بررسی مولکولی مقاومت القایی به کلیندامایسین در سویه های استافیلوکوکوس جدا شده از بیماران بستری

شادیه عبد اللهی [۱]، رشید رمضانزاده [۲]*، زهرا دیلمی خیابانی [۱]، عنایت ا.. کلانتر [۳]، شاهو منبری [۳]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران [۲] مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران [۳] گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۳۱۰۴۴۲۴ فاکس: ۰۸۷۱۶۶۶۴۶۷۴ E-mail: atrop_t51@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B (MLS_B) در درمان عفونت های استافیلوکوکی استفاده می‌شوند. این داروها سنتز پروتئین را با اتصال به 23SrRNA مهار می کنند. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی مقاومت القایی به کلیندامایسین در سویه های استافیلوکوکوس جداشده از نمونه های بالینی است.

روش کار: در کل ۲۰۰ نمونه استافیلوکوکوس از بینی و حلق بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه و عفونی بیمارستان های توحید و بعثت سنندج جمع آوری شد. حساسیت آنتی میکروبی با روش دیسک دیفیوژن، مقاومت به متی‌سیلین با روش Screen Agar و بررسی فنوتیپی مقاومت القایی با روش D-Test ارزیابی شد. همچنین جهت اثبات ژنهای *erm (A, B, C, TR)* یک multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

یافته ها: در بررسی ۲۰۰ نمونه، MRSA ۱۸/۵٪ و MRCNS ۳۲٪ به دست آمد. در کل از ۸۰ نمونه بالینی (۴۸ استافیلوکوکوس کواگولاز منفی و ۳۲ استافیلوکوکوس اورئوس) استافیلوکوکوس مقاوم به اریترومایسین جدا شد. از ۴۸ ایزوله استافیلوکوک کواگولاز منفی (*CONS*) مقاوم به اریترومایسین، $iMLS_B$ ۱۱/۶۳٪ *ermA* ۵/۴۱٪ *ermB* ۵/۴۱٪ *ermC* ۳/۱۳٪ و *ermTR* ۰٪ به دست آمد. از ۳۲ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومایسین، $iMLS_B$ ۹/۳۸٪ *ermA*، *ermB*، *ermC* و *ermTR* هر کدام ۲/۲۲٪ به دست آمد.

نتیجه گیری: این مطاالعه برای اولین بار وجود ژن *erm* و مقاومت القایی به کلیندامایسین را در نمونه های بالینی جدا شده از بیماران در سنندج نشان می‌دهد و همچنین فراوانی ژن های *erm* در سویه های *CONS* نسبت به *S. aureus* بالا بود که نشان دهنده انتقال ژن توسط سویه های غیر بیماری زا به سویه های بیماری زا می باشد. لذا توصیه می‌شود برنامه های کنترلی و پیشگیری مداوم جهت ایجاد سویه مقاوم انجام شود.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، کلیندامایسین، D-Test

دریافت: ۹۰/۸/۲۵ **پذیرش:** ۹۱/۹/۲۶

مقدمه

گروهی از آنتی بیوتیک‌ها شامل ماکرولید، لینکوزامید و استرپتوگرامین B هستند که به آنها آنتی بیوتیک‌های گروه MLS_B[1] می‌گویند. این گروه از داروها ساختارهای متفاوتی با هم دارند اما عملکرد یکسانی را در مقابل باکتری ایفا می‌کنند به طوری که سنتز پروتئین باکتری را از طریق اتصال به 23SrRNA مهار می‌کنند. در بین این گروه از داروها، کلیندامایسین داروی منتخب در درمان عفونت های پوستی و بافت نرم ایجاد شده توسط استافیلوکوک های حساس و مقاوم به متی سیلین

[1] Macrolides, Lincosamides and StreptograminB

www.SID.ir

می باشد. اما استفاده مکرر از این دارو سبب افزایش مقاومت به ویژه مقاومت القایی و به دنبال آن شکست درمان با کلیندامایسین می‌شود [۳-۱].

افزایش مکرر عفونت های استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین MRSA و الگوهای تغییر یافته در مقاومت های ضد میکروبی منجر به استفاده از آنتی بیوتیک های ماکرولید- لینکوزامید- استرپتوگرامین B (MLS_B) در درمان این عفونت ها شده است. اما استفاده گسترده از این آنتی بیوتیک ها منجر به افزایش تعداد سویه های استافیلوکوکوس مقاوم به آنتی بیوتیک های MLSB شده است [۳-۱].

