Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Identification of Streptomycin Resistance Gene Among Enterococcus spp. Isolated from Hospitals of Tehran by PCR

Nikta sajjadi[1], Vahhab Piranfar[2], Reza Mirnejad*[2]

1. Department of Biology, University of Minho, Braga, Portugal
2. Farname Inc, NORTH YORK, ONTARIO, Canada
3. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/04/26
Accepted: 2016/12/06
Available online: 2017/02/05

Article Subject:

Antibiotic Resistance

IJMM 2017; 10(6): 60-65

Corresponding author at:

Dr. Reza Mirnejad

Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 0982182482554

Email:
rmirnejad@bmsu.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Enterococci are normal flora and present in the intestinal tract of humans and many mammals. Today, the increasing prevalence of resistant enterococci to aminoglycosides is a major problem in hospitals around the world. In Enterococci, aph (3 ') - IIIa gene plays a major role in the emergence of resistance to streptomycin. The aim of this study was to identify this gene in enterococci isolated from patients using PCR method in Tehran.

Materials and Methods: In this study, 350 clinical samples were collected from Milad, Imam Khomeini, and Baghiyatallah hospitals during the years 2015-2014. Enterococcus species were identified based on specific biochemical tests and culture. Then, disk diffusion method was performed according to CLSI guidelines to determine the drug resistance of Enterococcus isolates to different antibiotics. The following primer to streptomycin resistance genes, aph (3 ') - IIIa was used in the PCR method.

Results: Among the 150 samples, 87 samples (58%) were reported as Enterococcus faecalis, and 63 (42%) as Enterococcus faecium. In Antibiotic test, strains showed high resistance to tetracycline and erythromycin whereas the least resistance was observed to chloramphenicol and vancomycin, respectively. The high resistance to Streptomycin was in 22.2% strains which included aph (3') -IIIa gene.

Conclusions: The results of this study can be concluded that the presence of aph (3') -IIIa gene is the main cause of antibiotic resistance to streptomycin in Enterococcus faecium and E. faecalis strains that is growing gradually in the hospitals in Tehran. Therefore, early detection of this type of resistance with the PCR method could be the best way to prevent the spread of infections caused by this bacterium.

KeyWords: Streptomycin, Enterococcus, PCR, Resistance Gene

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Sajjadi N, Piranfar V, Mirnejad R. Identification of Streptomycin Resistance Gene Among Enterococcus spp. Isolated from Hospitals of Tehran by PCR. Iran J Med Microbiol. 2017; 10 (6) :60-65

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۶ – بهمن و اسفند ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

شناسایی ژن aph(3')-IIIa مقاوم به استرپتومایسین در ایزوله های جداشده از بیماران شهر تهران با روش مولکولی PCR

نیکتا سجادی[۱]، وهاب پیرانفر[۲]، رضا میرنژاد[۳]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه مین هو، براگا، پرتغال
۲. موسسه فرنام، اونتاریو، کانادا
۳. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۷

پذیرش:۱۳۹۵/۰۹/۱۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷

موضوع:

مقاومت آنتی بیوتیکی

IJMM 1395; 10(6): 60-65

نویسنده مسئول:

دکتر رضا میرنژاد

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۸۲۴۸۲۵۵۴

پست الکترونیک:

rmirnejad@bmsu.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: انتروکوک ها به صورت فلور نرمال در دستگاه گوارش انسان و بسیاری از پستانداران وجود دارند . امروزه افزایش شیوع انتروکوک های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها در بیمارستان های سراسر جهان یک مشکل مهم به شمار می آید. در انتروکوک ها ژن aph(3')-IIIa نقش اصلی در پیدایش مقاومت نسبت به استرپتومایسین بازی می کند. هدف ازانجام این مطالعه شناسائی این ژن در انتروکوک های جداشده از بیماران شهر تهران به روش PCR می باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۳۵۰ نمونه بالینی مختلف در طی سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ از بیمارستان میلاد،امام خمینی ،بقیۀ ا..(عج) جمع آوری شد. گونه های انتروکوک بر اساس تست های بیوشیمیایی و کشت در محیط های اختصاصی تعیین هویت گردیدند، سپس جهت تعیین الگوی مقاومت دارویی ایزوله های انتروکوک ها به آنتی بیوتیک های مختلف، روش دیسک دیفیوژن بر اساس معیار CLSI انجام پذیرفت. در ادامه برای شناسایی ژن های مقاومت نسبت به استرپتومایسین از پرایمر aph(3')-IIIa در روش مولکولی PCR استفاده شد.

