرم افزار SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL.) و مربع کای، در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ تحلیل شدند.

یافته‌ها

از ۵۰ سویه پنوموکوک مورد پژوهش ۳۸ مورد (۷۶٪) از جنس مذکر با محدوده سنی ۲۰ روز تا ۷۴ سال و میانگین سنی ۳۵ سال و ۱۲ مورد (۲۴٪) از جنس مونث با محدوده سنی ۱۳ روز تا ۸۷ سال با میانگین سنی ۳۶ سال جداسازی گردید. بیشتر بیماران در گروه‌های سنی ۲۰ تا ۳۰ و ۳۰ تا ۴۰ سال (هر دو ۶۰٪) و کمترین آن‌ها در گروه سنی ۷۰ تا ۸۰ سال (۴٪) قرار داشتند. مدت زمان بستری در بیمارستان در جنس مذکر ۶ تا ۷۴ روز با میانگین ۲۶ روز و در جنس مونث ۷ تا ۸۷ روز با میانگین ۲۶ روز بود. ژن *lytA* در تمامی سویه‌های مورد پژوهش (۱۰۰٪) شناسایی گردید (شکل ۱). با روش استاندارد دیسک دیفیوژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، کلاریترومایسین و آزیترومایسین به ترتیب ۱۸٪، ۴۸٪ و ۴۴٪ شناسایی گردید. از مجموع سویه‌های *استرپتوکوکوس* پنومونیه جدا شده، در ۲۵ سویه (۵۰٪) ژن *mefA* و در ۲۱ سویه (۴۲٪) ژن *ermB* شناسایی گردید (شکل ۲). فراوانی انواع ژنوتیپ‌های مقاومت به ماکرولیدها در نمونه‌های مورد پژوهش در جدول ۱ نشان داده شده است. با آزمون آماری مربع کای مشخص گردید که بین مقاومت به اریترومایسین و ژن‌های *ermB* و *mefA* ارتباط معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب $p<۰/۰۰۲$ و $p<۰/۰۱۴$) (جدول ۲).



شکل ۱ : قطعات ۲۹۵ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *lytA* . ۱) کنترل مثبت، ۲) کنترل منفی، ۳-۶ نمونه‌های مثبت و M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی



شکل ۲ : قطعات ۲۲۴ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *ermB*. ۱) کنترل منفی، ۲) کنترل مثبت، ۳ و ۵) نمونه منفی، ۴ و ۶) نمونه های مثبت و M) سایز مارکر ۱۰۰bp

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: فراوانی و نسبت درصد ژنوتایپ‌های استرپتوکوکوس نمونه‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی

ژنوتایپ	*mefA-/ermB-* تعداد (٪)	*mefA+/ermB+* تعداد (٪)	*mefA-/ermB+* تعداد (٪)	*mefA+/ermB-* تعداد (٪)	جمع کل تعداد (٪)
مایع مغزی-نخاعی	۳ (٪۶)	۳ (٪۶)	۲ (٪۴)	۳ (٪۶)	۱۱ (٪۲۲)
خلط	۱۴ (٪۲۸)	۱۰ (٪۲۰)	۳ (٪۶)	۷ (٪۱۴)	۳۴ (٪۶۸)
خون	۱ (٪۲)	۱ (٪۲)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۲ (٪۴)
گلو	۱ (٪۲)	۰ (٪۰)	۱ (٪۲)	۰ (٪۰)	۲ (٪۴)
مایع ششی	۰ (٪۰)	۱ (٪۲)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۱ (٪۲)
جمع	۱۹ (٪۳۸)	۱۵ (٪۳۰)	۶ (٪۱۲)	۱۰ (٪۲۰)	۵۰ (٪۱۰۰)

جدول ۲: فراوانی ژن‌های مقاومت در سویه‌های حساس و مقاوم به اریترومایسین (n=۵۰)

مکانیسم مقاومت	اریترومایسین		مجموع
	مقاوم	حساس	
mefA+	۱۷ (۳۴)**	۸ (۱۶)	۲۵ (۵۰)
mefA-	۵ (۱۰)	۲۰ (۴۰)	۲۵ (۵۰)
ermB+	۱۶ (۳۲)**	۵ (۱۰)	۲۱ (۴۲)
ermB-	۶ (۱۲)	۲۳ (۴۶)	۲۹ (۵۸)
mefA+/ermB+	۱۲ (۲۴)	۳ (۶)	۱۵ (۳۰)
mefA-/ermB-	۱ (۲)	۱۲ (۲۴)	۱۳ (۲۶)

