

بررسی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در گونه‌های انتروکوک جدا شده از افراد سالم در شهر تهران ۸۷-۱۳۸۶

نسرین نوحی^{۱*}، ملیحه طالبی^۲، غلامحسین ابراهیمی پور^۱، محمدرضا پورشفیعی^۲

(۱) گروه میکرب شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی

(۲) بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: نسرین نوحی، گروه میکرب شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی

همراه: ۰۹۱۴۴۲۶۳۷۸۴ nasrinnoohi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۲۴

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروکوک فلور طبیعی روده انسان و حیوانات است که طی سال‌های اخیر به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است. مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در انتروکوک اثر سینرژیستی بین این آنتی بیوتیک و آنتی بیوتیک‌های مؤثر روی دیواره باکتری را از بین می‌برد. ژن اصلی ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین در انتروکوک *Ia-aac(6')-Ie-aph(2'')* است. هدف از این مطالعه تعیین مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در گونه‌های انتروکوک جدا شده از افراد سالم در شهر تهران بود.

روش بررسی: نمونه مدفوع داوطلبین سالم غیر بستری در شهر تهران، پس از غنی سازی در محیط Brain hearth infusion broth حاوی جنتامایسین، بر روی محیط m-انتروکوکوس کشت داده شد. بعد از شناسایی گونه‌ها، MIC سویه‌ها به جنتامایسین تعیین شد و حساسیت سویه‌های مقاوم در مقابل ۸ آنتی بیوتیک مختلف با روش دیسک دیفوزیون آگار بررسی گردید. برای بررسی مولکولی مقاومت به سطح بالای جنتامایسین در سویه‌های مقاوم، PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: از ۵۰۰ نمونه مدفوع در ۷۶ (۱۵/۲٪) نمونه انتروکوک مقاوم به سطح بالای جنتامایسین ($MIC \geq 500 \mu g/ml$) جداسازی شد. گونه‌های جداسازی شده عبارت بودند از: ۴۵ (۵۹/۲٪) سویه انتروکوکوس فکالیس، ۲۹ (۳۸/۱٪) سویه انتروکوکوس فسیوم و ۲ (۲/۷٪) سویه انتروکوکوس گالیناروم بودند. ۱۱ الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده شد. تمام سویه‌ها دارای ژن مقاومت *Ia-aac(6')-Ie-aph(2'')* بودند.

نتیجه گیری: شیوع انتروکوک‌های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین در افراد سالم مورد مطالعه در مقایسه با مطالعات سایر نقاط دنیا، بالا ارزیابی می‌شود. همانند سایر مطالعات، ژن اصلی و شاخص ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین، *aac(6')-Ie-aph(2'')* شناخته شد.

کلید واژه‌ها: انتروکوک، جنتامایسین، مقاومت سطح بالا، افراد سالم

مقدمه:

انتروکوک های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین در افراد سالم غیر بیمارستانی، شناسایی ژن های مقاومت و بررسی حساسیت ضد میکروبی آنها بود.

مواد و روش ها:

نمونه برداری: نمونه مدفوع ۵۰۰ داوطلب غیر بیمارستانی (شامل کسانی که بنا به دلایلی از جمله ازدواج، درخواست کار، بررسی عمومی سالیانه "چکاپ"، تعیین گروه خونی و غیره به آزمایشگاه مراجعه کرده بودند و نیز داوطلبان متفرقه و سالم) شهر تهران از ماه های مهر ۱۳۸۶ تا شهریور ۱۳۸۷ بررسی شد. در این مطالعه، از هر داوطلب فقط یک نمونه گرفته شد و از هر نمونه فقط یک سویه مقاوم مورد بررسی قرار گرفت. افراد مورد مطالعه در این بررسی طی ۶ ماه قبل از نمونه برداری سابقه بستری در بیمارستان را نداشتند و در دوره ۲ ماه قبل از نمونه برداری تحت درمان آنتی بیوتیکی قرار نگرفته بودند.

