مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۳۳ – ۳۸

بررسی وجود ژن *aac(6')-le-aph(2")-la* در سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم چند مقاومتی و مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین

مهناز سیفی[۱]، محمد رضا پورشفیع[۲]، کتایون برهانی[۲]، فاتح رحیمی[۲]، محمد مهدی سلطان دلال*[۱]

۱) بخش باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران

۲) بخش باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: محمد مهدی سلطان دلال، بخش باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران

تلفن: ۰۹۱۲۱۴۵۲۶۴۶ – ۶۶۴۶۵۴۰۴ **soltanda@tums.ac.ir**

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۳/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروککها نقش مهمی را در ایجاد عفونت های بیمارستانی دارند و وجود سویه های چند مقاومتی در بین آنها، درمان این نوع عفونتها را به یک معضل بهداشتی تبدیل کرده است. انتروککها می توانند برخی ژنهای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را بصورت اکتسابی بدست آورند . محصول این ژنها آنزیمهایی هستند که باعث تغییر در ساختار آمینوگلیکوزیدها شده ودر نهایت این امر منجر به حذف اثر سینرژیسم باکتریسیدال خواهد شد. یکی از مهمترین ژنهای ایجاد کننده مقاومت به مقادیر بالای جنتامایسین aac(6')- le-aph(2")-la است. هدف از این مطالعه بررسی شیوع سویه های آنتروکوکوس فکالیس و آنتروکوکوس فسیوم چند مقاومتی و همچنین مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین در نمونه های کلینیکی با تاکید بر روی وجود ژن aac(6')-le-aph(2")-la می باشد.

روش بررسی: بدنبال کشت اولیه۴۳۷ نمونه بالینی ارجاع شده به ۵ بیمارستان و ۳ آزمایشگاه خصوصی در شهر تهران ، جمعا ۳۰۰ سویه انتروکک جداسازی گردید و پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی و تعیین جنس و گونه باکتری ، با استفاده از روش دیسک دیفوزیون تست سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی برای ۱۱ آنتی بیوتیک آمپی سیلین ، تتراسیکلین ، اریترومایسین ،سیپروفلوکسازین ،جنتامایسین دوز بالا ،ونکومایسین، کوتریموکسازول،کوئینو پریستین – دالفو پریستین (سینرسید)، لینه زولید، تیکوپلانین و نیتروفورانتوئین انجام شد. مکانیزم مولکولی مقاومت به جنتامایسن با دوز بالا در دو گونه ذکر شده توسط تشخیص ژن aac(6')-le-aph(2")-la با روش PCR بررسی گردید.

یافته ها: در مجموع کل سویه های بدست آمده، درصد گونه فکالیس در مقایسه با گونه فیسیوم به ترتیب ۸۱/۳٪ و ۱۸/۷٪ بود. گونه های فیسیوم مقاومت نسبتا بالاتری به آنتی بیوتیک ها ی مورد مطالعه در مقایسه با گونه های فکالیس نشان دادند. درصد سویه های چند مقاومتی در گونه فکالیس ۵۰٪ و در گونه فیسیوم ۹۵٪ بدست آمد. این ارقام در خصوص سویه های مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین به ترتیب ۱۹/۵ و۲۳/۵ درصد بودند و کلیه این سویه ها دارای MICبالاتر از ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر بودند. ۸۳ درصد از سویه های فکالیس و ۱۰۰ درصد از سویه های فیسیوم دارای ژن aac(6')-le-aph(2")-la بودند.

نتیجه گیری: با توجه به درصد بالای سویه های چند مقاومتی و HLGR در بین جمعیت انتروککی مورد مطالعه و همچنین شیوع بالای ژن aac(6')-le-aph(2")-laدر بین سویه ها ی HLGR ،نشان دهنده ارتباط قوی این ژن با ایجاد مقاومت به مقادیر بالای جنتامایسین است که این خود بیانگر این نگرانی است که چنانچه در طول زمان، انتقال این ژن به سویه های حساس به جنتامایسین با روندی فزاینده اتفاق بیفتد، با مشکلات اساسی در درمان این نوع عفونتها مواجه خواهیم شد و این قضیه در دراز مدت نیاز به پیدایش نسل های تازه از آمینوگلیکوزیدها ویا آنتی بیوتیکهای جدید را می طلبد.