**ارتباط معنی دار

بحث

مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استرپتوکوکوس پنومونیه* یکی از مسائل مهم کلینیکی مورد توجه از دهه‌ی ۱۹۸۰ تا کنون بوده است. در سه دهه‌ی گذشته میزان مقاومت به پنی‌سیلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و غیر بتالاکتام در بسیاری از مناطق دنیا به سرعت افزایش یافته است. الگوی مقاومت *استرپتوکوکوس پنومونیه* در جوامع مختلف متفاوت است و این مسأله مشکلات زیادی را برای درمان عفونت‌های این باکتری ایجاد کرده است (۱۵).

ماکرولیدها به ویژه اریترومایسین، از داروهای مهم مورد استفاده در درمان عفونت‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* هستند. در دو دهه‌ی گذشته، مقاومت به ماکرولیدها در این باکتری اهمیت اپیدمیولوژیکی زیادی در مناطق مختلف دنیا داشته است. اولین مورد مقاومت به اریترومایسین در *استرپتوکوکوس پنومونیه*، در سال ۱۹۶۷ در آمریکا شناسایی شد. پس از آن موارد متعددی در کشورهای مختلف گزارش گردید. در سال ۱۹۸۴ در فرانسه میزان مقاومت به اریترومایسین در پنوموکوک به ۲۰٪ رسید. این وضعیت چند سال قبل از پیدایش و گسترش مقاومت به پنی‌سیلین در *استرپتوکوکوس پنومونیه* گزارش شده بود. بر اساس گزارش‌های اپیدمیولوژی کشورهای آسیایی، کشورهای اروپای غربی، افریقای جنوبی، آمریکای جنوبی و بخش‌های جنوبی آمریکا به عنوان مناطق بحرانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استرپتوکوکوس پنومونیه*

Archive of SID
www.SID.ir

در نظر گرفته می‌شود. با این وجود افزایش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری یک پدیده جهانی است. اطلاعات مستند در مورد میزان مقاومت در کشورهای آسیایی در سال‌های اخیر هشدار دهنده است (۱۸-۱۶). Song و همکاران با ارزیابی میزان شیوع مقاومت به ماکرولیدها در ده کشور آسیایی مختلف گزارش نمودند که از ۵۵۵ جدایه *استرپتوکوکوس پنومونیه* ، ۲۱۶ سویه (۳۸/۹٪) حساس، ۱۰ سویه (۱/۸٪) نیمه حساس و ۳۲۹ سویه (۵۹/۳٪) مقاوم به اریترومایسین می‌باشند. بیشترین میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک مربوط به کشورهای ویتنام (۸۸/۳٪)، تایوان (۸۷/۲٪)، کره (۸۵/۱٪)، هنگ‌کنگ (۷۶/۵٪) و چین (۷۵/۶٪) و کمترین میزان مقاومت مربوط به کشورهای هند (۱/۵٪) و سریلانکا (۱۰/۳٪) گزارش گردید (۱۹ و ۲۰). متوسط میزان مقاومت در کشورهای اروپایی ۱۷/۲٪ می‌باشد. بیشترین میزان مقاومت به ترتیب در فرانسه (۵۸/۱٪)، اسپانیا (۵۷/۱٪)، ایتالیا (۳۱/۴ ٪)، بلژیک (۲۳/۶٪)، فنلاند (۲۱/۵٪) و روسیه (۱۹٪) گزارش شده است. میزان مقاومت به اریترومایسین در کشورهای لهستان، یونان و پرتغال بیش از ۲۰ درصد است، اما این میزان در آلمان و سوئیس کمتر می‌باشد (۲۱-۱۴). از دهۀ ۱۹۹۰ به بعد مقاومت به اریترومایسین در آمریکا رو به افزایش بوده است. بیشترین میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک ۴۷٪ و مربوط به مناطق جنوب شرقی آمریکا شامل کنتاکی، تنسی، آلاباما و میسیسیپی است (۲۳). نتایج ما در این پژوهش نشان داد که میزان مقاومت به ماکرولیدها بین ۱۸٪ تا ۴۸٪ متفاوت است. نکته شایان توجه در این پژوهش، مقاومت سویه‌های مقاوم به ماکرولیدهای آزیترومایسین و کلاریترومایسین به‌صورت هم‌زمان بود. این مسأله خطر شیوع عفونت بیمارستانی و اهمیت پایش سویه‌های یاد شده را نشان می‌دهد.

