

## Determination of *mef* genotype in Beta-hemolytic streptococci group A strains isolated from patients in Sanandaj City

Ashja Ardalan A., MSc<sup>1</sup>, Keshavarzi F., PhD<sup>2</sup>, Fattahy Rad A., MD<sup>3</sup>, Baghbani-Arani F., PhD<sup>4</sup>

1. Master of Cellular and Molecular Sciences, Department of biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Genetics, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-87-33287652, gol.keshavarzi@gmail.com

3. General Practitioner, Tohid hospital, Kurdistan University of Medical Science, Sanandaj, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Genetics and biotechnology, Varamin- Pishva branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Increased resistance to the macrolides is probably due to excessive and inappropriate use of this type of antibiotics. The purpose of this study was to investigate macrolide resistance in group A Streptococci strains isolated from clinical samples carrying *mef* gene and comparison of the phenotype and genotype of the *mef* gene carriers and prevalence of bacteria in the study population.

**Material and methods:** Forty Beta-hemolytic streptococci pyogenes group A isolates obtained from 825 various clinical specimens by using disk agar diffusion (DAD) were studied for the presence of *mefA* and *mefE* genes by polymerase chain reaction (PCR). Statistical analysis was performed by means of SPSS and Microsoft Office Excel softwares.

**Results:** Prevalence of group A streptococcus was 4.84 % and also we found a macrolide resistance of 40% among isolates in the study population. By using D-test, the prevalence rates of phenotypes of GAS resistant to erythromycin among 8 isolates were 50% (4cases) for M-phenotyp, 37.5% (3 cases) for cMLS- phenotype and 12.5% (1 case) for iMLS<sup>B</sup> -phenotype 1. Among 16 isolates resistant to macrolides, 8 (50%) had *mefA*, one (6.25%) had *mefE* and 7 isolates (43.75%), didn't have *mefA/E* genes.

**Conclusion:** In the present study M- phenotype had the highest frequency among GAS isolates resistant to erythromycin. Also, PCR can be used as a confirmatory routine test for interpretation of the results of anti-biogram and D-tests.

**Keywords:** Beta-hemolytic streptococci group A, Macrolides, MLS<sup>B</sup>, D-TEST, Gene *mef*.

**Received:** Jul 27, 2015      **Accepted:** Jun 21, 2016

## تعیین ژنوتایپ *mef* ایزوله های استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A جدا شده از بیماران شهر سنندج

آذین اشجع اردلان<sup>۱</sup>، فاطمه کشاورزی<sup>۲</sup>، آزاد فتاحی راد<sup>۳</sup>، فهیمه باغبانی ارانی<sup>۴</sup>

۱. کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۲. استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران (مؤلف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۳۲۸۷۶۵۲،  
gol.keshavarzi@gmail.com

۳. پزشک عمومی، بیمارستان توحید، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۴. استادیار گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

### چکیده

**زمینه و اهداف:** افزایش مقاومت دارویی به ماکرولیدها احتمالاً بدلیل مصرف بی رویه و نا بجای این آنتی بیوتیک می باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی مقاومت به ماکرولیدها در ایزوله های استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A جدا شده از نمونه های بالینی حامل ژن *mef* و مقایسه فنوتیپ و ژنوتیپ آن ها و همچنین بررسی میزان فراوانی این باکتری در جامعه مورد مطالعه بود. **مواد و روش ها:** چهار نمونه استرپتوکوک پیوژنز بتا همولیتیک گروه A که از ۸۲۵ نمونه بیمارستانی با روش DAD جدا شده بود، با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی برای دو ژن *mefA* و *mefE* بررسی شدند و سپس آنالیز آماری داده ها با نرم افزار SPSS و EXCEL انجام گرفت.

**یافته ها:** شیوع فراوانی استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A در جامعه مورد مطالعه ۴/۸۴٪ و مقاومت ماکرولیدی در میان ایزوله ها ۴۰٪ بود. میزان فراوانی فنوتیپ های ایزوله های GAS مقاوم به اریترومايسين در تست القای مقاومت (D-TEST) از میان ۸ ایزوله، تعداد ۴ (۵۰٪) مورد دارای فنوتیپ M و ۳ (۳۷/۵٪) مورد دارای فنوتیپ cMLSb و ۱ (۱۲/۵٪) مورد دارای فنوتیپ i MLSb بودند. از میان ۱۶ ایزوله دارای مقاومت ماکرولیدی ۸ ایزوله (۵۰٪) حامل ژن *mefA* و یک ایزوله (۶/۲۵٪) حامل ژن *mefE* و ۷ ایزوله (۳۷/۵٪) هیچ کدام از ژن های *mefA/E* را نداشتند.

**نتیجه گیری:** در مطالعه حاضر در میان ایزوله های GAS مقاوم به اریترومايسين، فنوتیپ M دارای بیشترین شیوع بود. به علاوه، برای بررسی و تفسیر تست های D-TEST و آنتی بیوگرم، تست PCR به عنوان یک تست روتین تاییدی است.

**کلمات کلیدی:** استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A، ژن *mef*، cMLSb، D-TEST

وصول مقاله: ۹۴/۵/۶ اصلاحیه نهایی: ۹۵/۳/۲۹ پذیرش: ۹۵/۴/۱

## مقدمه

استرپتوکوک پیوژنز (*Streptococci pyogenes*) جزء بتا همولیتیک گروه A استرپتوکوک ها می باشد. استرپتوکوک پیوژنز واجد همولیز بتا می باشد. این باکتری عامل گلودرد چرکی، تب روماتیسمی، مخملک، گلومرولونفریت حاد، فاشیت نکروزان (فانقاریا) است و توکسین های تولید می کند که موجب تخریب کلیه ها (گلومرولونفریت)، از بین رفتن دریچه های قلبی (تب روماتیسمی)، مخملک و از بین رفتن بافت (فاسیت نکروزان) می شود (۱).

