

## Determination of Antimicrobial Resistance Pattern in Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis* and Detection of Resistance Genes to Clindamycin and Erythromycin

Hamed Tahmasebi<sup>1</sup>, Sanaz Dehbashi<sup>2</sup>, Mohammad Reza Arabestani<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
2. Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3. Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2018/02/26  
Accepted: 2018/08/05  
Available online: 2018/10/11

#### Article Subject:

Antibiotic Resistance

IJMM 2018; 12(3): 169-178

#### Corresponding author:

**Mohammad Reza Arabestani**  
Brucellosis Research Center,  
Hamadan University of Medical  
Sciences, Hamadan, Iran

**Tel:** 09188662009

#### Email:

mohammad.arabestani@gmail.com

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** Clindamycin is one of the selective drugs for treatment of staphylococcal infections. Molecular methods can complete phenotypic methods to diagnosis induction resistance to clindamycin. The aim of this study was to identify the genes responsible for the resistance to clindamycin and erythromycin, and determine their antibiotic resistance pattern.

**Materials and Methods:** 100 isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* were isolated from 466 different clinical specimens using biochemical tests. Using the disc diffusion method, AntibioGram susceptibility test was conducted to determinate lincosamides and tetracycline resistance pattern. Then *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* genes were identified and investigated by PCR method.

**Results:** Out of 100 strains of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens, 5 isolates were identified as *S. saprophyticus* (5%) and 55 isolates of *S. epidermidis* (55%), respectively. Out of the 5 isolated of *S. saprophyticus*, 2 (40%) isolates were resistant to methicillin and one (20%) isolate had D phenotype. In addition, 1 isolate had *ermA* gene and 1 isolate had *ermB*. Out of the 55 isolates of *S. epidermidis*, 25 (45.45%) isolates were resistant to methicillin, of which nine (36%) isolates had D phenotype. Also, 4 (16%) isolates had *ermA* gene, 3 (12%) isolates had *ermB*, 6 (24%) isolates had *ermC* and 1 (4%) isolate was carrying the *msrA*.

**Conclusions:** The phenotypic pattern of resistance to macrolide- lincosamides groups does not have a high degree of accuracy in detecting methicillin-resistant MLS<sub>B</sub> strains.

**Keywords:** *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, Methicillin resistance, Macrolides, Lincosamides

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani M R. Determination of Antimicrobial Resistance Pattern in Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis* and Detection of Resistance Genes to Clindamycin and Erythromycin. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :169-178



## تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی‌سیلین و ریبای ژن‌های مقاومت به کلیندامایسین و اریترومایسین

حامد طهماسبی<sup>۱</sup>، ساناز ده‌باشی<sup>۲</sup>، محمدرضا عربستانی<sup>۳</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲. گروه تخصصی باکتری‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳. مرکز تحقیقات بروسوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: یکی از داروهای منتخب برای درمان برخی از عفونت‌های استافیلوکوکوسی، کلیندامایسین است. روش‌های مولکولی می‌تواند تکمیل‌کننده روش‌های فنوتیپی برای تشخیص مقاومت القایی به کلیندامایسین باشد. هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های عامل مقاومت به کلیندامایسین و اریترومایسین و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها است.

مواد و روش کار: ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس کواگولاز منفی از ۴۶۶ نمونه بالینی مختلف با استفاده از آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی جداسازی شدند. با استفاده از روش دیسک دیفیوژن الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به لینکوزامیدها و تتراسایکلین‌ها به دست آمد. سپس، ژن‌های *ermA*، *ermB*، *ermC* و *msrA* با استفاده از روش PCR شناسایی و بررسی شدند.

یافته‌ها: از ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف، ۵ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (۵٪) و ۵۵ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۵۵٪) بودند. از ۵ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ۲ جدایه (۴۰٪) مقاوم به متی‌سیلین و ۱ جدایه (۲۰٪) دارای فنوتیپ D گزارش شد. همچنین، ۱ جدایه (۵۰٪) *ermA* و ۱ جدایه (۵۰٪) *ermB* داشتند. از ۵۵ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۲۵ جدایه (۴۵/۴۵٪) مقاوم به متی‌سیلین تعیین شد که از این میان ۹ جدایه (۳۶٪) فنوتیپ D داشتند. همچنین ۴ جدایه (۱۶٪) دارای ژن *ermA*، ۳ جدایه (۱۲٪) دارای ژن *ermB* و ۶ جدایه (۲۴٪) دارای ژن *ermC* و ۱ جدایه (۴٪) هم حامل ژن *msrA* مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: الگوی فنوتیپی مقاومت به گروه‌های ماکرولید - لینکوزامیدی، دقت بالایی برای تشخیص سویه‌های MLS<sub>B</sub> مقاوم به متی‌سیلین ندارد.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۷  
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۱۴  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹  
موضوع:  
مقاومت پادزیستی (آنتی‌بیوتیکی)  
IJMM1397;12(3): 169-178

### نویسنده مسئول:

محمدرضا عربستانی

مرکز تحقیقات بروسوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تلفن: ۰۹۱۸۸۶۶۲۰۰۹

پست الکترونیک:

mohammad.arabestani@gmail.com

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، مقاومت به متی‌سیلین، ماکرولید، لینکوزامید

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

### مقدمه

باکتری از طریق اتصال به 23S rRNA ریبوزومی اشاره کرد. MLS<sub>B</sub> از داروهای انتخابی برای درمان عفونت‌های پوستی استافیلوکوکوسی مقاوم به متی‌سیلین هستند که استفاده گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها، زمینه‌ساز ایجاد مقاومت به این گروه از داروها شده است (۲). مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها، ممکن است سبب بروز مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های MLS<sub>B</sub> شود.

