التحري عن جين مقاومة مجموعة الامينوكلايكوسايد *aph(2")Ic* في بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة سريريا

هادي رحمن رشيد الطائي [1] ، شهد سعد علوان [2] و داود سلمان[3]

[1,2]قسم علوم الحياة - كلية العلوم- جامعة ديالى
[3]المختبر المركزي - صحة ديالى - وزارة الصحة

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص 16 عزلة من بكتريا *Enterococcus faecalis* من مجموع 192عينة سريرية مختلفة (ادرار ، دم ، جروح ، حروق ، اذن ، حنجرة) بالإضافة الى عينات الخروج الموجودة كنبيت طبيعي في امعاء الانسان لمقارنتها بالبكتريا المرضية في مستشفى بعقوبة التعليمي والعيادة الاستشارية للفترة الزمنية من تشرين الاول 2015 لغاية شباط 2016 وكانت اعلى نسبة عزل للبكتريا (7) عينات من الخروج وبنسبة 15.21% و (5) عينات من الادرار وبنسبة 9.25% ، و(4) عينات الدم وبنسبة 22.22% شخصت العزلات استنادا على جهاز VITEK2 Compact system والصفات المظهرية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية ،اظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة لبكتريا *Enterococcus faecalis* ان 12 عزلة وبنسبة 75% لها القدرة على انتاج البكتريوسين ، كانت جميع العزلات لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 100% ، اما بالنسبة لمضخات الدفق فان 11 عزلة كانت تمتلك مضخات دفق بكفاءة عالية وبنسبة 69% تم التحري عن حساسية العزلات لثلاث مضادات حياة تابعة لمجموعة الامينوكلايكوسايد ، اوضحت النتائج ان جميع العزلات مقاومة لمضاد Gentamycin وبنسبة 100% ، بينما كانت نسبة المقاومة لمضاد Streptomycin 50% ، اما بالنسبة لمضاد Amikacin فبلغت 25 %، ثم اجري تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي PCR لثلاثة عشر عزلة مقاومة لمضاد الجنتاميسين من خلال استخدام البادئ المتخصص الذي يستهدف التسلسل النوعي لجين *aph(2")Ic* ، ثم رحلت نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، اظهرت النتائج ان 3 من العزلات قيد الدراسة تمتلك جين *aph(2")Ic* وبنسبة 23.07% باعتماد على ظهور حزم وبحجم 444bp .

الكلمات المفتاحية : المكورات المعوية البرازية ، مجموعة الامينوكلايكوسايد ، تقنية PCR ، جين *aph(2")Ic*

DIYALA JOURNAL FOR PURE SCIENCES

التحري عن جين مقاومة مجموعة الامينوكلايكوسايد *aph(2")Ic* في بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة سريريا

هادي رحمن رشيد الطائي ، شهد سعد علوان و داود سلمان

Detection of aminoglycoside resistance gene *aph(2")Ic* in clinical isolates of *Enterococcus faecalis*

Hadi Rahman Rasheed [1] ، **Shahad Saad Alwan**[2] and **Dawood Salman**[3]

[1,2] Biology Dept. - College of Science - Diyala university
[3]Centrality Laboratory - Health Diyala - Health Ministy
[1] hadialtaai@sciences.uodiyala.edu.iq
[2] zaadahmed@yahoo.co.uk

Received: 17 December 2016 **Accepted: 28 February 2017**

Abstract

This study involved isolation and diagnosis of 16 isolates of *Enterococcus faecalis* of the total 192 samples(urine ,stool , blood , wound , burns , ear and pharynge) collected from different hospital in Baquba for the period from October 2015 to February 2016 **.**The highest isolation rate 15.21% was from stool samples ، followed by 9.25% and 22.22% from urine and blood specimens respectively.The isolates was indentified and confirmed by using the VITEK2 (Biomerieux-France) . The results of the investigation of the virulence factors of *Enterococcus faecalis* showed 75% isolates have the ability to produce bacteriocin ,while all isolates 100% have the ability to biofilm production and 69% isolates have efflux pump .The susceptibility of isolates against aminoglycoside showed that all isolates were resistant to Gentamicin with 100% The percentage of resistance to Streptomycin was 50% ,while resistance to Amikacin was 25% .DNA bacterial of *Enterococcus faecalis* isolates which appeared to be resistant to Gentamycin was extracted and presence of, *aph(2")Ic* gene was detected by using conventional PCR ،anylitic results shows by using Ultraviolet light source (260/280 nm) isolates have for *aph(2")Ic* with 444bp.

