مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ٤١١/هفته‌ی سوم بهمن ماه ١٣٩٥

تاریخ دریافت: ١٣٩٥/٥/٩
تاریخ پذیرش: ١٣٩٥/١٠/٢٤

ردیابی ژن‌های مقاومت به ماکرولید، لینکوزآمید و استرپتوگرامین در نمونه‌های بالینی Staphylococcus Epidermidis مقاوم به متی‌سیلین در شهر اصفهان

مهتاب‌السادات موسوی[1]، وجیهه کرباسی‌زاده[2]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیک در میان عوامل ایجاد کننده‌ی عفونت‌های بیمارستانی، درمان چنین عفونت‌هایی با مشکل روبه‌رو شده است. Staphylococcus epidermidis، به عنوان یکی از شایع‌ترین دلایل عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است. این مطالعه، با هدف تعیین شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید، لینکوزآمید و استرپتوگرامین (MLSB یا Macrolide, Lincosamide, StreptograminB) در بین نمونه‌های بالینی Staphylococcus epidermidis مقاوم به متی‌سیلین (MRSE یا Methicillin- resistant Staphylococcus epidermidis) و ردیابی ژن‌های مقاومت مربوط انجام شد.

روش‌ها: در یک بازه‌ی زمانی ٨ ماهه، از میان ٢٥٠ نمونه‌ی بالینی Staphylococcus، ١٠٠ جدایه‌ی Staphylococcus epidermidis جداسازی و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها به روش انتشار دیسک تعیین گردید. نمونه‌های MRSE به روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین جداسازی شد. مقادیر حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC یا Minimum inhibitory concentration) اریترومایسین با روش میکرودایلوشن (Microdilution) سنجیده شد. فراوانی فنوتیپ مقاومت القایی به کلیندامایسین به روش آزمون D تعیین شد و ژن‌های مقاومت به MLSB با استفاده از تکنیک Polymerase chain reaction (PCR) ردیابی شد.

یافته‌ها: از بین ١٠٠ سویه‌ی Staphylococcus epidermidis، ٥٢ جدایه MRSE بودند. فراوانی فنوتیپ‌های مقاومت iMLSB، MS و cMLSB به ترتیب ١٧/٣، ١٣/٤ و ٤٨/٠ درصد بود. فراوانی ژن‌های مقاومت ermC، msrA و ermA به ترتیب ٧٣/٠، ١١/٥ و ٥/٧ درصد بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این مطالعه، نشان دهنده‌ی فراوانی به نسبت بالای ژن ermC در میان جدایه‌ها می‌باشد که هشداری جدی برای سیستم‌های بهداشتی است و لزوم اتخاذ روش‌های درمانی دقیق و مناسب را پس از انجام آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی طلب می‌کند.

واژگان کلیدی: مقاومت القایی، ژن‌های erm، Staphylococcus epidermidis مقاوم به متی‌سیلین، آزمون D

ارجاع: موسوی مهتاب‌السادات، کرباسی‌زاده وجیهه. **ردیابی ژن‌های مقاومت به ماکرولید، لینکوزآمید و استرپتوگرامین در نمونه‌های بالینی Staphylococcus Epidermidis مقاوم به متی‌سیلین در شهر اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ١٣٩٥؛ ٣٤ (٤١١): ١٥١٤-١٥٠٧

مقدمه

Staphylococcus epidermidis، باکتری گرم مثبت و کواگولاز منفی است که به طور معمول، فلور طبیعی پوست سالم انسان می‌باشد، اما در سال‌های اخیر، نقش فزاینده‌ای در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی داشته است و یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی عفونت خون می‌باشد (٢-١). فراوانی عفونت‌های ناشی از انواع Staphylococcus مقاوم به متی‌سیلین و الگوهای تغییر یافته در مقاومت‌های ضد میکروبی، منجر به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید، لینکوزآمید و استرپتوگرامین (MLSB یا Macrolide, Lincosamide, StreptograminB) در درمان این عفونت‌ها شده است که از لحاظ ساختمان با یکدیگر متفاوت هستند، اما نحوه‌ی عمل مشابهی دارند. استفاده‌ی گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث ظهور مقاومت به آن‌ها شده است (٤-٣).

