

تعیین حساسیت ضد میکروبی و تشخیص ژنهای مقاومت به ونکومايسين در انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين جدا شده از فاضلاب

علی احمدی^۱، محمد مهدی سلطان دلال^۱، محمدرضا پورشفیعی^{۲*}

(۱) بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

(۲) بخش میکروبيشناسی، انستیتو پاستور (ایران)

تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۲

تاریخ پذیرش: ۸۵/۷/۱۰

چکیده

مقدمه: افزایش شیوع انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين (VRE) در محیط های بهداشتی و غیر بهداشتی از جمله فاضلاب های شهری به یکی از مسائل مهم در حوزه بهداشت و درمان تبدیل شده است. در این مطالعه پس از جداسازی انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين از فاضلاب و تعیین الگوی مقاومت ضد میکروبی، با استفاده از روش PCR وجود ژنهای *vanA*، *vanB*، *vanC1* و *vanC2/3* در سویه ها بررسی شد.

مواد و روش ها: پس از نمونه برداری از فاضلاب و فیلتراسیون نمونه ها، ممبران های حاصله بر روی محیط های اختصاصی و حاوی آنتی بیوتیک قرار گرفته و انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين خالص سازی گردید. سپس تست های بیوشیمیایی، آنتی بیوگرام و MIC سویه ها در مورد ونکومايسين و چندین آنتی بیوتیک دیگر انجام شد. در نهایت PCR جهت تشخیص ژنهای *vanA*، *vanB*، *vanC1* و *vanC2/3* انجام گرفت.

یافته های پژوهش: طبق نتایج، از بین سویه های VRE جدا شده، ۵۳ کلنی بطور تصادفی خالص سازی گردید. با انجام تست های بیوشیمیایی تمام ایزوله ها بعنوان انتروکوک فسیوم شناسایی شدند. نتایج حساسیت ضد میکروبی حاکی از وجود مقاومت چندگانه در سویه ها بود و ۹۸ درصد سویه ها دارای مقاومت سطح بالا به ونکومايسين بودند. طبق نتایج PCR، بالاترین فرکانس، مربوط به ژن *vanA* (۹۶ درصد) بود و ژن *vanB* نیز در ۱۵ درصد سویه ها وجود داشت. هیچیک از ژنهای *vanC1* و *vanC2/3* در سویه های مورد نظر یافت نشد.

نتیجه گیری: به سبب اینکه ژنهای مقاومت به ونکومايسين قابل انتقال بین باکتریها و نیز بین باکتریها و محیط بوده و مخازن محیطی می توانند در انتشار انتروکوک های با مقاومت آنتی بیوتیکی نقش داشته باشند از اینرو باید نسبت به نظارت دقیق تر بر سیستم دفع و تصفیه فاضلاب های شهری و حذف ارگانيسم های مقاوم از آن توجه بیشتری مبذول داشت. گفتنی است وضع قوانین بهداشتی در مورد استفاده محدودتر از ونکومايسين در حوزه های مختلف بهداشتی، درمانی و صنایع غذایی تاثیر بسزایی در کنترل شیوع مقاومت به این ارگانيسم خواهد داشت.