یافته‌ها: از میان ۱۵۰ نمونه، ۸۷ مورد (۵۸٪) انتروکوک فکالیس و ٦٣ مورد (٤٢٪) انتروکوک فاسیوم گزارش شدند. در تست آنتی بیوگرام، سویه ها، مقاومت بالایی نسبت به تتراسایکلین و اریترومایسین از خود نشان دادند و کمترین مقاومت نسبت به دو آنتی بیوتیک کلرآمفنیکل و وانکومایسین بود. هم چنین مقاومت چندگانه در اکثر سویه ها مشاهده گردید و میزان فراوانی ژن *aph(3')-IIIa* ۲۲/۲٪ بود که اکثر انها مقاوم به استرپتومایسین بودند.

نتیجه‌گیری: از این مطالعه می توان نتیجه گرفت عامل اصلی مقاومت به آنتی بیوتیک استرپتومایسین وجود این ژن aph(3′)-IIIa در سویه های انتروکوک فاسیوم و فکالیس است که رفته رفته در بیمارستان های شهر تهران در حال گسترش است، لذا تشخیص سریع این نوع مقاومت ها با روش مولکولی PCR می تواند راهی برای جلوگیری از گسترش عفونت های ناشی از این باکتری باشد.

کلمات کلیدی: استرپتومایسین، انتروکوکوس، PCR، ژن مقاومت

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

مقدمه

انتروکوکوس‌ها (Enterococcus) باکتری‌های گرم مثبت تخمیری هستند که به صورت کوکسی‌های زنجیره‌ای و یا منفرد مشاهده می شوند. این باکتری فلور طبیعی روده پرندگان، انسان و حیوانات است. دو گونه مهم عامل عفونت های بیمارستانی انتروکوکوس‌ها عبارتند از، *انتروکوکوس فکالیس* (۹۰٪ تا ۹۵٪) و *انتروکوکوس فاسیوم* (۵٪ تا ۱۰٪). براساس اطلاعات سیستم‌های مراقبتی عفونت‌های بیمارستانی در آمریکا، انتروکوک ها به عنوان چهارمین عامل عفونت های بیمارستانی، سومین عامل عفونت‌های باکتریمی و دومین عامل عفونت های ادراری می باشند (۱). امروزه مقاومت این گونه از باکتری ها در برابر عوامل ضد میکروبی به ویژه آنتی بیوتیک ها، معضل بزرگی را ایجاد کرده است (۲). اصولا انتروکوک ها مقاومت آنتی بیوتیکی ناشی از مقاومت ذاتی به سطح پایین پنی سیلین، سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها دارند و یا با دریافت اجزا خارج ژنتیکی از طریق پلاسمید یا بر اثر موتاسیون

ها، مقاومت اکتسابی نسبت به گلیکوپپتیدها و غلظت های بالای آمینوگلیکوزیدها از خود نشان دهند (۳). مقاومت های اکتسابی توسط ژن های رمزگذار AMEs که سبب HLGR و HLSR ها که با دو عملکرد (استیل ترانسفراز و فسفوترانسفراز) کد می‌کند، باعث مقاومت به جنتامایسین و استرپتومایسین می‌شود (۴). در سال‌های اخیر ژن مقاومت به استرپتومایسین و کانامایسین (aph(3′)-IIIa) که توسط آنزیم آمینوگلیکوزید فسفوترانسفرازها کد می شود و ژن ant(4)-Ia که مسئول مقاومت به سایر آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی شناسایی شد (۵). برای تشخیص زود هنگام باکتری های مقاوم به دوز بالای آمینوگلیکوزیدها و پیشگیری از شیوع بیماری در بیمارستان های شهر تهران لازم است که این ژن‌ها شناسائی شوند. لذا این مطالعه با هدف بررسی مقاومت دارویی و فراوانی، aph(3′)IIIa در انتروکوک های ایزوله شده از بیماران شهر تهران به روش PCR اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در سال های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ طی مدت ۶ ماه، ۳۵۰ نمونه بالینی مشکوک به انتروکوک از بیمارستان های میلاد، امام خمینی، بقیۀ ا...(عج) از بخش های ICU و مراجعه کنندگان سرپایی، جمع آوری گردید که این نمونه ها شامل: خون، ادرار، زخم، مایع مغزی-نخاعی، BAL و خلط بودند.

