مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۱۱ – ۱۶

بررسی شیوع ژنهای آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها در انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم در ایران

محمد مهدی فیض آبادی[*۱]، سارا صیادی[۲]، لیلا شکرزاده[۲]، سپیده خطیبی [۲] ،سارا غروی [۲]

۱) گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲) گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران

نویسنده رابط : محمد مهدی فیض آبادی، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن : ۸۸۹۵۵۸۱۰ mfeizabadi@tums.ac.ir

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

چکیده:

زمینه و اهداف: سویه های مقاوم به غلظت های بالای جنتامایسین در بیمارستان های تهران شایع می باشد. شناخت ژن های مسئول مقاومت در پیش بینی نوع مقاومت احتمالی به سایر آمینو گلیکوزیدها و اتخاذ سیاست های درمانی موثر می باشد.

روش بررسی:در این مطالعه ابتدا سویه های انترو کوکوس مقاوم به غلظت های بالای جنتامیسین با دیسکهای حاوی ۱۲۰ میکروگرمی شناسائی و جدا شدند. ۷۹ سویه انتروکوکوس فکالیس و ۳۵ انتروکوکوس فسیوم دارای این مقاومت بودند. این جدایه ها از سه بیمارستان در تهران در طی دو سال(۱۳۸۴-۱۳۸۳) جمع آوری شدند. حد اقل غلظت کشنده برای جنتامیسین به روش ماکرو براث انجام گردید. تست های حساسیت دارویی به روش کر بی بوئر برای آنتی بیوتیک های آمیکاسین، نتیل مایسین، توبرامایسین و کانامایسین انجام شدند. تمامی جدایه ها برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز ژنهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycoside modifying Enzymes; MEs) که شامل *aac(6´)-aph(2´)*، *aph(2´)-Ib, aph(2´)-Ic, aph(2´)-Ia, aph(2´)-Id, aph(3´)-IIIa,* و *ant(4´)-Ia* می باشند انتخاب شدند.

یافته ها: ۵۹ جدایه (۵۲٪) فنوتیپ HLGR (High Level Gentamicin Resistant) را نشان دادند. MIC درتمام سویه های HLGR بیش از ۵۰۰ میکروگرم بوده و در سویه های LLGR (Low Level Gentamicin Resistant) مقدار MIC بین ۶۴ تا۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بوده است . تمام سویه های HLGR حاوی ژن *aac(6´)-aph(2´´)* بودند. ژن *aph(3´´)-III* در ۶۱٪ از سویه های با فنوتیپ HLGR و در ۶۵٪از سویه های دارای MIC<500 دیده شد. وجود همزمان دو ژن *aac(6´)-aph(2´´)* و *aph(3´)IIIa* در بین سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم به ترتیب ۶۰٪و ۶۵٪ دیده شدند. ژن *aph(2´)Ic* در دو سویه از انتروکوکوس فسیوم تکثیر شد. نتایج PCR برای ژن های *aph(2´)-Id aph(2´)-Ic ant(4´)-Ia,* منفی بود. ژن *aac(6´)-aph(2´´)* و سپس ژن *aph(3´)-IIIa* بیشترین ژن های موثر در ایجاد مقاومت به جنتامیسین و بقیه آمینوگلیکوزیدها می باشند.

نتیجه گیری: سویه های فاقد این ژنها به تمامی آمینوگلیکوزیدهای تست شده در این مطالعه حساس بودند. به دلیل حضور ژن *aac(6´)-aph(2´´)* اغلب سویه های مقاوم به جنتا مایسین به سایر آمینو گلیکوزیدها مقاوم می باشند.