واژه های کلیدی: انتروکوک، مقاومت به ونکومايسين، فاضلاب

* نویسنده مسئول: بخش میکروبيشناسی، انستیتو پاستور ایران

مقدمه

انتروکوک ها، کوکسی های گرم مثبت تخمیری و فلور نرمال دستگاه گوارش انسان و حیوان می باشند. این باکتریها که در گذشته از لحاظ بالینی کم اهمیت تلقی می شدند بدلیل کسب مقاومت اکتسابی به چندین آنتی بیوتیک مهم بالینی مانند ونکومایسین (با شیوع ۱۲ درصد) از اوایل ۱۹۷۰ بعنوان دومین عامل شایع عفونتهای بیمارستانی از جمله اندوکاردیت، عفونتهای مانند انتروکوک، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین و کلستریدیوم دیفیسیل در نظر گرفته می شوند. مصرف بی رویه ونکومایسین در ۲ دهه گذشته منجر به ظهور سویه های مقاوم انتروکوک به گلیکوپپتیدها شده است (۳ و ۵). مهمترین ژنهای مقاومت به ونکومایسین در انتروکوک ها شامل *vanA*, *vanB*, *vanC1* و *vanC2/C3* می باشند. ژنهای *vanA* و *vanB* بعنوان مهمترین ژنهای مسئول مقاومت، بترتیب بر روی ترانسپوزونهای *Tn1546* و *Tn1547* قرار دارند که می توانند روی پلاسمید یا کروموزوم یافت شود. ژنهای *vanC1* و *vanC2/C3* کروموزومی هستند. فنوتیپ *vanA* از طریق مقاومت اکتسابی سطح بالا هم به ونکومایسین و هم تیکوپلانیل مشخص می شود. فنوتیپ *vanB* از طریق مقاومت اکتسابی سطح متوسط به ونکومایسین (و نه تیکوپلانیل) مشخص می شود. فنوتیپ *vanC* از طریق مقاومت داخلی سطح پایین به ونکومایسین و حساسیت به تیکوپلانیل مشخص می شود (۶ و ۷ و ۸). انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین از تصفیه خانه های شهری، اولین بار در سال ۱۹۹۳ در انگلستان و سپس در شهر کوچکی در آلمان در نمونه های مدفوع خوک و طیور مزرعه دیده شد (۹).

سپس مطالعات فراوانی قابلیت انتشار این سویه ها به همراه انتقال ژنهای مقاومت را در بین محیط های مختلف تایید کرد (۱۰ و ۱۷). به سبب اینکه ژنهای مقاومت به ونکومایسین قابل انتقال بین باکتریها می باشند، بنابراین مخازن محیطی می تواند در انتشار انتروکوک های مقاوم حتی به محیط های درمانی و باکتری های مهم از لحاظ پزشکی نقش داشته باشد، چنانکه انتقال ژنهای مقاومت در بین انتروکوک ها در تصفیه خانه های شهری نیز گزارش شده است (۹، ۱۸ و ۱۹). ترانسپوزونهای کنزگاتیو انتروکوک فسیوم می توانند مقاومت به ونکومایسین را به استافیلوکوک اورئوس منتقل نمایند (۹). چنانکه سویه های استاف اورئوس مقاوم به ونکومایسین با ژنوتیپ *vanA* در

ادراری، سپتی سمی و غیره شناخته شدند (۲۰). از بین انتروکوک ها دو گونه انتروکوک فکالیس و انتروکوک فسیوم با شیوع بترتیب ۸۵ و ۱۰ درصد، شایع ترین عوامل مسبب را تشکیل می دهند (۳ و ۴). آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدیونکومایسین و تیکوپلانیل آخرین راه درمان عفونتهای جدی ناشی از کوکسی های گرم مثبت امریکا گزارش شده است (۲۰، ۲۱ و ۲۲). بنابراین بروز این نوع مقاومت در انتروکوک ها مشکلات عمده ای در بروز عفونتهای بیمارستانی ناشی از این ارگانیسم ها و نیز تشفیص و درمان آنها را سبب گردیده است.

روش PCR جهت شناسایی ژنهای مقاومت به ونکومایسین و تعیین پراکندگی این دسته از ژنها در انتروکوک های مقاوم کاربرد فراوانی داشته است (۱۱، ۱۲ و ۱۳). در این مطالعه پس از جداسازی انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین از فاضلاب و تعیین الگوی مقاومت ضد میکروبی، با استفاده از روش PCR وجود مهمترین ژنهای مقاومت به ونکومایسین در این سویه ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری:

نمونه برداری در ماههای آذر و بهمن سال ۱۳۸۳ انجام شد. جهت انجام نمونه گیری از تصفیه خانه شهرک اکباتان استفاده شد. منابع نمونه برداری در هر تصفیه خانه شامل ورودی حوضچه هوادهی، لجن و خروجی حوضچه هوادهی بود. پس از نمونه گیری، نمونه های فاضلاب به سرعت به آزمایشگاه میکروشناسی انستیتو پاستور ایران منتقل شد.

