

بررسی وجود ژن $aac(6')-le-aph(2'')-la$ در سویه های انتروکوکوس فکالیس و

انتروکوکوس فیسوم چند مقاومتی و مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین

مهنار سیفی^۱، محمد رضا پورشفیغ^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: انتروکوکها 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. انتروکوکها می توانند برخی ژنهای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را بصورت اکتسابی بدست آورند. محصول این ژنها آنزیمهایی هستند که باعث تغییر در ساختار آمینوگلیکوزیدها شده و در نهایت این امر منجر به حذف اثر سینرژیسیم 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 انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسوم 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: بدنال کشت اولیه ۴۳۷ نمونه بالینی ارجاع شده به ۵ بیمارستان و ۳ آزمایشگاه خصوصی در شهر تهران، جمعا ۳۰۰ سویه انتروکوک 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 پرستین - دالفو پرستین (سینرسید)، لینه زولید، تیکوپلانتین و نیتروفورانتوئین انجام شد. مکانیزم مولکولی مقاومت به جنتامایسین 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 فیسوم به ترتیب ۸۱/۳٪ و ۱۸/۷٪ بود. گونه های فیسوم مقاومت نسبتا بالاتری به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در مقایسه با گونه های فکالیس نشان دادند. درصد سویه های چند مقاومتی در گونه فکالیس ۵۰٪ و در گونه فیسوم ۹۵٪ بدست آمد. این ارقام در خصوص سویه های مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین به ترتیب ۱۹/۵ و ۲۳/۵ درصد بودند و کلیه این سویه ها دارای MIC بالاتر از ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر بودند. ۸۳ درصد از سویه های فکالیس و ۱۰۰ درصد از سویه های فیسوم 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 انتروکوکی مورد مطالعه و همچنین شیوع بالای ژن $aac(6')-le-aph(2'')-la$ در بین سویه های 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 و یا آنتی بیوتیکهای جدید را می طلبد.

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

مقدمه:

اسکولین، رشد بر روی محیط نمک ۶/۵٪ و تخمیر قندها با استفاده از استانداردهای بین المللی بود.

تست سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی: با استفاده از جداول CLSI و برای ۱۱ آنتی بیوتیک آمپی سیلین، تتراسیکلین، اریترومیسین، سیپروفلوکسازین، جنتامایسین دوز بالا، ونکومایسین، کوتریموکسازول، کوئینو پرستین - دالفو پرستین (سینرسید)، لینه زولید، تیکوپلانتین و نیتروفورانتوئین و بر روی محیط مولر هیتتون 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')-Ie-aph(2'')-Ia* 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 میشود. 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 و با شیکر بخوبی مخلوط نموده، ۱۰ دقیقه روی یخ قرار میدهم. پس از آن ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm 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')-Ie-aph(2'')-Ia، ش_____امل و CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC

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 میکرولیتر انجام میشود و ترکیب آن شامل ۲/۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۰/۴ میلی مول از dNTP، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۲ واحد از آنزیم Taq polymerase بود. سویه استاندارد JH2-102/

انتروکوکها جزء پاتوژنهای بسیار مهم در عفونتهای 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 ۵-۱۰ درصد از عفونت های انتروککی هستند (۱). مشخص شده انتروکوکها 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 (۲ و ۳). انتروکوکها 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 میباشد (۴). متأسفانه این اثر سینرژسم وقتی انتروکوکها مقاومت به مقادیر بالای جنتامایسین $MIC > 512$ 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 انتروکوکها ژن *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* 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')-Ie-aph(2'')-Ia* 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: از ۴۳۷ 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، آبرسه، لاواژ ریه و مایع مفصل بودند.

جداسازی سویه ها با استفاده از محیط کشت بلاد آگار و تشخیص فنوتیپی آنها با بکارگیری تستهای کاتالاز، PYR، هیدرولیزبایل

(۱۲۴ مورد) و ۱۹/۵٪ (۴۸ مورد) و در مورد گونه های فسیوم 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 پرستین - دالفویزیستین (سینرسید) نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های فسیوم بالاتر از موارد مشابه در گونه فکالیس است. در گونه فکالیس مقاومت بین ۶۰-۱۹/۵ درصد به ترتیب نسبت به جتتامایسین، سیپروفلوکسازین، کوتریموکسازول، اریترومایسین و تتراسیکلین وجود داشت. درحالیکه در گونه فسیوم مقاومت بین ۲۳/۵-۱۳/۵ درصد به ترتیب نسبت به کوتریموکسازول، آمپی سیلین، سیپروفلوکسازین، اریترومایسین، ونکومایسین و جتتامایسین بود. مقاومت نسبت به دو داروی جدید سینرسید و لینه زولید در گونه فکالیس به ترتیب ۱۰۰ و ۲/۵ درصد و در گونه فسیوم به ترتیب ۱ و ۰ درصد بود. (جدول ۳)
در آزمایش PCR برای تشخیص ژن -aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia، از کل سویه های HLGR در گونه فکالیس ۸۳٪ و در گونه فسیوم ۱۰۰٪ این ژن را داشتند.

p1P800+p1P802 نیز بعنوان کنترل مثبت در این واکنشها استفاده میشد. سیکل واکنش زنجیره پلیمرز، از دنا تورا سیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه شروع شده و به 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 می گرفت. و ژل آگاز با اتیدیدوم بروماید رنگ آمیزی شده و قطعات DNA با استفاده از نور UV رویت می شدند.