کلید واژه ها: انتروکوکوس، چند مقاومتی، مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین

مقدمه:

انتروکک ها جزء پاتوژنهای بسیار مهم در عفونت های بیمارستانی هستند . منبع اصلی این عفونت ها اغلب فلور نرمال گوارشی افراد است. طبق آمارهای موجود انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم به ترتیب مسئول ۹۰ و ۱۰-۵ درصد از عفونت های انتروککی هستند(۱). مشخص شده انتروککها توانایی بسیار بالایی برای کسب مقاومت های آنتی بیوتیکی جدید داشته و انتقال دهندگان مهمی نیز در مورد انواع ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها به حساب می آیند. این گروه از باکتریها در حال افزایش مقاومت به سه گروه دارویی موثر در درمان عفونت های انتروککی یعنی پنی سیلین ها ،آمینو گلیکوزیدها و گلیکو پپتیدها هستند(۳و۲) . انتروکک ها بدلیل نقص در ترانسپورت فعال از غشای سیتوپلاسمی ، بصورت ذاتی به مقادیر پایین آمینوگلیکوزیدها مقاوم بوده و به همین علت به تنهایی در درمان عفونت های انتروککی ناکافی هستند ولی در ترکیب با ممانعت کننده های سنتز سل وال که ورود آنها را به سلول تسهیل می کند از موثرترین درمانهای رایج میباشند(۴). متاسفانه این اثر سینرژیسم وقتی انتروککها مقاومت به مقادیر بالای جنتامایسین۵۱۲ <MIC راکسب کنند وجود ندارد(۳). این مسئله خطر جدی را در درمان عفونت های انتروککی مطرح ساخته است. مکانیزم اصلی در ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها ،غیرفعال شدن دارو توسط آنزیمهای ترشحی از باکتری است که توسط ژنهای خاصی کد می شوند. در انتروککها ژن aac(6')-le-aph(2")-la نقش اصلی را در پیدایش مقاومت نسبت به دوز بالای جنتامایسین دارد ولی در سالهای اخیر نقش چند ژن دیگر نیز در این قضیه مشخص شده است(۵). ژن-aac(6')-le-aph(2")-la در اکثریت سویه های مقاوم به جنتامایسین پلاسمیدی است و بر روی ترانسپوزون Tn 4001 استافیلوککی قرار دارد(۶).

مواد و روش ها:

جداسازی و تشخیص باکتری :از۴۳۷ نمونه ارجاع شده به ۵ بیمارستان و ۳ آزمایشگاه خصوصی در تهران از آذر ماه ۱۳۸۴ الی تیر ماه ۱۳۸۵ ، در مجموع ۳۰۰ سویه انتروکک جداسازی گردید. نمونه ها شامل ادرار ، زخم، خون ، مجرا ،آبسه،لاواژ ریه و مایع مفصل بودند.

جداسازی سویه ها بااستفاده از محیط کشت بلاد آگار وتشخیص فنوتیپی آنها با بکارگیری تستهای کاتالاز، PYR ، هیدرولیزبایل اسکولین، رشد برروی محیط نمک ۶/۵٪ و تخمیر قندها با استفاده از استانداردهای بین المللی بود.

تست سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی : با استفاده از جداول CLSI وبرای ۱۱ آنتی بیوتیک آمپی سیلین، تتراسیکلین، اریترومایسین، سیپروفلوکسازین، جنتامایسین دوز بالا، ونکومایسین، کوتریموکسازول، کوئینو پریستین – دالفو پریستین (سینرسید)، لینه زولید، تیکوپلانین و نیتروفورانتوئین و بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد . کنترل کیفی دیسکهای آنتی بیوگرام با استفاده از سویه های استاندارد استافیلوکوکوس ارئوس ۲۵۹۲۳ و انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲ انجام گرفت.

MIC سویه ها

برای سویه هایی که در روش دیسک دیفوزیون مقاوم به دیسک جنتامایسین ۱۲۰ میکروگرم بودند ،MIC به روش microdilution بر اساس استاندارد CLSI انجام شد.

تشخیص ژن aac(6')-le-aph(2")-la توسط روش PCR جهت تهیه DNA ژنومیک باکتری با استفاده از پروتکل انستیتو پاستور پاریس(۷)، چند کلنی از آن بر روی ۱۰ میلی لیتر محیط BHI مایع کشت داده میشد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد از ۳ میلی لیتر این کشت توسط سانتریفیوژ در ۴۰۰۰rpm بمدت ۲۰ دقیقه رسوب گیری به عمل می آمد. سپس به رسوب ۱۰ میلی مولار تریس –HCl، ۱ میلی مولار EDTA ، ۵۰٪ سوکروز ، ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر لیزوزیم و ۱۰ درصد SDS افزوده وبا شیکر بخوبی مخلوط نموده، ۱۰ دقیقه روی یخ قرار می دهیم. پس از آن ۲۰ دقیقه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ نموده ، مایع رویی را برداشته و با افزودن مخلوط فنل و کلروفرم DNA را استخراج می کنیم. یک میکرولیتر از این DNA برای واکنش PCR کافی است. سکانس پرایمر های مورد استفاده در واکنش PCR برای تشخیص وجود ژن aac(6')-le-aph(2")-la ، شامل CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC و CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG و محصول نهایی تکثیر، با حضور قطعه ای با وزن مولکولی ۳۴۸bp نشان دهنده وجود این ژن بود (۵).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیترانجام میشد و ترکیب آن شامل ۲/۵ پیکومول از هر پرایمر ، ۱/۵ میلی مول MgCl2 ، ۰/۴ میلی مول از dNTP ، ۲/۵ میکرولیتر بافرو ۲ واحد از آنزیم Taq polymerase

بود. سویه استاندارد JH2-102/ p1P800+plP802 نیز بعنوان کنترل مثبت در این واکنش ها استفاده میشد.سیکل واکنش زنجیره پلیمراز،از دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه شروع شده وبه تعداد ۳۵ سیکل به شرح زیر ادامه مییافت. ۹۴ درجه ۴۰ ثانیه،۵۵ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و در نهایت با ۷۲ درجه بمدت ۲ دقیقه پایان می یافت(۵).محصول PCR با وزن ۳۴۸bp بر روی آگاز ۱/۵ ٪در مقابل مارکر وزن مولکولی DNA ladder مورد

الکتروفورز قرار میگرفت.و ژل آگارز بااتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدهو قطعات DNA بااستفاده از نور UV رویت میشدند.

یافته ها:

از کل نمونه های بالینی مورد مطالعه، ادرار درصدغالب وپس از آن زخم وخون و سایر نمونه ها درصد های پایین تری را به خود اختصاص دادند.(جدول ۱).

از بین سویه های جداشده۸۱/۳٪ (۲۴۷ مورد) به گونه فکالیس و ۱۸/۷٪(۵۳مورد) به گونه فیسیوم اختصاص داشت. درصد سویه های MDR و HLGR در خصوص گونه فکالیس به ترتیب ۵۰٪ (۱۲۴ مورد) و۱۹/۵٪ (۴۸ مورد) ودر مورد گونه های فیسیوم به ترتیب ۹۵٪(۵۰ مورد) و ۲۳/۵٪ (۱۳ مورد) بود.(جدول ۲).

بررسی مقاومت به ۱۱ نوع آنتی بیوتیک مختلف از جمله دو داروی جدید لینه زولید و کوئینو پریستین –دالفوپزیستین (سینرسید) نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های فیسیوم بالاتر از موارد مشابه در گونه فکالیس است. در گونه فکالیس مقاومت بین ۶۰—۱۹/۵درصد به ترتیب نسبت به جنتامایسین، سیپروفلوکسازین ، کوتریموکسازول ،اریترومایسین وتتراسیکلین وجود داشت. درحالیکه در گونه فیسیوم مقاومت بین ۱۳/۵-۲۳/۵ درصد به ترتیب نسبت به کوتریموکسازول، آمپی سیلین،سیپروفلوکسازین ،اریترومایسین،ونکومایسین و جنتامایسین بود. مقاومت نسبت به دو داروی جدید سینرسید و لینه زولید در گونه فکالیس به ترتیب ۱۰۰ و۲/۵ درصد و در گونه فیسیوم به ترتیب ۱و صفر درصد بود.(جدول ۳)