جداسازی باکتری:

ابتدا رقت های ۱/۱۰ از نمونه های مورد نظر تهیه شد و سپس با استفاده از ممبران های میلی پور ۰.۴۵μm (Millipore Cooperation) فیلتر شدند. سپس فیلتر را برداشته و به آرامی بر روی پلیت محیط کشت Brain Heart Infusion (DIFCO, USA) آگار منتقل نموده و به مدت ۲ ساعت در ۳۷°C گرماگذاری شد. سپس مجدداً فیلترها بر روی محیط M Enterococcus agar (DIFCO, USA) (ME agar) حاوی ۸ μg/ml

تنها با کلروفرم شستشو شده و پس از سانتریفوژ مایع رویی برداشته شد (۱۶).

PCR:

در نهایت با استفاده از روش PCR و پرایمرهای اختصاصی، وجود ژنهای مقاومت به ونکومایسین شامل *vanA*, *vanB*, *vanC1*, و *vanC2/3* در سویه‌ها بررسی شد. سویه‌های استاندارد و کنترل مثبت شامل انتروکوک فکیس ATCC 51299 برای *vanA*، انتروکوک فسیوم ATCC V583 برای *vanB* و انتروکوک گالیناروم ATCC BM4174 برای *vanC* بودند. سکانس پرایمرهای مورد استفاده (۱۲) در مورد ژنهای مقاومت به ونکومایسین بترتیب عبارتند از: ژن *vanA* شامل Forward - CAT GAA TAG AAT AAT A Reverse- CCC و AAA AGT TGC AAT A در CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA شامل *vanB* مورد Forward-GTC ACA AAC CGG AGG CGA Reverse- CCG CCA TCC TCC TGC و GGA Forward شامل *vanC1* و در مورد AAA AAA Reverse- -GGTATCAAGGAAACCTC- *vanC2/C3* و در مورد CTTCCGCCATCATAGCT شامل Forward- CGCAGGGACGGTGATTTT Reverse-CGGGGAAGATGGCAGTAT می‌باشد. در مورد هر پرایمر واکنش PCR مربوطه بصورت جداگانه انجام گرفت. سپس الکتروفورز محصولات تکثیر یافته در هر PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ انجام شده و پس از رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌های پژوهش

نتایج حاصل از نمونه برداری:

در این مطالعه از تصفیه خانه شهرک اکباتان در تهران در مجموع سه بار نمونه برداری شد. با انجام فیلتراسیون نمونه‌های فاضلاب، از بین تقریباً ۳۰۰ کلنی مشاهده شده بر روی محیط‌های اختصاصی، در نهایت ۵۳ کلنی بطور تصادفی جدا و خالص سازی گردید. پس از انجام تستهای بیوشیمیایی تمام ایزوله‌ها بعنوان انتروکوک فسیوم شناسایی شدند.

ونکومایسین قرار گرفتند و بمدت ۴۸ ساعت در 42°C گرماگذاری شدند. سپس فیلترها بر روی پلیت‌های بایل اسکولین-آگار (DIFCO, USA) بمدت ۲ ساعت در 45°C گرماگذاری شدند. پس از این مدت از روی فیلترها، کلنی‌های سیاه، بر روی بلاد آگار خالص سازی شدند (۲).

تعیین هویت بیوشیمیایی:

پس از خالص سازی کلنی‌ها، تعیین هویت سویه‌ها از طریق تست‌های بیوشیمیایی مانند رشد در حضور نمک amide، pyrrolidonyl-B-naphty، ۶/۵ درصد (PYR)، رشد در 45°C و غیره انجام گرفت (۱۴).