Key Words: *Enterococcus faecalis* ، aminoglycoside group ، PCR ، *aph(2")Ic*

التحري عن جين مقاومة مجموعة الامينوكلايكوسايد *aph(2")Ic* في بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة سريريا

هادي رحمن رشيد الطائي ، شهد سعد علوان و داود سلمان

المقدمة

تمتاز أنواع المكورات المعوية *Enterococcus* بكونها ممرضات انتهازية كونها جزء من النبيت الطبيعي في امعاء الانسان والحيوان وتستطيع البقاء في ظروف صعبة مما جعلها من الاسباب الرئيسية للإصابات المكتسبة من المستشفيات واول ما شخصت عام 1990 من مريض مصاب بالتهاب شغاف القلب (Endocarditis) (1). ان اكثر من 90% من الاصابات التي تسببها المكورات المعوية في الانسان يعود سببها الى سلالات *Enterococcus faecalis* والبعض الاخر يعود الى سلالات *Enterococcus faecium* بينما بقية الاصابات فيعود سببها الى الانواع الاخرى(2).ان إمراضيتها مرتبطة بامتلاكها عوامل ضراوة متعددة وتشمل الهيمولايسين Haemolycin والهايلورينديز Hyaluronidase والبروتييز Protease واللايبيز Lipase والبكتريوسين Bacteriocin والفيرمونات Pheromones بإضافة الى البروتينات السطحية التي تسمى بمواد التجمع Aggregation Substance (A.S) والسكريات المتعددة للجدران الخلوية Cellwall polysaccharides وكذلك لها القدرة على انتاج المحفظة (3). تعد المكورات المعوية من الممرضات الانتهازية خاصة للأشخاص الراقدين في المستشفيات على الرغم من تعايشها في امعاء الانسان ولكن بسبب التعرض لمضادات الحياة بشكل كبير ادى الى تغير المجتمع الجرثومي في الامعاء مؤدي الى استعمار المكورات المعوية للأمعاء بشكل كبير فينتج عن ذلك التهابات منها التهاب مجرى الدم ، وهنالك العديد من الاسباب الاخرى المسؤولة عن تحول هذه البكتريا من حالة التعايش الى حالة الانتهازية منها وصول البكتريا الى مواقع اخرى في الجسم غير الامعاء فهذا يحدث من خلال التعرض للجروح او تدمير مناعة المريض، او اكتساب البكتريا صفات جديدة تزيد من إمراضيتها (4) . *E faecalis* تعد من اكثر الانواع التابعة للمكورات المعوية الذي يسبب الامراض التي تصيب الانسان لكونه يمتلك اغلب عوامل الضراوة التابعة لهذا الجنس (5). لذلك تستطيع هذه الجراثيم ان تسبب العديد من الامراض منها اصابات القناة البوليةUrinary tract او التجويف البطني Abdominal cavity او المجرى الدموي Bloodstream او القناة الصفراوية Bile duct او جروح الحروق Burns wound (6). تمتاز بكتريا *E faecalis* بمقاومتها المتعددة لكثير من مضادات الحياة التابعة لمجموعة الامينوكلايكوسايد المستخدمة في العلاج وتعود هذه الصفة نتيجة لامتلاك البكتريا جين المقاومة منها *aph(2")Ic* التي تشفر لمقاومة هذه المضادات وبالأخص الجنتاميسين Genetamicin وهذا الجين يقع على البلازميد ،ويستطيع ان ينتقل من خلال الاشرطة الجينية Gene cassettes او بواسطة العناصر القافزة Transposone او بواسطة البلازميدات الاقترانية Conjugative plasmids او بالتحويل الطبيعي Natural transformation ، ويمتلك وزن جزيئي 444 زوج قاعدي (7). ولأهمية هذه البكتريا جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على عزل بكتريا *Enterococcus faecalis* وتشخيصها من نماذج سريرية مختلفة والتحري عن عوامل ضراوتها . ودراسة حساسية بكتريا *E faecalis* لبعض مضادات الحياة العائدة لمجموعة الامينو كلايكوسايد . والكشف عن جين *aph(2")Ic* المشفرة لمقاومة الافراد التابعة لمجموعة الامينوكلايكوسايد باستخدام تقنية التفاعل التضاعف التسلسلي التقليدي PCR .

