مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۵، بهار و تابستان ۱۳۹۰، صفحات۱۸-۱۴

بررسی فراوانی مقاومت دارویی ایزوله‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* و شناسایی ژن van A/B در میان سویه های مقاوم به ونکومایسین با روش PCR در بیمارستانهای ایلام و کرمانشاه

فرزاد محمدی[۱]، دکتر بهمن تبرایی[۱*]، الهام داوودیان[۲]، عباس ملکی[۲]، شایان ملک نیا[۳]، نورخدا صادقی‌فرد[۲]، مهدی نجاتی[۳]، ترمه تبرایی[۱]،

۱- گروه میکرو بیولوژی ، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲- گروه میکرو بیولوژی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
۳- بخش واکسن های باکتریایی انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: بهمن تبرایی، بخش واکسن های باکتریایی انستیتو پاستور ایران
تلفن: ۰۲۶۱۶۱۰۲۹۳۸ همراه: ۰۹۱۲۳۶۱۸۱۶۰ E.mail:bahmantabaraie@yahoo.com

چکیده:

زمینه و اهداف: در دو دهه اخیر، انتروکوک ها مقاومت گسترده‌ای به تعدادی از آنتی بیوتیکها کسب کرده‌اند که این امرسبب پیچیدگی در درمان عفونتهای ناشی از این باکتریها گردیده است. امروزه انتروکوکهای مقاوم به غلظت‌های گوناگونی از ونکومایسین به طور تصاعدی از سراسر دنیا گزارش می شود. ژنهای vanA و vanB در انتروکوکها مسئول مقاومت به غلظت بالایی از ونکومایسین می‌باشد. در تحقیق حاضر مقاومت دارویی گونه‌های مختلف *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* بر علیه ونکومایسین و ۱۲ آنتی بیوتیک اختصاصی تعیین گردید، ضمناً حضور ژنهای van A/B در گونه‌های مقاوم به ونکومایسین مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: ۱۸۰ نمونه انتروکوک از بیمارستانهای کرمانشاه و ایلام جمع‌آوری گردید. گونه های انتروکوک با روشهای متداول استاندارد شناسایی شده و آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک ها طبق روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI انجام شد. مقاومت دارویی (MIC) با روش E.test بر روی نمونه‌های مقاوم به ونکومایسین انجام پذیرفت سپس با استفاده از روش PCR فراوانی ژنهای vanA و vanB مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: از بین ۱۸۰ نمونه ایزوله، ۱۲۸ نمونه *انتروکوکوس فکالیس* و ۵۲ نمونه *انتروکوکوس فاسیوم* شناسایی شدند. نتایج آزمون حساسیت به آنتی بیوتیکها نشان داد که ٦١/١ درصد سویه‌ها به اریترومایسین، ٥٩/٤ درصد به آمپی سیلین، ۲/۲ درصد به جنتامایسین ، ۱۸/۳ درصد به سفوتاکسیم ، ۸/۳ درصد به ونکومایسین ، ۵/۵ درصد به مروپنم ، ٣٦/١ درصد به کلرامفنیکل ، ٣١/١ درصد به استرپتومایسین ،٢٤/٤ درصد به تتراسایکلین ،١٤/٤ درصد به لینکومایسین، ٢١/١ درصد به تیکوپلانین، و ۳/۸ درصد آمیکاسین و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. MIC برای نمونه‌های مقاوم به ونکومایسین بین ۳۲ تا ٢٥٦ میکروگرم بدست آمد. از بین ۱۵ نمونه مقاوم به وانکومایسین، ژن vanA در ۱۲ سویه مشاهده گردید ولی در هیچ سویه ای ژن vanB مشاهده نشد.

نتیجه گیری: بررسی نتایج حاصله از این مطالعه نشان می دهد که فراوانی ژن vanA در بین ایزوله‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین خیلی شایع نبوده و ژن vanA صرفاً در ۱۲ مورد از سویه های ایزوله مشاهده گردید. در حالی که ژن vanB در هیچکدام از سویه‌ها یافت نشد.