ماکرولید - لینکوزامید - استرپتوگرامین B (MLS<sub>B</sub>) گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که برای درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس‌ها از آنها استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های MLS<sub>B</sub> تفاوت‌های ساختاری مختلفی با یکدیگر دارند؛ اما عملکرد یکسانی در مقابل باکتری‌ها ایفا می‌کنند (۱). از مهم‌ترین نقش‌های عملکردی این گروه از داروها می‌توان به مهار ساخت پروتئین

و به این ترتیب می‌تواند سبب القای مقاومت در کلیندامایسین شود (۱۰). مقاومت به واسطهٔ افلاکس پمپ‌ها به دلیل حضور ژن *msrA* است که باعث مقاومت ساختاری به اریترومایسین و حساسیت به کلیندامایسین شده و سبب بروز فنوتیپ N می‌شود. استافیلوکوکوس‌های دارای ژن *msrA* نوعی پمپ افلاکس را کد می‌کنند که موجب ایجاد مقاومت ساختاری نسبت به اریترومایسین و حساسیت نسبت به کلیندامایسین می‌شود. به ایزوله‌های دارای ژن *msrA* اصطلاحاً ایزوله‌های MS یا فنوتیپ N می‌گویند. مقاومت القایی نسبت به کلیندامایسین را نمی‌توان با استفاده از روش‌های آنتی‌بیوگرام معمول تشخیص داد (۸). این احتمال وجود دارد که ایزوله‌های iMLS<sub>B</sub> حین درمان، دچار موتاسیون شده و تبدیل به cMLS<sub>B</sub> شوند و بنابراین دیگر به درمان پاسخ ندهند. به دلیل وجود فنوتیپ‌های مختلف MLS<sub>B</sub> و تشخیص‌ندادن مقاومت القایی به کلیندامایسین با روش‌های آنتی‌بیوگرام معمول، بسیاری از پزشکان با دیدن مقاومت به اریترومایسین از تجویز کلیندامایسین خودداری می‌کنند؛ در صورتی که تمامی سویه‌های مقاوم به اریترومایسین به کلیندامایسین مقاوم نیستند (۳، ۱۱). این امر سبب شده است که شناسایی سویه‌های مقاوم به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها، اهمیت ویژه‌ای داشته باشند. به منظور غربالگری اولیه، تشخیص فنوتیپی جدایه‌های مقاوم از روش‌های مختلفی می‌توان استفاده کرد. یکی از روش‌های مطمئن، کم‌هزینه، ساده و با حساسیت و دقت بالا، روش D-Test است. در کنار این روش، می‌توان از PCR به‌عنوان یک روش دقیق‌تر استفاده کرد. هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های عامل مقاومت به کلیندامایسین - اریترومایسین و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس مقاوم به متی‌سیلین است.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری و کشت نمونه‌ها

در مرحلهٔ نخست این مطالعه که از نوع توصیفی - مقطعی است، در محدودهٔ زمانی زمستان ۹۴ تا بهار ۹۶ و طی یک دورهٔ ۱۳ ماهه، ۴۶۶ نمونهٔ بالینی مختلف (خون، ادرار، مایع مغزی - نخاعی، سواب بینی، زخم و سایر) از مراکز منتخب درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر همدان جمع‌آوری شد. برای تفریق استافیلوکوکوس‌ها از استرپتوکوکوس‌ها از آزمون کاتالاز استفاده شد. برای تشخیص استافیلوکوکوس‌ها از میکروکوکوس‌ها نیز از

مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس‌ها به دلیل تولید پروتئینی به نام Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) است که میل ترکیبی کمی با بتالاکتام‌ها دارد و سبب مقاومت به بتالاکتام‌ها می‌شود (۳). عامل مقاومت به متی‌سیلین در استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ژن *mecA* است که باعث بیان شدن پروتئین PBP2a در باکتری شده و مانع اتصال آنتی‌بیوتیک به باکتری می‌شود و در نتیجه اثر آن را خنثی می‌کند. این ژن روی یک کاست متحرک ژنی به نام کاست کروموزومال استافیلوکوکی وابسته به *SCCmec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) قرار گرفته که باعث بروز مقاومت در سطوح متفاوت می‌شود (۴). استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی که امروزه جزو عوامل ایجادکنندهٔ عفونت‌های بیمارستانی دسته‌بندی می‌شوند، با کسب مقاومت‌های القایی، در کنار مقاومت به متی‌سیلین، به گروه‌های MLS<sub>B</sub> نیز مقاومت پیدا کرده‌اند. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس که فراوان‌ترین کواگولاز منفی این گروه است، می‌تواند برخی مقاومت‌ها را بین گونه‌های مختلف انتقال دهد (۵، ۶).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه MLS<sub>B</sub> با سه مکانیسم متفاوت به وجود می‌آید که عبارت‌اند از: تغییر سایت هدف ریبوزومی؛ عملکرد پمپ‌های افلاکس؛ غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک به واسطهٔ آنزیم‌ها. در این بین تغییر سایت هدف ریبوزومی از شایع‌ترین مکانیسم‌های مقاومتی است که از طریق ژن‌های (*erm*) *erythromycin ribosome methylase* به وجود می‌آید (۷). ژن‌های موجود در استافیلوکوکوس‌ها، بر پلاسمیدها یا ترانسپوزون‌ها حمل می‌شوند که با تولید آنزیم‌های متیلاز سبب متیلاسیون زیرواحد 23S rRNA ریبوزومی شده و در نهایت مانع اتصال آنتی‌بیوتیک به جایگاه ریبوزومی خود می‌شود (۸). این رویه باعث بروز مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B می‌شود. این نوع مقاومت‌ها که به دو صورت مقاومت دائمی (constitutive MLS<sub>B</sub>) و مقاومت القایی (inducible MLS<sub>B</sub>) هستند، از طریق مجموعه‌ای از ژن‌های *erm* شامل *ermB*، *ermC*، *ermF* و *ermG* به‌وجود می‌آیند (فنوتیپ D) (۹). در مقاومت‌های دائمی cMLS<sub>B</sub>، متیلازهای mRNA بدون نیاز به الفاکندنده تولید می‌شوند که در این حالت، سویه‌های مقاوم‌شده به تمامی ماکرولیدها، لینکوزامیدها و استرپتوگرامین B مقاومت پیدا می‌کنند. در مقاومت القایی iMLS<sub>B</sub>، متیلازهای mRNA فقط در حضور یک ماکرولید الفاکندنده تولید می‌شوند. در این نوع مقاومت اریترومایسین به‌عنوان یک عامل الفاکندندهٔ تولید متیلاز عمل کرده

استافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591 به‌عنوان سویه استاندارد کنترل مثبت (مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، کلیندامایسین و تتراساکلین) و از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به‌عنوان کنترل منفی (حساس به همه آنتی‌بیوتیک‌ها) استفاده شد (۱۳، ۱۲).

#### تعیین سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس مقاوم به متی‌سیلین

به‌منظور تعیین سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس مقاوم به متی‌سیلین، روش تعیین حداقل غلظت مهاري (Minimum Inhibitory Concentration) با استفاده از نوارهای E-test آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین و اوگزاسیلین (لیوفلیچم، ایتالیا) به کار رفت. در این روش و براساس استاندارد CLSI حداقل غلظت مهاري  $\leq 2$  میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اوگزاسیلین و حداقل غلظت مهاري  $\leq 4$  میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سفوکسیتین به‌عنوان شاخصه مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شد (۱۲).

#### تعیین الگوی مقاومتی به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی در استافیلوکوکوس اورئوس

نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، دیترومایسین (۱۵ میکروگرم) و تلیترومایسین (۱۵ میکروگرم) (MAST انگلستان) به روش دیسک دیفیوژن تعیین مقاومت شدند. قطر هاله‌های ایجادشده براساس استاندارد CLSI مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۴).

#### تعیین سویه‌های مقاوم به لینکوزامیدها و تتراسایکلین‌ها با آزمون القا

بدین منظور، از دیسک‌های کلیندامایسین (۲ میکروگرم) (MAST انگلستان) و اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) (MAST انگلستان) استفاده شد. براساس دستورالعمل CLSI دیسک‌ها در فاصله ۲۶-۱۵ میلی‌متری از یکدیگر قرار داده شدند. مسطح‌شدن منطقه مهاري در اطراف دیسک کلیندامایسین که در مجاورت دیسک اریترومایسین قرار می‌گیرد (منطقه مهاري به شکل حرف D) به‌عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته شد. در این مطالعه از سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 به‌عنوان کنترل

آزمایش اکسیداسیون و احیا استفاده شد. برای تفکیک استافیلوکوکوس‌های کوگولاز مثبت از استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی، آزمون کوگولاز لوله‌ای به کار رفت.

#### تعیین گونه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس

برای تفکیک استافیلوکوکوس‌های کوگولاز مثبت از استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی از تست کوگولاز لوله‌ای استفاده شد. برای شناسایی و جداسازی دو گونه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس علاوه بر استفاده از دیسک‌های نووبیوسین ۳۰ میکروگرم (شرکت mast انگلستان) و نالیدیسیک اسید ۳۰ میکروگرم (شرکت MAST انگلستان)، از تست‌های PYR (شرکت Key Diagnostics Pty استرالیا)، آزمون دکربوکسیلاسیون اورنیتین، تولید اسید از فندهای مالتوز، ترهالوز، مانیتول و سوکروز و تخمیرنشدن گلوکوز در شرایط بی‌هوازی، کمک گرفته شد. در روش دیسک انتشاری ابتدا یک سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۲ یا ۲۴ ساعته با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و از این سوسپانسیون روی محیط مولر هینتون آگار (شرکت Merck آلمان) با ضخامت ۵ میلی‌متر کشت داده شد. دیسک‌های نووبیوسین ۳۰ میکروگرم، باسیتراسین ۱۰ میکروگرم و پلی‌میکسین B 100 واحدی با یک پنس استریل روی محیط قرار داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. طبق آخرین نسخه Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)، با استفاده از دیسک‌های نووبیوسین ۳۰ میکروگرم، باسیتراسین ۱۰ میکروگرم و پلی‌میکسین B ۱۰۰ واحدی گونه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس تفکیک شدند. نمونه‌هایی که قطر هاله ایجادشده در آنها نسبت به دیسک نووبیوسین بیشتر از ۱۶ میلی‌متر، نسبت به پلی‌میکسین B بیشتر از ۱۰ میلی‌متر و نسبت به باسیتراسین بیشتر از ۹ میلی‌متر مشاهده می‌شد، به‌عنوان استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در نظر گرفته شدند و در صورتی که قطر هاله نسبت آنتی‌بیوتیک‌های فوق کمتر از این مقدار باشد، نمونه به‌عنوان استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس در نظر گرفته شد. برای افتراق استافیلوکوکوس هومینیس از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس هم از آنتی‌بیوتیک‌های فسفومایسین و دیسفریوکسامین استفاده شد و نمونه‌هایی که برای آنتی‌بیوتیک فسفومایسین قطر هاله بیش از ۳۰ میلی‌متر و برای دیسفریوکسامین قطر هاله بیشتر از ۲۰ میلی‌متر داشتند، به‌عنوان استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در نظر گرفته شدند. در روند شناسایی از سویه

