

## جداسازی انتروکوک های مقاوم به ونکومايسين از فاضلاب بیمارستانی در تهران. 1395

فاتح رحیمی<sup>1\*</sup>، مینا ترابی<sup>2</sup>، ناهید براهویی<sup>3</sup>

1-دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

2-کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

3-کارشناس میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

\*نشانی برای مکاتبه: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، بخش میکروبیولوژی، f.rahimi@sci.ui.ac.ir

پذیرش برای چاپ: شهریور نود و هفت

دریافت مقاله: تیر نود و هفت

### چکیده

**سابقه و هدف:** اعضای جنس انتروکوکوس به عنوان باکتریهای بیماری زای مرتبط با عفونتهای بالینی از قبیل، باکتری می، اندروکاردیت عفونی، عفونتهای حفره شکمی، عفونتهای دستگاه ادراری و در موارد نادر عفونتهای سیستم عصبی مرکزی شناخته می شوند. این مطالعه با هدف جداسازی سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومايسين از فاضلاب بیمارستانی در شهر تهران به انجام رسیده است. **روش کار:** در طی سال 1395 نمونه گیری از فاضلاب خروجی یک بیمارستان در شهر تهران انجام گرفت. از نمونه مورد نظر سریال رقت تهیه گردید و نمونه ها فیلتر شدند و بر روی محیط اختصاصی *m-Enterococcus agar* واجد ونکومايسين در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. کلنیهای حاصل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند و مقاومت سویه ها نسبت به ونکومايسين و تیکوپلانین تعیین گردید. همچنین حضور 9 ژن مقاومت به ونکومايسين نیز با آزمون PCR مشخص شد.

**یافته ها:** در مجموع 92 جدایه انتروکوکوس مقاوم به ونکومايسين شامل انتروکوکوس فسیوم (80 درصد)، انتروکوکوس فکالیس (17 درصد) و انتروکوکوس گالیناروم (3 درصد) بر روی محیط اختصاصی جمع آوری شدند. تمامی سویه ها نسبت به دیسکهای ونکومايسين و تیکوپلانین مقاومت نشان دادند و محدوده حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنتی بیوتیک ونکومايسين 128-2048 میکروگرم/میلی لیتر بود که بیشترین تعداد سویه ها (82 درصد) نسبت به بالاترین غلظت مقاومت نشان دادند. سه ژن *vanB* *vanA* و *vanC* در میان سویه ها شناسایی شدند که ژن *vanA* در 100 درصد سویه های مقاوم به ونکومايسين حاضر بود. همچنین، حضور ژن *vanC* نیز تنها محدود به گونه انتروکوکوس گالیناروم بود.

**نتیجه گیری:** حضور سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومايسين و تیکوپلانین در فاضلاب خروجی بیمارستان مورد مطالعه در شهر تهران مؤید ناکارآمد بودن سیستم تصفیه فاضلاب در این بیمارستان است.

**واژگان کلیدی:** ونکومايسين، انتروکوکوس، فاضلاب بیمارستانی، تیکوپلانین.

### مقدمه

4). در میان گونه های مختلف انتروکوکوس، 2 گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم به عنوان مهمترین گونه های بیماریزای جنس انتروکوکوس شناخته می شوند و منجر به ایجاد عفونتهای مختلف انتروکوکوی در بیمارستانها و جامعه می شوند(3, 5).

ونکومايسين یک آنتی بیوتیک گلیکوپپتیدی است که به عنوان آخرین سلاح درمانی جهت درمان عفونتهای ناشی از باکتریهای گرم مثبت مقاوم به سایر آنتی بیوتیکها مانند استافیلوکوکهای مقاوم به متی سیلین و انتروکوکهای مقاوم به

انتروکوک ها به عنوان فلور همزیست دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات شناخته می شوند که مستقیماً یا از طریق فاضلاب وارد محیط شده و می توانند مدتهای مدیدی در آنجا باقی بمانند(1, 2). این باکتری ها از شایعترین عوامل ایجاد عفونتهای ادراری، اندوکاردیت و عفونتهای دستگاه تنفسی به شمار می روند و می توانند نقش مهمی در ایجاد و تداوم عفونتها در جامعه و بیمارستان ایفا نمایند؛ همچنین عفونتهای ناشی از انتروکوکوس را می توان در زمره مهمترین مشکلات و چالشهای پیش رو در بیماریهای عفونی بالینی قلمداد نمود(3).

یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت آماده سازی، از نمونه فاضلاب با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل سریال رقت تهیه گردید و سپس از سیستم فیلتراسیون میلی پور جهت فیلتراسیون نمونه های رقیق شده استفاده گردید. در هر مرتبه فیلتراسیون، 100 میلی لیتر نمونه فیلتر گردید و سپس فیلترها بر روی محیط اختصاصی *m-Enterococcus agar* (Merck, Germany) واجد 6 میکروگرم/میلی لیتر آنتی بیوتیک ونکومایسین (Sigma-Aldrich, Germany) قرار گرفتند و به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند (9). کلنی های قرمز و صورتی رنگ انتخاب شده و بر روی محیط (Merck, Germany) *BHI agar* کشت داده شدند و پس از انکوباسیون در دمای 44 درجه سانتی گراد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند (10). جهت استخراج DNA از کلنیهای باکتریایی از روش جوشاندن بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده گردید (10). برای این منظور، یک کلنی باکتری در 200 میکرولیتر آب مقطر استریل به خوبی ورتکس و حل شد و به مدت 20 دقیقه در دستگاه *Thermoblock* (Biometra, Germany) انکوبه گردید. سپس ویالها در  $13000 \times$  به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند و از سوپرناتانت به عنوان الگوی DNA جهت انجام آزمون PCR استفاده شد.

به منظور شناسایی گونه های مختلف *انتروکوکوس*، از پرایمرهای اختصاصی بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (10). همچنین، جهت تعیین ژنهای مقاومت به ونکومایسین *vanA-vanG* نیز از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (11). جهت تعیین مقاومت سویه های جداسازی شده بر روی محیط اختصاصی واجد آنتی بیوتیک نسبت به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین (30 میکروگرم) و تیکوپلانین (30 میکروگرم) از روش دیسک دیفیوژن بر اساس دستورالعملهای *Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI)* استفاده گردید (12). همچنین، به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده آنتی بیوتیک ونکومایسین با توجه به دستورالعمل *CLSI* از روش برات میکروداپلوشن استفاده گردید (13).

#### یافته ها

در طی یک مرتبه نمونه گیری از فاضلاب خروجی بیمارستان مورد نظر در مجموع 92 کلنی مشکوک به جنس *انتروکوکوس* بر روی محیط اختصاصی *m-Enterococcus agar* واجد

پنی سیلین و آمینوگلیکوزیدها مورد استفاده قرار می گیرد. تاکنون، 9 ژنوتایپ مختلف مقاومت به ونکومایسین *vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM, vanN* در میان گونه های مختلف *انتروکوکوس* شناسایی شده است که همچنان ژنوتایپهای *vanA, vanB, vanC* و *vanC* از بیشترین میزان شیوع در این جنس برخوردار می باشند (2, 6, 7). بیشتر موارد مقاومت در *انتروکوکوس* فسیوم و به میزان کمتر در سایر گونه های *انتروکوکوس* مانند *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس گالیناروم* مشاهده می شود. انتروککها دارای قابلیت کسب مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف می باشند. وجود مقاومت ذاتی انتروککها به بسیاری از آنتی بیوتیکهای معمول از جمله پنی سیلینها، سبب می شود که در زمان درمان عفونتهای سایر باکتریها و عفونتهای انتروککی، سویه های با مقاومت چندگانه در روده زیاد شده و جمعیت غالب موجود در آن منطقه را به خود اختصاص دهند. بنابراین امکان دریافت ژنهای مقاومت به مقادیر بالای آمینوگلیکوزیدها، پنی سیلین، تتراسایکلین و ونکومایسین برای آنها فراهم می گردد (8). در مواردی که میزان شیوع عفونتهای انتروککی پایین است، غربالگری جدایه های مقاوم به ونکومایسین در نمونه های روده ای به منظور بررسی میزان شیوع گونه های انتروککی رایج در جامعه و بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها، یک پروسه بسیار مشکل می باشد (2, 3). با در نظر گرفتن این مطلب که فاضلاب مجموعه ای از نمونه های مدفوعی هر یک از ساکنین آن منطقه (شهری، روستایی و بیمارستانی) در یک شبانه روز می باشد؛ بنابراین جستجو در نمونه های فاضلاب شهری و بیمارستانی به عنوان یک روش جایگزین جهت غربالگری سویه های انتروکوک می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. فاضلاب حاوی تعداد بسیار زیادی از باکتریهای با منشاء روده ای بوده و سهولت نمونه گیری باعث افزایش شانس جداسازی سویه ها با تنوع بیشتر می گردد، پس به طور گسترده ای می تواند مورد استفاده قرار گیرد (3). این مطالعه با هدف جداسازی سویه های *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب خروجی یک بیمارستان در شهر تهران در طی سال 1395 به انجام رسیده است.