کلید واژه ها: انتروکوکوس فکالیس ، انتروکوکوس فسیوم ، آمینو گلیکوزیدها

مقدمه:

انتروکوک ها به خصوص انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم دارای مقاومت ذاتی به غلظت های پایین جنتامیسین می باشند، بطوریکه حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) در این باکتري ها ۴ تا ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر می باشد (۱). یکی از دلایل مقاومت به مقادیر پایین این گروه از آنتی بیوتیک ها نفوذ اندک آمینوگلیکوزیدها از خلال غشا سلول می باشد(۲). ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام یا ونکومایسین ایجاد اثر سینرژیستی روی سویه های حساس نموده و می تواند در درمان عفونت ها موثر باشد. سویه های مقاوم به غلظت های بالای جنتامایسین (High Level Gentamicin Resistant; HLGR) در کشورهای مختلف دیده شده است (۵-۳). سویه های HLGR (MIC>500µg/ml) توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycosides Modifying Enzymes: AMEs) را دارا هستند. سویه های تولید کننده AMEs اثر سینرژیستی بین آمینوگلیکوزیدها و عوامل ضد دیواره را از بین می برند(۶). گزارشات بسیاری از AMEs های گوناکون در سراسر دنیا وجود دارند.

ژن *aac(6´)-aph(2´)* که آنزیم دو کاره ۶ آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز و ۲ آمینوگلیکوزید فسفو ترانسفراز را کد می کند در اغلب انتروکوک های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها دیده شده است (۷). در سالهای اخیر ژنهای مقاومت بیشتری مانند *aph(2´)-Ia, aaph(2´)-Id, aph(3´)-IIIa, ant(4´)-Ia aph(2´)-Ib, aph(2´)*-Ic که مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را کد می کنند در جمعیت های انتروکوکی دیده شده است (۱۱-۸). به علاوه آنزیم هایی که آمینوگلیکوزیدها ی غیر از جنتامیسین را غیر فعال می کنند نیز یافت شده اند (۱۳-۱۲). بعضی از آنزیم ها مانند *aph(3´)-IIIa* باعث ایجاد مقاومت به نئومایسین و کانامایسین در استافیلوکوکوس ها می شوند. ژن *aph(3´)-IIIa* ممکن است روی کروموزوم یا عوامل ژنتیکی متحرک باشد(۱۴).

شیوع سویه های HLGR انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم در ایران به ترتیب ۴۲٪و ۶۰٪ می باشد (۱۵). در مورد شیوع ژنهای کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در بین سویه های انتروکوکوس ایران مطالعه ای انجام نشده است. در مطالعه حاضر حضور ژنهای *aac(6) -aph(2´´), aph(2´´)-Ib, aph(2´´) Ic, aph(2´´)-Ia, aph(2´´)Id, aph(3)IIIa, ant(4)-Ia* در بین سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم ایران با الگوهای مقاومت مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها :

۷۹ جدایه انتروکوکوس فکالیس و ۳۵ جدایه انتروکوکوس فسیوم از نمونه های ادراری سه بیمارستان در تهران در طی سالهای ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۳ مورد بررسی قرار گرفت. تمامی جدایه ها توسط روش های باکتریولوژیکی معمول تا سطح گونه شناسایی شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی این جدایه ها در مطالعه قبلی تعیین شده بود(۱۵). سویه های فوق با استفاده از الکتروفورز مالتی لوکوس و پلازمید پروفایل از نظر ژنتیکی متفاوت تشخیص داده شده بودند(۱۷-۱۶).

E. faecalis ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 , *Escherchia coli* ATCC 1399 به عنوان سویه های کنترل در تستهای باکتریولوژیکی استفاده شدند. همچنین سویه رفرانس JH2-2 که توسط پروفسور B.E. Murray از دانشگاه Texas و سویه HH22 از دانمارک تهیه شدند به عنوان سویه های کنترل استفاده شدند.

تستهای حساسیت آنتی بیوتیکی:

دیسک های جنتامیسین ۱۲۰ میکروگرمی برای تعیین سویه های HLGR استفاده شدند (۱۸). حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) برای جنتامیسین با استفاده از روش رقتی(macrobroth dilution) مطابق استانداردهای NCCLS انجام شدند (۱). جنتامیسین (Sigma, St. Louis, MO) در رقت های 2،4، 8، 16،32 ، 64، 128، 256، 512، 1024 ، 2048و0.125 میلی گرم در میلی لیتر در محیط آبگوشت Muller-Hinton broth تهیه شد. سپس اینوکلوم باکتریایی که شامل 10^{6}-10^{5} سلول تشکیل دهنده کلنی (Colony Forming Unit, CFU) به هر کدام از رقت ها اضافه شد. سویه *E. faecalis* ATCC 29212 به عنوان سویه کنترل استفاده شد. حساسیت این سویه ها به آمیکاسین،کانامایسین، توبرامایسین، استرپتومایسین و نتیل مایسین نیز مطابق روش Kirby-bauer با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی (Oxoid Hampshire, England) انجام شد (۱۸).