المواد وطرق العمل

جمع العينات والعزل والتشخيص

جمعت 192 عينة سريرية مختلفة وتضمنت (الادرار والدم ومسحات الجروح والحروق والاذن واللوزتين) بالإضافة الى عينات الخروج ، في مستشفى بعقوبة التعليمي والعيادة الاستشارية للفترة من 2015/10/1 الى غاية 2016/2/1 شخصت العزلات البكتيرية اعتماد على ما ورد (8) (9) اذ شخصت المستعمرات مبدئيا بالاعتماد على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات ولونها وقوامها ورائحتها وحجمها فاستخدام وسط EJ-medium وهو للعزل الاولي للبكتريا حضر حسب ما جاء (10) (11) والمحور من قبل الخفاجي (12) . تم تأكيد التشخيص باستخدام جهاز VITEK2المجهز من شركة Bio Merieux لتشخيص البكتريا بدرجة عالية جدا من الدقة تصل الى 99% من خلال اجراء 64 اختبار من الاختبارات الكيموحيوية لغرض تشخيص البكتريا .

التحري عن بعض عوامل الضراوة في *E faecalis*

1- **الكشف عن انتاج البكتريوسين Bacteriocin**

استخدمت طريقة (Gupta واخرون ،1998) للتحري عن السلالات المنتجة للبكتريوسين والسلالات الحساسة له

2- **اختبار تكوين الغشاء الحيوي Bioflim**

بطريقة الكونكوريد Congo- red

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قابلية العزلات الداخلة في الدراسة على انتاجها للغشاء الحيوي وتبعا لطريقة (Mathurواخرون ،2006).

3- الكشف المظهري عن مضخات الدفق Efflux pump

اجري هذا الاختبار باستخدام طريقة العجلة الخشبية EtBr – agar cart wheel method بحسب ما جاء في (Martins واخرون ، 2011). باستعمال مصدر للأشعة الفوق البنفسجية U.V light عند طول موجي 320 نانومتر لملاحظة شدة التألق.

الكشف عن الجين المشفر لمضاد الجنتاميسين *aph(2")Ic*

خضعت العزلات المختارة بواسطة الاختبارات المظهرية الموجبة الى الفحص الجزيئي بواسطة تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة التقليدي (conventional PCR) .

تم استخلاص الدنا باستخدام Kit المجهز من قبل شركة Bioneer/Korea استعمال البادئات في تقنية PCR جدول (1)

التحري عن جين مقاومة مجموعة الامينوكلايكوسايد *aph(2")Ic* في بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة سريريا

هادي رحمن رشيد الطائي ، شهد سعد علوان و داود سلمان

(1) البادئات وتسلسلاتها الخاصة في اكثار الجين *aph(2")Ic*

البادئ	تتابع البادئ 5`——3`	عدد القواعد	حجم الناتج bp
aph(2")Ic	F/5`-CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC-3`	25	444
	R/5`-CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG-3`	22	

اعتمدت الظروف ادناه لغرض تفاعل PCR :

المسخ الاولي (دورة واحدة) 94 م°/3 دقائق ثم 35 دورة تتضمن المسخ 94م° / 40 ثانية ، والتثبيت55 م° / 40 ثانية والاستطالة 72 م°/ 40 ثانية ، واخيرا الاستطالة النهائية 72 م°/2 دقائق ، اجريت عملية الترحيل الكهربائي في (1%) من الاكاروز لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصة (15). النتائج المتحصل عليها اثناء الدراسة تم تحويلها الى قاعدة بيانات حاسوبية وتمت معالجتها باستخدام الجيل الثامن عشر من برنامج (Statistical package of Social Version 18 Science) . التوزيع لبعض المتغيرات المنتخبة انجزت اولا. العلاقات الاحصائية ذات المدى بين كل فئتين من المتغيرات تم تقييمها باستخدام اختبار مربع كاي الاحصائي (Chi square). قيم الاحتمالية (P values) الاقل من (0.05) اينما وجدت من خلال تطبيقات الاختبارات الاحصائية اعتبرت معنوية احصائيا.

النتائج والمناقشة

اظهرت العزلات قيد الدراسة عند تنميتها على وسط EJ-medium بشكل مستعمرات صغيرة جدا وشفافة وملساء وذات حافات مستديرة ومرتفعة قليلا ،جميع العزلات النامية على وسط Ej-medium زرعت على وسط المكورات المعوية التأكيدي (Bile esculin azide agar) وهو وسط انتقائي Selective وكانت النتيجة ظهور مستعمرات ذات لون اسود واتفقت هذه النتيجة مع ما ذكرة (9) (12) من صفات البكتريا جدول (2).