سایر استرپتوکوک های که آنتی ژن گروه A را دارند، عبارتند از: استرپتوکوک دیسگالاکتیه (*S. dysgalactiae*) زیرگونه اکوئی سیمیلیس (*Equisimilis*) و استرپتوکوک آنزینوسوس (*S. anginosus*)، که باکتری های اخیر، غیرشایع می باشند (۲). استرپتوکوک پیوژنز مهم ترین عامل فارنژیت باکتریایی می باشد (۳) و در نمونه های بالینی به شکل زنجیره های کوتاه، در حالی که در محیط های مایع به شکل زنجیره های بلند دیده می شود. استرپتوکوک ها حساس به باسیتراسین بوده و تست پیرو لیدونیل بتا نفتیل آمید (PYR) در آن ها مثبت می باشد (۴-۶). استرپتوکوک پیوژنز، فاکتورهای بیماریزای مختلفی را تولید می کند و با استفاده از این فاکتورهای بیماریزا می تواند به سلول های میزبان چسبیده و از سیستم ایمنی میزبان فرار می کند یا در بدن پخش می شود (۴-۱).

گلو درد ناشی از GABHS (Group A Beta Hemolytic Streptococcus) یکی از شایع ترین بیماری های سینن نوجوانی و جوانی است که هر ساله در سراسر دنیا مشکلات زیادی فراهم کرده و بودجه فراوانی صرف درمان بیماری و عوارض ناشی از آن می شود (۵). استرپتوکوک پیوژنز یکی از مهاجم ترین پاتوژن هاست و تقریباً ۳۰-۱۵ درصد فارنژیت های حاد کودکان ۱۵-۳ ساله را تشکیل می دهد. مطالعات انجام شده روی عوارض ثانویه

گلودرد های استرپتوکوکی نشان داده که با درمان آنتی بیوتیکی مناسب، بروز تب روماتیسمی تا ۱۰ برابر کاهش یافته است (۷). یکی از شایع ترین آنتی بیوتیک های که به طور معمول جهت درمان گلو درد چرکی استرپتوکوکی استفاده می گردد، پنی سیلین و آنتی بیوتیک های هم خانواده آن از جمله آمپی سیلین می باشد (۷). هر چند استفاده مناسب از آنتی بیوتیک ها به درمان سریع عفونت استرپتوکوکی منجر می شود ولی تجویز نابجا و تغییر خصوصیات باکتری ها به ایجاد مقاومت دارویی باکتری می انجامد. بروز این امر باعث درمان ناقص گلودرد و افزایش عوارض آن می شود و از سوی دیگر تعداد ناقلین سالم مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج را افزایش می دهد (۶). پژوهش های اخیر، روند رو به رشد مقاومت به ماکرولیدها به ویژه اریترومایسین در نقاط مختلف دنیا را نشان می دهد (۷). در استرپتوکوک پیوژنز، مقاومت به ماکرولیدها به واسطه دو مکانیسم اصلی ایجاد می گردد. اولین مکانیسم، متیلاسیون آدنین در ناحیه ی بسیار حفاظت شده ۲۰۵۸ در لوپ پیتیدیل ترانسفراز در دومین 23SrRNA V است. آنزیم متیلاز عامل متیلاسیون در این منطقه است که توسط ژن *erm* (Erythromycin Resistance Methylase Gene) کد می شود و موجب مقاومت مشترک به ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرمین B (فنوتیپ MLSB) می گردد. این فنوتیپ با مقاومت بالا به تمام این آنتی بیوتیک ها همراه می باشد. ژن های *erm* استرپتوکوکوس پیوژنز در بسیاری از ترانسپوزون ها شناسایی شده اند، در نتیجه امکان انتقال این ژن ها از طریق ترانسفورماسیون و یا هم یوغی (کونژوگاسیون) وجود دارد (۸). یکی دیگر از مکانیسم های اصلی مقاومت به ماکرولیدها در استرپتوکوکوس پیوژنز، پمپ یونی افلوکس است. در باکتری ها ناقل های غشایی متعددی وجود دارد که تسهیل کننده خروج داروهای گوناگون به ویژه بسیاری از آنتی بیوتیک ها از درون سلول به محیط هستند. ممکن است ناقل های یاد شده، یک داروی خاص و یا در طیف

مبتلا به فارنژیت حاد، اوتیت و گلو مرونفریت حاد مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی شهر سنندج، انجام گرفت.

### روش بررسی

تهیه نمونه های باکتریایی :

بررسی حاضر یک مطالعه توصیفی - تحلیلی است که در فاصله زمانی شهریور ۱۳۹۲ تا بهمن ۱۳۹۲ از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی شهر سنندج صورت گرفت. در مقطع زمانی ذکر شده از ۸۲۵ نمونه بیمار ۴۰ نمونه استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A جداسازی شد. نمونه گیری بشرح زیر انجام گردید:

بیماران مبتلا به فارنژیت حاد، اوتیت و گلو مرونفریت حاد مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی که بیماری آن ها توسط پزشک مربوطه تایید شده بود با رضایت کامل و تکمیل پرسشنامه جهت نمونه برداری آماده شدند. در تمامی موارد داده های مربوط به سن، جنس، نوع نمونه، بیماری تشخیص داده شده توسط پزشک، استفاده بیمار از آنتی بیوتیک، داروی تجویز شده توسط پزشک و سابقه بستری شدن در بیمارستان در پرسشنامه تنظیمی ثبت گردید. در نمونه برداری از بیماران مبتلا به فارنژیت حاد، در زیر نور مستقیم و دید کافی با استفاده از یک آبسلاتنگ چوبی زبان فرد را پایین نگه داشته و سوپ سر پنبه ای استریل بر سطح لوزه های حاوی اگزودای چرکی و قسمت خلفی حلق کشیده شد. نمونه برداری از بیماران مبتلا به اوتیت حاد نیز با استفاده از سوپ استریل از ترشحات چرکی گوش خارجی انجام شد. نمونه برداری از بیماران مبتلا به گلو مرونفریت حاد به صورت گرفتن نمونه ادرار در ظرف های استریل بود. پس از تایید استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A توسط تست های افتراقی، یک لوپ پر از کلونی های جوان و خالص از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری در ۲ سی سی محیط BHI (Brain Heart Infusion Broth) مایع کشت داده شد (محیط کشت BHI طبق دستورالعمل کارخانه سازنده (37g/l) به میزان مورد نیاز ساخته شد و