به طور کلی سه مکانیسم مقاومتی تغییر سایت هدف ریبوزومی، افلوکس پمپ و غیر فعال سازی آنزیمی آنتی بیوتیک ممکن است سبب مقاومت باکتریایی به این گروه از داروها شوند [۳-۲]. شایع ترین مکانیسم مقاومتی تغییر سایت هدف ریبوزومی است که توسط ژن های *erm* (erythromycin ribosome methylase) اتفاق می‌افتد که با تولید آنزیم های متیلاز سبب متیلاسیون یا موتاسیون 23SrRNA شده در نتیجه از اتصال آنتی بیوتیک به جایگاه ریبوزومی خود ممانعت می‌کند و از این طریق مقاومت های متقابلی بین ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B ایجاد می‌کند، بنابراین به آن فنوتیپ MLS_B می گویند. چهار وریته از ژن های *erm* شامل *ermA*، *ermB*، *ermC* و *ermF* شناخته شده اند که می‌توانند مقاومت‌های دایمی ($cMLS_B$)[1] و القایی ($iMLS_B$)[2] را نسبت به داروهای MLS_B ایجاد کنند [٤].

مقاومتهای دایمی $cMLS_B$ نوعی از مقاومت است که در آن متیلازهای mRNA بدون نیاز به القا کننده تولید می‌شوند و سویه هایی که مقاومت دایمی پیدا می‌کنند به تمامی ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B مقاومت پیدا می‌کنند، اما در مقاومت القایی $iMLS_B$ متیلازهای mRNA فقط در حضور یک ماکرولید القا کننده تولید می‌شوند در این نوع مقاومت اریترومایسین به عنوان یک عامل القاکننده تولید متیلاز عمل کرده و به این ترتیب می‌تواند سبب القا مقاومت در کلیندامایسین شود. در شرایط Invitro سویه های دارای مقاومت القایی نسبت به اریترومایسین مقاومت و نسبت به کلیندامایسین حساسیت را نشان می‌دهند، اما همانطور که قبلاً ذکر شد درمان با کلیندامایسین در این شرایط با شکست مواجه می‌شود [۶-۵].

مکانیسم دوم توسط ژن *msrA* اتفاق می افتد که سبب ایجاد مقاومت در ماکرولید و استرپتوگرامین B می‌شود در نتیجه به آن فنوتیپ M یا MS می‌گویند و مثل فنوتیپ MLS_B در شرایط Invitro به اریترومایسین مقاومت و به کلیندامایسین حساسیت را نشان می‌دهد با این تفاوت که در این فنوتیپ درمان با کلیندامایسین با شکست مواجه نمی‌شود. بنابراین لازم است که این دو فنوتیپ از هم متمایز شوند. برای این کار از روش D-Test استفاده می‌شود که روشی ساده، مطمئن، کم هزینه با حساسیت و دقت بالا می باشد. البته روش دقیق تر اثبات ژن های عامل مقاومت با تکنیک PCR است. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع مقاومت القایی به کلیندامایسین در سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان و اثبات ژن‌های مولد مقاومت القایی با روش multiplex PCR است [۸-۷].

روش کار

جمع آوری نمونه

از بیماران بستری شده در بخش‌های مراقبت ویژه و بخش عفونی بیمارستان‌های توحید و بعثت سنندج نمونه گیری با سوآپ استریل از حلق و بینی، انجام شد. با این روش تعداد ۲۰۰ نمونه استافیلوکوکوس جمع آوری شدند.

[1] Constitutive Resistance
[2] Inducible Resistance

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی و کشت

نمونه ها بلافاصله در محیط چاپمن کشت داده شدند. *استافیلوکوکوس اورئوس* و استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی با تست‌های بیوشیمیایی معمول شامل شکل کلنی، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، کواگولاز اسلایدی و لوله ای، تست تخمیر مانیتول و DNase شناسایی شدند [۹].

آنتی بیوگرام

حساسیت آنتی بیوتیکی با روش Kirby-Bauer طبق استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد. دیسک های استفاده شده اریترومایسین (15 µg)، جنتامایسین (10µg)، سیپروفلوکسازین (5 µg) بودند [۱۰].