گسترده‌ترین نوع مقاومت، تغییر هدف اتصال دارو به وسیله‌ی آنزیم متیلاز است که توسط ژن erm (erythromycin ribosomal methylase) کد می‌شود. چهار نوع از این ژن به نام‌های ermA، ermB، ermC و

١- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
٢- استادیار، گروه باکتری و ویروس شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: وجیهه کرباسی‌زاده
Email: v.karbasi@med.mui.ac.ir

ermF وجود دارد. این ژن‌ها، آنزیم‌های متیلاز را کد می‌کنند که باعث متیله شدن ریبوزوم پروکاریوت‌ها و مانع از اتصال این داروها به محل جایگاه خود می‌شوند. این نوع مقاومت، می‌تواند به دو صورت القایی (Inducible) یا ساختمانی (Constitutive) وجود داشته باشد (۸-۵).

ژن‌های erm به طور اساسی به وسیله‌ی پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها حمل می‌شوند و قادرند انتقال یابند. ژن‌های ermB بر روی ترانسپوزون Tn ۵۵۱ از پلاسمید پنی‌سیلیناز وجود دارند و طبق پژوهش Roberts و همکاران، این ژن بیشتر در گونه‌های استرپتوکوک و انتروکوک یافت می‌شود. ژن ermC در گونه‌هایی با مقاومت القایی و ساختمانی دیده می‌شوند و بر روی پلاسمیدهای کوچک وجود دارند که بعضی اوقات حذف می‌شوند. ژن‌های ermA بر روی ترانسپوزون Tn ۵۵۴ وجود دارد و به طور عمده، در گونه‌های مقاوم به متی‌سیلیناز یافت می‌شوند (۱۲-۹).

در مقاومت القایی یا iMLSB، ژن‌های erm نیازمند یک عامل القایی برای بیان مقاومت می‌باشند و فقط در حضور یک ماکرولید القا کننده، متیلازها تولید می‌شوند. در حالی که در مقاومت ساختمانی یا cMLSB، messenger RNA (mRNA) به طور پیوسته حتی در غیاب ماده‌ی القا کننده متیلاز فعال تولید می‌کند. با توجه به این که هر سه دسته دارو دارای محل اتصال مشترک هستند، باکتری مقاوم در برابر تمام آنتی‌بیوتیک‌های MLSB مقاومت نشان می‌دهد (۱۴-۱۳، ۷-۵). نوع دیگر مقاومت توسط ژن msrA اتفاق می‌افتد. این ژن، پمپ‌های افلاکس، وابسته به Adenosine triphosphate (ATP) را کد می‌کند که سبب خروج فعال دارو از سلول باکتری و مقاومت به ماکرولید و استرپتوگرامین B می‌گردد که با فنوتیپ MS شناخته می‌شود؛ با این تفاوت که در این فنوتیپ، درمان با کلیندامایسین با شکست مواجه نمی شود. بنابراین، لازم است که دو فنوتیپ MS و iMLSB از هم متمایز شوند. برای این کار، از آزمون D استفاده می‌شود (۶-۵، ۱).

این مطالعه، با توجه به لزوم جداسازی دو فنوتیپ MS و iMLSB و تأثیر آن در تشخیص و درمان صحیح بیماران و همچنین، فقدان اطلاعات مربوط به فراوانی ژن‌های مقاومت این آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های بالینی Staphylococcus epidermidis مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis یا MRSE) شهر اصفهان انجام شد.

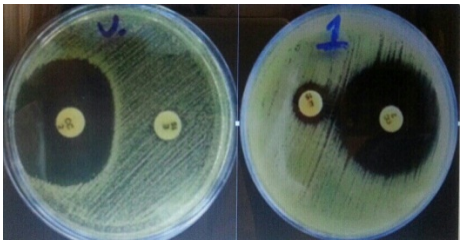
روش‌ها

در مدت زمان ۸ ماه از بهمن ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۴، از میان ۲۵۰ نمونه‌ی بالینی Staphylococcus تعداد ۱۰۰ جدایه‌ی Staphylococcus epidermidis از بیمارستان‌های الزهرای (س) و سوانح سوختگی اصفهان بر اساس روش‌های استاندارد، شامل آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، مقاومت به باسیتراسین، حساسیت به نوبیوسین، کواگولاز لوله‌ای و لامی، Dnase، مقاومت به پلی‌میکسین B، هیدرولیز اوره، تخمیر در محیط MSA (Mannitol salt agar) و آزمایش ووژ پرسکوئر جداسازی شدند. برای نگهداری نمونه‌ها، از محیط مایع BHI (Brain heart infusion broth) حاوی ۳۰ درصد گلیسرول استفاده شد و سپس، نمونه‌ها در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد و نتایج مطابق استاندارد Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) تفسیر گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، سفالوتین، اریترومایسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین بودند.