وسیع تر به دلیل ماهیت هیدروفوبیک چند داروی خاص را انتقال دهند. با اینکه نقش اصلی ناقل های غشایی، محافظت باکتری ها از سموم خارجی و انتقال متابولیت های طبیعی سلول است، اما اهمیت کلینیکی آن ها، ایجاد مقاومت دارویی در باکتری های پاتوژن می باشد. ژن کد کننده پمپ یونی efflux در استرپتوکوکوس پیوژنز، mef (Macrolide Efflux Genes) نام دارد (۹). در مطالعه که توسط Bley در سال ۲۰۱۱ در آلمان انجام شد، ژن mef(A) به عنوان ژن غالب تعیین کننده مقاومت ماکرولیدی در استرپتوکوک پیوژنز و پنومونه تعیین شد (۱۰). در مطالعه ای دیگری که توسط Del Grosso در سال ۲۰۱۱ در انگلستان انجام شد، بیشترین عامل مقاومت ماکرولیدی استرپتوکوک پیوژنز، زیر کلاس mef(A) از دسته ژن های mef تعیین گردید. این مطالعه اهمیت تشخیص زیر کلاس های mef در ایزوله های استرپتوکوک را یادآوری نمود (۱۱). در مطالعه دیگری که توسط Humieres در سال ۲۰۱۲ در فرانسه انجام شد، مقاومت ماکرولیدی و سروتایپینگ از ۵۸۵ کودک فرانسوی که مبتلا به فارنژیت حاد و از نظر استرپتوکوک پیوژنز گروه A مثبت بودند، صورت گرفت. در این مطالعه، شیوع فنوتیپ و ژنوتیپ ایزوله های استرپتوکوک A از کودکان فرانسوی که مقاومت ماکرولیدی نشان داده بودند، از اکتبر ۲۰۰۹ تا می ۲۰۱۲ مورد بررسی قرار گرفت و با نتایج منتشر شده از سایر نقاط دنیا مقایسه گردید. نتایج نشان داد که بیشترین نمونه های مقاوم به اریترومايسين حاوی ژن mef(A) و بعد از آن ژن های erm(A) و erm(B) قرار داشتند (۱۲). مطالعه ای مشابهی توسط کارگر (karegar) در سال ۱۳۹۰ در ایران انجام شد که نتایج ارتباط معنی داری بین مقاومت به اریترومايسين و هر دو ژن erm(B) و mef(A) را نشان داد (۱۳). لذا این مطالعه با هدف تعیین میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی ماکرولیدی و شناسایی ژن های مقاومت از جمله ژن mef در ایزوله های استرپتوکوکوس پیوژنز (GAS) جدا شده از بیماران

CLA15 تهیه شده از شرکت پادتن طب ایران، روی محیط کشت قرار داده شد و محیط ها به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۰٪ دی اکسیدکربن قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت قطر هاله های عدم رشد اطراف هر یک از دیسک ها خوانده شد. با توجه به جدول استانداردهای آزمایشگاه بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute) حساسیت و مقاومت نمونه ها تفسیر شد (۱۴). در ادامه ارزیابی دو روش آنتی بیوگرم و D-TEST جهت آشکارسازی ایزوله های دارای مقاومت القایی iMLSb (دارای القا مقاومت به CC)، صورت گرفت.

بررسی ژنوتیپی ایزوله های GAS به روش PCR برای تعیین فاکتورهای مقاومت ماکرولیدی (mefA و mefE) باکتری های جدا شده از نمونه های بیماران، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام شد. جهت استخراج DNA ژنومی ایزوله های استرپتوکوک گروه A، از کیت DNA CinnaPure ساخت شرکت سیناژن استفاده شد. جهت تایید حضور DNA پس از استخراج، از هر نمونه ۴ میکرولیتر DNA به همراه ۲ میکرولیتر Loading dye رقیق شده به روی ژل آگارز ۱/۵٪ ران شد. سپس ۳ μl از نمونه DNA استخراج شده به همراه ۱۷۷ μl آب مقطر (ضریب رقت ۳۳) به کووت دستگاه اضافه شد و میزان جذب نوری آن اندازه گیری گردید. با در نظر گرفتن نسبت  $OD_{260}/OD_{280}=1.8-2$  کیفیت مطلوب DNA برای استفاده در PCR، نمونه های مناسب تعیین گردید. در ادامه واکنش PCR برای ژن های mefA و mefE انجام شد. مشخصات پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ آمده است. برای ژن های mefA و mefE فرآیند PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت Acc Power PCR PreMIX (شرکت BioNEER) ساخت کشور کره) انجام گردید. پس از آماده سازی، میکروتیوب ها در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) Mastercycler gradien قرار داده شد. ژن های هدف

بعد از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۵-۸ دقیقه استریل گردید و پس از سرد شدن، محیط کشت به ویال های استریل در پیچ دار منتقل شد. ویال ها در ادامه به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. این محیط مایع به مدت ۷ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد و رسوب به دست آمده در محیط نوترینت برات (۸۰٪) + گلیسرین (۲۰٪) مخلوط شد و داخل کرایوتیوب های استریل چند پرل استریل قرار گرفت و پس از چند بار اینورت کردن مستقیماً به دمای ۷۰- درجه سانتی گراد انتقال یافت.

کشت نمونه ها

سواپ های تهیه شده از بیماران مبتلا به فارنژیت حاد و اوتیت حاد، بلافاصله بر روی محیط کشت بلاد آگار حاوی خون گوسفندی ۵٪، کشت داده شدند. همچنین از نمونه ادرار بیماران گلودولونفریت حاد به کمک لوپ استریل، بر روی محیط کشت بلاد آگار حاوی ۵٪ خون دفیبرینه گوسفندی کشت داده شد. تمامی محیط های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و دی اکسیدکربن ۱۰٪ انکوباسیون شدند.