تکثیر ژنهای AMEs :

DNA هر کدام از سویه ها با استفاده از روش انجماد و ذوب سوسپانسیون باکتریائی (freeze and thaw) استخراج گردید(۱۹).سپس با استفاده از پرایمرهای مناسب برای ژنهای *aac(6) -aph(2´´), aph(2´´)-Ib, aph(2´´) Ic, aph(2´´)-Ia, aph(2´´)Id, aph(3)IIIa, ant(4)-Ia* تکثیر گردید.توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

تکثیر در حجم نهایی ۲۵µl که شامل ۴۰۰ نانومول از هر پرایمر ، بافر PCR ۱×، $1.5mM\ MgCl_2$، دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۱۰٪، 0.5mM dNTPs ، DNA الگو ۱µl وآنزیم Taq پلیمراز ۰،۵ واحد (Fermentase, UAB, Lithuania) انجام شد. همچنین برنامه ترموسایکلر به صورت ۹۴°C برای ۳ دقیقه تنظیم شد بعد از آن ۳۵ سیکل که شامل ۹۴°C – ۴۵ ثانیه،۵۵°C –۴۵ ثانیه در ، ۷۲°C –۱ دقیقه و سیکل نهائی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود.

محصول PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل ۱،۵درصد آگارز از یکدیگر جدا شدند. برای تعیین سایز محصولات PCR از یک مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی ,Fermentase UAB) (Vilnius, Lithuania استفاده شد. ژل آگارز حاصل با استفاده از ترانس لو میناتور مجهز به دوربین دیجیتال عکس برداری شده و با کنترل های مثبت و منفی مقایسه گردید.

یافته ها:

۵۱ جدایه به فنوتیپ HLGR (MIC>500mg/ml) تعلق داشتند. بقیه جدایه ها یا به مقادیر پایین جنتامیسین (فنوتیپ LLGR ، MIC≤64 ، n=38) مقاوم بودند و یا مقاوم به مقادیر حد وسط(64<MIC<500, n=17) بودند. سویه هایی که دارای سطوح مختلفی از مقاومت نسبت به جنتامیسین بودند برای بررسی ژنهای AMEs استفاده شدند.

ژن های گوناگون کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها در بین سویه های *E. faecium* و *E. faecalis* در جدول ۲ نشان داده شده است. تمامی سویه ها با فنوتیپ HLGR در هر دو گونه *E. faecium* (n=17) و *E. faecalis* (n=42) دارای ژن *aac (6´)-aph(2´´)* بودند که حصول PCR آنها قطعه ای به طول ۲۲۲ جفت باز بود. همچنین سویه های دارای مقاومت به مقادیر حدواسط به جنتامیسین نیز دارای این ژن بودند.

رابطه ای بین مقاومت به آمینوگلیکوزیدهای دیگر و حضور ژن *aac(6´)-aph(2´´)* وجود دارد (جدول ۳). از ۱۱۴ جدایه ای که حساسیت آنها به سایر آمینوگلیکوزیدها بررسی شد ۱۰ سویه به جنتامیسین، کانامایسین، آمیکاسین، نتیل مایسین و توبرامایسین حساس بودند. این سویه ها فاقد ژنهای *aac(6´)-aph(2´´)* و *aph(3´´)-IIIa* بودند.

در بین سویه های HLGR گونه های *E. faecalis* (۶۰٪) و *E. faecium* (۶۵٪) بیشترین ژن *aac(6´)-aph(2´´)* بوده و پس از آن *aph(3´)-IIIa* می باشد. شیوع این ژن در بین سویه های LLGR گونه های *E. faecalis* و *E. faecium* به ترتیب ۵۹٪ و ۵۴٪ می باشد.