مثبت و از سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۵).  
**استخراج ژنومی با استفاده از کیت استخراج**  
 برای انجام استخراج DNA ژنومیک از کیت (سینا کلون، ایران) استفاده شد. مراحل استخراج طبق دستورالعمل مندرج در کیت انجام پذیرفت. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره سازی شد (۱۶).  
**آماده سازی پرایمرها و انجام آزمون PCR**  
 ژن های *ermA*، *ermB*، *emrC*، *msrA* و *mecA* با استفاده از روش PCR در جدایه های دارای مقاومت به متیسیلین بررسی شد. برای آماده سازی شرایط اولیه، ابتدا براساس حجم تعیین شده از سوی شرکت سازنده پرایمر، غلظت استوک (۱۰۰ پیکومولار) از هریک از پرایمرها تهیه شد. برای انجام واکنش PCR، ۲۵

میکرولیتر از محلول نهایی شامل: ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۲ میکرولیتر از مسترمیکس (Ampliqon آلمان) استفاده شد. حجم باقی مانده با استفاده از آب مقطر دیونیزه شده استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. ژن های مدنظر با استفاده از ترموسایکلر BioRad C1001 (آمریکا) و طبق برنامه مرحله واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، واسرشت سازی ثانویه ۵۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، اتصال پرایمر برای ژن *ermA* در دمای ۵۷ درجه سلسیوس، *ermB* و *ermC* ۵۹ درجه سلسیوس و *mrsA* و *mecA* در دمای ۵۸ درجه سلسیوس، با طولی سازی اولیه به مدت ۵۰ ثانیه در ۳۵ سیکل تکثیر شدند. طولی سازی نهایی نیز در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده به منظور تکثیر ژن های *mecA* و *msrA*، *emrC*، *ermB*، *ermA*

ژن های مدنظر	طول توالی	اندازه (bp)	رفرنس
<i>ermA</i>	F: GTTCAAGAACAATCAATACAGAG R: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	۴۲۱	(۱۷)
<i>ermB</i>	F: CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGG C R: GAATCGAGACTTGAGTGTGC	۳۵۹	(۱۷)
<i>ermB</i>	F: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC R: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	۵۷۲	(۱۷)
<i>msrA</i>	F: TCCAATCATTGCACAAAATC R: AATTCCTCTATTTGGTGGT	۱۶۳	(۸)
<i>mecA</i>	F: GTAGAAATGACTGAACGTCGGATGA R: CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	۳۱۰	(۸)

#### یافته ها

**نتایج حاصل از جداسازی جدایه ها:** از مجموع ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی جدا شده از نمونه های مختلف بالینی، ۵۵ جدایه (۵۵٪) استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ۵ جدایه (۵٪) استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس بودند. از ۵۵ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۲۴ جدایه (۴۳/۶۳٪) از کشت خون، ۱۴ جدایه (۲۵/۴۵٪) از کشت ادرار، ۱۳ جدایه (۲۳/۶۳٪) از کاتاتر و ۴ جدایه (۷/۲۷٪) از زخم جداسازی شد. همچنین از ۵ جدایه استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، ۲ جدایه (۴۰/۶۳٪) از کشت خون، ۳ جدایه (۶۰٪) از کشت ادرار و ۱ جدایه (۲۰٪) از کاتاتر به دست آمد. سایر نمونه های بالینی فاقد باکتری های مطالعه شده بودند.

**نتایج تعیین حداقل غلظت مهاری سفوکسیتین و اگزا سیلین:** در روش تعیین حداقل غلظت مهاری با استفاده از

#### الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

محصولات به دست آمده از فرایند PCR به منظور بررسی بر ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. از مارکر bp ۱۰۰ فرمنتاز (Thermofisher آمریکا) برای شناسایی باندهای مدنظر استفاده شد. در این بررسی از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591 و ATCC43300 به عنوان کنترل مثبت و از سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

#### تجزیه و تحلیل داده ها

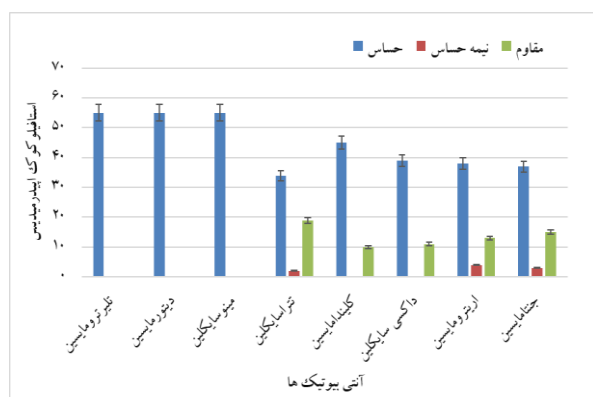
در این بررسی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و فرض مقادیر  $P < 0/05$  معنی دار، ارتباط بین متغیرها از طریق آزمون  $\chi^2$  آنالیز داده ها انجام گرفت. برای دسته بندی اطلاعات نیز از روش های آماری توصیفی (تعیین فراوانی، درصد و میانگین) استفاده شد.

**نتایج مقاومت براساس آزمون‌های فنوتیپی:** از ۵۵ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ۹ جدایه (۱۶/۳۶٪) دارای فنوتیپ D بودند و ۲۸ جدایه فنوتیپ S داشتند. از ۵ جدایه *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* نیز ۱ جدایه (۲۰٪) دارای فنوتیپ D و ۳ جدایه فنوتیپ S داشتند (شکل ۲).