یافته ها:

از کل نمونه های بالینی مورد مطالعه، ادرار در صد غالب و پس از آن زخم و خون و سایر نمونه ها درصد های پایین تری را به خود اختصاص دادند. (جدول ۱).
از بین سویه های جدا شده ۸۱/۳٪ (۲۴۷ مورد) به گونه فکالیس و ۱۸/۷٪ (۵۳ مورد) به گونه فسیوم اختصاص داشت. درصد سویه های MDR و HLGR در خصوص گونه فکالیس به ترتیب ۵۰٪

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)
ایسه	۱ (۰/۳)
لاواژ ریه	۱ (۰/۳)
مایع مفصل	۱ (۰/۳)

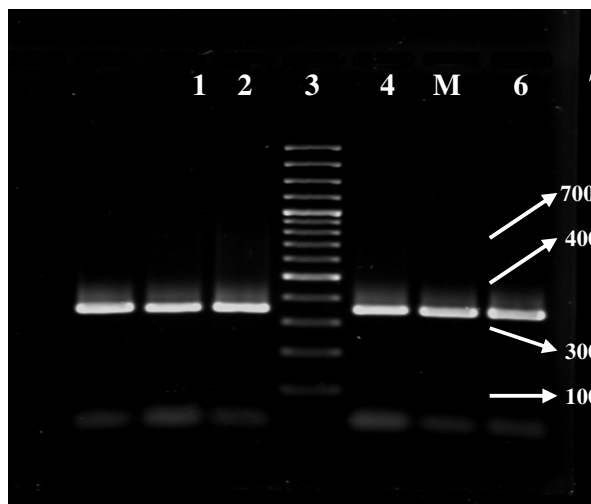
جدول ۲- درصد مقاومت به انواع آنتی بیوتیکها در دو گونه

نوع آنتی بیوتیک (میکروگرم)	انتروکوکوس فکالیس (%)	انتروکوکوس فسیوم (%)
آمپی سیلین ۱۰	۱/۳	۱۵
تتراسیکلین ۳۰	۶۰	۹/۵
اریترومایسین ۱۵	۳۶/۵	۱۶/۵
سیپروفلوکسازین ۵	۲۴/۵	۱۶
جتتامایسین ۱۲۰	۱۹/۵	۲۳/۵
ونکومایسین ۳۰	۷/۵	۲۱/۵
کوتریموکسازول ۱/۲۵ - ۲۳/۷۵	۳۰/۵	۱۳/۵
سینرسید ۱۵	۱۰۰	۱
لینه زولید ۳۰	۲/۵	صفر
تیکوپلانین ۳۰	۵/۵	۱۴
نیتروفورانتونین ۳۰۰	۰/۵	۲

جدول ۳ - درصد سویه های MDR و HLGR در بین دو گونه انتروکوکي

گروه	انتروکوکوس فکالیس (%)	انتروکوکوس فیسیوم (%)
کل	۲۴۷ (۸۱/۳)	۵۳ (۱۸/۷)
چند مقاومتی 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')-Ie-aph(2'')-Ia*



بحث:

برای سیستم مراقبت بهداشتی هر جامعه بسیار لازم و ضروری 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 انتروکوکي بشمار می رفتند ولی از زمانیکه سویه های مقاوم به هر کدام از این داروها شیوع بالایی پیدا کرده اند اثر سینرژسم 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 ادارار و ۲۰/۷٪ از سایر موارد مثل خون و کاتتر و... جدا شده بودند و اکثریت سویه ها با گونه فکالیس با ۹۲/۸٪ بود. در این مطالعه سویه های مقاوم به جنتامایسین با دوز بالا ۲۲/۸٪ بودند (۱۰).

محققین امریکایی در سال ۲۰۰۳ از ۳۶۰ سویه انتروکوک ۲۵۹ مورد HLGR گزارش کردند که MIC آنها بین ۱۰۲۴-۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. ۷۵ درصد از گونه های فکالیس و ۶۳ درصد از گونه های فسیوم دارای ژن *aac(6')-le-aph(2'')-la* بودند (۱۱). در بررسی ما این ژن در ۱۰۰ درصد از سویه های فسیوم 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 راهها و فرکانس این انتقال نیز بسیار مهم است.

در تحقیقی در ایتالیا از ۹۱ سویه انتروکوک کلینیکی ۴۳٪ از فکالیس ها و ۵۲٪ از فسیوم ها HLGR بودند (۱۲) و در موردی مشابه در کویت از ۱۱۷ سویه انتروکوک ۱۰۹ سویه فکالیس و ۷ سویه فسیوم و بقیه شامل گونه های دیگر بودند. در این میان ۵۵ سویه HLGR مشاهده شد که همگی MIC بالای ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر داشتند (۱۲).