برای تعیین نمونه‌های Staphylococcus epidermidis مقاوم به متی‌سیلین، از روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین استفاده گردید و مقادیر MIC (Minimum inhibitory concentration) اریترومایسین با روش میکرودایلوشن (Microdilution) بررسی شد؛ به این ترتیب که ابتدا از استوک آنتی‌بیوتیک (Sigma, USA) با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رقت‌های متوالی تهیه شد و به میزان ۵۰ میکرولیتر از هر رقت به هر چاهک اضافه گردید. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند، غلظت نهایی آنتی‌بیوتیک در چاهک‌ها در محدوده‌ی ۵۱۲-۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. یک چاهک حاوی سوسپانسیون باکتری و Muller- Hinton broth به عنوان شاهد مثبت و یک چاهک حاوی محیط کشت به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. سپس، جذب نوری چاهک‌ها در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و دوباره جذب نوری خوانده شد و میزان MIC اریترومایسین تعیین گردید (۱۵، ۱).

سپس، جدایه‌های MRSE و مقاوم به اریترومایسین، جهت آزمون القا با استفاده از آزمون D مطابق استاندارد CLSI مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا، کشت چمنی از سوسپانسیون میکروبی باکدورت ۰/۵ مک‌فارلند بر روی محیط Muller- Hinton broth انجام شد. سپس، دیسک کلیندامایسین (۲ میکروگرم) و دیسک اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) با فاصله‌ی ۲۶-۱۵ میلی‌متری از یکدیگر روی محیط قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون، وجود یک ناحیه‌ی مهار رشد به شکل D در اطراف دیسک کلیندامایسین که لبه‌ی مسطح آن به سمت دیسک اریترومایسین بود، به عنوان D مثبت و فنوتیپ iMLSB و جدایه‌هایی که هاله‌ی عدم رشد آن‌ها در اطراف دیسک کلیندامایسین

به صورت دایره بود، با نتایج D منفی و فنوتیپ MS در نظر گرفته شدند (شکل ۱). علاوه بر آن، نمونه‌هایی که نسبت به هر دو دیسک مقاومت داشتند، دارای مقاومت ساختمانی و با فنوتیپ cMLSB در نظر گرفته شدند (۱).



شکل ۱. نتایج آزمون D

راست: D منفی؛ چپ: D مثبت

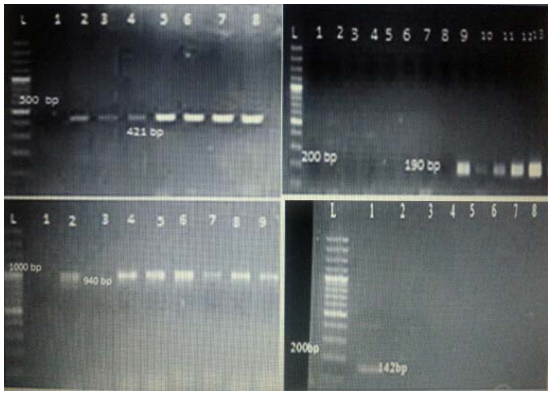
بررسی‌های مولکولی: ابتدا DNA جدایه‌های MRSE و مقاوم به اریترومایسین با استفاده از کیت K0512 (Fermentas, Germany) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده‌ی آن استخراج گردید. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده، از روش اسپکتروفتومتر استفاده شد. سپس، نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شد. برای تکثیر ژن‌های ermC و ermA، از ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (Merck, Germany)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X (Fermentas, Germany)، ۰/۲ میکرولیتر Taqپلیمراز (Fermentas, Germany)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F (Forward) و R (Reverse) (Metabion, Germany)، ۲ میکرولیتر Deoxy ribonucleotide triphosphate (dNTP) (Fermentas, Germany) و ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه که با ۱۲/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید، استفاده شد.