#### روش کار

در طی فروردین ماه 1395، یک مرتبه نمونه گیری از فاضلاب خروجی یک بیمارستان در شهر تهران انجام گرفت. برای انجام نمونه گیری از ظروف استریل استفاده شد و نمونه ها در کنار

1024 میکروگرم/میلی لیتر، 7 سویه نسبت به غلظت 512 میکروگرم/میلی لیتر، 2 سویه نسبت به غلظت 256 میکروگرم/میلی لیتر و 1 سویه نیز نسبت به غلظت 128 میکروگرم/میلی لیتر و نکومایسین مقاومت نشان دادند. در میان سویه های *انتروکوکوس گالیناروم* نیز هر 3 سویه نسبت به غلظت 128 میکروگرم/میلی لیتر و نکومایسین مقاوم بودند. در میان هر 3 گونه *فسیوم*، *فکالیس* و *گالیناروم* شناسایی شده در این مطالعه، تنها 3 ژن مقاومت *vanA*، *vanB* و *vanC* مورد شناسایی قرار گرفتند و سویه های مقاوم به نکومایسین تنها واجد این ژنوتایپها بودند. بر این اساس مشخص گردید که ژن *vanA* در میان تمامی 92 سویه *انتروکوکوس* مقاوم به نکومایسین شناسایی گردید و شیوع ژنهای *vanB* و *vanC* نیز به ترتیب محدود به 7 سویه (8 درصد) و 3 (3 درصد) سویه بود. همچنین، تمامی سویه های *انتروکوکوس گالیناروم* واجد هر دو ژنوتایپ *vanA* و *vanC* بودند و 16 سویه *انتروکوکوس فکالیس* تنها واجد ژنوتایپ *vanA* بودند.

ونکومایسین جداسازی شدند. جهت شناسایی و تأیید هر جدایه از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شده و بر این اساس 74 جدایه (80 درصد) به عنوان *انتروکوکوس فسیوم*، 16 جدایه (17 درصد) به عنوان *انتروکوکوس فکالیس* و 3 جدایه (3 درصد) به عنوان *انتروکوکوس گالیناروم* مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمون دیسک دیفیوژن جهت تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *انتروکوکوس* جداسازی شده از محیط واجد آنتی بیوتیک نشان داد که تمامی سویه ها نسبت به نکومایسین و تیکوپلانین مقاومت بودند. همچنین، نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و نکومایسین به روش برات میکرو دایلوژن در جدول 1 نشان داده شده است. بر این اساس مشخص گردید که تمامی سویه های *انتروکوکوس فسیوم*، نسبت به غلظت 2048 میکروگرم/میلی لیتر و نکومایسین مقاوم بودند. علاوه بر این، در میان سویه های *انتروکوکوس فکالیس* نیز 2 سویه نسبت به غلظت 2048 میکروگرم/میلی لیتر، 4 سویه نسبت به غلظت

جدول 1- حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و نکومایسین در میان گونه های مختلف *انتروکوکوس*.