کلید واژه ها: انتروکوک، ونکومایسین، vanA و vanB

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

انتروکوکها کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که قادرند در حضور ٦/٥ درصد نمک و ٤٠ درصد املاح صفراوی رشد نمایند. این باکتری ها فلور طبیعی روده حیوانات خونگرم از جمله انسان محسوب می‌شوند. شایع‌ترین انتروکوک‌های دخیل در عفونتهای انسانی *انتروکوکوس فکالیس* (۹۰-۸۵ درصد) و *انتروکوکوس فاسیوم* (۱۰-۵ درصد) هستند که منجر به ایجاد عفونت های مجاری ادراری، زخم‌هاو حتی اندوکاردیت می شود. این باکتریها که در گذشته از لحاظ بالینی کم اهمیت تلقی می‌شدند به دلیل کسب مقاومت اکتسابی به چندین آنتی بیوتیک مهم مانند ونکومایسین از اوایل ۱۹۷۰ بعنوان دومین عامل شایع عفونتهای بیمارستانی در نظر گرفته می‌شوند. انتروکوکهای مقاوم به ونکومایسین (VRE) اولین بار توسط Leclercq در سال ۱۹۸٦ شناسایی شدند و شیوع آنها با تجویز بی رویه آنتی‌بیوتیکهای گلیکوپپتیدی افزایش یافت (۲ ،۱). امروزه VRE با داشتن MIC≥4 برای ونکومایسین و مقاومت چندگانه به پنی‌سیلین، سفالوسپورینها و آمینوگلیکورزیدها شناخته می‌شود. ژنهای ساختمانی مقاومت به ونکومایسین vanB، vanA، $vanC_1$و $vanC_2/C_3$ می‌باشند که از بین آنها vanBوvanA بعنوان مهمترین ژنهای مسئول مقاومت شناخته شده و به ترتیب بر روی ترانسپوزونهای Tn1546 و Tn1547 قرار دارند که می‌توانند روی پلاسمید یا کروموزوم یافت شوند. فنوتیپ vanA به مقدار بالایی از ونکومایسین و تیکوپلانین مقاوم است. فنوتیپ vanB به ونکومایسین مقاوم بوده اما به تیکوپلانین حساس است. سهولت در تبادل ژنهای مقاوم ویرولانت بین سویه‌های انتروکوک و توانایی بالای ارگانیسم در انتقال بین افراد و بیماران و محیط فراوانی قابلیت انتشار این سویه‌ها را در بین محیط‌های مختلف تأیید می‌کند. در بیمارستانها این باکتریها به طور عمده توسط دست کارکنان بیمارستان از فردی به فرد دیگر انتقال می‌یابند و برخی از این افراد ممکن است این باکتری را در مجرای گوارشی خود داشته باشند. آنتی بیوتیکهای گلیکوپپتیدی ونکومایسین و تیکوپلانین (همراه با آمینو گلیکوزید) آخرین راه درمان عفونتهای جدی ناشی از کوکسی‌های گرم مثبت آمریکا گزارش شده است. سویه‌های فاسیوم به ویژه از نظر مقاومت به ونکومایسین حایز اهمیت هستند به طوریکه در آمریکا تا ۵۰ درصد سویه‌های جدا شده از این گونه نسبت به این دارو مقاوم گزارش شده‌اند و همچنین می‌توانند ژنهای مقاومت را کسب و به سایر گروههای باکتریایی منتقل کنند. بنابراین بروز این نوع مقاومت در انتروکوکها مشکلات عمده‌ای در بروز عفونتهای بیمارستانی ناشی از این ارگانیسم‌ها و نیز تشخیص و درمان آنها را سبب گردیده است. روش PCR جهت شناسایی ژنهای مقاومت به ونکومایسین و تعیین پراکندگی این دسته از ژنها در انتروکوکهای مقاوم کاربرد فراوانی داشته است (٤،٣).

مواد و روشها:

۱۸۰ نمونه انتروکوک در طی سال ۱۳۸۸ از عفونت‌های ادراری در بیمارستانهای شهر ایلام و بیمارستان امام رضا (ع) کرمانشاه جمع‌آوری گردید. پس از تهیه کشت خالص با استفاده از رنگ آمیزی گرم، آزمون های کاتالاز، تعیین مقاومت به دیسک ، اپتوچین، بایل اسکولین، رشد در شرایط مختلف درمان ۱۰و ٤٥ درجه سانتی‌گراد، تحمل دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت، تحمل متیلن بلو یک درصد سدیم آزاید ۰/۰۵ درصد، رشد در ٦/٥ درصد نمک، و هیدرولیز هیپورات نمونه‌ها در حد جنس شناسایی شدند. سپس نمونه‌های انتروکوک با استفاده از آزمایشات تولید اسید از مانیتول، سوربیتول، سوربوز، آرابینوز، رافینوز، ریبوز و ساکاروز در حد گونه شناسایی شدند. از سویه‌های استاندارد *E.faecium* ATCC V583و *E.faecalis* ATCC19433 جهت کنترل کیفی محیط‌های کشت و آزمونهای تشخیصی استفاده گردید(۵).