تعیین حساسیت ضد میکروبی:

تعیین حساسیت ضد میکروبی سویه‌ها انتشار دیسک با آنتی بیوتیک‌های Vancomycin (30 μg), Streptomycin (10 μg), Chloramphenicol (30 μg), Gentamicin (120 μg), Amikacin (30 μg), Ampicillin (10 μg), Ciprofloxacin (5 μg), Tetracycline (30 μg), Erythromycin (15 μg) (BBL, Sensi Disc, USA) و نیز MIC به روش Macrodilution و نیز E-test (AB Bio Disk, Sweden) در مورد ونکومایسین و تیکوپلانتین بر طبق استانداردهای CLSI انجام شد (۱۵).

استخراج DNA:

برای استخراج محتوای کل DNA از روش استخراج موتانولیزین استفاده شد. بطور خلاصه، ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI برات به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به رسوب حاصله ۱ میلی لیتر از بافر لیز با فرمول زیر اضافه شد:

(1mM NaCl, 10 mM Tris HCL, 5mM EDTA, 0.5 % Triton X-100)

سپس به محلول حاصله، بترتیب لیزوزیم (۱۰mg/ml)، موتانولیزین ۵۰ واحد، پروتئیناز K (۲۰mg/ml) و سارکوزیل (۲۰٪)، و سپس SDS (۲۵٪) افزوده و در هر مرحله یک ساعت در 37°C درجه سانتیگراد قرار داده شد. در نهایت محلول حاصل ابتدا با فنل و کلروفرم-ایزوپروپانول و سپس

نتایج حاصل از تعیین حساسیت ضد میکروبی:

نتایج MIC به روش Macrodilution و همچنین E-test نشان داد ۹۸ درصد سویه ها دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین بودند ($MIC \geq 256$) و تنها یک سویه دارای $MIC \leq 4$ بود. نتایج آنتی بیوگرام در مورد ۹ آنتی بیوتیک (جدول ۱) حاکی از آمار بالای مقاومت چندگانه در سویه های مورد نظر می باشد. در واقع بجز در مورد دو آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۲۱٪) و تتراسایکلین (۱۵٪) که مقاومت بطور قابل توجهی پایین تر از بقیه آنتی بیوتیک ها بود، ۹۴ درصد از سویه های مورد نظر به تمام آنتی بیوتیک های مورد استفاده مقاومت داشتند.

نتایج حاصل از PCR:

طبق نتایج PCR، بالاترین فرکانس مربوط به ژن *vanA* بوده (تصویر ۱) و ژن *vanB* نیز در مرتبه دوم قرار داشت (تصویر ۲). در مورد دو سویه فاقد *vanA*، هر دو دارای *vanB* بوده و با انجام E-test در مورد تیکوپالانین هر دو دارای $MIC \leq 8$ بودند که با فنوتیپ *vanB* همخوانی داشت. نتایج حاصل از توزیع فرکانس ژنی سویه های مورد آزمایش در جدول شماره ۲ ارائه شده است. در نهایت جدول ۳ نیز پراکندگی ژنهای مقاومت را بر حسب محل نمونه برداری نشان می دهد.

جدول ۱. نتایج آنتی بیوگرام در سویه های مقاوم

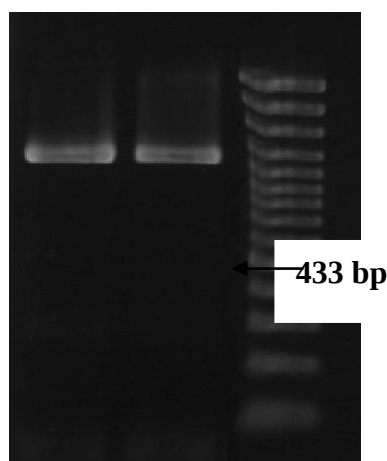
مواد ضد میکروبی	درصد مقاومت
Vancomycin	۱۰۰
Streptomycin	۱۰۰
Erythromycin	۹۸
Amikacin	۹۸
Ampicillin	۹۸
Gentamicin	۹۴
Ciprofloxacin	۹۴
Chloramphenicol	۲۱
Tetracycline	۱۵