در آزمایش PCR برای تشخیص ژن aac(6')-le-aph(2")-la از کل سویه های HLGR در گونه فکالیس ۸۳٪ و در گونه فیسیوم ۱۰۰٪ این ژن را داشتند.

جدول ۱: انواع نمونه های بالینی مورد مطالعه

نوع نمونه	تعداد(%)
ادرار	۲۸۶ (۹۵/۴)
زخم	۵ (۱/۶)
خون	۴(۱/۵)
مجرا	۲ (۰/۶)
آبسه	۱ (۰/۳)
لاواژ ریه	۱ (۰/۳)
مایع مفصل	۱ (۰/۳)

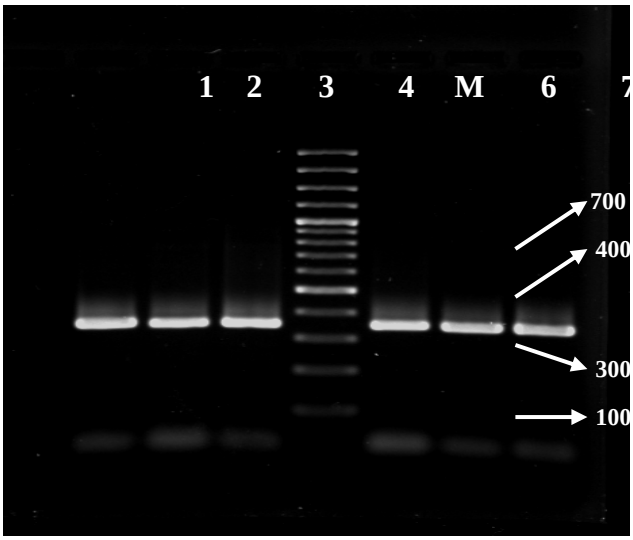
جدول ۲: درصد مقاومت به انواع آنتی بیوتیکها در دو گونه

نوع آنتي بيوتيك (ميكروگرم)	انتروکوکوس فکالیس (%)	انتروکوکوس فیسیوم (%)
آمپي سيلين ۱۰	۱/۳	۱۵
تتراسيكلين ۳۰	۶۰	۹/۵
اريترومايسين ۱۵	۳۶/۵	۱۶/۵
سيپروفلوكسازين ۵	۲۴/۵	۱۶
جنتامايسين ۱۲۰	۱۹/۵	۲۳/۵
ونكومايسين ۳۰	۷/۵	۲۱/۵
كوتريموكسازول ۱/۲۵ - ۲۳/۷۵	۳۰/۵	۱۳/۵
سينرسيد ۱۵	۱۰۰	۱
لينه زوليد ۳۰	۲/۵	صفر
تيكوپلانين ۳۰	۵/۵	۱۴
نيتروفورانتوئين ۳۰۰	۰/۵	۲

جدول ۳ : درصد سویه های MDR و HLGR در بین دو گونه انتروککی

گروه	انتروکوکوس فکالیس (%)	انتروکوکوس فیسیوم (%)
کل	۲۴۷ (۸۱/۳)	۵۳ (۱۸/۷)
چند مقاومتي ها (MDR)	۱۲۴ (۵۰)	۵۰ (۹۵)
مقاوم به جنتامایسین دوز بالا(HLGR)	۵۹ (۱۹/۵)	۷۰ (۲۳/۵)

عکس ۱ : PCR جهت ژن aac(6')-le-aph(2")-la



بحث:

برای سیستم مراقبت بهداشتی هر جامعه بسیار لازم وضروری است تا عوامل مهم و شایع پاتوژنهای بیمارستانی را شناسایی نموده و الگوی دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی آنها را مشخص نمایند تا بتوانند درمان موثری را جهت کنترل آنها بکار گیرند.(۸)

