

Molecular Detection of Inducible Clindamycin Resistance among Staphylococcal Strains Isolated from Hospital Patients

Abdollahi SH¹, Ramazanzadeh R^{2*}, Delami Khiabani Z¹, Kalantar E³, Menbari SH³

¹Department of Microbiology, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran

²Cellular & Molecular Research Center and Department of Microbiology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

³Department of Microbiology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

* Corresponding Author. Tel: +989143104424 Fax: +988716664674 E-mail: atrop_t51@yahoo.com

Received: 14 November 2011

Accepted: 16 December 2012

ABSTRACT

Background & Objectives: Macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS_B) antimicrobial agents are used in the treatment of staphylococcal infections. They prevent the microbial protein synthesis system through binding to 23SrRNA. The aim of this study was to apply molecular methods to detect inducible clindamycin resistance genes among staphylococcal strains isolated from clinical specimens.

Methods: Two hundred staphylococcus strains were isolated from nose and throat swabs of patients in Toohid and Besat hospitals in Sanandaj. Antimicrobial susceptibilities of isolates were determined using disc diffusion method, agar screen test and D-Test. A multiplex PCR was performed using primers specific for *erm* (A, B, C, TR) genes.

Results: Out of 200 isolates, 18.5 % were MRSA and 32% were MRCNS (methicillin resistant coagulase negative staphylococci). Of 80 erythromycin resistant isolates, 48 were coagulase negative and 32 were *S. aureus*. Among the 48 coagulase negative staphylococci (CONS) isolates, 11.63% expressed the MLS_B-inducible phenotypes. Using PCR, the frequency of different genes in the collection of isolates were as follows: *ermA*; 5.41 %, *ermB*; 5.41 %, and *ermC*; 3.13%. The *ermTR* gene was negative in all isolates. Among the 32 *S. aureus* isolates, 9.38% expressed the MLS_B-inducible phenotype. Using PCR, these isolates harbored *ermA* (2.22%), *ermB* (2.22%), *ermC* (2.22%) and *ermTR* (2.22%).

Conclusion: This is the first study to show the rate of inducible clindamycin clinical isolates of staphylococci harboring *erm* genes in Sanandaj. It also demonstrated the frequency of *erm* genes was higher among CONS isolates than *S. aureus*. This data suggested the transfer of resistance gene from nonpathogenic to pathogenic strains is likely to happen. Therefore, screening and control of these resistance genes is recommended at clinical laboratories.

Keywords: *S. aureus*; Clindamycin; D-Test

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

شادیه عبد‌اللهی^۱، رشید رمضانزاده^{۲*}، زهرا دیلمی خیابانی^۱، عنایت ا. کلاتر^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 میکروبیشناسی، 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 می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی مقاومت القایی به کلیندامایسین در سویه های استافیلوکوکوس جدا شده 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) 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* ۴/۱۳٪ و *ermTR* ۰٪ به دست آمد. از ۳۲ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومایسین، iMLS_B ۹/۳۸٪، *ermC* ۲/۲۲٪ هر کدام به دست آمد.

نتیجه گیری: این مطالعه 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

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 متی‌سیلین

گروهی از آنتی بیوتیک‌ها شامل ماکرولید، لینکوزامید و استرپتوگرامین B هستند که به آنها آنتی بیوتیک‌های گروه MLS_B^۱ می‌گویند. این گروه از داروها ساختارهای متفاوتی با هم دارند اما عملکرد

^۱ Macrolides, Lincosamides and StreptograminB

مقاومت القایی $iMLS_B$ متیلازهای mRNA فقط در حضور یک ماکروئید القا کننده تولید می‌شوند در این نوع مقاومت اریترومايسين 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 اریترومايسين 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 [۵-۶].

مکانیسم دوم توسط ژن *mstA* اتفاق می‌افتد که سبب ایجاد مقاومت در ماکروئید و استرپتوگرامین B می‌شود در نتیجه به آن فنوتیپ M یا MS می‌گویند و مثل فنوتیپ MLS_B در شرایط *Invitro* به اریترومايسين 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 می‌باشد. 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 [۷-۸].

روش کار

جمع آوری نمونه

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

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

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 ماکروئید- 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 MLS_B شده است [۱-۳].