حضور همزمان ژن های *aac(6´)-aph(2´´)* و *aph(3´)IIIa* در بین سویه های HLGR ، *E. faecalis* ۶۰٪ و *E. faecium* ۶۵٪ می باشد (جدول۲).

ژن *aph(2´´)Ic* در دو سویه از *E. faecium* دیده شد. این دو سویه دارای MIC جنتامیسین ۲۵۶ و 2000µg/ml ≤ بودند.

سایر ژن ها شامل *aph(2´´)Id* ،*ant(4´)Ia* و *aph(2´´)Ib* در مجموعه ایزوله های ما وجود نداشتند.

جدول شماره ۱: ترادف پرایمر های مورد استفاده در تکثیر ژنهای آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها

Gene	Primers	Sizes of PCR products (bp)	References
aac(6′)-aph(2″)	CCAAGAGCAATAAGGGCATA CACTATCATAACCACTACCG	۲۲۲	۱۹،۲۰
aph(2″)-Ic	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	٤٤٤	۱۰
aph(3´)-IIIa	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	٥۲۳	۱۰
aph(2″)-Ib	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	۸٦۷	۱۰
aph(2″)-Id	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	٦٤۱	۱۰
ant(4′)-Ia	CAAACTGCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	۲۹٤	۱۰

جدول شماره ۲: توزیع ژنهای کد کننده آنزیمهای اصلاح کننده آمینوگلیکوزیدها در سویه های آنتروکوکوس فکالیس و آنتروکوکوس فسیوم

AMEs genes	LLGR MIC≤۶۴ n (%)		Intermediate ٦٤<MIC<٥٠٠ n (%)		HLGR MIC>٥٠٠ n (%)	
	E. faecalis	*E. faecium*	*E. faecalis*	*E. faecium*	*E. faecalis*	*E. faecium*
aac(6′)-aph(2″)	۲(۷.۴)	-	۱۰(۱۰۰)	٥(۱۰۰)	۴۲(۱۰۰)	۱۷(۱۰۰)
aph(3´)-IIIa	۱۶(۵۹.۲۵)	۷(۵۳.۸)	۸(۸۰)	٥(۱۰۰)	۲۵(۵۹.۵)	۱۱(۶۴.۷)
aac(6′)-aph(2″) + *aph(3´)-IIIa*	۲(۷.۴)	-	۶(۶۰)	٥(۱۰۰)	۲۵(۵۹.۵)	۱۱(۶۴.۷)
aph(2″)-Ic	–	۱(۷.۶۹)	-	-	-	۱(۵.۸۸)

جدول شماره ۳: توزیع ژن *aac(6′)-aph(2″)* در بین سویه های آنتروکوکوس فکالیس و آنتروکوکوس فسیوم بر اساس فنوتیپ مقاومت

Phenotype of Resistance	**Number of isolates**	PCR results for *aac(6′)-aph(2″)*
Gm, Kan, Ak, Net, Tob	۳٤	+
Gm, Kan, Ak, Tob	۱۲	+
Gm, Kan, Ak, Net	۲	+
Gm, Kan, Tob	۲	+
Gm, Net, Tob	۴	+
Gm, Ak,, Tob	۳	+
Kan, Ak, Tob	۴	+
Kan, Tob	۵	+
Ak, Tob	۵	+
Kan	۱	+
Tob	۴	+
-	۱۰	-

Gm, gentamicin; Kan, Kanamycin; Ak, Amikacin; Net, Netilmicin; Tob, Tobramycin

بحث:

در طی چهار دهه گذشته در ایران آمینوگلیکوزیدها به خصوص جنتامیسین به طور گستردهای در درمان بیشتر عفونتها استفاده شده است، که می تواند یکی از علت های شیوع زیاد سویه های HLGR در بیمارستان های ایران باشد (۱۶). هدف مطالعه حاضر تعیین شیوع AMEs در بین ایزوله های انتروکوکوس کلینیکی در تهران است.