با توجه به افزایش قابل توجه مقاومت به ماکرولیدها، بررسی مکانیسم‌های مقاومت در مورد این آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه اریترومایسین حائز اهمیت است. پمپ یونی (افلوکس) در سویه‌های مقاوم به ماکرولیدها غالب‌ترین مکانیسم ایجاد مقاومت در شمال آمریکا می‌باشد در حالی که متیلاسیون ژن *ermB* در بیش از ۸۰ درصد سویه‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* جدا شده در اکثر کشورهای اروپایی دیده می‌شود (۲۳). در سال ۲۰۰۷، Calatuyud و همکاران در اسپانیا، مکانیسم مقاومت در ۱۲۵ سویه مقاوم به اریترومایسین را بررسی کردند. از این سویه‌ها، ۱۰۹ سویه (۸۷/۲٪) فنوتیپ MLSB داشتند. ژن *ermB* در ۱۰۳ سویه، ژن *mefA* در ۱۴ سویه و ژن *mefB* در ۲ سویه شناسایی شد . همچنین ژن *ermB* و *mefA* به طور هم‌زمان در ۶ سویه وجود داشت (۲۴).

در سال ۲۰۰۷، Linden و همکاران در آلمان شیوع و مکانیسم مقاومت به اریترومایسین را در ۳۸۴۰ سویه بررسی کردند. از مجموع سویه‌های یاد شده، ۴۳۰ سویه مقاوم به اریترومایسین بودند که ژن *ermB* در ۳۵/۶٪ و ژن *mefA* در ۶۳/۵٪ از سویه‌ها شناسایی گردید (۲۵). در سال ۲۰۰۵، Rantala و همکارانش در فنلاند شیوع و مکانیسم مقاومت به ماکرولیدها را در بین ۱۰۰۷ سویه *استرپتوکوکوس پنومونیه* بررسی کردند. در بین سویه‌های مقاوم، ژن *mefA* در ۱۲ سویه (۶٪) و ژن *ermB* در ۹۰ سویه (۴۱٪) شناسایی گردید (۲۰). همچنین Reinert و همکاران در سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ در روسیه فراوانی ژن *ermB* را ۵۰٪ گزارش نمودند (۲۱). در سال ۲۰۰۵ Wierzbowskiو

Archive of SID

www.SID.ir

همکارانش در کانادا با بررسی ۱۴۰ سویه مقاوم به ماکرولیدها ژن *mefA* را در ۷ سویه (۵٪) شناسایی نمودند (۲۶).

در سال ۲۰۰۷، Harimaya و همکاران در ژاپن در ۱۵۶ سویه *استرپتوکوکوس پنومونیه* جدا شده از نمونه‌های بالینی، ۲۷ سویه (۱۷/۳٪) حساس، ۶ سویه (۳/۹٪) نیمه حساس و ۱۲۳ سویه (۷۸/۹٪) مقاوم به اریترومایسین شناسایی نمودند که ژن *mefA* در ۵۹ سویه (۳۷/۸٪) و ژن *ermB* در ۸۹ سویه (۵۷/۱٪) تشخیص داده شد (۲۷). در سال ۲۰۰۸، Reinert و همکاران در آلمان مکانیسم مقاومت به ماکرولید ها را در ۷۶ سویه مقاوم به اریترومایسین مورد بررسی قرار دادند. هر کدام از ژن‌های *ermB* و *mefA* به‌ترتیب در ۵۰٪ و ۱۹/۷٪ از سویه‌های مقاوم و هر دو این ژن‌ها در ۳۰/۳٪ از سویه‌ها شناسایی گردید (۲۸). در سال ۲۰۰۸، Gulay و همکارانش در ترکیه با بررسی ۱۵۱ سویه پنوموکوک در ۴۰ سویه (۲۶/۴٪) مقاومت به اریترومایسین را شناسایی نمودند. همچنین فراوانی شناسایی ژن‌های *ermB* و *mefA* به ترتیب ۹۵٪ و ۵٪ گزارش نمودند (۲۹).