جدول ۲. نتایج PCR ژنهای مقاومت به ونکومایسین در سویه ها

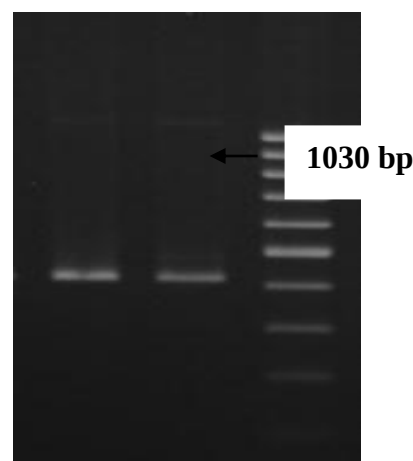
نتایج آن ها	تعداد یا درصد مثبت	تعداد یا درصد منفی
VanA	۵۱ (۹۶)	۲ (۴)
VanB	۸ (۱۵)	۴۵ (۸۵)
VanC1	۰ (۰)	۵۳ (۱۰۰)
VanC2/3	۰ (۰)	۵۳ (۱۰۰)

جدول ۳- پراکندگی ژنهای مقاومت بر حسب محل نمونه برداری

	تعداد ایزوله ها با <i>vanA</i>	تعداد ایزوله ها با <i>vanB</i>
Incoming	۱۳	۲
Sludge	۱۸	۳
Outgoing	۲۰	۳
Total	۵۱	۸



شکل ۲. محصول PCR مربوط به ژن *vanB*.



شکل ۱. محصول PCR مربوط به ژن *vanA*.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه به علت استفاده از روش کاملاً انتخابی به نفع جداسازی انتروکوک های دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین می توان به سرعت و مستقیماً برای جداسازی چنین سویه هایی از سیستم فاضلاب شهری و انجام بررسی های فنوتیپی و ژنوتیپی بر روی آنها اقدام کرد. تمام سویه های جدا شده انتروکوک فسیوم بودند که در چندین مطالعه مشابه نیز آمار انتروکوک فسیوم بر سایر گونه های جدا شده غلبه داشت (۱۰ و ۲۳). از لحاظ مقاومت چند گانه، آمار مقاومت در مورد آنتی بیوتیک های مختلف بالا بود اما مقاومت به دو آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و تتراسایکلین پایین تر از آنتی بیوتیک هایی همچون آمپی سیلین و جنتامایسین است (۲۴ و ۲۵). مهمترین دلیل این امر پایین تر بودن میزان کاربرد بالینی این دو آنتی بیوتیک می باشد که این امر باعث می شود پلاسمید های مقاومت مربوط به این دو آنتی بیوتیک در سویه های فاضلاب شهری پایینتر از بقیه آنتی بیوتیک ها باشد. در این مطالعه دو مورد از سویه ها، فاقد *vanA* و در عوض دارای ژنوتیپ *vanB* بودند. با انجام MIC تیکوپلاندین به روش E-test در مورد این دو سویه و حساس بودن هر دو ($MIC \leq 8$)، فنوتیپ *vanB* برای دو سویه کاملاً تأیید گردید. چرا که مطابق اطلاعات موجود، دامنه MIC مربوط به ژن *vanB* می تواند بین ۲۵۶-۴ متغیر باشد. ژن *vanB* آمار پایین تری نسبت به *vanA* داشته و دومین عامل انتشار فنوتیپ مقاومت بشمار می رود (۱۰). از آنجا که تمام سویه های جدا شده انتروکوک فسیوم بوده و