بررسی مقاومت به متی سیلین

برای تشخیص سویه های استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین از محیط اختصاصی استفاده گردید. برای این منظور به محیط مولر هینتون آگار NaCl ٤% و oxacillin ۶ mg/L اضافه گردید. سویه‌های استافیلوکوکوس شناسایی شده بر روی آن کشت داده شده و در دمای ۳۵°C به مدت ۱۸ الی ۲٤ ساعت انکوبه گردید. پس از آن رشد بیشتر از یک کلنی نشان دهنده مقاومت به متی سیلین تلقی شد [۱۰].

بررسی فنوتیپی القا بیان ژن های *erm*

بررسی فنوتیپیک فعال شدن ژن های *erm* با استفاده از روش D - Test طبق راهنمایی های CLSI انجام شد. یک سوسپانسیون معادل کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند از ارگانیسم ها تهیه شده و به پلیت‌های حاوی مولر هینتون آگار تلقیح شد. دیسک اریترومایسین (ER 15 µl) در فاصله ۲۶ mm -۱۵ (لبه به لبه) دیسک کلیندامایسین (CL 2 µl) روی محیط مولر هینتون آگار قرار داده شد. پلیت‌ها بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ^{oC} ۳۵ بررسی شدند (شکل ۱) [۳].

شکل ۱. روش انتشار دو دیسک: D-Test تست مثبت را نشان می‌دهد که لبه ای از یک ناحیه مهاری اطراف دیسک کلیندامایسین به شکل حرف D ظاهر شده است.CL : کلیندامایسین ، E : اریترومایسین

استخراج DNA استافیلوکوکوس

جهت استخراج DNA ژنومی سویه‌های استافیلوکوک ایزوله شده، از کیت Cinna Pure DNA ساخت شرکت سیناژن استفاده شد.

واکنش Multiplex PCR برای ژن های *erm*

در ابتدا پرایمرهای اختصاصی برای ژن های *erm* تهیه شدند که در جدول۱ آورده شده است.

Multiplex PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری با استفاده از کیت PCR, DFS Master Mix Kit ساخت شرکت سیناژن انجام شد این کیت شامل آنزیم Taq پلی مراز، $MgCl_2$، dNTP، $(NH_4)_2SO_4$، TrisHCl، Tween-20 بود. مقادیر و ترکیبات مورد استفاده برای این واکنش به صورت زیر بود:

$MgCl_2$ 3 mM, Master Mix 12.5 µl , هر کدام از پرایمرها 12.5 pmol, DNA template 1 µl و 2 µl Distilled water. شرایط دمایی PCR Multiplex برای ژن های *erm* به صورت زیر است:

Archive of SID

www.SID.ir

Primary denaturation ۹٤°C به مدت ٤ دقیقه، Denaturation ۹٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing ۵۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، Extension ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه، ۳۰ cycle، Final Extension ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه.

الکتروفورز محصول PCR

معمول ترین روش جهت مشخص کردن و دیدن محصول PCR، الکتروفورز روی ژل آگارز یا ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی آن با اتیدیوم بروماید است [۱۱]. در این تحقیق از ژل آگارز با درصد ۱/۵ استفاده شد، برای تهیه ژل ۱/۵ درصد ۰/۶ گرم پودر آگارز (ندای فن راه) در ٤۰ cc بافر TAE (۰/۵x) حل گردید. پس از بسته شدن ژل و شانه گذاری و لود کردن ٤ میکرولیتر از محصول PCR مخلوط شده با ۲ میکرولیتر Loading Buffer، الکتروفورز محصول PCR روی ژل ۱/۵٪ در ولتاژ ۵۰ به مدت یک ساعت انجام شد. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید $10\ ^{mg}/_{ml}$ (BIORON)، آشکار سازی ژل الکتروفورز شده توسط دستگاه ترانس لومیناتور انجام شد (شکل ۲).

سایز محصولات PCR و قطعات حاصل با مقایسه آنها با سایزهای استاندارد DNA Ladder ۱۰۰ bp (BIORON) تخمین زده شد و به صورت دقیق تر با نرم افزار Gelxone مورد مطالعه قرار گرفت [۱۵].