جهت بررسی مقاومت دارویی با روش استاندارد Kirby-Baur مقاومت سویه‌های جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیکهای اریترومایسین، آمپی سیلین، جنتامایسین، سفوتاکسیم، ونکومایسین، مروپنم، کلرامفنیکل،

Archive of SID

www.SID.ir

استرپتومایسین، تتراسایکلین، لینکومایسین، آمیکاسین، تیکوپلانین و سیپروفلوکساسین ارزیابی شد. (دیسکهای آنتی بیوتیک ازشرکت هایمدیا هندوستان تهیه گردید). به منظور به دست آوردن میزان مقاومت، تمامی سویه‌هایی که به روش دیسک دیفیوژن از خود مقاومت نشان می‌دادند با روش E.test (نوارها مربوط به شرکت هایمدیا هند) MIC آنها تعیین گردید.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA از کشت ۲٤ ساعته نمونه‌ها در محیط LB براث حاوی تریپتون (مرک آلمان)، عصاره مخمر (مرک آلمان) و NaCl کشت داده شد و با استفاده از سانتریفیوژ رسوب سلولی جمع آوری گردید و استخراج طبق دستورالعمل کیت استخراج DNA (فرمنتاز ساخت کشور انگلیس) انجام گردید.

آزمون PCR: با استفاده از روش PCR و توالی پرایمرهای اختصاصی نشان داده شده در جدول ۱، وجود ژنهای مقاومت به ونکومایسین شامل vanB و vanA در سویه‌ها بررسی شد(٦).

جدول ۱: توالی پرایمر های مورد استفاده در آزمون PCR ژن های vanA وvanB

Primers	Sequences
vanA	Forward: vanA (vanA-gene) 5'-TCT GCA ATA GAG ATA GCC GC-3'
	Reverse: vanA (vanA-gene) 5′-GGA GTA GCT ATC CCA GCA TT – 3′
vanB	Forward: vanB (vanB-gene) 5′-CAT CGT CCC CGA ATT TCA AA-3′
	Reverse: vanB (vanB-gene) 5'-GAT GCG GAA GAT ACC GTG GCT-3′

الکتروفورز افقی بر روی ژل آگاروز ۰/۷۵ درصد و درون بافر TAE (تریس، اسیداستیک گلایسیال و EDTA) انجام گرفت. نمونه‌ها پس از مخلوط کردن، بالودینگ بافر وارد چاهک شدند. باندهای DNA بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV مشاهده گردید. از مارکر ۱۰۰۰bp (شرکت ژن فن آوران) به عنوان مارکر استانداردهای وزن مولکولی استفاده گردید.

یافته ها:

در تحقیقات حاضر، ۱۸۰ نمونه انتروکوک از عفونت‌های ادراری جدا گردید که از بین آنها، ۲۸ نمونه (۱٦ درصد) مربوط به بیمارستان امام رضا (ع) کرمانشاه، بیمارستان امام خمینی (ره) ایلام ۱۱۷ نمونه (٦٤درصد)، بیمارستان مصطفی خمینی ایلام ۲۸ نمونه (۱٦درصد) و بیمارستانهای خصوصی ایلام ۷ نمونه (٤ درصد) می‌باشند (جدول ۲). بعد از انجام تستهای بیوشیمیایی و تأییدی مشخص گردید که از ۱۸۰ نمونه مورد آزمایش ۱۲۸ نمونه (۷۱ درصد) *انتروکوکوس فکالیس* و ۵۲ نمونه (۲۹ درصد) *انتروکوکوس فاسیوم* می‌باشند. نتایج MIC به روش E-test نشان داد که ۲۰ درصد (۳ نمونه) سویه‌ها دارای مقاومت سطح بالا به ونکومایسین یعنی MIC≥۲۵٦ بودند، ۲ نمونه بیشتر از ۳۲ میکروگرم و مابقی بین ٤ تا ۳۲ میکروگرم می باشند.