برای تکثیر ژن‌های ermB و msrA، از ۲ میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۲ میکرولیتر Taqپلیمراز، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R، ۲ میکرولیتر dNTP و ۵ میکرولیتر از DNA هر نمونه که با ۱۱/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید، استفاده شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های مقاومت در جدول ۱ آمده است (۱۶، ۱). از نمونه‌ی دارای ژن مورد نظر بعد از توالی‌یابی به عنوان شاهد مثبت و از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

برنامه‌ی چرخه‌ی حرارتی Polymerase chain reaction (PCR) برای تکثیر ژن‌های ermC و ermA شامل واسرشت شدن اولیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت شدن ثانویه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکرار (۳۵ چرخه) و طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود و برای ژن ermB شامل واسرشت شدن اولیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت شدن ثانویه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکرار (۳۵ چرخه) و طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برنامه‌ی چرخه‌ی حرارتی برای ژن msrA شامل واسرشت شدن اولیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت شدن ثانویه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، تکرار (۲۵ چرخه) و طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۱۶، ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرها

ژن	پرایمر	اندازه‌ی محصول	منبع
ermA	F: GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	۴۲۱ bp	(۱)
ermA	R: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	۴۲۱ bp	(۱)
ermC	F: CTTGTTGATCACGATAATTTCC	۱۹۰ bp	(۱۶)
ermC	R: ATCTTTTAGCAAACCCGTATTC	۱۹۰ bp	(۱۶)
ermB	F: CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT	۱۴۲ bp	(۱۶)
ermB	R: GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA	۱۴۲ bp	(۱۶)
msrA	F: GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG	۹۴۰ bp	(۱)
msrA	R: AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT	۹۴۰ bp	(۱)



شکل ۲. واکنش Polymerase chain reaction (PCR) ژن‌های مقاومت به MLSB

بالا راست ژن ermC: چاهک L: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، چاهک ۱: شاهد منفی، چاهک ۹: شاهد مثبت

بالا چپ ژن ermA: چاهک L: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، چاهک ۱: شاهد منفی، چاهک ۲: شاهد مثبت

پایین راست ژن ermB: چاهک L: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، چاهک ۱: شاهد مثبت، چاهک ۲: شاهد منفی

پایین چپ ژن msrA: چاهک L: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، چاهک ۱: شاهد منفی، چاهک ۲: شاهد مثبت

جهت مشاهده‌ی محصولات، از الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد (Merck, Germany)، استفاده شد که در شکل ۲ با استفاده از نشانگر ۱۰۰ bp (Fermentas, Germany)، نمایش داده شده است. محصولات PCR جهت تأیید، توسط شرکت مالزیایی بیس آسیا (Base asia) تعیین توالی و سپس بلاست شدند. داده‌های مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ (version 23, SPSS Inc., Chicago, IL)، آزمون‌های χ^2 و Fisher's exact تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

از میان ۲۵۰ نمونه‌ی بالینی Staphylococcus به دست آمده، تعداد ۱۰۰ سویه‌ی Staphylococcus epidermidis شناسایی شدند. در جدول ۲، توزیع متغیرها بر اساس جنس، بخش و منبع نمونه آمده است. بر اساس این جدول، به ترتیب بخش زنان ۵۹ نفر (۴۶ درصد)، بخش داخلی اعصاب ۹ نفر (۶۰ درصد) و نمونه‌ی خون با ۵۷ نفر (۵۷ درصد) دارای بالاترین فراوانی بودند. همچنین، درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، سفالوتین، اریترومایسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین در جدایه‌های Staphylococcus epidermidis به ترتیب ۵۵، ۲۵، ۳۴، ۴۰، ۳۳، ۴۷، ۴۱، ۳۱ و ۵۳ درصد بودند و مقاومت به سفوکسیتین به میزان ۵۲ درصد برآورد شد. مقاومت دارویی چندگانه (MDR یا Multi- drug resistant) نیز ۶۱ درصد بود.

جدول ۲. توزیع متغیرهای دموگرافیک و عمومی جدایه‌های بیماران مبتلا به Staphylococcus epidermidis از میان نمونه‌های Staphylococcus