تا چندی قبل آمپی سیلین همراه با جنتامایسین یا استرپتومایسین بعنوان اولین داروهای انتخابی در درمان عفونت های حاد انتروککی بشمار می رفتند ولی از زمانیکه سویه های مقاوم به هر کدام از این داروها شیوع بالایی پیدا کرده اند اثر سینرژیسم درمانی آنها خنثی شده و درمان آنتی بیوتیکی با مشکلات فراوانی مواجه شده است(۹). در این میان سویه های مقاوم به آمینو گلیکوزیدها و بخصوص جنتامایسین با دوز بالا در سالهای اخیر محور تحقیق بسیاری از محققین را به خود اختصاص داده است بدیهی است که نه تنها شناسایی ژنهای ایجاد کننده این مقاومتها نسبت به انواع آمینوگلیکوزیدها بلکه راهها و فرکانس انتقال آنها نیز مد نظر بوده است(۵).

در مطالعه حاضر اکثریت سویه های جدا شده به گونه فکالیس با ۸۱/۳٪ اختصاص داشت که در مطالعات مشابه این ارقام چندان تفاوتی را نشان نمی دهند. در مطالعه ای در برزیل اکثریت نمونه ها ۷۰/۳ ٪ از ادرار و ۲۰/۷ ٪ از سایر موارد مثل خون ء کاتتر و.... جدا شده بودند و اکثریت سویه ها با گونه فکالیس با ۹۲/۸ ٪

بود.در این مطالعه سویه های مقاوم به جنتامایسن با دوز بالا ۲۲/۸ ٪ بودند(۱۰).

محققین امریکایی در سال ۲۰۰۳ از ۳۶۰ سویه انتروکک ۲۵۹ مورد HLGR گزارش کردند که MIC آنها بین ۱۰۲۴– ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. ۷۵ درصداز گونه های فکالیس و ۶۳ درصد از گونه های فیسیوم دارای ژن aac(6')-le-aph(2")-la بودند (۱۱). در بررسی ما این ژن در ۱۰۰ درصد از سویه های فیسیوم و ۸۳ درصد از گونه های فکالیس دیده شد. این قضیه بیانگر جایگاه ویژه این ژن بعنوان مخزن ژن مقاومت و انتقال آن به

سایر سویه ها می باشد. بررسی راههـا و فرکـانس ایـن انتقـال نیـز بسیار مهم است.

در تحـــقیقی در ایتالیـــا از ۹۱ ســـویه انتروکـــک کلینیکـــی ۴۳٪ از فکالیس ها و ۵۲ ٪ از فیسیوم ها HLGR بودند (۱۲)و در موردی مشابه در کویت از ۱۱۷ ســویه انتروکـک ۱۰۹ ســویه فکـالیس و ۷ سویه فیسیوم و بقیه شامل گونه های دیگر بودند. در ایـن میـان ۵۵ ســویه HLGR مـشاهده شـد کـه همگـی MIC بـالای ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر داشتند(۱۲).

در مطالعـه Zarrilli در سـال ۲۰۰۳ هـیچ انتروکوکـوس فیـسیوم مقاوم به آمپی سیلین گزارش نشد و این در حالی بود که ۲۲ درصد از گونه فکالیس HLGR بودند که به گفته این محقق ایـن رقـم در مطالعات مختلف بـین ۱۴-۴۱ درصـد(۱۲) و بـه گفتـه محقـق دیگـــری بـــین ۱-۴۸ درصـــد (۱۳) نوســـان دارد. مقاومـــت بـــه سیپروفلوکسازین ء تتراسیکلین و اریترومایسین در بین هر دو سویه شایع و برای تتراسیکلین و سیپروفلوکسازین به ترتیب ۹۸٪ و ۶۶٪ بوده است. در این تحقیق در مورد آمپی سیلین ۱۲ درصد مقاومـت در بین سویه های فکالیس گزارش شده است(۱۲) در حالیکه در تحقیق ما فقط ۱/۳ درصد از فکالیس ها و ۱۵ درصد از فیسیوم هـا مقاوم به آمپی سیلین بودند که کاملا متفاوت اسـت . در ایتالیـا ۱۷ درصـد از سـویه هـای فکـالیس مقـاوم بـه آمپـی سـیلین گـزارش شدند(۹).