ابتدا برای تمایز انتروکوک‌ها از سایر استرپتوکوک‌ها، نمونه مشکوک بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و دیسک های باسیتراسین، اپتوچین و تری متوپریم/سولفامتوکسازول بر روی محیط کشت قرار داده شد.

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در صورت رشد باکتری در مجاورت این دیسک ها به انتروکوک بودن آنها مشکوک شده، سپس کلنی های مشکوک به انتروکوک را با انجام تست کاتالاز، کشت بر روی محیط بایل اسکولین آگار و رشد در محیط آبگوشت حاوی ۶/۵ درصد کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفتند. جهت اثبات گونه های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* از تست قند لاکتوز استفاده شد هم چنین برای تمایز این دو گونه از هم دیگر تست قند آرابینوز انجام گرفت.

جهت انجام آنتی بیوگرام با خریداری دیسک های تتراسایکلین (۳۰میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰میکروگرم)، سیپروفلوکسازین (۵میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰میکروگرم)، استرپتومایسین (۳۰میکروگرم) از شرکت انگلیسی MAST، به روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط مولرهینتون اگار انجام شد.

پلیت ها سپس به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور در ۳۷ درجه سلسیوس، قرار گرفته و بعد از این مرحله، قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گرفته شد. طبق استاندارد CLSI سال ۲۰۱۲ بر اساس قطر هاله رشد باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شدند.

برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)، پس از جداسازی نمونه های مقاوم به استرپتومایسین، استخراج DNA به روش جوشاندن انجام گرفت. به منظور شناسایی ژن aph(3′)-IIIa، از روش PCR و پرایمر اختصاصی استفاده گردید. برای اجرای PCR، واکنش نهایی با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۱۰ میکرولیتر Master Mix 2X (Ampliqon III Co, Denmark) شامل بافر۲x، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر تهیه گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با شرایط دمایی ۴ دقیقه دناتوره اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه دناتوره ثانویه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال در دمای ۶۳ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی رنگ Safe Stain منتقل گردید. از نمونه *E.faecalis* ATCC 2912 که حضور این ژن در یک مطالعه اثبات شده بود و به عنوان کنترل مثبت و از نمونه *E.faecalis* V583 که دارای ژن های مذکور نمی باشند به عنوان کنترل منفی استفاده شد .محصولات PCR ژن aph(3′)-IIIa که خالص سازی شد جهت تعیین توالی به روش سانگر به کمپانی MWG فرستاده شدند.

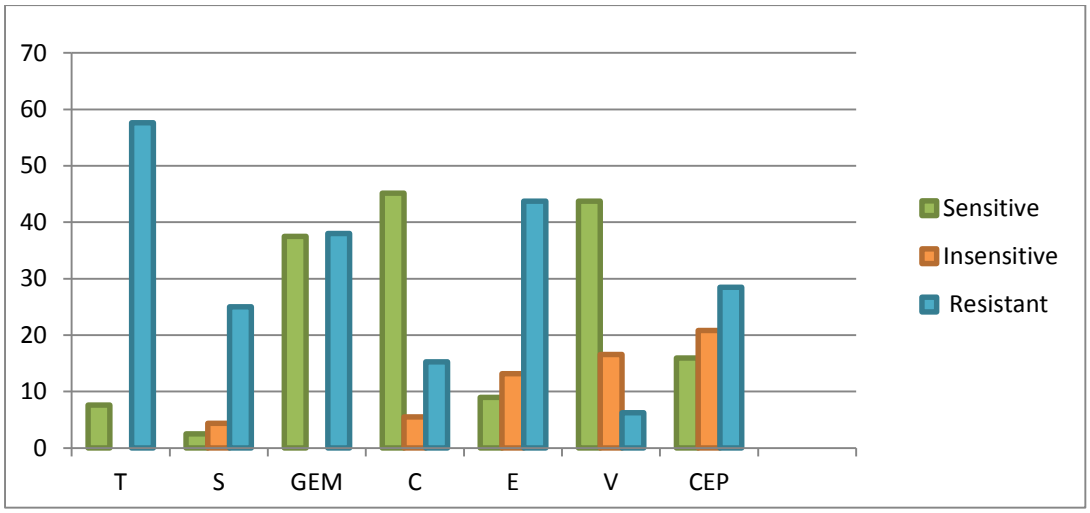
یافته‌ها

از میان ۱۵۰ نمونه، ۸۷ مورد (۵۸٪) *انتروکوک فکالیس* و ۶۳ مورد (۴۲٪) *انتروکوک فاسیوم* گزارش شدند که بیشتر از نمونه ادرار جدا شده (۸۱/۳ ٪) و بقیه به ترتیب از زخم (۹/۳ ٪)، خون (۳/۷) و سایر (۲/۱ ٪) که شامل تراشه، بال و جدا شدند. در تست

آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن، سویه ها، مقاومت بالایی نسبت به تتراسایکلین (۵۷/۶٪) و اریترومایسین (۴۳/۷۵٪) از خود نشان دادند. کمترین مقاومت نسبت به دو آنتی بیوتیک کلرآمفنیکل (۱۵/۲۷٪) و وانکومایسین (۶/۲۵٪) بوده است (نمودار ۱). با روش PCR مشخص شد ۳۲ (۲۲/۲ درصد) از انتروکوک های ایزوله شده از بیماران دارای ژن aph(3′)-IIIa و نشان دهنده عامل اصلی مقاومت به سطح بالای استرپتومایسین است.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

Gene	Primer Sequence	Size	Reference of AMES gene sequence
aph(3′)-IIIa	5'-GGCTAAAATGAGAATATCACCGG-3' 5'-CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG-3'	523	23



نمودار ۱: نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن برای تمام ایزوله های انتروکوکی

بحث

اعلیرغم کاربرد گسترده آنتی بیوتیک ها به ویژه پنی سیلین و کشف عوامل ضد میکروبی جدید، انتروکوک ها همچنان به عنوان سر دسته علل شایع عفونت های بیمارستانی به ویژه در ICU هستند (۶). انتروکوک‌ها عمدتا توسط دست های پرسنل بیمارستان که ممکن است در دستگاه گوارش خود ناقل انتروکوک ها باشند از یک فرد به فرد دیگر و یا گاهی از طریق وسایل پزشکی منتقل می شوند (۷, ۸). در بیماران شایع ترین محل های عفونت ناشی از انتروکوک ها عبارتند از: دستگاه ادراری، جراحت ها، سیستم صفراوی و خون. انتروکوک ها ممکن است در نوزادان مننژیت و باکتریمی ایجاد کنند و در بزرگسالان می توانند اندوکاردیت ایجاد نمایند (۶, ۹, ۱۰). با این وجود انتروکوک‌ها معمولاً در عفونت های داخل شکمی، جراحت ها، عفونت های ادراری و سایر عفونت ها همراه نمونه های دیگری از باکتری ها در محیط کشت رشد می کنند به همین دلیل تعیین نقش بیماری زایی انتروکوک ها مشکل است (۱۱-۱۳).

گفته می شود که *انتروکوکس فکالیس* با ۹۰٪ بروز و بعد از آن انتروکوکوس فاسیوم با ۱۵-۱۰ ٪ بروز، شایع ترین علت در عفونت های انتروکوکی هستند . ظهور آن ها در دو دهه اخیربه صورت چشمگیری افزایش پیدا کرده است (۱۴, ۱۵). مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین ها، آزترئونام‌ها، خانواده بتالاکتام‌ها، تری‌متوپریم موجب افزایش مقاومت و پیشرفت باکتری شده است (۱۶). هرچند که به نظر می‌رسد انتروکوک‌ها برای بدست آوردن ژن‌های مقاومت و انتقال آن‌ها مستعد هستند (۱۷). این دو عامل سبب شده است که امروزه با پدیده HLAR مواجه شویم.

از جمله مکانیسم‌های مولکولی که در ایجاد مقاومت در انتروکوک‌ها نقش دارند عبارتند از: تولید آنزیم های بتالاکتاماز کد شده توسط پلاسمیدها، مقاومت ذاتی کد شده توسط کروموزوم نسبت به سفالوسپورین ها، همچنین مطالعات نشان داده که این

مقاومت دارویی در انتروکوک ها می تواند توسط عناصر ژنتیکی قابل انتقال مانند اینتگرون، ترانسپوزون ها و IS کد شده باشد و به وسیله آن ها انتقال یابد (۱۸-۲۱).