جدول (۲)تعداد نمونه‌های گردآوری شده از هر بیمارستان به تفکیک گونه

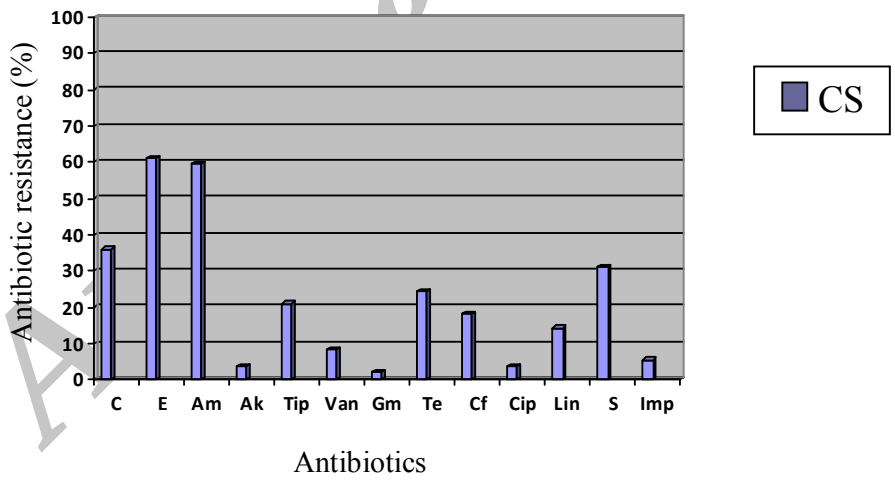
تعداد مراکز درمانی (٪)	بیمارستان امام	بیمارستان امام‌رضا	بیمارستان مصطفی خمینی	آزمایشگاههای خصوصی	مجموع
انتروکوکوس فکالیس	۸۵	۱۹	۲۰	٤	۱۲۸
انتروکوکوس فاسیوم	۳۲	۹	۸	۳	۵۲
مجموع	۱۱۷	۲۸	۲۸	۷	۱۸۰

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام در مورد ۱۳ آنتی بیوتیک در نمودار (۱) نشان داده شده است که نشان دهنده مقاومت‌های چندگانه سویه‌های مختلف می‌باشد. میزان مقاومت به ۳ آنتی بیوتیک جنتایسین (۲/۲ درصد)، آمیکاسین و سیپروفلوکاسین (۳/۸ درصد)و مروپنم (۵/۵ درصد) نشان می‌دهد که هنوز برخی سویه‌های حساس به سایر داروها در شهر ایلام و کرمانشاه وجود دارند. از ۲۸ نمونه بیمارستان امام رضا (۱۹ نمونه *انتروکوکوس فکالیس* و ۹ نمونه *انتروکوکوس فاسیوم*) ۲ نمونه به ونکومایسین مقاوم بودند. از ۱۱۷ نمونه بیمارستان امام خمینی (ره) ایلام (۸۵ نمونه *انتروکوکوس* فکالیس و ۳۲ نمونه *انتروکوکوس* فاسیوم) ۱۳ نمونه به ونکومایسین مقاوم بوده و از ۲۸ نمونه بیمارستان مصطفی خمینی (۲۰ *انتروکوکوس* فکالیس و ۸ نمونه *انتروکوکوس* فاسیوم) و از ۷ نمونه (٤ نمونه *انتروکوکوس* فکالیس و ۳ نمونه *انتروکوکوس* فاسیوم) بیمارستانهای خصوصی شهر ایلام هیچ گونه مقاوم به ونکومایسین مشاهده نگردید. بر اساس نتایج PCR، vanA دارای فراوانی بیشتری است. از دو نمونه بیمارستان امام رضا (ع) یک نمونه دارای vanA و از ۱۳ نمونه بیمارستان امام خمینی شهر ایلام ۱۱ نمونه دارای vanA بودند. (شکل ۱). در هیچ کدام از نمونه‌ها ژن vanB مشاهده نشد.