انجام رنگ آمیزی و تست های افتراقی جهت تشخیص نوع باکتری

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون رنگ آمیزی گرم، تست های افتراقی شامل کاتالاز، بررسی همولیز، تست حساسیت به باسیتراسین و تست D-zone روی نمونه های باکتریایی رشد یافته، انجام شد.

تست آنتی بیوگرم (دیسک دیفیوژن)

برای تعیین الگوی حساسیت باکتری های جدا شده به آنتی بیوتیک ها از روش انتشار دیسک استفاده گردید. از نمونه های مثبت، کلونی های مجزا از استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A انتخاب و روی محیط آگار خوندار کشت داده شد و سپس دیسک های پنی سیلین ۱۰ μg P، اریترومايسين ۱۵ μg E، کلیندامایسین ۲ μg CC، آزیترومایسین ۱۵ μg AZM و کلاریترومایسین μg

از سایز مارکر (bp) ۱۰۰ جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده گردید. پس از اتمام واکنش، محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. در ادامه ارزیابی دو روش آنتی بیوگرم و PCR جهت آشکار سازی ایزوله های حامل ژن مقاومت ماکرولیدی از ایزوله های بدون مقاومت ماکرولیدی، صورت گرفت. بعد از بدست آمدن نتایج، آنالیز آماری با نرم افزار SPSS و EXCEL انجام گرفت.

در ترموسایکلر با برنامه ای شامل واسرشت سازی (Denaturation) اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) پرایمر ها در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش (Extention) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و سپس گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در این بررسی

جدول ۱ - مشخصات پرایمرهای mefA و mefE

Primer	Sequence	mer	GC%	Tm	Product(bp)
mefA	Forward: GGGGTCTATTATTA GGGTT	19	42	55	339bp
mefE	Forward: AGGA GGCTTATTATTA GGAA G	21	38	58	340bp
Mef	Riverse: TACCTGATAGTAAAAACCAATG	22	32	57	-

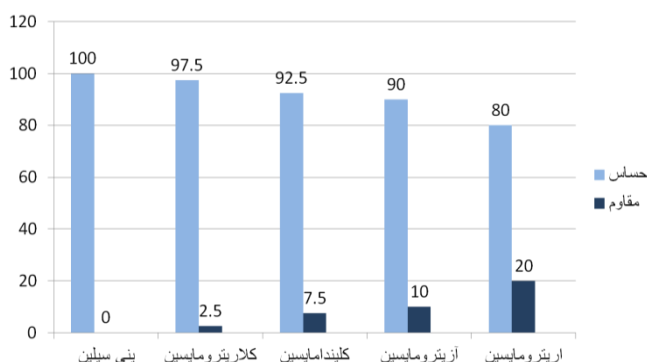
شد. از نتایج بدست آمده از PCR ایزوله های دارای مقاومت ماکرولیدی (۱۰۰٪) ۱۶، تعداد (۵۰٪) ۸ مورد، حامل ژن mefA (شکل ۱) و تعداد (۶۲/۲۵٪) ۱ حامل ژن mefE (شکل ۲) بودند و تعداد (۳۷/۵٪) ۷ هیچکدام از دو ژن mefA/E را نداشتند (نمودار ۳). از نتایج بدست آمده از PCR ایزوله های بدون مقاومت ماکرولیدی، فقط یکی از آن ها، حامل ژن mefA بود. همچنین یکی از ایزوله های بدون مقاومت در آنتی بیوگرم، در PCR حامل ژن مقاومت می باشد.

باتوجه به ضرایب همبستگی فی، کرامر و توافقی C، ارتباط معنی داری بین ابتلا به استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A و جنسیت مبتلایان وجود نداشت ( $\chi^2=0$ ) ولی برای سن مبتلایان وجود داشت ( $\chi^2=0.753$ ). همچنین ارتباط معنی دار و همبستگی اندکی بین مقاومت ماکرولیدی ایزوله های استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A و

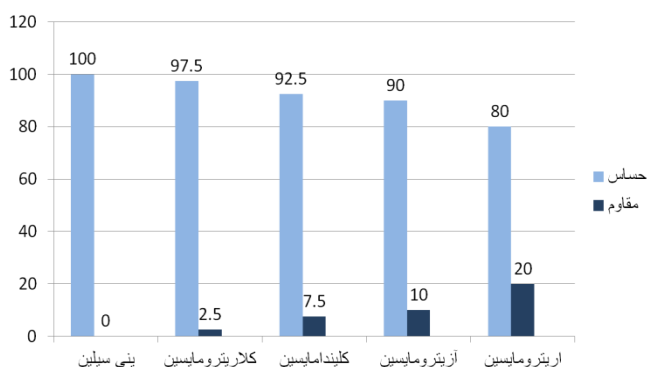
## نتایج

از ۸۲۵ بیمار تعداد ۴۰ (۴/۸۴٪) نمونه باکتری استرپتوکوک پیوژنز توسط تست های تشخیصی - افتراقی جدا گردید. در تست آنتی بیوگرم، از مجموع ۴۰ نمونه ایزوله شده تعداد ۱۶ مورد حداقل به یکی از ماکرولیدهای مورد استفاده در آنتی بیوگرم مقاومت نشان دادند و تمامی ایزوله ها نسبت به پنی سیلین حساس بودند. هم چنین تعدادی از ایزوله های مقاوم به ماکرولیدها هم زمان به بیش از یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند (نمودار ۱). به علاوه، بیشترین درصد ایزوله های استرپتوکوک پیوژنز دارای مقاومت ماکرولیدی، مربوط به محل نمونه گیری ناحیه گلو بود. از تست D-TEST در ایزوله های دارای مقاومت به اریترومايسين، بیشترین درصد فراوانی فنوتیپ های به دست آمده مربوط به فنوتیپ M (۵۰٪) بود (نمودار ۲). همچنین در D-TEST یک مورد مقاومت القایی به کلیندامایسین نسبت به آنتی بیوگرم افزوده

جنسیت (£=0.386) و سن (£=0.223) مبتلایان وجود داشت.