(2)الفحوصات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا *E faecalis*

Lactose	Glucose	Sorbitol	Sorbose	Xylose	Rhaffinose	Arabinose	Adonitol	Catalase	Oxidase
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Glycerol	Mannitol
+	+

وللتأكد من تشخيص هذه البكتريا تم استخدام جهاز VITEK2 Compact الذي يعطي نتائج تشخيصية للبكتريا بدقة تصل الى 99 %(13) . وبالاعتماد على الصفات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية وفقا لما ورد في (8) (9) .اظهرت نتائج ان العزلات تابعة لجنس *Enterococcus faecalis*.

اختبار حساسية بكتريا *E faecalis* لمضادات الحياة

استخدمت طريقة الاقراص Kirby-Bauer لجميع العزلات قيد الدراسة لثلاث مضادات تابعة لمجموعة الامينوكلايكوسايد لعلاج الامراض المختلفة لمعرفة نوع الاستجابة بالاعتماد على قياس قطر منطقة التثبيط حول قرص مضاد الحياة المستخدم وقورنت النتائج وفق ما ورد في (17). يبين جدول 3 نتائج الاختبار مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة ، اذ بلغت نسبة عزلات المكورات المعوية البرازية لمضاد Gentamycin (GN) (100%). وبلغت نسبة مقاومة المكورات المعوية البرازية قيد الدراسة لمضاد Streptomycin (S) (50%) ، ونسبة العزلات الحساسة (50%).بينما بلغت نسبة مقاومة مضاد AmiKacin (AK) (25%) ، ونسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد بلغت (18.75%) اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها (56.25%)

(3) اعداد ونسب العزلات الحساسة والمقاومة لمضادات الحياة

مضادات الحياة	عدد العزلات (%)				
Antibiotic	Resistant	Intermediate	Sensitive	Chi-square	P value
Gentamycin	(%100)16	(%0)0	(%0)0	1.00	1.00
Amikacin	(%25)4	(%18.75)3	(%56.25)9	3.87	0.144^{NS}
Streptomycin	(%50)8	(%0)0	(%50)8	8.00	0.018^{*}

التحري عن بعض عوامل الضراوة للمكورات المعوية البرازية

1- الكشف عن انتاج البكتريوسين Detection of bacteriocin

استخدمت جميع العزلات البكتيرية في اختبار التحري عن انتاج البكتريوسين في الدراسة الحالية كعزلات منتجة للبكتروسين ، بلغت نسبة العزلات المنتجة 12 عزلة بنسبة 75 % مقابل 4 عزلات بنسبة 25% اعطت نتائج سالبة ، ان اختلاف نسب العزلات المنتجة للبكتريوسين تعتمد على عزلات الاختبار بصورة رئيسية ، لان عزلة الاختبار يمكن ان تكون متحسسة لنوع معين من البكتريوسين ولكن الفعالية القاتلة تعود الى افتقارها للمستقبلات الخاصة بنقلها ، اوقد ينتج ولكن بكميات قليلة لا تستطيع قتل الخلية الحساسة (19) ان البكتريوسينات لاتعد من العوامل الضراوة المباشرة ، انما تعمل على دعم نمو البكتريا وتكاثرها في البيئات التي تتواجد فيها كالأمعاء (20).

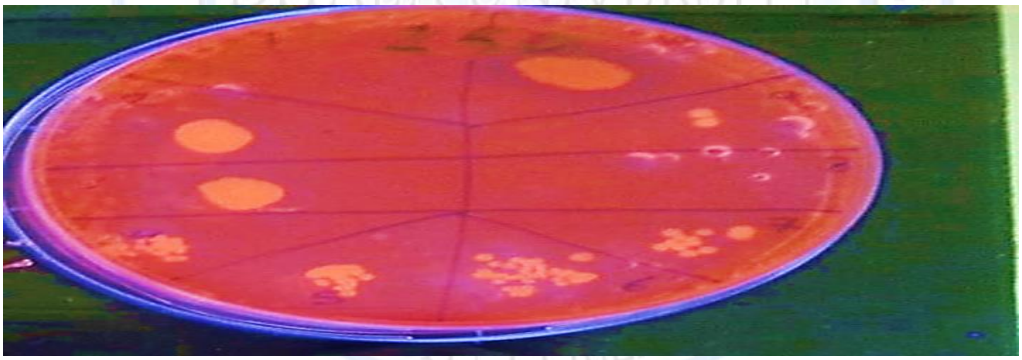
2- **التحري عن انتاج الغشاء الحيوي Biofilm**