متغیر	سطح	تعداد نمونه‌ی Staphylococcus	تعداد Staphylococcus epidermidis (درصد)
جنس	زن	۱۲۸	۵۹ (۴۶/۰)
	مرد	۱۲۲	۴۱ (۳۳/۶)
جمع کل		۲۵۰	۱۰۰
بخش	داخلی اعصاب	۱۵	۹ (۶۰/۰)
	داخلی مردان	۲۴	۱۲ (۵۰/۰)
	دیالیز	۲۸	۴ (۱۴/۲)
	جراحی	۱۲	۶ (۵۰/۰)
	اطفال	۸	۲ (۲۵/۰)
	مراقبت‌های ویژه	۳۸	۱۷ (۴۴/۷)
	اورژانس	۸۶	۴۲ (۴۸/۸)
	اتاق عمل	۱۶	۳ (۱۸/۷)
	داخلی زنان	۲۳	۵ (۲۱/۷)
جمع کل		۲۵۰	۱۰۰
نمونه	ادرار	۷۸	۲۹ (۳۷/۱)
	خون	۱۰۰	۵۷ (۵۷/۰)
	زخم	۳۸	۱۰ (۲۶/۳)
	مایع نخاع	۷	۱ (۱۴/۲)
	تراشه‌ی نای	۱۷	۱ (۵/۸)
	گلو	۱۰	۲ (۱۰/۰)
جمع کل		۲۵۰	۱۰۰

از میان ۵۲ جدایه‌ی MRSE، ۴۱ جدایه مقاوم به اریترومایسین بودند. با توجه به این که جدایه‌ها با ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر ≤ MIC نسبت به اریترومایسین مقاوم شناخته می‌شوند، میزان MIC اریترومایسین در بین جدایه‌های مقاوم در غلظت‌های ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر >، ۳۲-۸، ۱۲۸-۳۲، ۲۵۶-۱۲۸ و ۵۱۲-۲۵۶ گروه‌بندی شد و ۳ (۵/۷ درصد)، ۵ (۹/۶ درصد)، ۲۸ (۴۸/۰ درصد) و ۵ (۹/۶ درصد) سویه‌ی مقاوم در گروه‌های پیش‌گفته به ترتیب جای گرفتند که بعد از آزمون D، در بین جدایه‌های MRSE، ۹ نفر (۱۷/۳ درصد) D مثبت با فنوتیپ iMLSB و ۷ نفر (۱۳/۴ درصد) D منفی با فنوتیپ MS بودند. همچنین، ۲۵ نفر (۴۸ درصد) دارای فنوتیپ cMLSB بودند. آزمون χ^2 نشان داد که توزیع فراوانی فنوتیپ cMLSB در نمونه‌های بالینی، به طور معنی‌داری بیشتر از دو فنوتیپ دیگر بود ($P < ۰/۰۵$).

علاوه بر آن، نتایج به تفکیک دو بیمارستان بررسی شدند. با توجه به این که از بین ۵۲ جدایه‌ی MRSE، ۲۵ جدایه مربوط به بیمارستان الزهرا (س) و از این میان، ۲۰ جدایه دارای مقاومت به اریترومایسین بودند، نتایج MIC اریترومایسین در غلظت‌های ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر >، ۳۲-۸، ۱۲۸-۳۲، ۲۵۶-۱۲۸ و ۵۱۲-۲۵۶ به ترتیب ۰، ۱، ۳، ۱۴ و ۲ بودند. بعد از آزمون D، ۴ جدایه D مثبت با فنوتیپ iMLSB، ۳ جدایه D منفی با فنوتیپ MS و ۱۳ جدایه دارای فنوتیپ cMLSB بودند. از طرفی، از بین ۵۲ جدایه‌ی MRSE، ۲۷ جدایه مربوط به بیمارستان سوانح سوختگی و از این میان، ۲۱ جدایه دارای مقاومت به اریترومایسین بودند. نتایج MIC اریترومایسین در بین جدایه‌های MRSE در غلظت‌های ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر >، ۳۲-۸، ۱۲۸-۳۲، ۲۵۶-۱۲۸ و ۵۱۲-۲۵۶ به ترتیب ۰، ۲، ۲، ۱۴ و ۳ بودند. بعد از آزمون D، ۵ جدایه D مثبت با فنوتیپ iMLSB، ۴ جدایه D منفی با فنوتیپ MS و ۱۲ جدایه دارای فنوتیپ cMLSB بودند.