جداسازی و شناسایی انتروکوک: ابتدا نمونه ها در محیط BHI مایع حاوی ۳۲ µg/ml جنتامایسین به مدت یک شبانه روز و در دمای ۴۵°C غنی سازی شدند و سپس سوسپانسیون حاصل بر روی محیط m-انتروکوکوس آگار (Becton Dickinson and co., Sparks, MD, USA) ۳۲ µg/ml جنتامایسین کشت داده شدند (۴۸ h / ۳۷°C). کلونی های تپیک انتروکوک بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شدند. سپس آزمایش های بیوشیمیایی جهت شناسایی جنس و گونه بر روی سویه های جدا شده انجام گرفت. این آزمایش ها شامل رنگ آمیزی گرم، رشد در محیط بایل اسکولین آگار، رشد روی محیط ۶/۵٪ نمک، تحمل ۰/۰۴٪ تلوریت، تست کاتالاز، تست PYR، آرژنین دهیدرولاز، حرکت، تولید پیگمان، هیدرولیز کربوهیدرات ها (آرابینوز، گلیسرول، لاکتوز، مانیتول، ملیبیوز، رافینوز، ریبوز، سوربوز، سوربیتول، ساکارز و تrehalose) بود (۹).

آزمایش حساسیت ضد میکروبی: حساسیت ضد میکروبی سویه ها به روش انتشار از دیسک در مورد آنتی بیوتیک های تتراسیکلین (۳۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، آمپی سیلین (۱۰ µg)، سیپروفلوکسازین (۵ µg)، لینزولید (۳۰ µg)، سینرسید (۱۵ µg) و تایکوپلانتین (۳۰ µg) از BioRad, Hercules, CA, USA یا BBL, Sensi Disc, USA) روی محیط مولر هیتون آگار (Difco, USA) سنجیده شد.

انتروکوک فلور طبیعی روده انسان و بسیاری از حیوانات است (۱). این میکرواورگانیسم دومین عامل ایجاد کننده عفونت ادراری در بیمارستان ها و سومین عامل رایج ایجاد باکتری می بیمارستانی است. از بین ۲۰ گونه مختلف جنس انتروکوکوس (Enterococcus)، به طور معمول گونه های انتروکوکوس فکالیس (*E. faecalis*) و انتروکوکوس فسیوم (*E. faecium*) در بدن انسان کلونیزه شده و عامل اصلی عفونت در انسان می باشند. به طوری که ۸۰ تا ۹۰ درصد عفونت های ناشی از انتروکوک در انسان توسط گونه *E. faecalis* و ۱۰ تا ۱۵ درصد از آنها توسط *E. faecium* ایجاد می شود (۱ و ۲). یکی از دلایل اصلی که انتروکوک ها در بیمارستان ها زنده می مانند، مقاومت ذاتی آنها به چندین آنتی بیوتیک مورد استفاده معمول در بیمارستان ها است. شاید عامل مهم تر توانایی آنها در کسب مقاومت به آنتی بیوتیک های رایج موجود از طریق موتاسیون و یا کسب ماده ژنتیکی حامل ژن مقاومت از طریق کونژوگاسیون یا روش های دیگر می باشد (۳). انتروکوک های مقاوم در مدفوع حیوانات، غذاهای تولید شده با منشاء حیوانی، آب های سطحی و فاضلاب های بیمارستانی در سطح وسیع یافت می شوند که قادر هستند به افراد سالم جامعه انتقال یافته و در جامعه غیر بیمارستانی منتشر شوند. وجود این باکتری های مقاوم در فلور نرمال، ذخیره مناسبی برای ژن های مقاومت جهت انتقال به باکتری های پاتوژن به شمار می آید (۱، ۴ و ۵).

مقاومت به سطح بالای جنتامایسین (high level gentamicin resistance: HLGR) در انتروکوک ها سینرژسم بین جنتامایسین و آنتی بیوتیک های موثر روی دیواره باکتری ها مثل ونکومایسین، آمپی سیلین و پنی سیلین را از بین می برد (۲ و ۶). از این رو، کسب این مقاومت توسط انتروکوک ها بسیار حائز اهمیت است. مقاومت سطح بالا به جنتامایسین ($MIC \geq 500 \mu g/ml$) در انتروکوک اغلب به واسطه ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ایجاد می شود که آنزیم غیر فعال کننده آمینوگلیکوزید AAC(69)-APH(20) را کد می کند (۷). این آنزیم با ایجاد تغییر در ساختار آمینوگلیکوزیدها باعث غیر فعال شدن آنها می شود (۶).