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 [۲-۳]. 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 23S rRNA شده در نتیجه از اتصال آنتی بیوتیک به جایگاه ریبوزومی خود ممانعت می‌کند و از این طریق مقاومت های متقابل بین ماکروئیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B ایجاد می‌کند، بنابراین به آن فنوتیپ MLS_B می‌گویند. چهار ورته از ژن های *erm* شامل *ermA*, *ermB*, *ermC* و *ermF* شناخته شده اند که می‌توانند مقاومت‌های دائمی ($cMLS_B$)^۱ و القایی ($iMLS_B$)^۲ را نسبت به داروهای MLS_B ایجاد کنند [۴].

مقاومت‌های دائمی $cMLS_B$ نوعی از مقاومت است که در آن متیلازهای mRNA بدون نیاز به القا کننده تولید می‌شوند و سویه هایی که مقاومت دائمی پیدا می‌کنند به تمامی ماکروئیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B مقاومت پیدا می‌کنند، اما در

¹ Constitutive Resistance

² Inducible Resistance

جداسازی و کشت

نمونه‌ها 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 (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام شد. دیسک‌های استفاده شده اریترومايسين (15 µg)، جنتامایسین (10µg)، سیپروفلوکسازین (5 µg) بودند [۱۰].

بررسی مقاومت به متی سیلین

برای تشخیص سویه‌های *استافیلوکوکوس* مقاوم به متی‌سیلین از محیط اختصاصی استفاده گردید. برای این منظور به محیط مولر هینتون آگار NaCl ۴% و ۶ mg/L oxacillin اضافه گردید. سویه‌های *استافیلوکوکوس* شناسایی شده بر روی آن کشت داده شده و در دمای ۳۵°C به مدت ۱۸ الی ۲۴ 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 ارگانیسیم‌ها تهیه شده و به پلیت‌های حاوی مولر هینتون آگار تلقیح شد. دیسک اریترومايسين (ER 15 µl) در فاصله ۲۶-۱۵ (لبه به لبه) دیسک کلیندامایسین (CL 2 µl) روی محیط مولر هینتون آگار قرار داده شد. پلیت‌ها بعد

از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵°C 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: اریترومايسين

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 جدول ۱ 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 مرار، MgCl₂، dNTP، (NH₄)₂SO₄، TrisHCl، Tween-20 بود. مقادیر و ترکیبات مورد استفاده برای این واکنش به صورت زیر بود:

MgCl₂ 3 mM, Master Mix 12.5 µl, هر کدام از پرایمرها 12.5 pmol، DNA template 1 µl و DNA 2 µl Distilled water. شرایط دمایی PCR Multiplex برای ژن های *erm* به صورت زیر است:

یافته ها

از کل ۲۰۰ نمونه استافیلوکوکی ۹۰ مورد *S. aureus* بودند (۱۸/۵٪ MRSA^۱، ۲۶/۵٪ MSSA^۲) و ۱۱۰ مورد CNS (۳۲٪ MRCNS^۳ و ۲۳٪ MSCNS^۴)، ۸۰ ایزوله بالینی (۴۰٪) به اریترومايسين 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^۳، ۵٪ MRCNS^۳ و ۱/۲۵٪ iMLS_B (۱/۸) MSCNS).

۸۷/۵٪ از فنوتیپ های iMLS_B در ایزوله های مقاوم به متی سیلین به دست آمدند. ۳ ایزوله مقاوم به اریترومايسين و حساس به کلیندامایسین (فنوتیپ MS) و ۶۴ ایزوله مقاوم به اریترومايسين و کلیندامایسین (فنوتیپ cMLS_B) به دست آمد (جدول ۲). حساسیت فنوتیپ های iMLS_B به سپروفلوکسازین ۵۰٪ و به جنتامایسین ۶۲/۵٪ بودند.

در بررسی های ژنتیکی انجام شده بر روی ایزوله های مقاوم به اریترومايسين، جهت جستجوی ژن های *erm*، در بین ۴۸ ایزوله CNS، *ermA* در ۵/۴۱٪ (۳/۴۸)، *ermB* در ۵/۴۱٪ (۳/۴۸) و *ermC* در ۳/۱۳٪ (۲/۴۸) و *ermTR* در ۰٪ این ایزوله ها به دست آمد (جدول ۳).

در بین ۳۲ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به اریترومايسين *ermA* در ۲/۲۲٪ (۲/۳۲)، *ermB* در ۲/۲۲٪ (۲/۳۲) و *ermC* در ۲/۲۲٪ (۲/۳۲) و *ermTR* در ۲/۲۲٪ (۲/۳۲) به دست آمد (جدول ۳).