در مطالعه Zarrilli در سال ۲۰۰۳ هیچ انتروکوکوس فسیوم مقاوم به آمپی سیلین گزارش نشد و این در حالی بود که ۲۲ درصد از گونه فکالیس HLGR بودند که به گفته این محقق این رقم در مطالعات مختلف بین ۱۴-۴۱ درصد (۱۲) و به گفته محقق دیگری بین ۱-۴۸ درصد (۱۳) نوسان دارد. مقاومت به سیپروفلوکسازین و 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 مقاومت 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 فسیوم ها مقاوم به آمپی سیلین بودند که کاملا متفاوت است. در ایتالیا ۱۷ درصد از سویه های فکالیس مقاوم به آمپی سیلین گزارش شدند (۹).

در سالهای ۱۹۸۵-۱۹۸۶ مقاومت به سیپروفلوکسازین در سویه های انتروکوک بسیار محدود و حدود ۱/۴٪ از آنها HLGR بودند ولی

فهرست مراجع:

این رقم در سالهای ۱۹۸۹-۱۹۹۰ افزایش یافته و به ۱۵/۲٪ رسید و این بار دیگر اغلب این سویه ها HLGR گزارش شدند. مقاومت در بین سویه های فکالیس جدا شده در این مطالعه نسبت به سیپروفلوکسازین ۲۴/۵٪ و در سویه های فسیوم ۱۶٪ بود که سیر افزایشی موجود در مطالعه schaberg را نشان می دهد (۱۴).

در طی مطالعه ای در ایتالیا در بین سویه های مقاوم و حساس به ونکومایس مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها مقایسه شده است. براین اساس در سویه های فسیوم مقاوم به ونکومایسین درصد مقاومت به آمپی سیلین و جنتامایسین و سیپروفلوکسازین تتراسیکلین و اریترومایسین و کوتریموکسازول به ترتیب ۸۱٪، ۴۰٪، ۸۱٪، ۸۷٪، ۸۷٪ و ۶۷٪ درصد و در سویه های فسیوم حساس به ونکومایسین به ترتیب ۷۱٪، ۱۴٪، ۷۱٪، ۷۱٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ درصد بوده است که در مورد گونه فکالیس این درصدها همه بسیار پایبتر بوده است. در این میان سویه های چند مقاومتی و مقاوم به ۴ آنتی بیوتیک یا بیش از آن حدود ۹۰ درصد بودند (۱۵). در مطالعه ما سویه های فکالیس ۷/۵٪ و سویه های فسیوم ۲۱/۵٪ نسبت به ونکومایسین مقاومت داشتند و تعداد چند مقاومتی ها در بین فسیومها بیشتر بود. همچنین درصد مقاومت به سایر آنتی بیوتیکها نیز در بین گونه فسیوم ارقام بالاتری را نشان می دهد.

در مطالعه دیگری در یونان در طی یکسال از ۵۵ گونه فکالیس و ۲۱ گونه فسیوم که اکثرا از ادار جدا شده بودند هیچ سویه ای مقاوم به ونکومایسین گزارش نشد ولی ۲۲ سویه از فکالیس ها HLGR بود و ژن *aac(6')-le-aph(2'')-la* در ۱۰ سویه از فکالیس ها مشاهده شد (۱۶).

با افزایش تعدد و شیوع ژنهای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و بخصوص جنتامایسین در بین ایزوله های کلینیکی امروزه استفاده از این داروها در درمان عفونتهای انتروکوک محدود شده است و نقش داروهایی مثل سینرسید و لینه زولید و آمینو گلیکوزیدهای جدید که خوشبختانه در مطالعات مختلف هنوز مقاومت چندانی به آنها گزارش نشده است و بسیار مطرح است (۱۷ و ۱۸).

1 – Simonsen G.S., Smabrekke L., Monnet D.L., Sorensen T.L., Moller J.K., et al. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin, and vancomycin in enterococcus faecalis and enterococcus 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., Leclerc 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. Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*.

Antimicrob. Agents Chemother. 2006.50(!!): 3615-21.

4- Lefort A., Arthur M., Garry L., Carbon C., Courvalin P., Fantin B. Bactericidal activity of gentamicin against *Enterococcus faecalis* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. 44(8):2077-80

5- Vakulenko S.B., Donabedin S.M., Voskresenskiy A.M., Zervos M.J., Lerner S.A., Chow J.W. Multiplex 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* isolates 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-Almeida R., Rollo Filho M., Silveria C.A.N., Rodrigues I.P., Eudes Filho J., et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Enterococci* recovered from Brazilian 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., et al. 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., Crispino 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. Chemother.* 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 *Enterococci* 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 P.T., 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. Aminoglycoside resistance in *Enterococci*. *Clin. Infec. Dis.* 2000.31.586-9.

18- 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): 2542-4