مقاومت به غلظت های بالای انتروکوکوس ها به آمینوگلیکوزیدها معمولا توسط ژن *aac (6´)-aph (2´´)* کد می شود (۱۴،۲۰).

نتایج PCR برای این گروه از ایزوله ها که همگی دارای فنوتیپ HLGR بودند وجود ژن *aac(6´) aph (2´´)* را ثابت کرد. تمامی این سویه ها دارای MIC≥2000µg/ml برای جنتامیسین بودند. همچنین سویه های *E. faecalis* دارای مقاومت حد واسط (n=10) و مقاومت پایین (n=2) به جنتامیسین هم دارای ژن فوق بودند.

سویه هایی که فاقد ژنهای *aac (6´)-aph (2´´)* و *aph (3´) IIIa* بودند به سایر آمینوگلیکوزیدهای به کار برده شده در این مطالعه حساس بودند. این موضوع می تواند اهمیت هر دو آنزیم را در تغییر آمینوگلیکوزیدهای مختلف در مجموعه سویه های انتروکوکوس ایرانی توضیح دهد.

تعداد سویه های انتروکوکوس HLGR ایرانی که دارای ژن *aac(6´) aph(2´´)* هستند (۱۰۰٪) بسیار بیشتر از این تعداد در اسپانیا(۶۴،۷٪) ، چین(۶۸،۸٪) و کویت می باشد (۲۲-۲۱ ،۵). دومین ژن بلحاظ فراوانی که در این مطالعه بررسی شد *aph(3´)-IIIa* بود. آنزیم مربوط به ژن مذکور باعث مقاومت به آمیکاسین گردیده و نقشی در مقاومت به جنتامیسین ندارد (۲). وجود آنزیم مذکور در بین ۵۹٪ از سویه های *E. faecalis* که به مقادیر پایین جنتامیسین مقاوم بودند دیده شده است. اهمیت سویه های فوق در مقاومت به آمیکاسین است. در چنین مواردی ترکیب آمپی سیلین و توبرامایسین و یا موارد مشابه آن می تواند از نظر کلینیکی موثر باشد. دو سویه *E. faecium* با MIC=256 و MIC>2000 دارای ژن *aph(2´´)Ic* بودند. این ژن اولین بار در سال ۱۹۷۷ در یک سویه *E. galinarum* که از حیوان جدا شده بود شناسایی گردید و بعدها در سویه های *E. faecium* و *E. faecalis* انسانی گزارش شد (۹-۸). در مطالعه حاضر تمامی سویه های *E. faecalis* بررسی شده فاقد *aph(2´´)-Ic* بودند. MIC جنتامیسین برای سویه هایی که حاوی این ژن هستند ۳۸۴-۲۵۶ میکروگرم درمیلی لیتر می باشد (۸). مقاومت به مقادیر بالا در دومین دسته از سویه ها که دارای MIC>2000 می باشند به علت حضور ژن *aac(6´)-aph(2´´)* است. سویه های دارای ژن *aph(2´´)-Ic* و فاقد ژن *aac(6´)-aph(2´´)* به طور بالقوه به ترکیب آمپی سیلین با آمیکاسین و نتیل مایسین یا دی بکاسین (Dibekacin) حساس هستند(۲). بنابر این در چنین حالت هایی شناسایی *aph(2´´)-Ic* می تواند در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب کمک کند. این مطالعه اولین گزارش از حضور *aph(2´´)-Ic* در بین سویه های انتروکوکوس ایرانی می باشد. تعداد سویه های فوق در ایران کمتر از آنها در کویت است (۲۲).

بیش از ۵۰٪ از سویه های انتروکوکوس ایرانی به مقادیر بالای استرپتومایسین مقاوم هستند(۷). در این مطالعه وجود ژن *ant(6´)-Ia* که در سویه های مقاوم به استرپتومایسین گزارش شده است (۲۲) بررسی نشد. از آنجاییکه سویه های ایرانی مقاومت به مقادیر بالای استرپتومایسین (۳۰۰ µg) نشان می دهند، چنین مقاومتی می تواند در رابطه با آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها باشد.