ژنهای *vanC1* و *vanC2/3* نیز عامل مقاومت ذاتی در انتروکوک های گالیناروم و کاسلیفلاووس هستند (۱۰)، یافت نشدن ژنهای فوق در سویه های مورد نظر غیر عادی نیست. مطالعه مشابهی توسط Novais و همکاران در سال ۲۰۰۵ در کشور پرتغال انجام شد (۲۶). در این مطالعه ۳۱ نمونه فاضلاب شهری بیمارستانی و رودخانه ای جداسازی شد. در بین این ۳۱ سویه، ۲۵ سویه انتروکوک فسیوم بودند. با انجام PCR، در ۲۷ سویه، ژن *vanA*، و در ۴ سویه *vanB* و در یک سویه *vanC* یافت شد.

در مطالعه مشابه دیگری که توسط Iversen در سال ۲۰۰۲ در سوئد انجام شد (۲۷) نمونه های فاضلاب تصفیه خانه های شهری مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از محیط های اختصاصی M Enterococcus agar حاوی ۸ میکروگرم در میلی لیتر ونکومایسین، انتروکوک های مقاوم به ونکومایسین جداسازی شد. در نهایت از بین نمونه های فاضلاب مورد استفاده، ۳۵ ایزوله VRE جداسازی شد. پس از تعیین هویت بیوشیمیایی در این ۳۵ ایزوله، ۲۴ ایزوله (۶۹ درصد) انتروکوک فسیوم بودند و اکثر سویه های مورد نظر دارای مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه بودند. پس از انجام PCR، ۳۰ ایزوله دارای ژن *vanA* و ۵ ایزوله دارای ژن *vanB* بودند. مقایسه این مطالعات و سایر پژوهش ها با مطالعه اخیر نشان می دهد استفاده از روش فیلتراسیون غشایی و محیط M Enterococcus agar حاوی ۸ میکروگرم در میلی لیتر ونکومایسین برای

جداسازی انتروکوک های دارای مقاومت سطح بالا به ونکومايسين از نمونه های فاضلاب، یک روش استاندارد و با راندمان بالا بشمار می رود. از سویی دیگر نشان می دهد که انتروکوک فسیوم همواره مقاومترین گونه انتروکوک به آنتی بیوتیک های مختلف بوده و بروز سویه های با مقاومت های آنتی بیوتیکی، آمار بسیار بالاتری نسبت به بقیه گونه ها دارد. البته بعلاوه فراوانتر بودن در محیط و نیز دارا بودن فاکتورهای ویروالانس بسیار بیشتر، انتروکوک فکاليس بیشترین شیوع از لحاظ بالینی را بخود اختصاص می دهد. در مورد فرکانس ژنهای مقاومت به ونکومايسين، در این دو مطالعه و نیز تمام پژوهش های دیگر، ژن *vanA* بالاترین آمار را بخود اختصاص می دهد که علت آن قابلیت بالای انتقال ترانسپوزون مربوطه می باشد. بدنبال ژن *vanA*، ژن *vanB* نیز دومین ژن مهم در

انتقال مقاومت قلمداد می شود. این مطالعه هر چند اپیدمی دقیق انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين در فاضلاب را به دست نمی دهد، اما مسلماً وجود این باکتریهای دارای مقاومت چندگانه را در سیستم فاضلاب های شهری تهران تایید کرده و با در نظر گرفتن امکان انتقال ژنهای مقاومت به سایر باکتریها و محیط ها، توجه مسئولان امر را نسبت به برنامه ریزی و نظارت دقیقتر بر سیستم دفع و تصفیه فاضلاب های شهری، حذف ارگانيسم های مقاوم از طریق جلوگیری از تجویز بی رویه در درمان و نیز ممنوعیت از استفاده از این آنتی بیوتیک بعنوان مکمل های غذایی و کشاورزی و همچنین جلوگیری از آلودگی تصفیه فاضلاب های شهری با فاضلاب های بیمارستانی در سطح شهر ها جلب می نماید.