Primary denaturation ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، Denaturation ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing ۵۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، Extension ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه، Final Extension ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ cycle.

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 ۴۰ cc بافر (۰/۵x) TAE حل گردید. پس از بسته شدن ژل و شانه گذاری و لود کردن ۴ 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 (BIORON) 10^{mg}/ml، 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

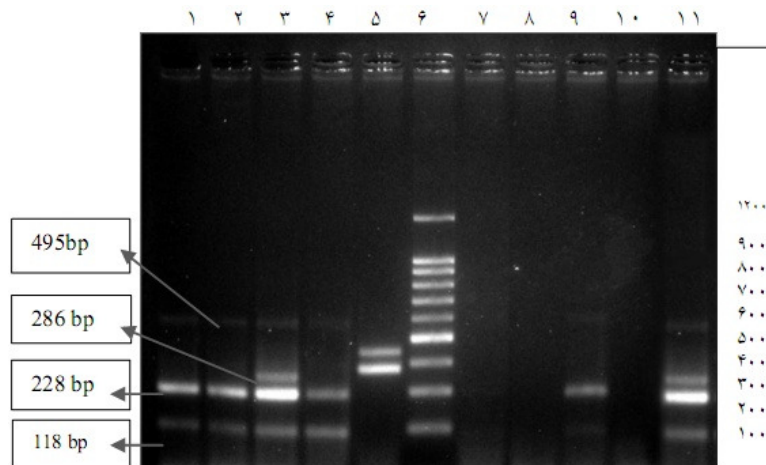
تجزیه و تحلیل داده ها و مقایسات آماری با استفاده از نرم افزار Excel و همچنین SPSS (آمار توصیفی، آزمون χ^2) انجام شد [۳].

¹ Methicillin-Resistant *S. aureus*

² Methicillin-Sensitive *S. aureus*

³ Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci

⁴ Methicillin-Sensitive Coagulase-Negative Staphylococci



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 و ۸ 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 ۴ 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: CTTGTTGATCACGATAAATTTC | 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

| | مقاوم به اریترومايسين (n = 80) | | | حساس به اریترومايسين (n = 120) | | کل |
|-------|-----------------------------------|--------------------------|----------------|-----------------------------------|-------------|------|
| | فنوتیپ cMLS _B | فنوتیپ iMLS _B | | فنوتیپ MS | | |
| | | D | D ⁺ | | | |
| MRSA | ۲۲ | ۳ | ۰ | ۰ | ۱۲ | ۳۷ |
| MSSA | ۷ | ۰ | ۰ | ۰ | ۴۶ | ۵۳ |
| MRCNS | ۳۱ | ۱ | ۳ | ۲ | ۲۴ | ۶۱ |
| MSCNS | ۴ | ۱ | ۰ | ۱ | ۳۸ | ۴۴ |
| کل | 64(٪۳۲/۸۲) | ۵(٪۲/۵۶) | ۳(٪۱/۵۴) | ۳(٪۱/۵۴) | ۱۲۰(٪۶۱/۵۴) | ۱۹۵* |

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

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 <i>S. aureus</i> (n=32) | No. (%) total staphylococci (n=80) |
|---------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|---|--|
| erm(A) | ۳(٪. ۴/۶۹) | . | ۳(٪.۲/۷۳) | ۲(٪. ۵/۴۱) | . | ۲(٪.۲/۲۲) | ۵ (٪. ۲/۵) |
| erm(B) | ۳(٪. ۴/۶۹) | . | ۳(٪.۲/۷۳) | ۲(٪. ۵/۴۱) | . | ۲(٪.۲/۲۲) | ۵ (٪. ۲/۵) |
| erm(C) | ۲(٪. ۳/۱۳) | . | ۲(٪. ۱/۸۲) | ۲(٪. ۳/۱۳) | . | ۲(٪. ۲/۲۲) | ۴ (٪. ۲) |
| erm(TR) | . | . | . | ۲ (٪.۵/۴۱) | . | ۲(٪. ۲/۲۲) | ۲(٪.۱) |
| PCR (-) | ۱(٪. ۱/۵۶) | ۱(٪.۲/۱۷) | ۲(٪. ۱/۸۲) | . | . | . | ۲ (٪. ۱) |

بحث

فصیح^۵ 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 ۲۴۳۲ ایزوله در روش دیسک دیفیوژن نشان داده که ۶۴٪ (n= ۱۵۵۳) به هر دو آنتی بیوتیک اریترومايسين و کلیندامایسین حساس بودند، در حالی که ۳۰٪ (n=۷۴۱) مقاومت دائمی به هر دو دارو داشتند. ۶٪ (n=۱۳۸) ایزوله ها در روش دیسک دیفیوژن نتایج نا جوری را نشان دادند (حساسیت به کلیندامایسین و مقاومت به اریترومايسين). 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 اریترومايسين و کلیندامایسین حساس بودند، در حالی که ۳۲٪ (n=۶۴) مقاومت دائمی 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 اریترومايسين). 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 فنوتیپ های iMLSb مقاوم به متی سیلین بودند.