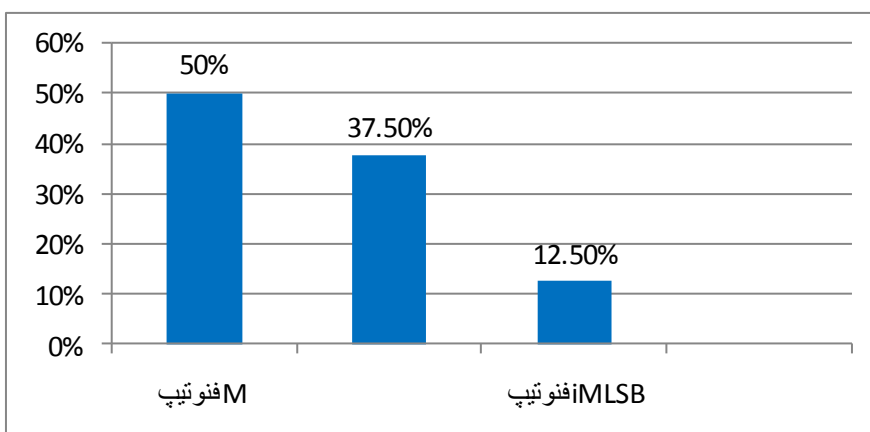


نمودار ۱. درصد فراوانی ایزوله های دارای مقاومت ماکرولیدی بر حسب آنتی بیوتیک مورد استفاده در تست آنتی بیوگرم. از مجموع ۴۰ نمونه ایزوله شده تعداد ۱۶ مورد آن ها حداقل به یکی از ماکرولیدهای مورد استفاده در آنتی بیوگرم مقاومت نشان دادند و تمامی ایزوله ها نسبت به پنی سیلین حساس بودند. هم چنین تعدادی از ایزوله های مقاوم به ماکرولیدها هم زمان به بیش از یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند.

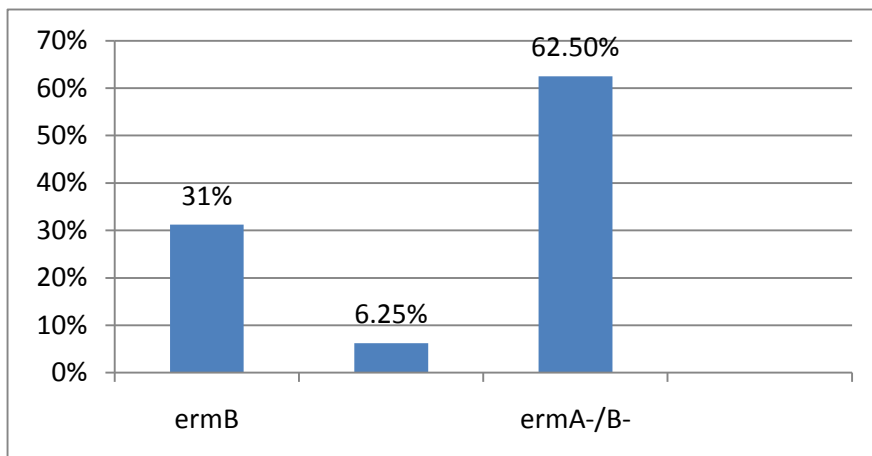


نمودار ۲. درصد فراوانی فنوتیپ های بدست آمده در بین ایزوله های استرپتوکوکوس پیوژنز در تست D-TEST. با توجه به نتایج به دست آمده از

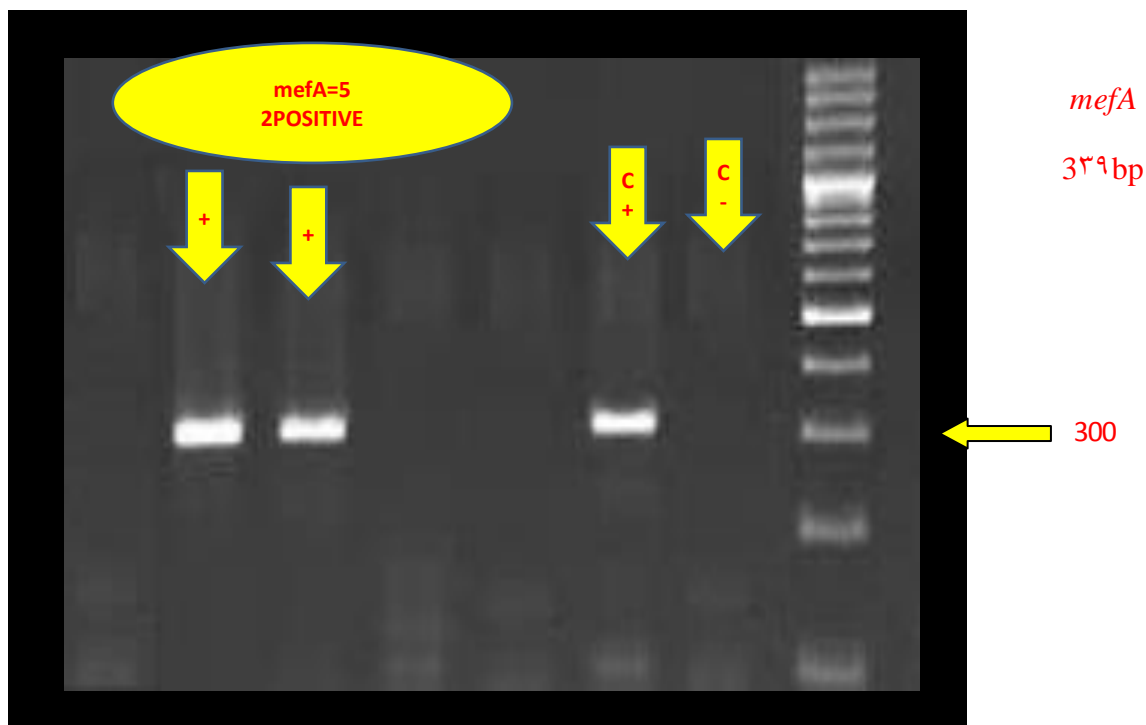
تست D-TEST در ایزوله های دارای مقاومت به اریترومایسین، بیشترین درصد فراوانی فنوتیپ های به دست آمده مربوط به فنوتیپ M (۵۰٪) بود.