استخدمت طريقة احمر الكونغو Congo-red Method في الكشف عن انتاج المكورات المعوية البرازية للأغشية الحيوية ، ان جميع العزلات قيد الدراسة تمتلك خاصية تكوين الغشاء الحيوي بنسبة 100% ، وان البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي

تكون مسؤولة عن الكثير من الاصابات والامراض التي من الصعب معالجتها وذلك بسبب تقييد وصعوبة اختراق المضاد للغشاء الحيوي ، وكذلك امتلاك البكتريا صفة المقاومة المتعددة لمضادات الحياة ، بالإضافة الى قدرتها على مقاومة البلعمة Phagocytosis وعملية الاستساغة Opsonisation والظروف البيئية المختلفة (21).

3- انتاج مضخات الدفق Efflux pump

اختبرت 16 عزلة لبكتريا *E faecalis* للكشف عن وجود مضخات الدفق باعتماد على طريقة العجلة الخشبية Ethidium Bromide-Agar Cartweel Method واستخدمت صبغة الاثيديوم كمؤشر للكشف عن مضخات الدفق ، اظهرت النتائج ان 11 عزلة وبنسبة 69% تمتلك مضخات دفق وبكفاءة عالية ، بينما كانت عزلتين وبنسبة 13% تمتلك مضخات دفق متوسطة الانتاج ، و3 عزلات بنسبة 18% كانت غير منتجة لمضخات الدفق اي اعطت نتيجة سالبه للاختبار ، شكل (1) يوضح الكشف عن مضخات الدفق في بكتريا المكورات المعوية البرازية بعد تنميتها على وسط Tryptose soy agar الحاوي على صبغة بروميد الاثيديوم. اكدت النتائج ان العزلات التي لها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي وامتلاكها صفة المقاومة المتعددة لمضادات الحياة تمتلك مضخات دفق ذو كفاءة عالية بالمقارنة مع العزلات التي كانت متوسطة الكفاءة والعزلات التي لا تمتلك مضخات دفق.



(1): الكشف المظهري عن مضخات الدفق في بكتريا *E faecalis* بعد تنميتها على وسط TAS الحاوي على صبغة بروميد الاثيديوم بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة

التحري عن جينات مقاومة الجنتاميسين في بكتريا *E faecalis*

اختبرت 13 عزلة من بكتريا *E faecalis* للكشف عن وجود جين *aph(2")Ic* التي تشفر لمقاومة مضاد الجنتاميسين باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR لان جميعها مقاومة لمضاد الجنتاميسين وامتلاكها عوامل ضراوة ، اذ ظهرت نتائج الكشف عن جين *aph(2")Ic* تبين ان (3) عزلات فقط تمتلك هذا الجين وبنسبة (23.07%)، اظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *aph(2")Ic* انه يمتلك حجم 444 زوج قاعدي عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder شكل (2)

التحري عن جين مقاومة مجموعة الامينوكلايكوسايد *aph(2")Ic* في بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة سريريا

هادي رحمن رشيد الطائي ، شهد سعد علوان و داود سلمان

شكل (2) : الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الاكاروز لجين *aph(2")Ic* المتضاعف بأستخدام تقنية PCR لبكتريا *E faecalis* ، بتركيز 1% وفرق جهد 100 فولت لمدة 45 دقيقة ، المسار M : الدليل الحجمي 2000bp ..المسار رقم 15،14،9 الحاوية على جين *aph(2")Ic* / المسار رقم 10،16،7،1،12،2،3،4،5،6 غير حاوية على جين *aph(2")Ic*