تجزیه و تحلیل مشاهدات

تجزیه و تحلیل داده ها و مقایسات آماری با استفاده از نرم افزار Excel و همچنین SPSS (آمار توصیفی، آزمون χ^2) انجام شد [۳].

یافته ها

از کل ۲۰۰ نمونه استافیلوکوکی ۹۰ مورد *S. aureus* بودند (۱۸/۵٪ MRSA[1]، ۲۶/۵٪ MSSA[2]) و ۱۱۰ مورد CNS (۳۲٪ MRCNS[3] و ۲۳ ٪ MSCNS[4]). ۸۰ ایزوله بالینی (٤۰٪) به اریترومایسین مقاومت نشان دادند که جهت بررسی القاء مقاومت در کلیندامایسین تحت D-Test قرار گرفتند. ۸ ایزوله (۱۰٪) مقاومت القایی $iMLS_B$ نشان دادند (۳/۷۵٪ MRSA ($^3/_8$)، ۵ ٪ MRCNS ($^4/_8$) و ۱/۲۵ ٪ ($^1/_8$) MSCNS).

۸۷/۵ ٪ از فنوتیپ های $iMLS_B$ در ایزوله های مقاوم به متی سیلین به دست آمدند. ۳ ایزوله مقاوم به اریترومایسین و حساس به کلیندامایسین (فنوتیپ MS) و ٦٤ ایزوله مقاوم به اریترومایسین و کلیندامایسین (فنوتیپ $cMLS_B$) به دست آمد (جدول ۲). حساسیت فنوتیپ های $iMLS_B$ به سیپروفلوکسازین ۵۰٪ و به جنتامایسین ۶۲/۵٪ بودند.

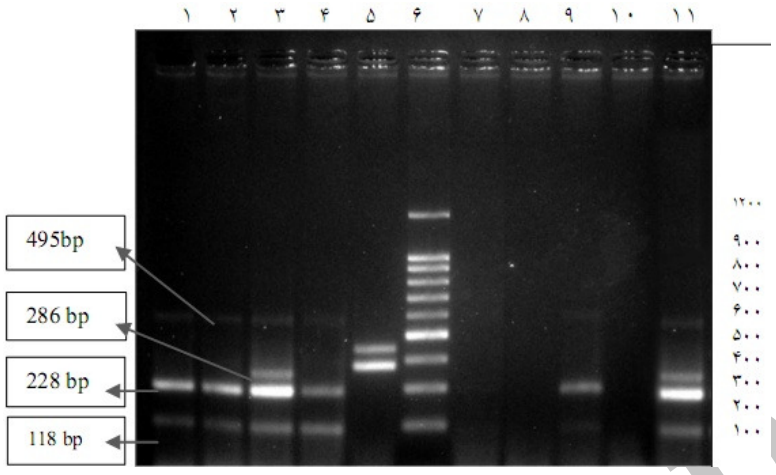
در بررسی های ژنتیکی انجام شده بر روی ایزوله‌های مقاوم به اریترومایسین، جهت جستجوی ژن‌های *erm*، در بین ٤۸ ایزوله CNS، *ermA* در ۵/٤۱ ٪ ($^3/_{٤۸}$)، *ermB* در ۵/٤۱ ٪ ($^3/_{٤۸}$)، *ermC* در ۳/۱۳ ٪ ($^2/_{٤۸}$) و *ermTR* در ۰ ٪ این ایزوله ها به دست آمد (جدول۳).

در بین ۳۲ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به اریترومایسین *ermA* در ۲/۲۲ ٪ ($^2/_{۳۲}$)، *ermB* در ۲/۲۲ ٪ ($^2/_{۳۲}$)، *ermC* در ۲/۲۲ ٪ ($^2/_{۳۲}$) و *ermTR* در ۲/۲۲ ٪ ($^2/_{۳۲}$) به دست آمد (جدول۳).

[1] Methicillin-Resistant *S. aureus*
[2] Methicillin-Sensitive *S. aureus*
[3] Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci
[4] Methicillin-Sensitive Coagulase-Negative Staphylococci

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. الکتروفورز محصولات multiplex PCR برای ژن های erm

(شماره ۶ مارکر بوده که از ۱۰۰ جفت باز تا ۱۲۰۰ جفت باز می باشد. ۷ و۸ ایزوله هایی هستند که در بررسی ژنوتیپی هیچ کدام از باند های مربوط به ژن های فوق را ندارند. شماره ۱۰ کنترل منفی ، شماره ۱۱ کنترل مثبت و شماره های ۱ و ۲ و ۳ و ٤ و ۵ و ۹ ایزوله هایی هستند که ژن های فوق را دارند.)