نمودار ۳. درصد فراوانی ژن های mefA/E در بین ایزوله های استرپتوکوکوس پیوژنز با مقاومت ماکرولیدی



نمودار ۴ درصد فراوانی ژنهای *mefA* و *mefE* در بین ایزوله های استرپتوکوکوس پیوژنز با مقاومت ماکرولیدی



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR برای ژن *mefA* برای ایزوله های GAS مقاوم ماکرولیدی

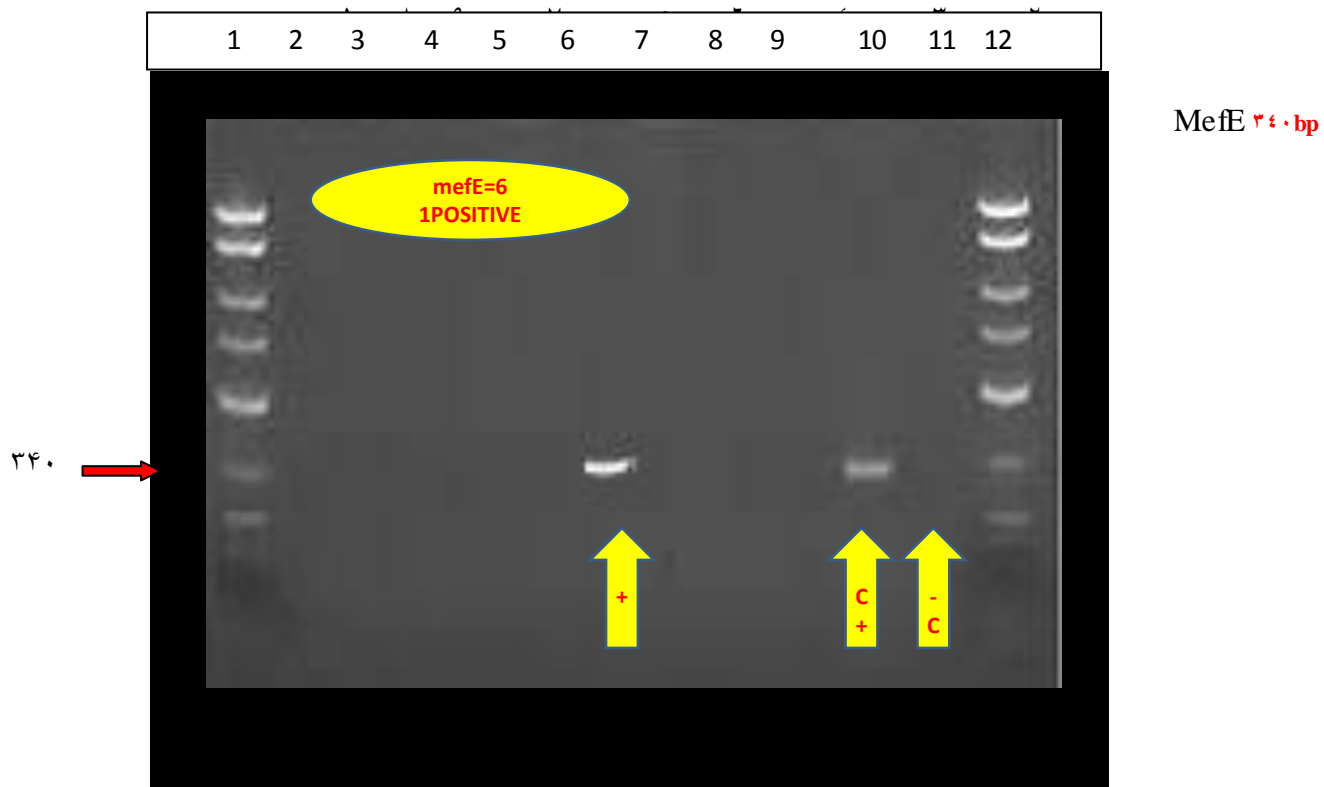
لاین ۱: مارکر، وزن مولکولی (۱۰۰-۱۰۰۰ bp)

لاین ۲: سوش کنترل منفی، فاقد ژن *mefA*

لاین ۳: سوش کنترل مثبت (PTCC:1447 مرکز کلکسیون باکتری های صنعتی ایران)، دارای ژن *mefA*

لاین های ۴، ۵، ۸: نمونه فاقد ژن *mefA* ۳۳۹bp

لاین ۶ و ۷: نمونه های مثبت دارای ژن *mefA* ۳۳۹bp



شکل ۲. الکتروفورز محصولات PCR برای ژن *mefE* برای ایزوله های *GAS* مقاوم ماکرولیدی لاین ۱۲ او: مارکر، وزن مولکولی (۱۰۰ - ۱۰۰۰bp)  
 لاین های ۲، ۳، ۴ و ۵ و ۷ و ۸ و ۹: نمونه های منفی فاقد ژن *mefE* ۳۴۰bp  
 لاین ۶: نمونه دارای ژن *mefE* ۳۴۰bp  
 لاین ۱۰: سوش کنترل مثبت (PTCC:104030 مرکز کلکسیون باکتری های صنعتی ایران)، دارای ژن *mefE*  
 لاین ۱۱: سوش کنترل منفی، فاقد ژن *mefE*:

## بحث

در این مطالعه از میان ۴۰ ایزوله استرپتوکوک پیوژنز، در ۱۶ مورد مقاومت ماکرولیدی مشاهده شد. آنالیز مولکولی ایزوله های فوق از نظر وجود ژن *mef* مشخص نمود، ۴ (۵۰٪) ایزوله دارای فنوتیپ M، همه نمونه ها حامل ژن *mefA* (۵۰٪)، ۴ ایزوله فنوتیپ MLSB و هیچ نمونه ای دو ژن *mefA/E* را نداشتند. از میان ۱۶ ایزوله مقاوم ماکرولیدی (۵۰٪) ۸ ایزوله حاوی ژن *mefA* (۶۲/۲۵٪)، ۱ مورد حاوی ژن *mefE* (۴۳/۷۵٪) و ۷ ایزوله هیچکدام از ژن های *mefA/E* را نداشتند. این نتیجه می تواند به دلیل بیان نشدن این ژن در اثر جهش در DNA، قرار داشتن ژن بر روی ترانسپوزون و از همه مهم تر حساسیت بالای PCR نسبت به سایر تست های تشخیصی تفسیر نمود. همچنین استرپتوکوک های گروه A بتا همولیتیک به عنوان عوامل بالقوه انتشار گلودرد در بین بیماران، علی الخصوص کودکان مراجعه کننده به بیمارستان های سندج شناخته شد. مقاومت دارویی استرپتوکوک بتا همولیتیک نسبت به اریترومايسين، آزیترومایسین، کلیندامایسین و کلاریترومایسین بترتیب ۲۰، ۱۰، ۷/۵ و ۲/۵ درصد در جامعه مورد مطالعه بوده است. استرپتوکوک پیوژنز کماکان حساسیت به سزایی نسبت به پنی سیلین دارد. نتایج ما با یافته های مطالعه Kocoglu در سال ۲۰۰۶ (۱۵) تا حدودی مطابقت دارد. وی با بررسی ۲۸۹ مورد بیان کرد که فقط ۴٪ آنها به عنوان ایزوله استرپتوکوک هستند و در مطالعه حاضر میزان ابتلا به باکتری استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A به میزان ۴/۸۴٪ بود که با مطالعه فوق همخوانی دارد (۱۲). در این مطالعه میزان ابتلا به GAS (۴/۴۸٪) ۴۰ مورد بود که، (۴۷/۵٪) ۱۹ مورد مرد و (۵۲/۵٪) ۲۱ مورد زن و میانگین سنی این ایزوله ها ۱۲/۳۷

سال بود که از نظر آماری ارتباط معنی دار و همبستگی میان مبتلایان به استرپتوکوک گروه A با جنسیت آنها وجود نداشت ولی بین مبتلایان به GAS و سن افراد مورد مطالعه همبستگی وجود داشت. این اتفاق می تواند به علت شیوع این باکتری در میان کودکانی با یک سن خاص و همچنین فصل انجام مطالعه باشد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه رودپیما (Rodpyma) که بر روی ۴۴۳ کودک مبتلا به گلودرد انجام شده بود، مطابقت دارد (۱۶).

میزان ابتلا به گلودرد استرپتوکوکی در میان جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق ۳/۳۹٪ بود که نسبت به مطالعات Durmaz در ترکیه (۱۷) و Rijal و همکاران در نپال (۱۸)، از نظر ابتلا به گلودرد استرپتوکوکی در سطح پایین تری بود. این میزان فراوانی گلودرد بدست آمده تحقیق جاری می تواند ناشی از عوامل مختلف آب و هوایی، زمان و جمعیت خاص مورد مطالعه باشد. در تعداد زیادی از مطالعات میزان گلودرد در کودکان ۱۵ تا ۲۰ درصد برآورد شده و این میزان در بالغین کاهش قابل توجهی دارد، اگرچه در برخی از مطالعات شیوع این بیماری را بین ۱۰ تا ۵۰ درصد اعلام نموده اند (۱۴).

از دیگر نتایج مطالعه حاضر این بود که از ۴۰ (۴/۸۴٪) نمونه استرپتوکوکوس پیوژنز، ۱۶ (۴۰٪) مورد مقاومت ماکرولیدی نشان دادند و از میان ۴۰ ایزوله GAS، تعداد (۲۰٪) ۸ مورد به اریترومايسين، (۱۰٪) ۴ به آزیترومایسین، (۷/۵٪) ۳ به کلیندامایسین و یک مورد به کلاریترومایسین مقاومت داشتند و تمامی ایزوله ها به پنی سیلین حساس بودند. این نتایج با مطالعات انجام شده در سایر نقاط دنیا تقریباً هماهنگی دارد (۵-۱). مقاومت به اریترومايسين وابسته به پمپ افلوکس در استرپتوکوکوس، با یک الگوی عملکردی سطح پایین مقاومت در مجاورت آنتی بیوتیک

نتایج مطالعه حاضر تأکید مجددی بر حفظ حساسیت استرپتوکوک پیوژنز به پنی سیلین می باشد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری مدیریت و پرسنل آزمایشگاه های بیمارستان توحید و بعثت شهرستان سنندج تشکر می کنیم.

های MLSB (ماکرولید، لینکوزامید، استرپتوگرمین B) همراه است که ژن *mef* و زیر کلاس هایش، آن را کد می کنند. نمونه هایی که فنوتیپ MLSB دارند ژن *erm* و زیر کلاس های آن، بالاترین میزان همکاری در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام کلیندامایسین و تتراسایکلین را دارا هستند (۱۹).

نتایج تحقیق حاضر همچنین در راستای مطالعات Carmen Ardanuy در فاصله سال های ۲۰۰۸-۱۹۹۳ و Athanasios در سال ۲۰۰۹ می باشد (۲۱-۲۰). Del Grosso سال ۲۰۱۱ در آلمان (۱۰) همچنین Humieres در سال ۲۰۱۲ در فرانسه پژوهش های مشابهی انجام دادند که نتایج آنها نشان داد، بیشترین نمونه های مقاوم به اریترومایسین، حاوی ژن *mef(A)* و در ادامه ژن های *erm(A)* و *erm(B)* می باشد (۱۲). مطالعه ای کارگر (karegar) در سال ۱۳۹۰ در ایران نیز ارتباط معنی داری بین مقاومت به اریترومایسین و هر دو ژن *erm(B)* و *mef(A)* را نشان داد (۱۳).