همچنین Song و همکاران با بررسی مکانیسم مقاومت به اریترومایسین در ۳۲۹ سویه کلینیکی مقاوم به اریترومایسین، ژن *ermB* در ۱۵۷ سویه (۴۷/۷٪) و ژن *mefA* در ۱۰۱ سویه (۳۰/۷٪) و در ۷۱ سویه (۲۱/۶٪) هر دو ژن *ermB* و *mefA* را شناسایی نمودند. شیوع ژن *ermB* در کره (۴۰٪)، هنگ کنگ (۲۴/۴٪)، ویتنام (۴۵/۳٪)، مالزی (۱۴/۳٪)، سنگاپور (۴۴/۴٪)، سریلانکا (۷۵٪)، تایوان (۷۰/۷٪)، تایلند (۲۸/۶٪) و چین (۷۶/۹٪) گزارش شده است. میزان شیوع ژن مقاومت *mefA* در کره (۲۱/۱٪)، هنگ کنگ (۶۶/۷٪)، ویتنام (۵/۷٪)، مالزی (۶۴/۳٪)، سنگاپور (۵۵/۶٪)، سریلانکا (۲۵٪)، تایوان (۲۹/۳٪)، تایلند (۷۱/۴٪) و چین (۳/۱٪) شناسایی شده است (۱۹).

نتایج ما در این پژوهش نشان داد که ۲۵ سویه (۵۰٪) دارای ژن *mefA* و ۲۵ سویه (۵۰٪) فاقد این ژن می‌باشند. همچنین ۲۱ سویه (۴۲٪) دارای ژن *ermB* و ۲۹ سویه (۵۸٪) فاقد این ژن بودند. به این ترتیب به نظر می‌رسد که شیوع سویه‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* واجد ژن *mefA* در ایران مانند برخی از کشورهای آسیایی مانند مالزی و فیلیپین بیشتر از ژن *ermB* باشد. اما به طور میانگین میزان شیوع ژن *ermB* در کشورهای آسیایی مانند چین (۷۶.۹٪)، سریلانکا (۷۵٪) و تایوان (۷۰.۷٪) نسبت به ژن *mefA* زیادتر است. نکته قابل توجه این پژوهش، شیوع قابل توجه مقاومت به ماکرولیدها در افراد بستری شده در بخش مراقبت‌های ویژه بود. فراوانی و انتشار قابل ملاحظه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط حساس بیمارستان، می‌تواند زمینه‌ساز شیوع عفونت‌های بیمارستانی مقاوم در برابر دارو باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش فراوانی سویه‌های مقاوم چند دارویی را در منطقه مورد پژوهش نشان می‌دهد. این میزان مقاومت می‌تواند اثرات زیادی را بر کارایی رژیم‌های درمانی متداول داشته باشد. فراوانی سویه‌های مقاوم می‌تواند موجب انتخاب و تنوع بیشتر سویه‌های جهش یافته و بروز مقاومت ثانویه نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به دنبال داشته باشد. از این رو با توجه به ظهور سویه‌های مقاوم چند دارویی، تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی به ویژه در مورد بیماران پرخطر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به نتایج به

Archive of SID

www.SID.ir

دست آمده به نظر می‌رسد که مهم‌ترین مکانیسم مقاومت در مورد ماکرولیدها در منطقه مورد پژوهش ژن *mefA* باشد که متفاوت از مکانیسم متداول در بین اکثر کشورهای آسیایی و اروپایی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی در انجام این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Ghasemi A, Namaki S, Mirshafiey A. *S pneumoniae*. J of Chinese Clin Mid 2009;4:1-8.
2. Laval CB, de Andrade AL, Pimenta FC, de Andrade JG, de Oliveira RM, Saliva SA, and et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *S. pneumoniae* in Brazilian children in the era of *Pneumococcal* vaccines . Clin Microbiol Infect 2006;12:50-55.
3. Ozdemir B, Beyazova U, Camurdan AD, Sultan N, Ozkan S, and Sahin F. Nasopharyngeal of carriage of *S. pneumoniae* in healthy Turkish infant. J Infect 2008;56:332-9.
4. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. CID 2003;36:11-23.
5. Leclerq R, and Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae* .Antimicrob Agents and Chemother 2002;46:2727-2734.
6. Gaynor M, and Mankin AS. Macrolide antibiotics: binding site mechanism of action, resistance. Frontiers in Medical Chemistry 2005;2:21-35.
7. Reinert RR, Filimonova OY, Al-Lahham A, Grudinina SA, Ilina EN, Weigel LM and et al. Mechanisms of macrolide resistance among *streptococcus pneumonia* isolates from Russia. Antimicrob Agents and Chemother 2008;52:2260–2262.
8. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Gime´nez MJ, Aragoneses-Fenoll L, and Hanquet G. Temporal trends of invasive *streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. J Clin Microbiol 2009;47:1012–1020.
9. Hermann T. Drugs targeting the ribosome. Current Opinion in Structural Biology 2005:15: 335-366.
10. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev 2006;19:382-402.
11. Vestera B, and Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents and Chemotherapy 2001;45:1-12.
12. Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies TA, Jacobs MR, Ubukata K and et al. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolated and beta- lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2001;48:915-918.
13. Fukushima KY, Yanagihara K, Hirakata Y, Sugahara K, Morinaga Y, Kohno S and et al. Rapid identification of penicillin resistance genes and simultaneous quantification of *Streptococcus pneumoniae* in purulent sputum samples by us of a novel real-time multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2008;46:2384–2388.
14. Pedrosa EG, Morosini MI, Linden M, Garbajosa PR, Galan JC, Baquero F, and et al. Polyclonal population structure of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain carrying *mefA* and *mefB* plus *erm(B)* . Antimicrob Agent and Chemother 2008;6:1964-1969.
15. Deasy J. Antibiotic resistance: the ongoing challenge for effective drug therapy. JAPPA 2009;22:18-22.