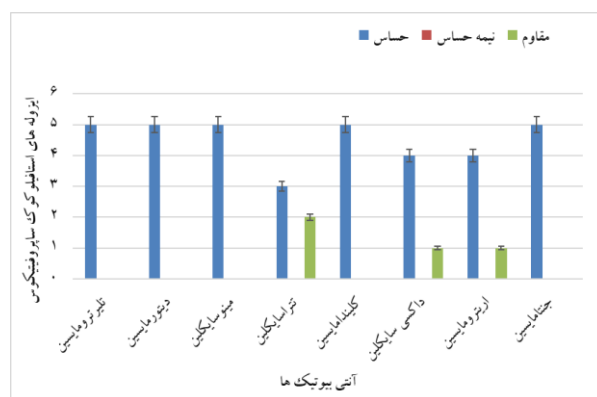
**نتایج آزمون PCR:** از ۲۵ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی‌سیلین ۴ جدایه (۱۶٪) دارای ژن *ermA*، ۳ جدایه (۱۲٪) دارای ژن *ermB*، ۶ جدایه (۲۴٪) دارای ژن *ermC* و ۱ جدایه (۴٪) هم حامل ژن *msrA* بودند. همچنین از ۲ جدایه *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* مقاوم به متی‌سیلین ۱ جدایه (۵۰٪) دارای ژن *ermA* و ۱ جدایه (۵۰٪) دارای ژن *ermB* بود (شکل ۳).

نوارهای E-test سفوکسیتین و اگزاسیلین، ۲۵ ایزوله (۴۵/۴۵٪) *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (MIC= 2-4) و ۲ جدایه (۴۰٪) *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (MIC=2-4) مقاوم به متی‌سیلین تشخیص داده شدند (شکل ۱).

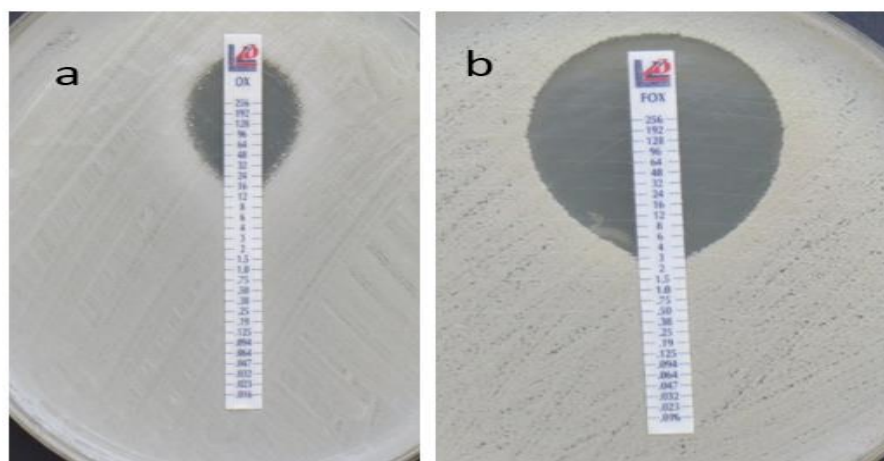
**نتایج آنتی‌بیوگرام:** از ۵۵ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۱۳ جدایه (۲۳/۶۳٪) به اریترومایسین، ۱۱ جدایه (۲۰٪) به تتراسایکلین، ۱۱ جدایه (۲۰٪) به داکسی‌سایکلین، ۱۰ جدایه (۱۸/۱۸٪) به کلیندامایسین مقاوم بودند. همچنین از ۵ جدایه *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، ۱ جدایه (۲۰٪) به اریترومایسین و ۱ جدایه (۲۰٪) به داکسی‌سایکلین مقاومت داشتند. نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومتی دیده نشد (نمودار ۱ و ۲).



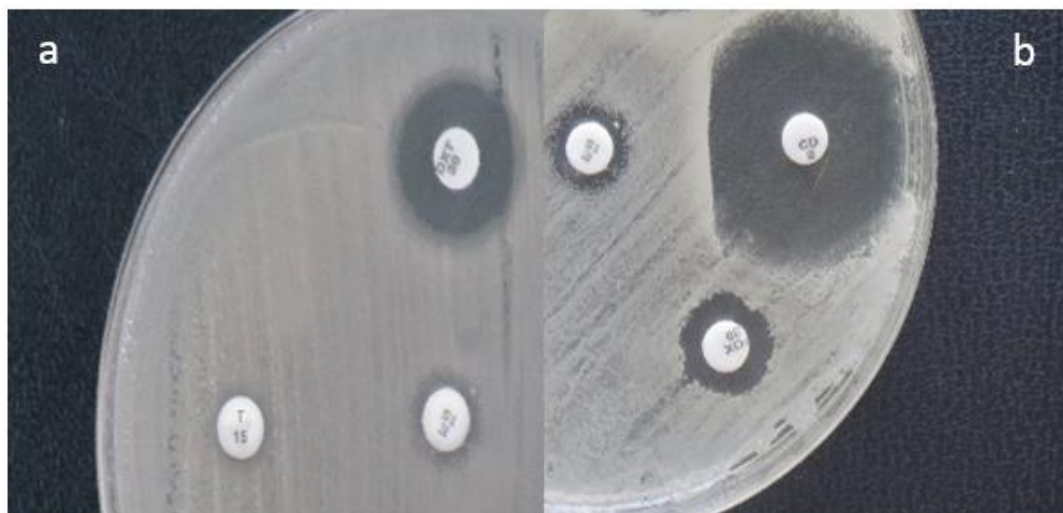
نمودار ۲. فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۵۵ جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*



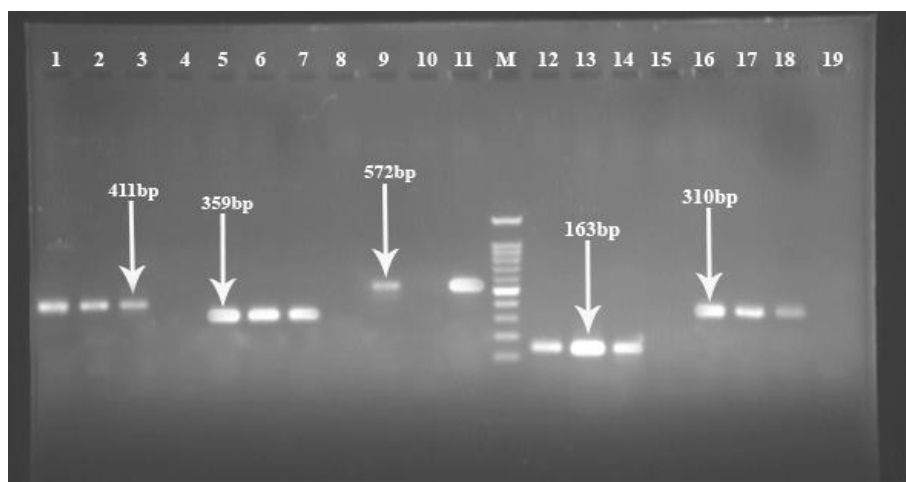
نمودار ۱. فراوانی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۵ جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*