جدول ۱. پرایمرها و طول قطعات حاصل از آن در ردیابی ژن های erm [۱۷]

Gene	Primer: sequence	Size
ermA	ermA/TRSb: TCA GGA AAA GGA CAT TTT ACC ermAAb: ATA TAG TGG TGG TAC TTT TTT GAG C	118 bp
ermB	ermBAb: CGA TAT TCT CGA TTG ACC C ermBSb: GGT AAA GGG CAT TTA ACG AC	228 bp
ermC	ermCab: TAGCAAACCCGTATTCCACG ermCsb: CTTGTTGATCACGATAATTTCC	495 bp
ermTR	ermTRAb: AAA ATA TGC TCG TGG CAC ermA/TRSb: TCA GGA AAA GGA CAT TTT ACC	286 bp

جدول ۲. فنوتیپ های مقاومت به MLS_B در *S. aureus* و CNS

	کل	حساس به اریترومایسین (n = 120)	مقاوم به اریترومایسین (n = 80)		
		فنوتیپ MS	فنوتیپ $iMLS_B$		فنوتیپ $cMLS_B$
			D^+	D	
MRSA	۳۷	۱۲	۰	۳	۲۲
MSSA	۵۳	٤۶	۰	۰	۷
MRCNS	۶۱	۲٤	۳	۱	۳۱
MSCNS	٤٤	۳۸	۰	۱	٤
کل	۱۹۵*	۱۲۰(٪ ۶۱/۵٤)	۳(٪ ۱/۵٤)	۵(٪۲/۵۶)	64(٪۳۲/۸۲)

* phenotype S و phenotype HD به ترتیب ۲ و ۳ مورد (۲۰۰ = ۵+ ۱۹۵)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳. توزیع فراوانی ژن های erm (A, B, C, TR) در بین ۸۰ ایزوله استافیلوکوکی

Genes	No. (%) MRCNS (n=40)	No. (%) MSCNS (n=8)	No. (%) total CNS (n=48)	No. (%) MRSA (n=25)	No. (%) MSSA (n=7)	No. (%) total *S. aureus* (n=32)	No. (%) total staphylococci (n=80)
erm(A)	۳(٪ ٤/ ۶۹)	۰	۳(٪۲/۷۳)	۲(٪ ۵/٤۱)	۰	۲(٪۲/۲۲)	۵ (٪ ۲/۵)
erm(B)	۳(٪ ٤/ ۶۹)	۰	۳(٪۲/۷۳)	۲(٪ ۵/٤۱)	۰	۲(٪۲/۲۲)	۵ (٪ ۲/۵)
erm(C)	۲(٪ ۳/۱۳)	۰	۲(٪ ۱/۸۲)	۲(٪ ۳/۱۳)	۰	۲(٪ ۲/۲۲)	٤ (٪۲)
erm(TR)	۰	۰	۰	۲ (٪۵/٤۱)	۰	۲(٪ ۲/۲۲)	۲(٪۱)
PCR (-)	۱(٪ ۱/۵۶)	۱(٪۲/۱۷)	۲(٪ ۱/۸۲)	۰	۰	۰	۲ (٪ ۱)

بحث

افزایش فراوانی عفونت های استافیلوکوکی به همراه مشکل افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی منجر به استفاده از کلیندامایسین شده است که برای درمان عفونت های خفیف تا متوسط استافیلوکوکی مناسب و یک جایگزین خوب برای پنی سیلین در بیماران حساس به پنی سیلین است. با وجود این دستور العمل‌ها بیشترین خطر درمان با کلیندامایسین شکست درمان در فنوتیپ مقاومت القایی کلیندامایسین است [۳].