تعداد	غلظت آنتی بیوتیک و نکومایسین (میکروگرم/میلی لیتر)					گونه باکتریایی
	128	256	512	1024	2048	
80) 74	-	-	-	-	100) 74	<i>انتروکوکوس فسیوم</i>
درصد)					درصد)	
17) 16	6) 1	12) 5	44) 7	25) 4	12) 5	<i>انتروکوکوس فکالیس</i>
درصد)	درصد)	درصد)	درصد)	درصد)	درصد)	
3) 3	100) 3	-	-	-	-	<i>انتروکوکوس گالیناروم</i>
درصد)	درصد)					
	4) 4	2) 2	8) 7	4) 4	82) 76	تعداد
	درصد)	درصد)	درصد)	درصد)	درصد)	

## بحث

امروزه استفاده گسترده از آنتی بیوتیکها با افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی همراه شده است. آنتی بیوتیکها در درمان عفونتهای انسانی و همچنین در دامپزشکی به عنوان محرک رشد در خوراک دام مورد استفاده قرار می گیرند. در ایران نیز انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در میان باکتریهای بیماریزا، به عنوان یک چالش مهم برای جامعه پزشکی مطرح شده است. علیرغم اینکه در بسیاری از مراکز درمانی فاضلاب بیمارستانی و عفونی تحت فرآیند تصفیه قرار می گیرد و سپس وارد سیستم فاضلاب شهری می شود، اما در پاره ای از موارد این سیستم از کارآیی کافی و مناسب برخوردار نبوده و همچنین در برخی از مراکز درمانی نیز فاضلاب بیمارستانی مستقیماً و بدون انجام هرگونه فرآیند تصفیه وارد فاضلاب شهری می شود که این امر خود باعث انتشار باکتریهای بالقوه بیماریزا و مقاوم نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیکها از محیط بیمارستان به جامعه و ورود آن به سیستم فاضلاب شهری می شود. وجود هرگونه نقص در سیستم تصفیه فاضلاب شهری و بیمارستانی، سیستم انتقال فاضلاب و یا ترکیب و پوسیدگی لوله ها منجر به راه یافتن فاضلاب و میکروارگانیسمهای بیماریزا همراه آن به آبهای زیرزمینی و سطحی می شود. بر اساس شواهد موجود، از یک طرف اعتقاد به انتقال افقی انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین از محیط به انسان وجود دارد و از طرفی دیگر مشخص شده است که انواع گونه های انتروکوک می توانند توانایی تکثیر و بقا در آب و خاک را دارند که همین مقاومت در محیط، مبارزه با آنها را بسیار مشکل ساخته است. بنابراین، باید توجهات زیادی را به جلوگیری از انتقال و پخش این میکروارگانیسمها در طبیعت معطوف داشت. راه یافتن انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین که خود به عنوان مخازن بالقوه انتشار مقاومت نسبت به ونکومایسین شناخته می شوند، به فاضلاب تصفیه شده شهر تهران که در نهایت جهت آبیاری مزارع و صیفی جات مورد استفاده قرار می گیرد، می تواند امکان مواجه شدن افراد به شکل‌های مختلف با این باکتریها را افزایش دهد و باعث گسترش عفونتهای شدید در جامعه گردد.

در مورد جداسازی و اپیدمیولوژی جدایه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در نمونه های بالینی، فاضلاب شهری و مواد غذایی مقالات متعددی در ایران و سایر کشورها منتشر شده است، اما علیرغم مطالعات انجام گرفته در نقاط مختلف دنیا تاکنون اطلاعات بسیار محدودی در مورد فراوانی گونه