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 العمل ها بیشترین خطر درمان با کلیندامایسین شکست درمان در فنوتیپ مقاومت القایی کلیندامایسین است [۳].

در این مطالعه ۲۰۰ ایزوله استافیلوکوکی به دست آمدند که ۴۰٪ مقاوم به اریترومايسين بودند. از بین استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به اریترومايسين مقاومت iMLSb در ۱۰٪ (۸/۸۰) مورد به دست آمد که مشابه آن توسط گادپالی^۱ و همکاران، فیبلکورن^۲ و همکاران، جورجسننت^۳ گزارش شده است [۱۴-۱۲]. 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^۴ 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].

¹ Gadepalli² Fiebelkorn³ Jorgensenet⁴ Pal⁵ Fasih

در مطالعه ای که سیمگل^۱ و همکاران انجام دادند میزان فنوتیپ های MLS_B را با روش D-test و ژنوتیپ ها را 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 ایزوله ها ۲۲۵ مورد (۸۴/۹٪) به اریترومايسين مقاوم بودند و ۱۷۰ مورد (۶۴/۱٪) به کلیندامایسین مقاوم بودند. از بین ۲۲۵ نمونه MRSA مقاوم به اریترومايسين، ۴۹/۳٪ مقاومت دائمی (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 بررسی های 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 (۲/۵٪) MRSA و ۳ (۴/۶۹٪) MRCNS و ۲ (۵/۴۱٪) MRSA، ۵ ژن *erm(B)* به دست آمد که همگی مربوط به استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین بوده و (۲/۴٪) MRSA و ۳ (۵/۴۱٪) MRCNS، ۴ ژن *erm(C)* به دست آمد که همگی مربوط به استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین بوده و (۳/۱۳٪) MRCNS و (۳/۱۳٪) MRSA، ۲ (۳/۱۳٪) ژن *erm(TR)* به دست آمد که همگی مربوط به استافیلوکوکوس های مقاوم به متی سیلین بوده و (۵/۴۱٪) MRSA بودند.

زیرین اکتاش^۲ و همکارانش میزان شیوع مکانیسم های ژنتیکی استافیلوکوکوس های مقاوم به اریترومايسين را بررسی کردند. در کل ۱۰۲ نمونه بالینی (۷۸ مورد استافیلوکوکوس کوگولاز منفی CNS و ۲۴ مورد

استافیلوکوکوس اورئوس) از استافیلوکوکوس مقاوم به اریترومايسين را جمع آوری کردند. حساسیت آنتی میکروبی را با روش دیلوشن آگار و فنوتیپ های مقاوم را با روش القا دیسک های دوتایی ارزیابی کردند. یک multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن های *ermB*، *ermA*، *ermC* و ژن *msrA* انجام دادند. از بین ۷۸ ایزوله CNS ۵۷/۸٪ مقاومت دائمی 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*، ۶/۴٪ ژن *ermB* و ۱۱/۵٪ ژن *msrA* را نشان دادند. در ۵۰٪ و 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 ۴۸ ایزوله CONS مقاوم به اریترومايسين، مقاومت دائمی به MLS_B در ۸۱/۴٪ (۴۸/۳۵)، مقاومت القایی به MLS_B در ۱۱/۶۳٪ (۴۸/۵)، و فنوتیپ MS_B در ۶/۹۸٪ (۴۸/۳) به دست آمد. *ermA* در ۵/۴۱٪ (۴۸/۳)، این ایزوله ها، *ermB* در ۵/۴۱٪ (۴۸/۳) این ایزوله ها، *ermC* در ۳/۱۳٪ (۴۸/۲) 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*، *ermB* و *ermC* و *ermTR* در هیچ کدام از ایزوله های 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

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.

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.

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.

- 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 *staphyloccus aureus* in turkey, from 2003 to 2006. *J microbiology*. 2008 Sep; 57(4): 307-312.