در این مطالعه ۲۰۰ ایزوله استافیلوکوکی به دست آمدند که ٤۰ ٪ مقاوم به اریترومایسین بودند. از بین استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به اریترومایسین مقاومت iMLSB در ۱۰٪ (۸/۸۰) مورد به دست آمد که مشابه آن توسط گادپالی[1] و همکاران، فیبلکورن[2] و همکاران، جورجنسنت[3] گزارش شده است [۱۲-۱٤]. بسیاری از محققان شیوع بالاتری را گزارش کرده اند [۱۵،۱۷]، در حالی که دیگران شیوع کمتری را نشان داده اند [۱۸،۱۹]. در مطالعه ما برخلاف مطالعه پال[4] و همکاران درصدهای متفاوتی از مقاومت القایی در بین *S. aureus* (٪۳۷/۵) و CNS (٪۶۲/۵) به دست آمد [۹] اما نتیجه مطالعه حاضر با بسیاری از مطالعات انجام شده همخوانی داشت [۲،۷].

فصیح[5] و همکاران، فراوانی فنوتیپیک ظاهر شده حاصل از بیان ژن های القایی *erm* را در ایزوله های بالینی *S. aureus* به روش D-test ارزیابی کرده اند. آنالیز ۲٤۳۲ ایزوله در روش دیسک دیفیوژن نشان داده که ٦٤٪ (n= ۱۵۵۳) به هر دو آنتی بیوتیک اریترومایسین و کلیندامایسین حساس بودند، در حالی که ۳۰٪ (n=۷٤۱) مقاومت دایمی به هر دو دارو داشتند. ۶٪ (n=۱۳۸) ایزوله‌ها در روش دیسک دیفیوژن نتایج نا جوری را نشان دادند (حساسیت به کلیندامایسین و مقاومت به اریترومایسین). از بین ایزوله های ناجور ۷۲ ٪ (n=۹۹) فنوتیپ مقاومت القایی را با روش D-Test نشان دادند که از بین آنها ۸۵ ایزوله (٪ ۶۲) MRSA بودند [۳] در مطالعه حاضر، از ۲۰۰ نمونه مورد بررسی ۶۰ ٪ (n=۱۲۰) به هر دو آنتی بیوتیک اریترومایسین و کلیندامایسین حساس بودند، در حالی که ۳۲٪ (n=٦٤) مقاومت دایمی به هر دو دارو داشتند. ۵/۵٪ (n=۱۱) ایزوله در روش دیسک دیفیوژن نتایج نا جوری را نشان دادند (حساسیت به کلیندامایسین و مقاومت به اریترومایسین). از بین ایزوله های ناجور ۷۳/ ۷۲٪ (n=۸) فنوتیپ مقاومت القایی را با روش D-Test نشان دادند که از بین آنها ۳ ایزوله (٪۳۷/۵) MRSA بودند یا به عبارت دیگر ۸۷/۵ ٪ از فنوتیپ‌های iMLSB مقاوم به متی سیلین بودند.

[1] Gadepalli
[2] Fiebelkorn
[3] Jorgensenet
[4] Pal
[5] Fasih

Archive of SID

www.SID.ir

در مطالعه ای که سیمگل[1] و همکاران انجام دادند میزان فنوتیپ های MLS_B را با روش D-test و ژنوتیپ ها ر ا با استفاده از multiplex real time PCR در سویه های MRSA تعیین کردند، در مجموع ۲۶۵ سویه MRSA از نمونه های بالینی از بیماران بستری شده در بیمارستان و بیماران خارج از بیمارستان جمع آوری کردند. از بین این ایزوله‌ها ۲۲۵ مورد (۸٤/۹ ٪) به اریترومایسین مقاوم بودند و ۱۷۰ مورد (٦٤/۱٪) به کلیندامایسین مقاوم بودند. از بین ۲۲۵ نمونه MRSA مقاوم به اریترومایسین، ٤۹/۳ ٪ مقاومت دایمی ($cMLS_B$) و ۳۹/۱٪ مقاومت القایی ($iMLS_B$) نشان دادند و فنوتیپ M در ۱۱/۵٪ موارد گزارش شد. به طور کلی ژن های *ermA*، *ermC*، به ترتیب در ۸۵ نمونه (۳۷/۷ ٪) و ۶۰ نمونه (۲۶/۶٪) شناسایی شدند [۲۰]. در بررسی‌های ژنوتیپی انجام شده جهت اثبات ژن های کد کننده مقاومت القایی که ما انجام دادیم (۲/۵ ٪) ۵ ژن *erm(A)* به دست آمد که همگی مربوط به استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین بوده (٤/۶۹٪) ۳ MRCNS و (۵/٤۱ ٪)۲ MRSA، (۲/۵ ٪) ۵ ژن *erm(B)* به دست آمد که همگی مربوط به استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین بوده و (٤/۶۹٪) ۳ MRCNS و (۵/٤۱٪) ۲ MRSA، (۲٪) ٤ ژن *erm(C)* به دست آمد که همگی مربوط به استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین بوده و (۳/۱۳٪) ۲ MRCNS و (۳/۱۳ ٪) MRSA۲، (۱٪)۲ ژن *erm(TR)* به دست آمد که همگی مربوط به استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین بوده و (۵/٤۱٪) ۲ MRSA بودند.