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که برای کنترل انتشار مقاومت باکتریایی در یک منطقه جغرافیایی، کسب اطلاعات راجع به طرح های حساسیت باکتری ها در آن منطقه ضروری می باشد (۸). از این رو هدف از انجام این مطالعه تعیین شیوع

فراوانی و درصد مقاومت به آنتی بیوتیک ها عبارت بود از: اریترومايسين ۷۱ سويه (۹۳/۴٪)، سیپروفلوکسازين ۲۶ سويه (۳۴/۲٪)، تتراسيكلين ۷۱ سويه (۹۳/۴٪)، کلرامفنیکل ۱۴ سويه (۱۸/۴۲٪)، آمپی سیلین ۱۹ سويه (۲۵٪)، تايکوپلانیين ۴ سويه (۵/۲۶٪) و سینرسید ۴۵ سويه (۵۹/۲٪). تمام سويه های جدا شده به آنتی بیوتیک لینزولید حساس بودند. همانطور که در جدول ۱ مشخص است، مقاومت به سینرسید در گونه *E. faecium* و همین طور مقاومت به آمپی سیلین در گونه *E. faecalis* مشاهده نشد. تمام سويه های *E. faecalis* به سینرسید مقاوم (ذاتی) بودند و مقاومت به آنتی بیوتیک های تايکوپلانیين و آمپی سیلین، فقط در گونه *E. faecium* مشاهده شد. ۵/۶۵٪ از سويه های *E. faecium* مقاوم به آمپی سیلین بودند. بالاترین میزان مقاومت به کلرامفنیکل در سويه های *E. faecalis* دیده شد. مطالعه مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که ۴۲ (۵۶٪) سويه دارای مقاومت چند گانه بودند. یعنی علاوه بر جنتامایسین به سه آنتی بیوتیک دیگر نیز مقاومت نشان دادند.

نتایج حاصل از PCR نشان داد که تمام سويه های مورد مطالعه دارای ژن مقاومت *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* بودند (شکل ۱).

جدول ۱: تعداد و درصد مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف

بر حسب گونه در سويه های مقاوم

آنتی بیوتیک	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
سیپروفلوکسازین	۱۶(۵۵/۱)	۱۰(۲۲/۲)
اریترومايسين	۲۶(۸۹/۶)	۴۳(۹۵/۵)
کلرامفنیکل	۱(۳/۱)	۱۳(۲۸/۹)
آمپی سیلین	۱۹(۶۵/۵)	–
تتراسيكلين	۲۷(۹۳/۱)	۴۲(۹۳/۳)
تايکوپلانیين	۴(۱۳/۸)	–
لینزولید	–	–
سینرسید	–	۴۵(۱۰۰)

MIC سويه های جدا شده نسبت به جنتامایسین (Sigma) به روش microbroth dilution تعیین شد (۱۰). رقت آنتی بیوتیکی مورد بررسی ۱۶–۲۰۴۸ µg/ml بود.

استخراج DNA: استخراج DNA به روش فنل کلروفرم انجام گرفت. 6ml از سوسپانسیون باکتری کشت شده در محیط BHI مایع، به مدت 18 دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. روی رسوب حاصله ۳۰۰µl از بافر لیز (حاوی EDTA 0.5M, Tris-HCL 1M, sucrose 50% و لیزوزیم) اضافه شد و به مدت 1 ساعت در بن ماری 37°C قرار داده شد.

سپس به محلول حاصله ۲۵ µl از ۱٪ SDS اضافه شد و بعد از قرار دادن روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه، به مدت ۱۶ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سوسپانسیون رویی ابتدا دو مرتبه با فنل و کلروفرم-ایزوپروپانول و سپس با کلروفرم شستشو داده شد. در هر مرحله مایع رویی برداشته شد. در نهایت رسوب DNA حاصل از اضافه شدن اتانول ۱۰۰ بر روی مایع رویی، در بافر TE حاوی RNase حل شد (۱۱).

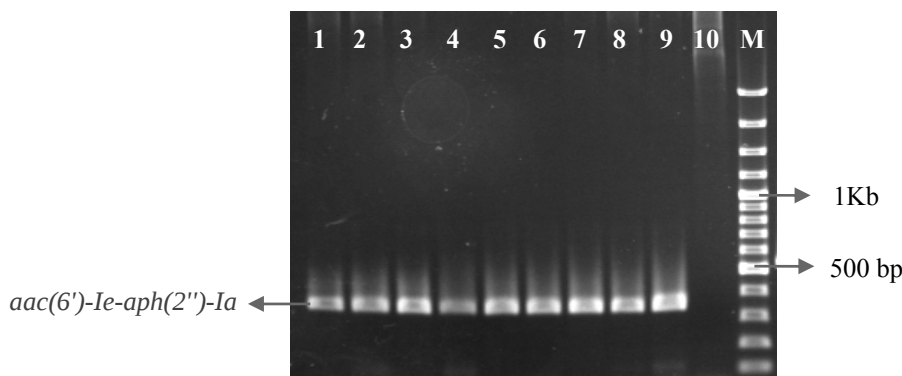
PCR: با استفاده از PCR و پرایمر اختصاصی 5'CAG AGC CTT GGG AAG ATG AAG3' و