شکل ۱. تعیین حداقل غلظت مهاری (a) سفوکسیتین و (b) اگزاسیلین با استفاده از روش E-test



شکل ۲. انواع مختلف سویه‌های *MLS<sub>B</sub>*/ستافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی. (شکل a) فنوتیپ S، دیسک‌های اریترومايسين و کلیندامایسین و داکی سایکلین، حساسیت به داکی سایکلین و مقاومت به اریترومايسين و کلیندامایسین. (شکل b) آزمون فنوتیپی D برای شناسایی اثر القایی اریترومايسين و کلیندامایسین



شکل ۳. الکتروفورز محصولات ژن‌های *ermA*، *ermB*، *ermC*، *msrA* و *mecA* با طول قطعه ۴۱۱ جفت باز برای ژن *ermA*، ۳۵۹ جفت باز برای ژن *ermB*، ۵۷۲ جفت باز برای ژن *ermC*، ۱۶۳ جفت باز برای ژن *msrA* و ۳۱۰ جفت باز برای ژن *mecA* بر ژل آگارز ۱/۱۵٪. چاهک‌های ۴، ۸، ۱۱، ۱۵ و ۱۹ کنترل منفی. چاهک‌های ۳، ۵، ۹، ۱۳ و ۱۶ کنترل مثبت. چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت باز. سویه استاندارد/ستافیلوکوکوس اورئوس ATCC43300 به‌عنوان کنترل مثبت. استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 کنترل منفی.

#### بحث

استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی یکی از عوامل اصلی عفونت‌های خون و باکتری‌می ناشی از کاتتر محسوب می‌شوند. در مطالعات مختلف، فراوانی باکتری‌می‌های ناشی از این باکتری‌ها تا حدود ۵۰٪ گزارش شده است (۱۸). بروز و افزایش مقاومت استافیلوکوکوس‌های کوگولاز منفی به متی‌سیلین و بتالاکتام‌ها، سبب جایگزینی ماکرولیدها و استرپتوگرامین‌ها به‌عنوان خط دوم درمانی شده است (۱۹). این در حالی است که فشار انتخابی ناشی

#### تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از آزمون آماری $\chi^2$ ارتباط

معنی‌داری بین حضور ژن *mecA* و ژن‌های گروه *MLS<sub>B</sub>* در باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دیده نشد. این در حالی بود که ارتباط معنی‌داری بین فنوتیپ القایی کلیندامایسین، تتراسایکلین و حضور ژن *mecA* در جدایه‌های کوگولاز منفی دیده شد.

فعالیت‌های افلاکسی *استافیلوکوکوس*ها را کنترل می‌کنند، می‌توانند در این رابطه نقش مهمی داشته باشند. حضور ژن *msrA* که مقاومت از طریق پمپ‌های افلاکسی را سبب می‌شود، ممکن است زمینه مقاومت و ظهور برخی سویه‌های *استافیلوکوکوس* مقاوم به متی‌سیلین را ایجاد کند و سبب ظهور زیرسویه‌هایی با کاست‌های متفاوت ژنی شود. اینکه چه عاملی می‌تواند پیونددهنده این ارتباط باشد به‌طور روشن مشخص نیست؛ اما در این مطالعه، نبود این رابطه را شاید بتوان در فراوانی کم ژن *msrA* در سویه‌های بررسی‌شده عنوان کرد (۲۶). همان‌طور که ذکر شد، سویه‌های دارای این ژن فنوتیپ N دارند اما در این مطالعه سازگاری فنوتیپ N و فنوتیپ D به‌منظور معرفی سویه‌های *MLS<sub>B</sub>* نتایج هم‌سو و دقیقی را نشان نداد؛ زیرا در برخی از فنوتیپ‌های D، ژن *msrA* مشاهده نشد. این امر نشان‌دهنده دقت پایین فنوتیپ D در شناسایی سویه‌های دارای مقاومت است و شاید یکی از دلایل گسترش این سویه‌ها استفاده‌نکردن هماهنگ از تمامی تست‌های تشخیصی در تأیید سویه‌های *MLS<sub>B</sub>* است. در مطالعاتی که Yusuf و همکاران (۲۰۱۴) و Navidinia (۲۰۱۵) بر کارآمدی تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به‌منظور شناسایی تعیین سویه‌های *MLS<sub>B</sub>* انجام دادند، مشخص شد که تست‌های فنوتیپی در مقایسه با تست‌های ژنوتیپی از حساسیت کمتری برخوردار هستند و ممکن است شناسایی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را با شکست مواجه کنند. همچنین مطرح شد که این تست‌ها به‌عنوان یک تست اولیه قابل‌قبول هستند و در گزارش‌های نهایی نمی‌توان از آنها به‌عنوان یک تست نهایی استفاده کرد (۲۷، ۲۳).