زرین اکتاش[2] و همکارانش میزان شیوع مکانیسم‌های ژنتیکی استافیلوکوکوس های مقاوم به اریترومایسین را بررسی کردند. در کل ۱۰۲ نمونه بالینی (۷۸ مورد استافیلوکوکوس کواگولاز *منفی* CNS و ۲٤ مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*) از استافیلوکوکوس مقاوم به اریترومایسین را جمع آوری کردند. حساسیت آنتی میکروبی را با روش دیلوشن آگار و فنوتیپ‌های مقاوم را با روش القا دیسک های دوتایی ارزیابی کردند. یک multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن های *ermA*، *ermB*، *ermC* و ژن *msrA* انجام دادند. از بین ۷۸ ایزوله CNS ۵۷/۸٪ مقاومت دایمی به MLS_B، ۲۰/۶ ٪ مقاومت القایی به MLS_B و ۲۱/۶ ٪ فنوتیپ MS_B را نشان دادند. در PCR انجام شده توسط آنها ۷۸/۲ ٪ از این ایزوله ها ژن *ermC*، ۸/۹ ٪ ژن *ermA*، ۶/٤ ٪ ژن *ermB* و ۱۱/۵٪ ژن *msrA* را نشان دادند. *ermA* در ۵۰٪ و *ermC* در ۶۲/۵ ٪ از ایزوله ها شناسایی شد در حالی که ۳۷/۵ ٪ شامل هر دو ژن *ermA* و *ermC* بودند [۷]. در مطالعه حاضر، در بین ٤۸ ایزوله CONS مقاوم به اریترومایسین، مقاومت دایمی به MLS_B در ۸۱/٤ ٪ ($^{٤۸}/_{۳۵}$)، مقاومت القایی به MLS_B در ۶۳/ ۱۱ ٪ ($^{٤۸}/_{۵}$) و فنوتیپ MS_B در ۶/۹۸ ٪ ($^{٤۸}/_{۳}$) به دست آمد. *ermA* در ۵/٤۱ ٪ ($^{٤۸}/_{۳}$) این ایزوله ها، *ermB* در ۵/٤۱ ٪ ($^{٤۸}/_{۳}$) این ایزوله ها، *ermC* در ۳/۱۳ ٪ ($^{٤۸}/_{۲}$) و *ermTR* در ۰ ٪ این ایزوله ها به دست آمد. وجود هم زمان ژن های *ermA* و *ermC* در دو ایزوله، *ermB* و *ermC* در دو ایزوله، *ermA* و *ermB* و *ermC* و *ermTR* در هیچ کدام از ایزوله‌های CONS به دست نیامد.

نتیجه گیری

گردش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک در بین افراد جامعه و به خصوص جمعیت در معرض خطر مانند کودکان، افراد دارای نقص ایمنی و مسن ترها مسئله مهمی است که باید تدابیر کنترلی مناسبی در این راستا و برای پیشگیری از گسترش آن اندیشیده شود. با توجه به اینکه شیوع مقاومت القایی در مناطق مختلف متفاوت است و اهمیت تشخیص مقاومت القایی در موفقیت درمان عفونت های استافیلوکوکی

[1] Cemgul
[2] Zerrin Aktas

Archive of SID

www.SID.ir

و پیشگیری از شکست درمان با کلیندامایسین در سویه های MRSA و سادگی،کم هزینه بودن و حساسیت بالای روش D-Test ، لازم است که این تست ساده به صورت روتین در گزارش آنتی بیوگرام آزمایشگاه گنجاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید گروه میکروب شناسی همچنین معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی کردستان جهت تامین مالی و همچنین از همکاری تکنسین های دانشکده و آزمایشگاه بیمارستان توحید و بعثت نهایت تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1- Shantala GB, Adithi SS, Rahul RK, Nagarathnamma T. Detection of inducible Clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* by the Disc Diffusion Induction Test. J Clinical and Diagnostic Research. 2011 Feb**;** 5(1): 35-37.