های مختلف انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب بیمارستانی اطلاعاتی در کشور در اختیار قرار گرفته است. در این مطالعه، در مجموع 92 جدایه انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین از فاضلاب خروجی یک بیمارستان در شهر تهران جداسازی گردید که در نهایت 3 گونه انتروکوکوس فسیوم، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس گالیناروم در میان این جدایه ها شناسایی گردیدند. در سایر مطالعات انجام گرفته در کشور بر روی نمونه های بالینی، فاضلاب شهری، دامی و مواد غذایی همواره انتروکوکوس فسیوم به عنوان گونه غالب در کشور معرفی شده است (9، 10، 21-14). در مطالعات انجام گرفته در کشور تاکنون گونه های مختلفی از انتروکوکوس شناسایی و گزارش شده است. به عنوان مثال در سال 2007 گونه های انتروکوکوس فسیوم، انتروکوکوس هایره، انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس گالیناروم، انتروکوکوس کسلی فلاووس، انتروکوکوس موندتی، انتروکوکوس رافینوزوز، انتروکوکوس دیسپار و انتروکوکوس اویوم از فاضلاب شهری تهران جداسازی شدند که شامل بیشترین میزان تنوع گونه های انتروکوکوس جداسازی شده در کشور می باشد (10). در مطالعه ای در جنوب استان فارس که بر روی فاضلاب بیمارستانی و شهری به انجام رسیده است، دو گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم شناسایی شدند (19). در مطالعه ای در کشور آرژانتین در سال 2016، تنها دو گونه انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس دورانس مقاوم به ونکومایسین از فاضلاب بیمارستانی جداسازی شدند (22). همچنین، در مطالعه ای در کشور پرتغال در سال 2013، چهار گونه مختلف انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فسیوم، انتروکوکوس هایره و انتروکوکوس اویوم از فاضلاب بیمارستانی جداسازی شدند (23). علاوه بر این، در سال 2005 نیز تنها حضور دو گونه انتروکوکوس فسیوم و انتروکوکوس فکالیس از فاضلاب بیمارستانی در پرتغال گزارش گردید (24).

در مطالعه حاضر، سویه های انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین تنها واجد 3 ژنوتایپ *vanA*، *vanB* و *vanC* بودند و سایر ژنوتایپها در این مطالعه شناسایی نشدند. این یافته ها منطبق بر سایر گزارشات در کشور می باشند که همواره ژنوتایپ *vanA* به عنوان ژنوتایپ غالب معرفی شده است (9، 14-16، 19، 21، 25). تمامی سویه ها در این مطالعه واجد ژن *vanA* بودند و ژن *vanC* نیز تنها در میان سویه های انتروکوکوس گالیناروم شناسایی شد. همچنین،

فاضلاب خروجی بیمارستان مورد مطالعه در شهر تهران است. بنابراین، استفاده از سیستمهای نوین تصفیه فاضلاب و یا استفاده از ترکیبات ضدعفونی مؤثر بر علیه این باکتریها در پساب خروجی بسیاری از بیمارستانهای کشور کاملاً ضروری به نظر می رسد. انتقال و راه یافتن این سویه های مقاوم، به سطوح بالای ونکومایسین، به آبهای سطحی می تواند سلامت و بهداشت عمومی جامعه را در معرض تهدید جدی قرار دهد.

#### تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب بخشی از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی با حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

تمامی 92 سویه مورد بررسی MIC بالایی نسبت به ونکومایسین داشتند (128-2048 میکروگرم/میلی لیتر) که کاملاً منطبق بر یافته های ژنوتیپی می باشد. ژن مقاومت *vanA* بر روی ترانسپوزون Tn1546 واقع شده است که باعث ایجاد مقاومت سطح بالا نسبت به ونکومایسین و تیکوپلانیس می شود. این ترانسپوزون قابلیت اینتگره شدن بر روی پلاسمید و کروموزوم را دارد که بیشتر بر روی پلاسمید گزارش شده است (20). در سایر کشورها نیز شیوع مشابهی در این زمینه گزارش شده است (3, 22-24, 26). در پایان باید توجه داشت که مطالعه حاضر مؤید حضور سویه های *انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین و تیکوپلانیس* در