بنابراین با توجه به فراوانی ژن *ermA* و بالابودن احتمال مقاومت القایی نسبت به کلیندامایسین، در بسیاری موارد این آنتی‌بیوتیک از لیست انتخاب برای درمان حذف می‌شود؛ در صورتی که ممکن است مقاومت به اریترومایسین در نتیجه حضور ژن‌های کدکننده مقاومت ساختاری بوده و موجب القای مقاومت به کلیندامایسین نشود (۲۱). در چنین شرایطی، برای سویه‌های *استافیلوکوکوس کواگولاز* منفی که به متی‌سیلین مقاوم هستند یا در موارد حساسیت بیمار به پنی‌سیلین، کلیندامایسین می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مناسب باشد که به‌دلیل احتمال مقاومت القایی حذف می‌شود؛ بنابراین استفاده از آزمون فنوتیپی D در آزمایشگاه‌های بالینی، برای شناسایی موارد مقاوم به کلیندامایسین مؤثر است.

از استفاده بی‌رویه از برخی آنتی‌بیوتیک‌ها زمینه مقاومت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی را فراهم می‌کند. از این جمله می‌توان به افزایش مقاومت به گروه *MLS<sub>B</sub>* در سویه‌های *استافیلوکوکوس کواگولاز* منفی اشاره کرد (۲۰).

استفاده از تست D برای شناسایی ایزوله‌های دارای مقاومت القایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ زیرا این نوع از مقاومت می‌تواند منجر به شکست در درمان شود. بنابراین شناسایی دقیق این ایزوله‌ها می‌تواند پزشکان را در درمان مناسب عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس*های مقاوم به این گروه آنتی‌بیوتیکی کمک کند. در این مطالعه برخی از سویه‌ها که دارای فنوتیپ D بودند، ژنوتیپ مقاومت را از خود نشان ندادند و فاقد ژن‌های عامل مقاومت به گروه‌های *MLS<sub>B</sub>* بودند. مطالعات و بررسی‌های صورت‌گرفته روی فنوتیپ‌های القایی و دقت و حساسیت آنها نیز مؤید این نتیجه است که در مرحله اول برای شناسایی سویه‌های *MLS<sub>B</sub>* نمی‌توان فقط به استفاده از تست‌های فنوتیپی، اکتفا کرد و نیاز به انجام تست‌های بیشتر و دقیق‌تری مانند ردیابی ژن‌های مؤثر در بروز این مقاومت‌ها است (۲۳-۲۱). مقاومت به *MLS<sub>B</sub>* از طریق افلاکس پمپ‌ها در مطالعات مختلف با فراوانی ۶-۴ درصد گزارش شده است (۲۴، ۲۰، ۱۸). در مطالعه حاضر نیز در سویه‌های *استافیلوکوکوس* /پیدرمیدیسی مقاومت ناشی از ژن *msrA* مشاهده شد. همچنین مقاومت نسبت به اریترومایسین به‌واسطه ژن‌های *ermA* و *ermC* که به‌ترتیب موجب مقاومت القایی و ساختاری به اریترومایسین می‌شوند، در این مطالعه تقریباً نزدیک به هم مشاهده شد. درصد فراوانی‌ها به‌ترتیب ۱۳/۲۷ و ۱۲/۳۸ به دست آمد که با مطالعه‌ای در بیمارستان آموزشی در ایلینویز آمریکا همخوانی دارد (۲۵). فراوانی ژن *ermC* در مطالعات کشور ترکیه، آلمان و برزیل بیش از ۵۰٪ گزارش شده است که می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌های منطقه‌ای و الگوهای مصرف آنتی‌بیوتیک باشد (۲۴، ۲۱، ۱۸).

در برخی مطالعات ذکر شده است که بین حضور و فعالیت ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین و ژن‌هایی که سبب فعالیت‌های القایی کلیندامایسین - اریترومایسین در *استافیلوکوکوس*ها می‌شود، ممکن است ارتباط وجود داشته باشد؛ اما در مطالعه حاضر، هیچ ارتباطی بین حضور ژن‌های بررسی‌شده دیده نشد. در مطالعاتی که Teodoro و همکاران (۲۰۱۲) در برزیل داشتند، گزارش شد که برخی سویه‌های *MLS<sub>B</sub>* /*استافیلوکوکوس* دارای زیرگروه‌های خاصی از کاست *SCCmec* هستند که از این نظر با مطالعه حاضر همخوانی ندارد. حضور و فعالیت ژن‌هایی که به‌نوعی



## نتیجه‌گیری

مقاومت‌های القایی به کلیندامایسین - اریترومایسین در استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی، می‌تواند به دلیل تشخیص اشتباه در سویه‌های مقاوم نیز ایجاد شود. بدین صورت که گاهی در فنوتیپ‌های القایی N و یا D برخی ژن‌های دخیل در مقاومت حضور داشته باشند که فنوتیپ‌های القایی را به صورت فنوتیپی نشان نمی‌دهند. از این رو استفاده از روش‌های فنوتیپی جهت تشخیص فنوتیپ‌های القایی مقاومت به کلیندامایسین‌ها - اریترومایسین ممکن است در برخی موارد با خطا همراه باشد که نیاز به استفاده از یک روش دقیق‌تر مانند PCR را در کنار روش‌های کشت و فنوتیپی بیشتر نشان می‌دهد. همچنین با توجه به مقطعی و توصیفی بودن این مطالعه توصیه می‌شود که سایر

مطالعات با تعداد نمونه‌های بیشتر و با استفاده از تکنیک‌های دقیق‌تر و حساس‌تر صورت گیرد تا بتوان در ارائه نتایج و مقایسه آن با روش‌های فنوتیپی و همچنین بالابردن دقت تشخیص، قدم‌های مؤثرتری برداشت.