5'CCT CGT GTA ATT CAT GTT CTG GC3' حضور ژن مقاومت آمینوگلیکوزیدی *aac(69)-Ie-*

aph(20)-Iaa در سويه های مقاوم بررسی شد. در این مطالعه از زوج پرایمرهای پیشنهاد شده Chow و همکارانش استفاده شد (۶). سیکل حرارتی برای انجام آزمایش PCR شامل یک مرحله lysing اولیه ۳ دقیقه در ۹۴°C، ۳۵ سیکل از ۴۰ ثانیه در ۹۴°C (denaturation)، ۴۰ ثانیه در ۵۵°C جهت اتصال پرایمر (annealing)، ۴۰ ثانیه در ۷۲°C برای تکثیر قطعه هدف (extension) و در نهایت یک مرحله extension نهایی ۲ دقیقه در ۷۲°C بود. در نهایت الکتروفورز محصولات تکثیر یافته در هر PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ انجام شد و پس از رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:

از ۵۰۰ نمونه مدفوعی، ۷۶ نمونه (۱۵/۲٪) حاوی سويه مقاوم به سطح بالای جنتامایسین بودند. انجام آزمایش های بیوشیمیایی بر روی سويه های جدا شده نشان داد که ۴۵ (۵۹/۲٪) سويه *E. faecalis* ۲۹ (۳۸/۱٪) سويه *E. faecium* و ۲ (۲/۶۳٪) سويه *E. gallinarum* بودند. نتایج MIC نشان داد که تمام سويه های مقاوم به جنتامایسین دارای MIC ≥ 500 µg/m بودند.



شکل ۱: PCR جهت تکثیر ژن مقاومت به جنتامایسین، مارکر ۱۰۰ bp (M)، نمونه های مثبت برای ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (شماره های ۱-۹) و کنترل منفی (شماره ۱۰)

بحث:

نتایج نشان داد میزان HLGR بالا است و همه سویه های جدا شده داراری ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* هستند.

فلور روده افراد سالم در جامعه، محل ذخیره مناسبی برای باکتری های مقاوم و ژن های مقاومت به شمار می آید. این مسئله شیوع مقاومت در سطح جامعه را بالا برده و درمان عفونت های انتروکوک می مقاوم را با مشکل رو به رو می کند. از این رو، بررسی شیوع انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف در جامعه سالم انسانی از نظر اپیدمیولوژی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بررسی شیوع مقاومت به جنتامایسین در آمریکا، کانادا، آمریکای لاتین، اروپا و آسیا حاکی از مقاومت ۱۴ تا ۴۰ درصد انتروکوک ها به جنتامایسین می باشد (۱۲). در مورد شیوع HLGR در انتروکوک های جدا شده از نمونه های غیر بیمارستانی، طی مطالعه ای در تایلند در سال ۲۰۰۶، شیوع انتروکوک های مقاوم به جنتامایسین در مواد غذایی منجمد شده و آب های سطحی این کشور به ترتیب ۰/۹ درصد و ۱/۶ درصد گزارش شده است (۱۳). همین طور در مطالعه ای در مالزی شیوع انتروکوک های مقاوم به جنتامایسین در ماکیان، ۱۹/۵ درصد گزارش شد (۱۴).

بررسی شیوع HLGR در سویه های جدا شده از نمونه های بالینی در ایران نشان دهنده افزایش رو به رشد مقاومت در سطح بیمارستان های کشور است (۱۷-۱۵). در مطالعه سیفی و همکاران روی انتروکوک های جدا شده از عفونت های دستگاه ادراری میزان HLGR در ایزوله های *E. faecium* و *E. faecalis* به ترتیب ۹۲ درصد و ۳۰ درصد گزارش شده است (۱۷). گزارشات به دست آمده از سایر نقاط دنیا در مورد شیوع انتروکوک های مقاوم به سطح