در سالهای۱۹۸۵-۱۹۸۶ مقاومت به سیپروفلوکسازین در سویه های انتروکک بسیار محدود و حدود ۱/۴ ٪ از آنها HLGR بودند ولی این رقم در سالهای ۱۹۸۹-۱۹۹۰ افزایش یافته و به ۱۵/۲ ٪ رسـید و این بار دیگـر اغلـب ایـن سـویه هـا HLGR گـزارش شـدند. مقاومت در بین سویه های فکالیس جداشده در این مطالعه نسبت به سیپروفلوکسازین ۲۴/۵٪ و در سویه های فیسیوم ۱۶٪ بودکه سیر افزایشی موجود در مطالعه schaberg را نشان می دهد(۱۴).

در طی مطالعه ای درایتالیا در بین سویه های مقـاوم و حـساس بـه ونکومایس مقاومت به سایر آنتی بیوتیک هـا مقایـسه شـده اسـت. براین اساس در سویه های فیسیوم مقـاوم بـه ونکومایـسین درصـد مقاومـــت بـــه آمپـــی ســـیلینء جنتامایـــسینء سیپروفلوکـــسازینء تتراسیکلینء اریترو مایسین و کوتریموکسازول به ترتیب ۸۱ء ۴۰ ء ۸۱ ء ۸۷ ء ۸۷ و ۶۷ درصد و در سویه های فیـسیوم حـساس بـه ونکومایـسین بـه ترتیـب ۷۱ ء ۱۴ء ۷۱ء ۷۱ ء ۱۰۰ و ۱۰۰ درصـد بوده است که در مورد گونـه فکـالیس ایـن درصـدها همـه بـسیار پاییینتر بوده است. در این میان سویه های چند مقاومتی و مقاوم بـه ۴ آنتی بیوتیک یـا بـیش از آن حـدود ۹۰ درصـد بودنـد (۱۵). در مطالعه ما سویه های فکالیس ۷/۵ ٪ و سـویه هـای فیـسیوم ۲۱/۵٪ نسبت به ونکومایسین مقاومت داشتند و تعداد چند مقاومتی هـا در بـیـن فـیـسیومها بـیـشتر بود. همچنین درصد مقاومـت بـه سـایر آنتی بیوتیک ها نـیـز در بـیـن گونه فیسوم ارقام بـالاتری را نـشان می دهد.

در مطالعه دیگری در یونان در طی یکسال از ۵۵ گونـه فکـالیس و ۲۱ گونه فیسیوم که اکثرا از ادرار جدا شـده بودنـدءهیچ سـویه ای مقاوم به ونکومایسین گزارش نشد ولـی ۲۲ سـویه از فکـالیس هـا HLGR بـودو ژن aac(6')-le-aph(2")-la در ۱۰ سـویه از فکالیس ها مشاهده شد.(۱۶)

با افزایش تعـدد و شـیوع ژنهـای مقاومـت بـه آمینوگلیکوزیـدها و بخصوص جنتامایسین در بین ایزوله های کلینیکی ء امروزه استفاده از این داروها در درمان عفونتهای انتروککی محدود شـده اسـت و نقش داروهایی مثل سینرسید و لینه زولیـد و آمینـو گلیکوزیـدهای جدید که خوشبختانه در مطالعات مختلف هنوز مقاومت چندانی به آنها گزارش نشده است ء بسیار مطرح است.(۱۷و۱۸).

فهرست مراجع:

1 – Simonsen G.S., Smabrekke L., Monnet D.L., Sorensen T.L., Moller J.K. ,et al .Prevalence of resistance to ampicillinn, gentamicin,and vancomycin in enterococcus faecalis and enteococcus faecium isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five nordic ospitales. *J.Antimicro.Chemother*.2003. 51: 323-331.