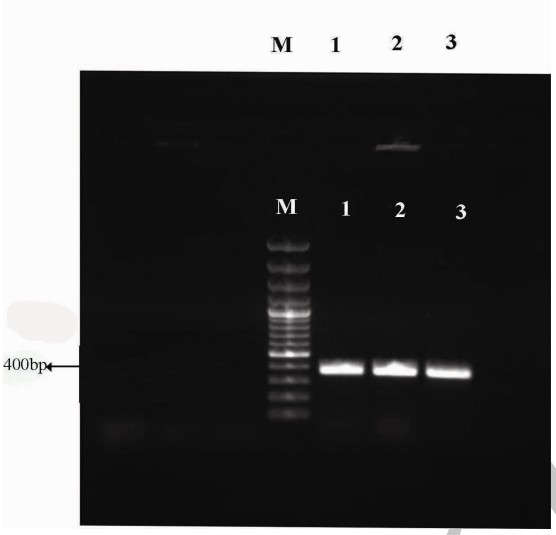
نمودار شماره ۱: توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های VRE جدا شده از نمونه‌های ادرار بیماران نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های، کلرامفنیکل (C)، اریترومایسین (E)، آمپی سیلین (Am)، آمیکاسین (Ak)، تیکوپلانین (Tip)، ونکومایسین (Van)، جنتامایسین (Gm)، تتراسیکین (Te)، سفوتاکسیم (CF)، سیپروفلوکساسین (Cip)، لینکومایسین (Lin)، استرپتومایسین (S) و ایمی پنم (Imp).



Archive of SID

www.SID.ir

شکل (۱): الکتروفورز محصول PCR ژن vanA بر روی ژل آگارز ۰/۷۵ درصد



- ستون M : سایز مارکر ۱۰۰bp می‌باشد،
- ستون ۲: کنترل مثبت واکنش می‌باشد (*vanA, ATCC*, 29212. *E.Faecium*) سویه مقاوم به وانکومایسین بوده، دارای ژن vanA می‌باشد.. محصول این ژن ۳۷۷bp می‌باشد.
- ستون ۱ و ۳ سویه های مقاوم به ونکومانسین بوده ، و دارای ژن van A می باشد.

بحث:

VRE به عنوان یکی از مهمترین عوامل عفونتهای بیمارستانی در بیماران با حال وخیم و دارای ضعف ایمنی شناخته می‌شود. بعلاوه حضور انتروکوک مقاوم در جوامع بشری به عنوان یک منبع برای عفونت‌های بیمارستانی عمل می‌کند(۷) . در این مطالعه همانند چندین مطالعه دیگر نشان داده شد که آمار *انتروکوک فکالیس* در ایجاد عفونت نسبت به سایر انتروکوک‌ها غلبه دارد و نیز میزان مقاومت *انتروکوک فاسیوم* بیشتر از *انتروکوک فکالیس* می‌باشد(۸) . از نظر مقاومت چندگانه، آمار مقاومت در مورد آنتی بیوتیک‌های مختلف، متفاوت بود. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین (۲/۲ درصد)، آمیکاسین و سیپرفلوکساسین (۳/۸ درصد) و مروپنم (۵/۵ درصد) کمترین میزان مقاومت را به خود اختصاص دادند و بیشترین مقاومت نسبت به اریترومایسین (٦١/١ درصد) و آمپی سیلین (٥٩/٤ درصد) نشان داده شد.

این مسئله می‌تواند نشان دهنده میزان مصرف و فرهنگ مصرف دارو و آنتی بیوتیک در یک منطقه می‌باشد. آنتی بیوتیک همانند آمپی سیلین به مراتب بیشتر از سایر آنتی بیوتیکها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ثابت شده است در اکثر موارد به واسطه استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیکها، شاهد موارد زیادی از مقاومت داروئی در پاتوژنها باشیم که این خود سبب عدم موفقیت در درمان و پیدایش بسیاری از عوارض علی‌رغم صرف هزینه‌های هنگفت درمانی می‌گردد(۹) . مقاومت داروئی نسبت به آنتی بیوتیکها در مناطق مختلف ایران و جهان به دلیل تغییرات ژنتیکی در سویه‌های ایجاد کننده و تفاوت در مصرف میزان آنتی بیوتیکها و وجود اختلاف در میزان دسترس به آنتی بیوتیکهای وسیع الطیف و جدید متفاوت می‌باشند.