نتایج مطالعه حاضر همچنین تأکید مجددی بر حفظ حساسیت استرپتوکوک پیوژنز به پنی سیلین می باشد و می توان آن را بدون نیاز به آنتی بیوگرام در درمان استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A در افرادی که نسبت به این آنتی بیوتیک حساسیت ندارند، به کار برد.

### نتیجه گیری

در میان ایزوله های GAS جامعه مورد مطالعه مقاوم به اریترومایسین، فنوتیپ M دارای بیشترین شیوع بود. در این بررسی در مقایسه ارزیابی دو روش PCR و آنتی بیوگرام، روش PCR دارای حساسیت و ویژگی بالاتری بود. به علاوه،

## Reference

1. Mayanskiy, N., Alyabieva, N., Ponomarenko, O., Lazareva, A., Katosova, L., Ivanenko, A. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia. *Int J Infect Dis* 2014;20:58-62.
2. Rudolph, K., Bulkow, L., Bruce, M., Zulz, T., Reasonover, A., Harker-Jones, M. Molecular resistance mechanisms of macrolide-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Alaska, 1986 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5415-22.
3. Kanungo, R. Macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae*: Opening Pandora's Box. *Indian J Med Microbiol* 2016; 34:5-6.
4. Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., *Harrisons principles of internal medicine*. 16<sup>th</sup> ed. New York: McGraw- Hill 2005;5:824-5.
5. Simoes, A.S., Pereira, L., Nunes, S., Brito-Avo, A., Lencastre, H., Sa-Leao R. Clonal evolution leading to maintenance of antibiotic resistance rates among colonizing Pneumococci in the PCV7 era in Portugal. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2810-7.
6. Michos, A.G., Bakoula, C.G., Braoudaki, M. Macrolide resistance in streptococcus pyogenes :prevalence, resistance determinants and emm types. *Diagn Microbiol Infect D J* 2009;64:295-9.
7. Ghasemi, A., Namaki, S., Mirshafiey, A. S pneumoniae. *J of Chinese Clin mid* 2009; 4:1-8.
8. Ochoa, T.J., Guerra, R.R., ernandez, H. Penicillin resistance and serotypes/ serogroups of *Streptococcus pneumonia* in nasopharyngeal carrier children younger than 2 years in Lima, Peru. *Diagn Microbiol Infect Dis J* 2005; 51:59-64.
9. Green, M.D., Beall, B., Marcon, M.J. Multicenter surveillances of their valence and molecular epidemiology of macrolide resistance amonpharyngeal isolates of group A streptococci in the USA. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:1240-3.
10. Bley, Ch., Linden, M., Reinert, R. Mef(A) is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011; 37:425–431.
11. Del Grosso, M., Camilli, R., Barbabella, G., Northwood, J.B., Farrell, D.J., Pantosti, A. Genetic Resistance Elements Carrying mef Subclasses Other than mef(A) in *Streptococcus pyogenes*. *J antimicrobial Agents and chemotherapy* 2011; 4: 3226 –3230.
12. Humieresa, C., Cohenb, R., Levyb, C., Bideta, P., Thollotd, F., Wollnerb, A., Bingena, E. Decline in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from French children. *International Journal of Medical Microbiology* 2012; 302: 300- 303.
13. kargar, M., Baghernejad, M., Ghorbani-Dalini, S., Hashemizadeh, Z. Evaluation of molecular mechanisms resistance to macrolide by *S. pneumonia* strains isolated from Nemazee and Shahid Faghihi Hospitals in Shiraz. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2012, 16: 83-91
14. Deurenberg, R.H. The molecular evolution of methicill inresistant staphylococcus aureus. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases J* 2007;13: 222-235.
15. Kocoglu, E., Karabay, O., Yilmaz, F., Ekerbicer, H. The impact of incubating the throat culture for 72h on the diagnosis of group A betahemolytic streptococci. *Auris Nasus Larynx J* 2006; 33:311-3.
16. Rodpyma, SH., Babaii, A., velaii, N. Streptococcal Pharyngitis among children. *Journal of Iran University of Medical Sciences* 1995; 2: 242-235.
17. Durmaz, R. DB, Bayraktar, M., Ozerol, IH. Prevalence of group A Streptococcal carriers in asymptomatic children and clonal relatedness among isolates in Malaya, Turkey. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5285-7.

18. Rijal, K., Dhakal, N., Shah, R., Timilsina, S., Mahato, P., Thapa, S., Ghimire, P. Antibiotic susceptibility of Group A Streptococcus isolated from throat swab culture of schoolchildren in Pokhara. Nepal. Nepal Med Coll J 2009; 11(4): 238-240.
19. Humieresa, C.D., Cohenb, R., Levyb, C., Bideta, P., Thollotd, F., Wollnerb, A., Bingena, E., Decline in macrolide-resistant Streptococcus pyogenes isolates from French children. International Journal of Medical Microbiology 2012; 302: 300– 303.
20. Ardanuy, C., Domenech, A., Rolo, D., Calatayud, L., Tubau, F., Ayats, J., Martin, R., Lin J. Molecular characterization of macrolide- and multidrug-resistant Streptococcus pyogenes isolated from adult patients in Barcelona, Spain (1993–2008). J Antimicrob Chemother 2010; 65: 634–643.
21. Athanasios, G., Bakoulaa, C.H., Braoudakia, M., Koutouzia, F.I., Romaa, E. S., Pangalisb, A., Nikolopouloua, G., Kirikoub, E., Vassiliki, P. Syriopouloua, Macrolide resistance in Streptococcus pyogenes: prevalence, resistance determinants, and emm types. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease J 2009; 64: 295–299.