2- Mohanasoundaram KM. The Prevalence Of Inducible Clindamycin Resistance Among Gram Positive Cocci From Various Clinical Specimens. J Clinical and Diagnostic Research. 2011 Feb; 5(1): 38 - 40.

3- Fasih N, Irfan S, Zafar A, Khan E, Hasan R. Inducible clindamycin resistance due to expression of erm genes in *Staphylococcus aureus*: Report from a Tertiary Care Hospital Karachi, Pakistan. J Pak Med Assoc. 2010 Sep; 60(9): 750-753.

4- Shrestha B, Pokhrel BM, Mohapatra TM. Phenotypic characterization of nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* with reference to MRSA. J Infect Dev Ctries. 2009; 3(7): 554 - 560.

5- Adaleti R, Nakipoglu Y, Ceran N, Tasdemir C, Kaya F, Tasdemir S. Prevalence of phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. Braz J Infect Dis. 2010; 14(1): 11-14.

6- Eksi F, Gayyurhan ED, Bayram A, Karsligil T. Determination of antimicrobial susceptibility patterns and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* strains recovered from southeastern Turkey. J Microbiology, Immunology and Infection. 2011; 44: 57- 62.

7- Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, Aydin D. Resistance to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin antibiotics in Staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. The Journal of Microbiology. 2007 Aug; 45(4): 286-290.

8- Christine D, Raney PM, Morrel AK, Williams PP, Linda K, Jevitt L, et al. Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. J clinical microbiology. 2005 Apr; 43(4): 1716–1721.

9- Pal N, Sharma B, Sharma R, Vyas L. Detection of inducible clindamycin resistance among Staphylococcal isolates from different clinical specimens in western India. Department of Microbiology, Jaipur, India. 2010 Aug; 56(3): 182-185.

10- Franklin R, Matthew A, Karen B, Michael N, George M, Dwight J, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Twentieth Informational Supplement, 30(1), 2010: 60-75

11- John Burpo F. A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. Biochemistry. 2001 Aug; 218: 1-12.

12- Gadepalli R. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus.* Indian J Med Res. 2006 April; 123(4): 571 - 573.

13- Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical Disk Diffusion Method for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. J Clinical Microbiology. 2003 Oct ; 41(10): 4740 – 4744.

14- Jorgensen JH, Crawford SA, McElmeel ML, Fiebelkorn KR. Detection of Inducible Clindamycin Resistance of Staphylococci in Conjunction with Performance of Automated Broth Susceptibility Testing. J Clinical Microbiology. 2004 April; 42(4): 1800–1802.

15- Ciraj AM, Vinod P, Sreejith G, Rajani K. Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of *staphylococci*. Indian J Pathology and Microbiology. 2009 March; 52(1): 49 - 51.

Archive of SID

www.SID.ir

16- Goyal R, Singh NP, Manchanda V, Mathur M. Detection of clindamycin susceptibility in macrolide resistant phenotypes of Staphylococcus aureus. Indian J Med Microbiol, 2004 Oct-Dec, 22(4): 251-254.
17- Matthew VN, Cai Y, Kong F, Zeng X, Gilbert GL. Influence of Disk Separation Distance on Accuracy of the Disk Approximation Test for Detection of Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus* spp. J clinical microbiology. 2006 Nov; 44(11): 4072-4076.
18- Rahbar M, Hajia M. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus:* a cross-sectional report. Pak J Biol Sci. 2007 Jan; 10(1): 189-192.
19- Delialioglu N, Aslan G, Ozturk C, Baki V, Sen S, Emekdas G. Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococci* Isolated from Clinical Samples. Jpn. J Infect Dis. 2005 Apr; 58(2): 104-106.
20- Cemgul H, Kilic A, Guclu AU, Bedir O, Orhon M, Basustaoglu C. Macrolide-lincosamide-sterptogramin B resistant phenotypes and genotypes for methicillin resistant *staphylocccus aureus* in turkey, from 2003 to 2006. J microbiology. 2008 Sep; 57(4): 307-312.

Archive of SID

www.SID.ir