Archive of SID
www.SID.ir

16. Lynch JP, and Zhanel GG. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors evolution of antimicrobial resistance and impact of vaccines. Curr Opin Plum 2010;16:217-225.
17. Levy SB, and Marshal B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Medicine 2004;12:122-127.
18. Bari SB, Mahjan BM, and Surana SJ. Resistance to antibiotic: a challenge in chemotherapy. Ind J Pharm Edu and Res 2008;42:3-11.
19. Song JH, Chang HH, Suh JY, Ko KK, Jung SI, Oh WS, and et al . Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian network for surveillance of resistance pathogens(ANSORP). J Antimicrob Chemother 2004;53:457-463.
20. Bisht R, Katiyar A, Singh R, and Mittal P. Antibiotic resistance –A global issue of concern. Asian J Pharm and Clin Res 2009;2:34-39.
21. Reinert RR, Reinert S, Linden M, Cli MY, Al-Lahham A, and Appelbaum P. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003 . Antimicrob Agents Chemother 2005;7:2903-2913.
22. Rantala M, Huikko S, Huovien P, and Jalava J. Prevalence and molecular genetics of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated collected in Finland in 2002. Antimicrob Agent and Chemotherapy 2005;46:371-377.
23. Jenkins SG, Brown SD, and Farrel DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US years 1-4. Annals of Clin Microbiol and Antimicrob 2008;7:1-11.
24. Calatayud L, Ardanuy C, Cercenado E, Fenoll A, Bouza E, Pallares R, and et al. Serotype, clones and mechanisms of resistance of erythromycin resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated collected in Spain. Antimicrob Agent and Chemother 2007;51:3240-3246.
25. Linden M, Al-Lahham A, Haupts S, and Reinert R. Clonal spread of mef-positive macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated causing invasive disease in adults in Germany. Antimicrob Agent and Chemother 2007;51:1830-1834.
26. Wierzbowski AK, Swedlo D, Boyd D, Mulvey M, Nichol KA, HobanDJ, and et al. Molecular epidemiology and prevalence of macrolide efflux genes *mef(A*) and *mef(E)* in *Streptococcus pneumoniae* obtained in Canada from 1997 to 2002. Antimicrob Agent and Chemother 2005;49:1257-1261.
27. Harimaya A, Yokota S, Sato K, Yamazaki N, Himi T, and Fujii N. High prevalence of erythromycin resistance and macrolide-resistance genes, *mefA* and *ermB*, in *Streptococcus pneumoniae* isolates from the upper respiratory tracts of children in Sapporo district, Japan. J Infec and Chemother 2007;13:219-223.
28. Reinert RR, Wild A, Appelbaum P, Lutticken R, Cil MY, and Al-Lahham A. Ribosomal mutations conferring resistance to macrolides in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolated in Germany. Antimicrob Agent and Chemother 2003;47:2319-2322.
29. Gulay Z, Ozbek OA, Bicmen M, and Gur D. Macrolide resistant determinants in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae.* Jpn J Infect Dis 2008;61:490-493.

Archive of SID
www.SID.ir