REFERENCES

1. Kavindra VS, Weinstock GM, Murray BE. An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46: 1845–1850.
2. Kennethe GV, Gedris CA, Rodnery KM, et al. Selective isolation of vancomycin-resistant *Enterococci*. *J Clin Microbiol* 1996, 38: 924–927.
3. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin resistance *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev* 2000, 13: 686–707.
4. Harwood VJ. Vancomycin-resistance *enterococci spp.* isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *App Env Microbiol*. 2001, 67: 4930–4933.
5. Saeed AK, Mohamed SN, Ashraf AK, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus spp.* from poultry and dairy farms: Detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular Cellular Probes* 2005, 19: 27–34.
6. Maria DA, Citron DM, Kwok R. Evaluation of the velogene genomic assay for detection of *vanA* and *vanB* genes in vancomycin-resistant *Enterococcus* Species. *J Clin Microbiol* 2004, 42: 1751–1752.
7. Mendez-Alvarez S, Perez-Hernandez X, Claverie-Martin F. Glycopeptide resistance in *Enterococci*. *Microbiol* 2000, 7252: 71–80.
8. Murray B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New Eng J Med* 2000, 32:557–567.
9. Lukasova J, Sustackova A. Enterococci and Antibiotic resistance. *Acta Vet Brno* 2003, 72: 315–323.
10. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol*, 2003, 88: 269–290.
11. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P et al. Detection of the *vanA* alphabet and identification of *enterococci* and *staphylococci* at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004, 28: 5857–5860.

12. Kariyama R, Mitsuhta R, Chow JW, et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant *Enterococci*. J Clin Microbiol 2000, 38: 3092-3095.
13. Patel R, Uhl JR, Kohner P, et al. Multiplex PCR detection for *vanA*, *vanB*, *vanC1* and *vanC2/3* genes in enterococci. J Clin Microbiol 1997, 36:703-707.
14. Facklam RR, Collins MD. Identification of *enterococcus* species isolated from human infection by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989, 27: 731-734
15. CLSI guidelines, 2006.
16. Regnault B. Universal ribotyping methods using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture. Res Microbiol 1997, 148: 649-659.
17. Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, et al. Prevalence of vancomycin-resistant *enterococci* in fecal samples from hospitalized patients and non hospitalized controls in a cattle-rearing area of france. J Clin Microbiol 2000, 38: 620-624.
18. Jayaratne P, Rutherford C. Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant *Enterococci* in nosocomial surveillance specimens by PCR. J. Clin. Microbiol., 1999, 37: 2090-2092.
19. Noble WC, Virani A, Cree R, et al. Cotransfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1992 195-198.
20. Klopp S. Resistance to vancomycin in US chicken feed. Lancet 1999, 353:1190-1195.
21. Schwalbe RS, McIntosh AC, Qaiyumi S, et al. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococci* from animal feed in USA. Lancet 1999, 353: 722-728.
22. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, et al. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother 2004, 48: 275-280.
23. Huycke MM, Sham DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant *enterococci*: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerge Infect Dis 2002, 4: 239-249.
24. Hayes, English LL, Carter PJ, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcus species isolates from retail meats. Appl Env Microbiol 2003, 71:7153-7160.
25. Panesso D, Ospina S, Robledo J, et al. First characterization of a cluster of *vanA*-type glycopeptide-resistant *enterococcus faecium*. Colombia Emerge Infect Dis 2002; 8: 961-965
26. Novais C, Coque T, Ferreira H, et al. Environmental contamination with vancomycin-resistant *enterococci* from hospital sewage in portugal. App Env Microbiol 2005, 71:3364-3368.
27. Versen A, Kuhn I, Franklin A, et al. High prevalence of vancomycin-resistant *enterococci* in Swedish sewage. Appl Env Microbiol 2002, 68: 2838-2842 .