نتیجه گیری:

در این تحقیق، از ۱۵ نمونه مقاوم به ونکومایسین، ۱۲ نمونه دارای ژن vanA بوده و از ۱۲ نمونه‌ای که دارای ژن vanA بودند، ۳ نمونه دارای MIC≥٢٥٦ بوده و ۲

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه نیز دارای MIC≥32 بوده‌اند ومابقی بین ٤ تا ۳۲ میکروگرم بودند ، که نشان دهنده این امر است که فنوتیپ vanA به مقدار بالایی از ونکومایسین مقاوم است. با توجه به PCR در میان نمونه‌ها ژن vanB مشاهده نشد. در سایر مطالعات نیز ژن vanB فراوانی کمتری نسبت به ژن vanA دارد و دومین فنوتیپ بعد از فنوتیپ vanA در ارتباط با مقاومت به ونکومایسین به شمار می‌رود(۱۰). در مطالعه‌ای perez-Hernandez و همکاران در سال ۲۰۰۲ در جزایر قناری اسپانیا مشخص کردند که از میان ٤۳۷ نمونه انتروکوک فقط سه نمونه VRE وجود داشت که از آنها فقط یک نمونه *انتروکوک فکالیس* دارای فنوتیپ vanA بود (۱۱) . طبق آزمون مقایسه‌ای کای اسکور این نتایج با نتایج این تحقیق دارای اختلاف می‌باشد. Iaewook Yang و همکاران در سال ۲۰۰٦ در کره جنوبی نشان دادند که مقاومت به ونکومایسین و تیکوپلانین در بین نمونه‌ها ١٦ و ١٢ درصد بوده است و از میان نمونه‌های مقاوم، ٤ نمونه دارای ژن vanA و فاقد ژن vanB بودند. هر چهار نمونه را *انتروکوک فاسیوم* تشکیل می‌دادند(٦) که بر طبق آزمون مقایسه‌ای کای اسکور نتایج آن با نتایج بدست آمده در این تحقیق قرابت دارد.. چندین بررسی نشان داده است که استفاده از داروهایی مثل avoparcin در مراکز پرورش حیوانات اهلی به عنوان تحریک کننده رشد در افزایش VRE ها در حیوانات، محیط و انسان دخالت دارد(۱۲) .

گسترش مقاومت به گلیکوپپتیدها مثل ونکومایسین و تیکوپلانین انتخابهای دارویی و درمانی را محدود کرده است زیرا چگونگی درمان جایگزین در ایران پیشرفتی نداشته است و خطر مضاعف انتقال ژنهای مقاومت به سایر باکتریها مانند استافیلوکوک می‌باشد. برای اینکه شیوع VRE محدود گردد باید استفاده از دارو چه در زمینه‌های حیوانی و چه انسانی با احتیاط باشد و نیز یک کنترل دائمی در مورد شیوع گونه‌های انتروکوک مقاوم به گلیکوپپتیدها در محیط‌های بیمارستانی ضروری است.

فهرست مراجع:

1. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin resistance Enterococci. *Clin Microbial Rev*. 2000, 13:686-707.
2. Saeed AK, Mohamad SN, Ashraf AK, et al. Selective isolation of multi drug resistant *Entrococcus spp*. from poultry and dairy farms: Detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular Cellular Probes*. 2005, 19:27-34.
3. Maria DA, Citron DM, K wok R. Evaluation of the velogene genomic assay for detection of vanA and vanB gene in vancomycin resistant Enterococcus Species. *J Clin Microbial*. 2004, 42:1751-1752.
4. Murray B.E, Vancomycin resistant Enterococcal infections. *New Eng J Med*. 2000.32:557-567.
5. Facklam RR, Collin ND. Identification of Entrococcus species isolated from human infection by a conventional test scheme. *J Clin Microbial*. 1989, 27(4):731-734.
6. Jaewook Y, Dokyung L, et al, Occurrence of the Van Genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Clinical Isolates in Korea. *Arch Pharm Res*. 2007 30(3):329-336.
7. Mendez-Alvarez S, Perez-Hernandez X, Claverie-Martın F. Glycopeptide resistance in Enterococci. *Int Microbiol*. 2000, 3:71–80
8. Huycke MM, Sham DF, Gilmore MS. Multidrug resistant Entrococci: The nature of problem and an agenda for the future. *Emerge Infect Dis*. 2002, 4:239-249.
9. Kim JM and Song YG. Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections in Korea. *Yonsei Med J*.1998, 39: 562-568.
10. Aarestrup E M, Agerso Y, et al. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000, 37:127-137.
11.Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S,et al, Low prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in clinical samples from hospitalized patients of the Canary Islands, Spain. *Int Microbiol*. 2002, 5: 117–120.
12.Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum A.M , Bager F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis*. (1999), 5:329-335.

Archive of SID

www.SID.ir