بالای جنتامایسین در بین افراد سالم جامعه متفاوت است. طی مطالعه ای در آمریکا در سال ۲۰۰۰ شیوع انتروکوک های HLGR در بین افراد سالم به عنوان فلور طبیعی روده ۱ درصد گزارش شد. در مطالعه انجام شده در هنگ کنگ (۲۰۰۴) و همین طور در پرتغال (۲۰۰۶) بر روی افراد سالم جامعه، شیوع HLGRE به ترتیب ۲۷/۸ درصد و ۱۱ درصد گزارش شده است (۱۸ و ۱۹). در مطالعه حاضر شیوع انتروکوک های HLGR در جامعه سالم ۱۵/۲ درصد به دست آمد که با توجه به سایر مطالعات انجام شده در نقاط مختلف دنیا رقم بالایی است. طی سه دهه اخیر آمینوگلیکوزیدها از جمله جنتامایسین در سطح وسیع جهت درمان عفونت های مختلف در بیماران بیمارستانی و غیر بیمارستانی در ایران مورد استفاده قرار می گیرد. این امر می تواند مهم ترین عامل شیوع بالای مقاومت در جامعه باشد.

در اکثر مطالعات انجام شده در خصوص شیوع انتروکوک های مقاوم به جنتامایسین، دو گونه غالب جداسازی شده *E. faecium* و *E. faecalis* بودند. درصد بالای انتروکوک های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین جداسازی شده در این مطالعه *E. faecium* و *E. faecalis* بودند که ۵۹/۲ درصد آنها متعلق به گونه *E. faecalis* بود. در مطالعه سیفی و همکاران بر روی انتروکوک های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین، ۶۴ درصد از ایزوله های *E. faecium* جداسازی شده از فاضلاب و ۲۹ درصد از ایزوله های *E. faecalis* به سطح بالای جنتامایسین مقاوم بودند (۲۰). مشابه با مطالعه ما، در مطالعه ای در آمریکا روی افراد سالم و غیر بیمارستانی، گونه غالب انتروکوک های مقاوم به جنتامایسین، *E. faecalis* گزارش شده است (۲۱).

مقاومت به تایکوپلانتین و لینزولید پایین بود. در مطالعات مختلف انجام شده در ایران مشابه با این مطالعه، مقاومتی به آنتی بیوتیک لینزولید مشاهده نشده است (۱۷). در این مطالعه، مقاومتی به سینرسید در *E. faecium* مشاهده نشد. *E. faecalis* دارای مقاومت ذاتی به سینرسید است ولی *E. faecium* مقاوم به چندین آنتی بیوتیک مختلف به طور همزمان معمولاً به این آنتی بیوتیک حساس می باشد. در سایر مطالعات انجام شده در ایران نیز میزان مقاومت به این آنتی بیوتیک پایین گزارش شده است (۱۷). تمام سویه های مقاوم به آمپی سیلین جداسازی شده در این مطالعه متعلق به گونه *E. faecium* بود. در بین سویه های *E. faecalis* مقاومتی به این آنتی بیوتیک مشاهده نشد. در کل در بین انتروکوک های مقاوم، ۱۱ طرح مختلف مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شد. قابل ذکر است که بیش از نیمی از سویه های HLGR جداسازی شده، به ۳ آنتی بیوتیک دیگر به جز جنتامایسین مقاوم بودند.

نتیجه گیری:

این مطالعه حاکی از شیوع بالای مقاومت به جنتامایسین در فلور روده افراد سالم و غیر بیمارستانی در شهر تهران می باشد. از طرف دیگر یک منبع بزرگ ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف در بین انتروکوک های جداسازی شده در این مطالعه شناسایی شد. این مقاومت قابل انتقال به سایر باکتری های فلور نرمال می باشد که نتیجه آن افزایش سطح مقاومت در جامعه سالم انسانی و به تبع آن در بیمارستان ها است. این امر درمان عفونت های ناشی از این میکرواورگانیزم های مقاوم را بیش از پیش با مشکل رو به رو می کند.