المصادر

1. **Soheili**, S.; Ghafourian, S.; Sekawi, Z.; Neela, V.; Sadeghifard, N.; Ramli, R.; Hamat, R.A.(2014).Widedistribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical. **Sci. World J. 10:1155-623174.**
2. **Baldassarri**, L.; Creti, R.; Montanaro, L.; Orefici, G. and Arciola, C.R. (2005).Pathogenesis of implant infections by enterococci. ***Int. J. Artif. Organs. 28: 1101-1109.***
3. **Sava**, I.G.; Heikens, E.; Kropec, A.; Theilacker, C.; Willems, R. and Huebner, J.(2010). Enterococcal surface protein contributes to persistence in the host butis not a target of opsonic and protective antibodies in *Enterococcus faecium* infection***. J. Med. Microbiol., 59: 1001-1004.***
4. **Ubeda,** C.; Taur, Y.; Jenq, R.R.; Equida, M.J.; Son, T.; Samstein, M.; Viale, A.; Socci, N.D.; Brink, M.R.M.; Kamboj, M.; Pamer, E.G. (2010). Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. ***J. Clin. Invest.120(12):4332-4341***

5. **Koneman**, E.W.; Allen, S.P.; Janda, W.C. (2006). "Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology". 6th ed. Lippincott-Willams and Wilkins Publishers, ***Philadelphia,USA.***
6. **Gilmor**, Michael.(2002).The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance.Washington, DC: ***Amer Soci for Microbiol Pre***.
7. **Gupta,** K. ; Hooton, T. M. and Stamm, W. E. (1998). Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infections. **Am. Intern. Med. 135:41 – 50.**
8. **Tolmasky**, M.E.(2007). Aminoglycoside-modifying enzymes: characteristics, localization, and dissemination. In: Bonomo, RA.; Tolmasky, ME., editors. Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. ***ASM Press; Washington. 35-52***
9. **Forbes**, B.A.; Sahm, D.F. & Weissfeld, A.S. (2002). Baily and Scotts: Diagnostic Microbiology***. 11th edition. Mosby, Inc.Baltimore,USA.236:302-309.***
10. **Macfaddin**,J.F. (2000) Biochemical test for identification of medical Bacteria.3rd edition.Lippincott Williams & Wilkins,Co. London.
11. **Martins**, M. ; Viveiros, M. ; Couto, I. ; Costa, S. S. ; Pacheco, T. ; Fanning, S. ; Pagès, J. M. and Amaral, L. (2011) . Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method **.** ***In Vivo . 25: 171–178***.
12. **Mathur,** T. ; Singhal S. ; Khan S. ; Upadhyay D.J. ; Fatma T. and A. Rattan. (2006) . Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of *Staphylococci* An Evaluation of Three Different Screening Methods. ***Indian J. Med. Microbiol. 24(1): 25-29.***
13. ***Facklam,*** R.R. (1976). A review of the microbiological techniques for isolation and identification of streptococci***. J. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 6:287-317.***
14. **Ross**,P.W.(1996). *Streptococci* and *Enteroccoi* In :Collee,J.G. ; Marmion, B .P.;Fraizerand Simmon,A.(Editors)***.Prac. Med. Microb. 14th ed. Churchill Livigston,chapter12:263-274.***

15. الخفاجي ، جواد كاظم.(2005). دراسة بكتريولوجية و وراثية لبعض عزلات *Enterococcus faecalis* المعزولة من مصادر سريرية و بيئية في محافظة بابل ، أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية

16. **Pincus**, D. H. (2011) . Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek® 2 System. ***bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA . 1: 1-32.***

17. **El-Ghazawy,**I.F. ;Oskasha,H.A. ;Mazloum,S.M.(2016). A study of high level aminoglycoside resistant enterococci .***African .J. of Microbiol Res.10(16):572-577.***

18. **Facklam,**R.R. ; Sahm,D.F. and Teixeira,L.M. (1999).*Enterococcus* .In :Murray,P.R. ; Baron,E.J. ; Pfaller,M.A. ; Tenover,F.C. &Yolken,R.H. (Eds). "Manual of Clinical Microbiology".***7th edition.ASM Press,Washington D.C.:297-307***.

19. **The Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2012) . Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition M07-A9 . CLSI . Clin and Lab Stand Ins , Wayne, PA. USA **. 32(2): 1-8.**

20. **Tagg, S**.R. ; Dajani ,A.S. and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocin of gram positive bacteria. ***Bacteriol.Rev. 40 : 722–756.***

21. **Van den Berghe**, E. ; De Winter, T. & De Vuyst, L. (2006). Enterocin A production by Enterococcus faecium FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion**.** ***Int J Food Microbiol.107:159–170***

22. **Hassan,** A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. and Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates **.*The Brazil. J. of Infect Dis* .15(4): 305-311.**