در مطالعهٔ حاضر (۵۸٪) *انتروکوکوس فکالیس* و (۴۲٪) *انتروکوکوس فاسیوم* گزارش شدند که نشان داد درصد فراوانی هر دو گونه بیماریزای انتروکوکی خیلی نزدیک به هم است که با میزان گزارش شده توسط Rahimi در سال ۲۰۰۷، مطالعات دادفرما در سال ۲۰۱۰ و پدمانسی و در چنای هند در سال ۲۰۱۴ هم خوانی دارد (۲۲, ۲۳). ولی برخلاف مطالعات Mohammadi و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که شیوع *انتروکوکوس فکالیس* خیلی بیشتر از *انتروکوکوس فاسیوم* در نمونه بالینی بوده است (۲۴). به نظر می‌رسد به دلیل متفاوت بودن موقعیت جغرافیایی منطقه و زمان جمع آوری نمونه‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت نمی کند.

بر خلاف مطالعات Mohammadi و تحقیقات Ghaffarpasand، سویه‌های مورد آزمایش، مقاومت بالایی نسبت به تتراسایکلین و اریترومایسین از خود نشان دادند (۲۵). کمترین مقاومت نسبت به دو آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل و ونکومایسین بوده است که عدم تطابق می تواند به دلیل نوع دیسک آنتی بیوتیکی مصرفی و اجرای آنتی بیوگرام باشد. در حالی که نتایج حاصل از آنتی بیوگرام با مطالعه Nasaj و همکارانش در سال ۲۰۱۶ تطابق زیادی دارد (۲۶).

میزان HLSR در این مطالعه ۲۲/۲٪ بوده و همانند مطالعه Padmasini گزارش شد (۲۷). تفاوت هایی نیز در مطالعات دیگر مشاهده گردید که درصد بالاتری را نشان می‌داند (۲, ۲۸, ۲۹). از علت های ناهمگونی این مطالعات می توان به انتقال روز افزون ژن‌های مقاومت به گروه آنتی‌بیوتکی آمینوگلیکوزیدی مانند استرپتومایسین از طریق پلاسمید و ترانسپوزون در سال های اخیر اشاره کرد. همچنین مصرف بی رویه این آنتی‌بیوتیک باعث پیدایش سویه هایی با مقاومت بالا شده است.

وجود مقاومت افزایشی در نزدیک به نیمی از نمونه ها، مقاومت بالای آنتی بیوتکی در سویه انتروکوک را نشان می دهد که در این مطالعه با آزمون PCR شناسایی شد. همچنین باتوجه به مطالعات گذشته، نتایج این مطالعه افزایش مقاومت به آنتی-بیوتیک استرپتومایسین که داروی خط اول درمان در ایران است را نشان می دهد. هم چنین میزان شیوع ژن عامل مقاومت به استرپتومایسین در این مطالعه در سطح بالائی قرار داشت که این نیازمند پایش مداوم جهت جلوگیری از انتشار آن می باشد.

تقدیر و تشکر

از کلیه عزیزانی که در مراحل مختلف این پژوهش امکانات لازم جهت انجام این پژوهش را فراهم نمودند، سپاسگزاری می-گردد.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Masoumi Zavaryani S, Mirnejd R, Zareh S, Piranfar V, Bagheri Bejestani O. Identification of Enterococci faecalis&E. faeaciumpathogens viaTehran hospitals clinical samples by phenotypic and genotypic methods and Evaluation of Antimicrobial Susceptibility in 2016. Pars of Jahrom University of Medical Sciences. 2016;14(3):48-54.

2. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. Nat Rev Microbiol. 2012;10(4):266-278.

3. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):417-433.

4. Khani M, Fatollahzade M, Pajavand H, Bakhtiari S, Abiri R. Increasing Prevalence of Aminoglycoside-Resistant Enterococcus faecalis Isolates Due to the aac(6')-aph(2'') Gene: A Therapeutic Problem in Kermanshah, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2016;9(3):e28923.

5. Qu TT, Zhang Y, Yu YS, Chen YG, Wei ZQ, Li LJ. [Genotypes of aminoglycoside-modifying enzyme and clinical study of high-level gentamycin resistant enterococcus]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2006;35(1):76-82.

6. Agudelo Higuita NI, Huycke MM. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Boston2014.

7. Alotaibi FE, Bukhari EE. Emergence of Vancomycin-resistant Enterococci at a Teaching Hospital, Saudi Arabia. Chin Med J (Engl). 2017;130(3):340-346.

8. Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, et al. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial

Pathogens: Attack of the Clones? Front Microbiol. 2016;7:788.

9. Gawryszewska I, Zabicka D, Bojarska K, Malinowska K, Hryniewicz W, Sadowy E. Invasive enterococcal infections in Poland: the current epidemiological situation. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016;35(5):847-856.

10. Khalifa L, Shlezinger M, Beyth S, Houri-Haddad Y, Coppenhagen-Glazer S, Beyth N, et al. Phage therapy against Enterococcus faecalis in dental root canals. J Oral Microbiol. 2016;8:32157.

11. Marcus G, Levy S, Salhab G, Mengesha B, Tzuman O, Shur S, et al. Intra-abdominal Infections: The Role of Anaerobes, Enterococci, Fungi, and Multidrug-Resistant Organisms. Open Forum Infect Dis. 2016;3(4):ofw232.

12. Arabestani MR, Nasaj M, Mousavi SM. Correlation between Infective Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Clinical Isolates in West of Iran. Chonnam Med J. 2017;53(1):56-63.

13. Farahani A. State of Globe: Enterococci: Virulence Factors and Biofilm Formation. J Glob Infect Dis. 2016;8(1):1-2.

14. O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. Infect Drug Resist. 2015;8:217-230.

15. Rau G, Seedor JA, Shah MK, Ritterband DC, Koplin RS. Incidence and clinical characteristics of enterococcus keratitis. Cornea. 2008;27(8):895-899.

16. Lebreton F, van Schaik W, McGuire AM, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, et al. Emergence of epidemic multidrug-resistant Enterococcus faecium from animal and commensal strains. MBio. 2013;4(4).

17. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014;12(10):1221-1236.

18. Hidano A, Yamamoto T, Hayama Y, Muroga N, Kobayashi S, Nishida T, et al. Unraveling antimicrobial resistance genes and phenotype patterns among Enterococcus faecalis isolated from retail chicken products in Japan. PLoS One. 2015;10(3):e0121189.

19. Samadi N, Pakzad I, Monadi Sefidan A, Hosainzadegan H, Tanomand A. Study of aminoglycoside resistance genes in enterococcus and salmonella strains isolated from ilam and milad hospitals, iran. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(4):e18102.

20. Launay A, Ballard SA, Johnson PD, Grayson ML, Lambert T. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from Clostridium symbiosum to Enterococcus spp. in the gut of gnotobiotic mice. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(3):1054-1062.

21. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Boston2014.

22. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iran Biomed J. 2007;11(3):161-167.

23. Dadfarma N, Imani Fooladi AA, Oskoui M, Mahmoodzadeh Hosseini H. High level of gentamicin resistance (HLGR) among enterococcus strains isolated from clinical specimens. J Infect Public Health. 2013;6(3):202-208.

24. Mohammadi F, Tabaraie B, Davudian E, Maleki A, Maleknia S, Sadeghi fard N, et al. Evaluation of drug resistance frequency among Entrococcus faecium and Entrococcus faecalis strains and detection of vanA/B genes in vancomycin resistance isolated by PCR method in Ilam and Kermanshah hospitals. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2011;5(1):14-18.

25. Ghaffarpasand I, Moniri R, Kheradi E, Tehrani MD. Antibiotic resistance in fecal enterococci in hospitalized patients. Indian J Pathol Microbiol. 2010;53(4):898-899.

26. Nasaj M, Mousavi SM, Hosseini SM, Arabestani MR. Prevalence of Virulence Factors and Vancomycin-resistant Genes among Enterococcus faecalis and E. faecium Isolated from Clinical Specimens. Iran J Public Health. 2016;45(6):806-813.

27. Padmasini E, Padmaraj R, Ramesh SS. High level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistant genes among clinical isolates of Enterococcus species in Chennai, India. ScientificWorldJournal. 2014;2014:329157.

28. Sanchez-Diaz AM, Cuartero C, Rodriguez JD, Lozano S, Alonso JM, Rodriguez-Dominguez M, et al. The rise of ampicillin-resistant Enterococcus faecium high-risk clones as a frequent intestinal colonizer in oncohaematological neutropenic patients on levofloxacin prophylaxis: a risk for bacteraemia? Clin Microbiol Infect. 2016;22(1):59 e51-58.

29. Abamecha A, Wondafrash B, Abdissa A. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia. BMC Res Notes. 2015;8:213.