2- Tankovic J., Mahjoubi F., Courvalin P., Duval J., Leclerco R. Development of fluoroquinolone resistance in Enterococcus faecalis and role of mutations in the DNA gyrase gyrA gene. *Antimicrob.Agents Chemother*.1996. 40(11):2558-61.

3- Aslangul E., Massias L., Meulemans A., Chau F., Andremont A., Courvalin P., Fantin B., Ruimy R. Acuired gentamicin resistance by permeability impairment in Enterococcus faecalis.

Antimicrob.Agents Chemother. 2006.50: 3615-21.
4- Lefort A., Arthur M., Garry L., Carbon C., CourvaliinP., Fantin B.Bactericidal activity of tgentamicin against Enterococcus faecalis in vitro and in vivo. *Antimicrob.Agents Chemother.2000.* 44(8):2077-80
5-Vakulenko S.B., Donabedin S.M., Voskersenskiy A.M., Zervos M.J., Lerner S.A., Chow J.W. Multuplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococcus. *Antimicrob.Agents Chemother*. 2003.47(4):1423-26
6- Daikos G., Bamias G.,Kattamis C., Zervos M.J., Chow J.W., Christakis G., et al. Structure , location and transfer frequencies of genetic elements conferring high-level gentamicin resistance in Enterococcus faecalis isoletes in Greece . *Antimicrob.Agents Chemother*.2003.47(12):3950-53.
7-Unite des Agents Antibacteriens centre National de reference des Antibiotiques –Institute pasteur –Antibiotic resistance techniques- 5th edition- 2006-102.
8- Tenover F.C., Tokars J., Swenson J., Paul S., Spitalny K., Jarvis W. Ability clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant Enterococci. *J.Clin.Microbiol.*1993. 31(7): 1695-99
9-Titze-de-Almeiad R., RolloFilho M., Silveria C.A.N., Rodrigues I.P., Eudesfilho J., etal. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazillian intensive care units. *BJID* .2004.8(3): 197-205
10- Azevedo P>A., Dias C.A.G., Teixeira L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of Enterococcal isolates from southern region of Brazil. *Rev.Inst. Med.Trop. S. Paulo.*2006.48(1):11-16.
11 - Donabedian S.M., Thal L.A., Hershberger E., Perri M.B., Chow J.W., etal. Molecular characterization of gentamicin –resistant Enterococci in the United states:evidence of spread from animals to human through food. *J.Clin.Microbiol*.2003.41(3):1109-13.
12- Zarrilli R., Tripodi M.F., Dipopolo A., Fortunato R., bagattini M., Crisipino M., Florio A., Triassi M., Utili R. Molecular epidemiology of high- level aminoglycoside –resistant Enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy.*J.Antimicro.Chemothe*r.2005.56(5):827-3
13-Schouten M.A., Voss A., Hoogkamp-korstanje J.A.A . Antimicrobial susceptibility patterns of Enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob.Agents Chemother.*1999. 43(10): 2542-46.
14– Schaber D.R., Dillon W.I., Terpenning M.S., Robinson K.A., Bradley S.F., Kauffman C.A. Increasing resistance of Enterrococci to ciprofloxacin. *Antimicrob.Agents Chemother*.1992. 36(11):2533-35.
15- Busani L. , Del Grosso M., Paladini C., Graziani C., Pantosti A., Biavasco F., Capriolo A. Antimicrobial susceptibility of vancomycin –susceptible and –resistant enterococci isolated in Italy from raw meat product, farm animals and human infections . *Inter.J. food.Microbiol* .2004.
16- Kapaparaskevas J., Vatopoulos A., Tassios PT., Avlami A.,Legakis N.J., Kalapothaki V. Diversity among High- level aminoglycoside-resistant Enterococci .*J.Antimicro.Chemother*. 2000.45(3):.277-83
17- Eliopoulos G.M.Aminiglycoside resistance in Enterococci. *Clin.Infec.Dis*.2000.31.586-9.
18- Schouten M.A., Voss A., Hoogkamp-korstanje J.A.A. Antimicrobial susceptiility patterns of Enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob.Agents Chemother*.1999. 43(10): 2542-4