نتیجه گیری:

سویه های فاقد این ژنها به تمامی آمینو گلیکوزیدهای تست شده در این مطالعه حساس بودند. به دلیل حضور ژن-*aac(6´) aph(2´´)* اغلب سویه های مقاوم به جنتا مایسین به سایر آمینو گلیکوزیدها مقاوم می باشند.

فهرست مراجع:

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. 3rd ed. : Approved Standard M7-A6. 2004: NCCLS, Villanova, PA, USA.
2. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis*. 2000 ; **31(2):**586-589.
3. Miranda G, Lee L, Kelly C, Solórzano F, Leaños B, Muñoz O. *et al.* Antimicrobial resistance from enterococci in a pediatric hospital. Plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin and streptomycin resistance. *Arch Med Res*. 2001: **32(2):**159-163
4. Papaparaskevas J, Vatopoulos A, Tassios PT, Avlami A, Legakis NJ, Kalapothaki V.
5. Diversity among high-level aminoglycoside resistant terococci.*J Antimicrob Chemother*. 2000: **45(3):**277-283.
6. Qu TT, Chen YG, Yu YS, Wei ZQ, Zhou ZH, Li LJ. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant Enterococcus in a Chinese hospital. J Infect. 2006; **52(2):**124-130.

7. Murray, B. E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emer. Infect. Dis.* 1998; **4**:37-47.
8. Ferretti JJ, Gilmore KS, Courvalin P. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6´-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in Streptococcus faecalis and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol*. 1986; **167(2)**:631-638.
9. Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD. *et al.* A novel gentamicin resistance gene in Enterococcus. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; **41(3):**511-514.
10. Kao SJ, You I, Clewell DB, Donabedian SM, Zervos MJ, Petrin J. *et al.* Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene aph(2")-Ib in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; **44(10):**2876-2879.
11. Tsai SF, Zervos MJ, Clewell DB, Donabedian SM, Sahm DF, Chow JW. A new high-level gentamicin resistance gene, aph(2´´)-Id, in Enterococcus spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; **42(5):**1229-1232.
12. Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner SA, Chow JW. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; **47(4)**:1423-1426.
13. Carlier C, Courvalin P. Emergence of 4´,4"-aminoglycoside nucleotidyltransferase in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 **:34(8):**1565-1569.
14. . Matsumura M, Katakura Y, Imanaka T, Aiba S. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110. *J Bacteriol*. 1984; **160(1):**413-420.
15. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan. *J Clin Microbiol*. 2001; **39(9):**3115-3121.
16. Feizabadi MM, Asadi S, Aliahmadi A, Parvin M, Parastan R, Shayegh M. *et al.* Drug resistant patterns of enterococci recovered from patients in Tehran during 2000-2003. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; **24(5):**521-522.
17. Feizabadi MM, Aliahmadi A, Mobasheri F, Asgharzadeh A, Asadi S, Etemadi G.Phenotypic characteristics and population genetics of Enterococcus faecalis cultured from patients in Tehran during 2000-2001. *Can J Microbiol.* 2003; **49(10):**645-649.
18. Feizabadi MM, Asadi S, Zohari M, Gharavi S, Etemadi G. Genetic characterization of high-level gentamicin-resistant strains of Enterococcus faecalis in Iran. *Can J Microbiol.* 2004; **50(10):**869-872.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Performance Standards for Antimicrobial Disk SusceptibilityTests. 5th ed.: Approved Standard M2-A8. NCCLS, Villanova, PA, USA.
20. Rossello-Mora, R. and R. Amann. The species concept for prokaryotes. *FEMS. Microbiol. Rev.* 2001; **25**:39-67.
21. Culebras E, Martínez JL. Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional enzyme6´-N-aminoglycoside etyltransferase-2"-O-aminoglycoside phosphotransferase *Front Biosci.* 1999; **4**:D1-8.
22. del Campo R, Tenorio C, Rubio C, Castillo J, Torres C, Gómez-Lus R. Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant Enterococcus spp. in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; **15(3):**221-226.
23. Udo EE, Al-Sweih N, John P, Chugh TD. Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; **43(3)**:233-238.