## سپاسگزاری

مقاله حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Sadat Hosseini S, Niakan M, Sadari H, Motallebi M, Taherikalani M, Asadollahi K, et al. Frequency of genes encoding erythromycin ribosomal methylases among *Staphylococcus aureus* clinical isolates with different D-phenotypes in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol.* 2016;8(3):161-7. PMID:[27928482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27928482/) PMCID:[PMC5139918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5139918/)
2. 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 Clin Microbiol.* 2003;41(10):4740-4. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4740-4744.2003> PMID:[14532213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14532213/) PMCID:[PMC254362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC254362/)
3. Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, et al. Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in the Community: High Homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and Major Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis.* 2010;202(2):270-81. <https://doi.org/10.1086/653483> PMID:[20550456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20550456/)
4. Vafaei Mehr M, Alikhani M, Tahmasebi H, Arabestani M. Identification and Determination of the Relationship between ccr Alleles and Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Babol Univ Med Sci.* 2017;19(12):28-35. <http://jbums.org/article-1-6808-en.html>
5. Bokaeian M, Tahmasebi H, Mohammadzadeh AR, Adabi J, Sepehri Rad N. Comparison of Two PCR Methods in determining the Methicillin-Resistant Gene in Coagulase-Negative Staphylococci. *Quarterly of Horizon of Medical Sciences.* 2016;22(3):201-7. <https://doi.org/10.18869/acadpub.hms.22.3.201>
6. Rahman A, Hossain MA, Paul SK, Sultana S, Haque N, Kabir MR, et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) by disk diffusion method. *Mymensingh Med J.* 2013;22(2):229-31. PMID:[23715340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23715340/)
7. Goudarzi GR, Azadpour M. Prevalence of Clindamycin Inducible Resistance in *Staphylococcus Aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Using D-Test: A Short Report. *J Rafsanjan Univ Med Sci.* 2015;14(1):77-82. <http://journal.rums.ac.ir/article-1-2211-en.html>
8. Moosavian M, Shoja S, Rostami S, Torabipour M, Farshadzadeh Z. Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to erm genes, Iran. *Iran J Microbiol.* 2014;6(6):421-7. PMID:[25926961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25926961/) PMCID:[PMC4411429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4411429/)
9. Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(1):103-6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01567.x> PMID:[17184298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17184298/)
10. Uzun B, Gungor S, Pektas B, Aksoy Gokmen A, Yula E, Kocal F, et al. [Macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance phenotypes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates and investigation of telithromycin activity]. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48(3):469-76. <https://doi.org/10.5578/mb.7748> PMID:[25052113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25052113/)
11. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes.* 2011;4:453. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-453> PMID:[22032892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22032892/) PMCID:[PMC3212975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3212975/)

12. Bokaeian M, Tahmasebi H, Shahraki Zahedani S. Comparison of Susceptibility Testing of E-test Strips with Cefoxitin and Oxacillin Disks in Identification of Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* Strains. *Qom Univ Med Sci J.* 2017;11(5):116-26. <http://journal.muq.ac.ir/article-1-738-en.html>
13. Lindsay JA, Riley TV. Susceptibility to desferrioxamine :a new test for the identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol.* 1991;35(1):45-8. <https://doi.org/10.1099/00222615-35-1-45> PMID:2072377
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
15. Kassim A, Omuse G, Premji Z, Revathi G. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15:21 <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0135-3> PMID:27068515 PMCID:PMC4827198
16. Bokaeian M, Adabi J, Zeyni B, Tahmasebi H. The Presence of *aac* (6') *Ie* / *aph* (2"), *aph* (3') - IIIa1, *ant* (4') - Ia1 Genes and Determining Methicillin Resistance in *Staphylococcus Epidermidis* and *Staphylococcus Saprophyticus* Strains Isolated from Clinical Specimens. *J Arak Uni Med Sci.* 2017;19(11):11-25. <http://amuj.arakmu.ac.ir/article-1-4534-en.html>
17. Lim J-A, Kwon A-R, Kim S-K, Chong Y, Lee K, Choi E-C. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(3):489-95. <https://doi.org/10.1093/jac/49.3.489> PMID:11864949
18. 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. [https://doi.org/10.1016/S1684-1182\(10\)60081-3](https://doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60081-3) PMID:21195981
19. Marosevic D, Kaevska M, Jaglic Z. Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage - a review. *Ann Agric Environ Med.* 2017;24(2):338-44. <https://doi.org/10.26444/aaem/74718> PMID:28664720
20. Li L, Feng W, Zhang Z, Xue H, Zhao X. Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Vet Res.* 2015;11:168. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0492-8> PMID:26209340 PMCID:PMC4515024
21. Perez LR, Caierao J, Antunes AL, d'Azevedo PA. Use of the D test method to detect inducible clindamycin resistance in coagulase negative staphylococci (CoNS). *Braz J Infect Dis.* 2007;11(2):186-8. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702007000200002> PMID:17625757
22. O'Sullivan MVN, 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 Clin Microbiol.* 2006;44(11):4072-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01632-06> PMID:17005747 PMCID:PMC1698332
23. Yusuf E, de Bel A, Bouasse J, Pierard D. D-Zone test for detection of inducible clindamycin resistance using SirScan paper disks and Rosco Neo-Sensitabs at 25 and 15 mm distances. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt8):1052-4. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.074641-0> PMID:24899599
24. Gatermann SG, Koschinski T, Friedrich S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(8):777-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01749.x> PMID:17501977
25. Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of Constitutive and Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in a Community and a Tertiary Care Hospital. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2777-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2777-2779.2004> PMID:15184468 PMCID:PMC427875
26. Teodoro CR, Mattos CS, Cavalcante FS, Pereira EM, dos Santos KR. Characterization of MLS(b) resistance among *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying different SCCmec types. *Microbiol Immunol.* 2012;56(9):647-50. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00481.x> PMID:22672011
27. Navidinia M. Detection of inducible clindamycin resistance (MLS<sub>Bi</sub>) among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from health care providers. *Journal Of Paramedical Sciences.* 2015;6(1):91-6. <http://dx.doi.org/10.22037/jps.v6i1.8380>