سپس، ژن‌های مقاومت MLSB در بین نمونه‌های MRSE در دو بیمارستان با انجام PCR شناسایی شدند که ermC ۳۸ مورد (۷۳ درصد)، ermA ۳ مورد (۵/۷ درصد)، ermB صفر درصد و msrA ۶ مورد (۱۱/۵ درصد) بودند و در ۵ مورد (۹/۶ درصد) از نمونه‌ها، هیچ کدام از ژن‌های مقاوم یافت نشد و در این حالت، تمامی نمونه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و کلیندامایسین حساس بودند. علاوه بر آن، در هیچ کدام از جدایه‌های MRSE، تمامی ژن‌های مربوط به مقاومت ردیابی نشد. آزمون χ^2 نیز نشان داد که فراوانی ژن ermC به طور معنی‌داری بیشتر از سایر ژن‌های مقاوم بود ($P < ۰/۰۵$). سپس، محصولات به منظور تأیید PCR، تعیین توالی شدند و با استفاده از برنامه‌ی بلاست در پایگاه National Center for Biotechnology Information (NCBI) توالی‌های DNA با توالی‌های منتشر شده در بانک ژنی مورد بررسی قرار گرفتند و شباهت ۹۹ درصد را نشان دادند؛ شناسه‌ی توالی هر یک از ژن‌های *ermC*، *msrA* و *ermA* در بانک ژنی به ترتیب gi 646226446، gi 47000 و gb AF466412.1 بود.

بحث

بخش مهمی از میکروفلور طبیعی مخاط و پوست، از گروه Staphylococcusهای کواگولاز منفی است. Staphylococcus epidermidis مهم‌ترین عضو این گروه می‌باشد که در سال‌های اخیر، دلیل عمده‌ی عفونت‌های بیمارستانی در افرادی با سیستم ایمنی ضعیف بوده است. فراوانی عفونت‌های ناشی از انواع Staphylococcus مقاوم به متی‌سیلین و الگوهای تغییر یافته در مقاومت‌های ضد میکروبی، منجر به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های MLSB در درمان این عفونت‌ها شده است، اما استفاده‌ی گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث ظهور مقاومت به آن‌ها شده است (۴-۳، ۱). در مطالعه‌ی حاضر، بیشترین جدایه‌های Staphylococcus epidermidis از خون و کمترین آن‌ها از تراشه‌ی نای جداسازی شدند.

Sharma و همکاران از بین ۳۰۰ نمونه‌ی بالینی تعداد ۱۶۲ نمونه (۵۴ درصد) Staphylococcus epidermidis جمع‌آوری نمودند که نمونه‌های خون با ۱۳۹ (۴۶ درصد) بیشترین فراوانی و جدایه‌های سینوویال و مایعات آسیت با ۲ نمونه (۰/۶ درصد)، دارای کمترین فراوانی بودند (۱۷).

طبق مطالعات انجام شده، در بیشتر تحقیقات همانند مطالعه ی اخیر، میزان فراوانی نمونه‌ی خون از دیگر نمونه‌ها بالاتر است. در این مطالعه، فنوتیپ های cMLSB با بالاترین فراوانی و MS با کمترین فراوانی شناسایی شدند. شجاع و همکاران، در مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز میزان مقاومت iMLSB را در بین ایزوله‌های MRSE (۱ درصد) کمتر از Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین (۶ درصد) گزارش کردند (۱۸). نفیسی و همکاران در شهرکرد از بین ۲۳۰ نمونه‌ی بالینی Staphylococcus، میزان مقاومت cMLSB را در بین ایزوله‌های Staphylococcus کواگولاز منفی و مقاوم به متی‌سیلین ۷۰ درصد و مقاومت iMLSB را در ایزوله‌های Staphylococcus کواگولاز منفی و حساس به متی‌سیلین، ۴/۳ درصد گزارش کردند (۱۹).

El-Mahdy و همکاران نیز در مصر میزان فراوانی iMLSB و cMLSB را به ترتیب، ۳۹/۵ درصد و ۱۱/۶ درصد شناسایی نمودند (۲۰). Cetin و همکاران، مطالعه‌ای بر روی جدایه‌های Staphylococcus کواگولاز منفی در ترکیه انجام دادند و میزان

فراوانی cMLSB را ۴۴ درصد وفراوانی iMLSB را ۱۹ درصد گزارش نمودند (۲۱). بر اساس مطالعات انجام شده در اغلب تحقیقات همانند پژوهش حاضر، فراوانی جدایه‌ها با فنوتیپ cMLSB بیشتر از iMLSB بود؛ اما بسته به هر ناحیه‌ی جغرافیایی، تفاوت‌هایی در میزان درصد فراوانی فنوتیپ‌ها مشاهده می‌شود. در این مطالعه، با بررسی ژن‌های مقاومت MLSB در بین نمونه‌های MRSE، ژن ermC بالاترین فراوانی و ermB کمترین فراوانی را داشتند.