در مورد ژن های مختلف ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین، مطالعات متفاوت در آمریکا، کانادا، آمریکای لاتین، اروپا و آسیا نشان داده که ۷۹ درصد مقاومت های سطح بالا به جنتامایسین توسط ژن مقاومت *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* حاصل شده و همین طور ۵ درصد آنها دارای *aph(2'')-Ib*، ۱۶ درصد دارای *aph(2'')-Id* و ۱۴ درصد دارای *aph(2'')-Ic* می باشند (۱۲). طبق مطالعات انجام شده در ایران بر روی انتروکوک های HLGR جدا شده از بیمارستان های مختلف با $MIC \geq 500 \mu g/ml$ برای جنتامایسین، حضور ژن مقاومت *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* در سطح بالا گزارش شده است. به طوری که تمامی انتروکوک های مقاوم به سطح بالای جنتامایسین دارای این ژن مقاومت بودند (۱۵، ۱۶ و ۲۰). در مطالعه حاضر مطابق با سایر مطالعات در نقاط مختلف دنیا، *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ژن غالب ایجاد کننده مقاومت به جنتامایسین است. این ژن روی ترانسپوزون یا پلاسمید قرار دارد که به راحتی قادر به انتقال به سایر باکتری ها از جمله استافیلوکوک می باشد و عامل ایجاد مقاومت در مقابل اکثر آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی است. در این مطالعه ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* در تمام انتروکوک های HLGR جدا شده از افراد سالم جامعه شناسایی شد. نتایج حاکی از اهمیت ویژه این ژن در ایجاد و انتقال مقاومت به جنتامایسین در بین انتروکوک ها در تهران است. این سطح بالای مقاومت در جامعه سالم انسانی، به عنوان یک محل ذخیره مناسب برای این ژن مقاومت می باشد که به سرعت مقاومت را در جامعه سالم گسترش می دهد.

نتایج آزمایش های ضد میکروبی حاکی از مقاومت چند گانه در بین انتروکوک ها بود. بالاترین میزان مقاومت (بیش از ۹۰ درصد) در مقابل اریترومایسین و تراسیکلین مشاهده شد. از طرف دیگر میزان

فهرست مراجع:

1. Huycke M M, Sahm D F, Gilmore M S. Multiple drug resistant enterococci: The nature of problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(2): 239-249.
2. Marothi Y A, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance. *Indian J Med Microbiol*. 2005; 23(4):214-219.
3. Cleavel DB. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990; 9:90-102.
4. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Mollby R, Pourshafie M R. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J. Curr Microbiol*. 2007; 56:468-473.
5. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(4):686-707.
6. Vakulenko S B, Donabedian S M, Vaskresenskiy A M, Zerros M J, Lerner S A, Chow J W. Multiplex PCR for detection of

- aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**(4):1423-1426.
7. Kao S J, You I L, Clewell D B, Donabedian S M, Zerros M J, Petrin J, Shaw K.J. Detection of high-level aminoglycoside resistance gene *aph*(2) –Ib in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; **44**(10):2876-2879.
8. Talebi M, Eshraghi S S, Pourshafie M R, Pourmand M R, Eshraghian M R. Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Iranian J Publ Health.* 2007; **36**(4):20-25.
9. Manero A, Blanch A R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Appl Environ Microbiol.* 1999; **65**: 4425–4430.
10. National Committee for Clinical laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 11th informational supplement. 2001, vol21. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayn, Pa.
11. The *Enterococcus* research site. Total DNA purification from *Enterococcus*. <http://W3.ouhsc.edu/Enterococcus/DNA> Purification from *Enterococcus*.
12. Vakulenko S B, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; **16**: 430-450.
13. Tansuphasiri U, Khaminthakul D, Pandii W. Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006; **37**: 162-70.
14. Chan Y Y, Abd Nasir M H, Yahaya M A, Salleh N M, Md Dan A D, Musa A M, Ravichandran M. Low prevalence of vancomycin- and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. *Int J Food Microbiol.* 2008; **122**: 221-6.
15. Feizabadi M M, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. *Microb Drug Resist.* 2006; **12**: 265-268.
16. Feizabadi M M, Aliahmadi A, Mobasheri F, Asgharzade A, Asadi S, Etemad G. Phenotypical characteristics and population genetics of *Enterococcus faecalis* cultured from patients in Tehran during 2000-2001. *Can J Microbiol.* 2003; **49**: 645-649.
17. Saifi M, Pourshafie M R, Eshraghian M R, Soltan Dallal M M. Anti-microbial resistance of enterococci isolated from urinary tract infections in Iran. *Iran Biomed J.* 2008; **12**: 185-90.
18. Boost M, Lai L, Donoghue M. Drug resistance in fecal enterococci in Hong Kong. *J Infect Chemother.* 2004; **10**: 326-330.
19. Novais C, Coque T M, Sousa J C, Peixel V. Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. *Clin Microbiol Infect.* 2006; **12**: 1131-1134.
20. Saifi M, Soltan Dallal M M, Pourshafei M R, Eshraghian M R, Pourmand M R, Salari M H, Skirazi M H. High level resistance of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from municipal sewage treatment plants to gentamicin. *Iranian J Publ Health.* 2008; **37**: 103-107.
21. Clark N C, Cooksey R C, Hill B C, Swenson J M, Ternover F C. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; **37**:2311–2317.