## REFERENCES

1. Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, Whitlock JE. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(10):4930-3.
2. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, et al. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(9):5383-90.
3. Iversen A, Kühn I, Franklin A, Möllby R. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(6):2838-42.
4. Mundy L, Sahn D, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(4):513-22.
5. Magi G, Capretti R, Paoletti C, Pietrella M, Ferrante L, Biavasco F, et al. Presence of a *vanA*-carrying pheromone response plasmid (pBRG1) in a clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(5):1571-6.
6. Teo JW, Krishnan P, Jureen R, Lin RT. Detection of an unusual van genotype in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* hospital isolate. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(12):4297-8.
7. Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(Supplement\_1):S25-S34.
8. Noble W, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology letters*. 1992;93(2):195-8.
9. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Kühn I, Möllby R, Eshraghi S, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcal species in sewage treatment plants in Iran. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2007;185(1-4):111-9.

10. Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iranian Biomedical Journal*. 2007;11(3):161-7.
11. Bhatt P, Sahni A, Praharaj A, Grover N, Kumar M, Chaudhari C, et al. Detection of glycopeptide resistance genes in enterococci by multiplex PCR. *Medical Journal Armed Forces India*. 2015;71(1):43-7.
12. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 25th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2015.
13. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07-A10. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2015.
14. Ameri S, Talebi M, Rahimi F, Pourshafie M, Ebrahimipour G. The homogeneity of *vanB* gene cluster among enterococcal isolates in Iran. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;48(2):157-61.
15. Arbabi L, Vandyousefi J, Bouzari M, Rahimi F, Rastegar-Lari A. Antibiotic susceptibility pattern among vancomycin resistant enterococci isolated from meat and fecal samples in Tehran livestock husbandries *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2012;6(2):621-5.
16. Borhani K, Ahmadi A, Rahimi F, Pourshafie MR, Talebi M. Determination of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* diversity in Tehran sewage using plasmid profile, biochemical fingerprinting and antibiotic resistance. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014;7(2):e8951.
17. Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Polish Journal of Microbiology*. 2008;57(2):173-8.
18. Feizabadi MM, Shokrzadeh L, Sayady S, Asadi S. Transposon Tn5281 is the main distributor of the aminoglycoside modifying enzyme gene among isolates of *Enterococcus faecalis* in Tehran hospitals. *Canadian Journal of Microbiology*. 2008;54(10):887-90.
19. Hosseini F, Kargar M. Antibiotic resistance pattern and identification of vancomycin resistance genes in *Enterococcus* spp. isolated from environmental samples in southern Fars province. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2017;17(2):164-73.
20. Talebi M, Pourshafie MR, Katouli M, Möllby R. Molecular structure and transferability of Tn1546-like elements in *Enterococcus faecium* isolates from clinical, sewage, and surface water samples in Iran. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(5):1350-6.
21. Talebi M, Rahimi F, Katouli M, Möllby R, Pourshafie MR. Epidemiological link between wastewater and human vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Current Microbiology*. 2008;56(5):468-73.
22. Nuñez L, Tornello C, Puentes N, Espigares Rodríguez E, Moreno Roldán E, Espigares García M, et al. Hospital effluent constitutes a source of vancomycin-resistant enterococci. *Ars Pharmaceutica*. 2016;57(3):121-6.
23. Varela AR, Ferro G, Vredenburg J, Yanık M, Vieira L, Rizzo L, et al. Vancomycin resistant enterococci: from the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*. 2013;450:155-61.
24. Novais C, Coque TM, Ferreira H, Sousa JC, Peixe L. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(6):3364-8.
25. Rahimi F, Saifi M, Pourshafei M, Soltan D, Ashraqhian M, Pourmand M. Investigation of clonality among high level gentamicin resistant *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from sewage treatment plants in Tehran. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2008;13(3):Pe70-Pe82, En10.

26. Goldstein RER, Micallef SA, Gibbs SG, George A, Claye E, Sapkota A, et al. Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four US wastewater treatment plants that provide effluent for reuse. *Science of the Total Environment*. 2014;466:404-11.