عبداللهی و همکاران با بررسی مولکولی مقاومت القایی به کلیندامایسین در سویه‌های Staphylococcus جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های بعثت و توحید سنندج از ۴۸ ایزوله‌ی Staphylococcus کواگولاز منفی مقاوم به اریترومایسین، فراوانی ژن‌های ermA، ermB و ermC را به ترتیب ۵/۴۱، ۵/۴۱ و ۳/۱۳ درصد گزارش نمودند (۲۲).

El-Mahdy و همکاران میزان فراوانی چندین ژن مقاومت MLSB را در نمونه‌های Staphylococcus کواگولاز منفی به ترتیب ermC را ۳۹/۶ درصد، msrA را ۴۸/۸ درصد و msrA + ermC را ۱۱/۶ درصد گزارش کردند (۲۰).

Cetin و همکاران نیز در ترکیه ermC را ۳۰ درصد، ermA را ۱۷ درصد و ermC + ermA را ۴ درصد گزارش کردند (۲۱). Zmantar و همکاران نیز میزان فراوانی ژن‌های مقاومت را به ترتیب ermA ۹/۴ درصد، ermB را ۱۱/۱ درصد، ermC را ۲۷/۴ درصد و msrA را ۴۱/۰ درصد گزارش نمودند (۱۲). در اغلب تحقیقات همانند مطالعه‌ی اخیر، بالاترین فراوانی مربوط به ژن ermC بوده است.

بر اساس دانسته‌های پژوهشگران، در اصفهان در زمینه‌ی ژن‌های مقاومت MLSB در ارتباط با سویه‌های Staphylococcus epidermidis مطالعه‌ای صورت نگرفته و این پژوهش اولین مورد از این نوع بود.

نتیجه‌گیری نهایی این که گردش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مسأله مهمی است که باید تدابیر کنترلی مناسبی در این راستا و برای پیش‌گیری از گسترش آن‌ها اندیشیده شود. فراوانی به نسبت بالای ژن ermC در بیشتر نمونه‌ها، بر تأثیر به سزای لزوم بیان این ژن در ایجاد مقاومت MLSB دلالت دارد. با توجه به این که شیوع مقاومت القایی در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت است و تشخیص آن در درمان سویه‌های Staphylococcus epidermidis با کلیندامایسین اهمیت بالایی دارد، پیشنهاد می‌شود که انجام آزمون D به دلیل سادگی، کم هزینه بودن و حساسیت بالایی که دارد، در گزارش آنتی‌بیوگرام آزمایشگاه گنجانده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی است که به شماره‌ی ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۳۱۰۲۱ در معاونت پژوهشی دانشکده‌ی علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به تصویب رسیده است. با تشکر از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه تشخیص طبی مهدیه‌ی اصفهان به ویژه آقای مهندس محمد تقی کاردی که در پیشبرد این مجموعه کمک شایانی نمودند.

References

1. Castro-Alarcon N, Ribas-Aparicio RM, Silva-Sanchez J, Calderon-Navarro A, Sanchez-Perez A, Parra-Rojas I, et al. Molecular typing and characterization of macrolide, lincosamide and streptogramin resistance in Staphylococcus epidermidis strains isolated in a Mexican hospital. J Med Microbiol 2011; 60(Pt 6): 730-6.
2. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol 2006; 24(1): 25-9.
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; 60(9): 750-3.
4. Shantala GB, Adithi SS, Rahul Rao K, Nagarathnamma T. Detection of inducible Clindamycin resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus by the Disc Diffusion Induction Test. J Clin Diagn Res 2011; 5(1): 35-7.
5. Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, Aydin D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. J Microbiol 2007; 45(4): 286-90.
6. Juyal D, Shamanth AS, Pal S, Sharma MK, Prakash R, Sharma N. The prevalence of inducible clindamycin resistance among staphylococci in a tertiary care hospital - a study from the garhwal hills of uttarakhand, India. J Clin Diagn Res 2013; 7(1): 61-5.
7. Ozbek E, Temiz H, Tekay F, Kalayci R, Akkoc H. Phenotypical examination of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in Staphylococcus isolates. Afr J Microbiol Res 2012; 6(13): 3292-6.
8. Tekin A, Dal T, Deveci O, Tekin R, Atmaca S, Dayan S. Assessment of methicillin and clindamycin resistance patterns in Staphylococcus aureus isolated from a tertiary hospital in Turkey. Infez Med 2013; 21(2): 111-6.
9. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 836-71, table.
10. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and

streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(5): 1062-6.
11. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(12): 2823-30.
12. Zmantar T, Chaieb K, Ben AF, Ben Kahla-Nakbi A, Ben HA, Mahdouani K, et al. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus strains isolated from auricular infections. Folia Microbiol (Praha) 2008; 53(4): 357-62.
13. 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): 11-4.
14. 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 Microbiol Immunol Infect 2011; 44(1): 57-62.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M07-A8. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-approved standard. 8th ed. Wayne, PA: CLSI; 2009.
16. Chaieb K, Zmantar T, Chehab O, Bouchami O, Ben HA, Mahdouani K, et al. Antibiotic resistance genes detected by multiplex PCR assays in Staphylococcus epidermidis strains isolated from dialysis fluid and needles in a dialysis service. Jpn J Infect Dis 2007; 60(4): 183-7.
17. Sharma V, Jindal N, Devi P. Prevalence of methicillin resistant coagulase negative staphylococci in a tertiary care hospital. Iran J Microbiol 2010; 2(4): 185-8.
18. Shoja S, Nahaei MR, Nahaei M. Detection of Inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis by using D-test. Pharmaceutical Sciences 2009; 15(1): 1-8.
19. Nafisi M, Shariati L, Validi M, Karimi A. Prevalence of constitutive and inducible resistance to clindamycin in staphylococci isolates from Hajar and Kashani hospitals in Shahrekord 2008. J Shahrekord Univ Med Sci 2010; 12 (1): 13-20. [In Persian].
20. El-Mahdy TS, Abdalla S, El-Domany R, Snelling AM. Investigation of MLS B and tetracycline resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from the skin of Egyptian acne patients and controls. J Am Sci 2010; 6(11): 880-8.
21. Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. J Microbiol Immunol Infect 2010; 43(6): 524-9.
22. Abdollahi S, Ramazanzadeh R, Delami Khiabani Z, Kalantar E, Menbari S. Molecular Detection of inducible clindamycin resistance among staphylococcal strains isolated from hospital patient. J Ardabil Univ Med Sci 2013; 13(1): 59-68. [In Persian].

Journal of Isfahan Medical School
Received: 30.07.2016
Vol. 34, No. 411, 3rd Week, February 2017
Accepted: 13.01.2017

Detection of Macrolid, Lincosamide and Streptogramin Resistance Genes in Methicillin-Resistant Staphylococcus Epidermidis Strains Isolated from Clinical Samples in Isfahan City, Iran

Mahtabossadat Mousavi[1], Vajihe Karbasizadeh[2]

Original Article

Abstract

Background: Increased antibiotic resistance among nosocomial infections has made the treatment of these infections difficult. Staphylococcus epidermidis is also known as one of the most common causes of nosocomial infections. The aim of this study was to determine the prevalence of resistance to macrolide, lincosamid and streptogramin antibiotics, in methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis (MRSE) strains isolated from clinical samples and to detect their related resistance genes.

Methods: For a period of 8 months, from 250 clinical Staphylococcus strains, 100 isolates of Staphylococcus epidermidis were identified and the antibiotic susceptibility patterns of the isolates were determined using the disc diffusion method. MRSE samples were isolated by using the disk diffusion method for cefoxitin. The minimum inhibitory concentration (MIC) of erythromycin was determined using the micro dilution method. The frequency of inducible clindamycin resistance phenotype was detected via D test method and the resistance genes to MLSB were detected using polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings: Among 100 Staphylococcus epidermidis strains, 52 isolates were MRSE. The frequency of resistance phenotype iMLSB, MS and cMLSB were 17.3%, 13.4% and 48%, respectively. The frequency of the resistance genes ermC, msrA and ermA were 73%, 11.5% and 5.7%, respectively.

Conclusion: The high frequency of the ermC gene among isolates is a serious warning to health systems; thus, use of convenient and effective treatment methods after antibiotic susceptibility tests is necessary.

Keywords: Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis, erm genes, D test

Citation: Mousavi M, Karbasizadeh M. **Detection of Macrolid, Lincosamide and Streptogramin Resistance Genes in Methicillin-Resistant Staphylococcus Epidermidis Strains Isolated from Clinical Samples in Isfahan City, Iran.** J Isfahan Med Sch 2017; 34(411): 1507-14.

1- MSc Student, Department of Microbiology, School of Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Vajihe Karbasizadeh, Email: v.karbasi@med.mui.ac.ir