pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 2, pp. 135~140 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.2.135

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

서울시내 시판 식육에서 분리한 *Enterococcus faecalis*의 항생제 내성 유형, 다중약물 유출 펌프 유전자 및 병독성 유전자의 분포도 분석

최민경 · 최성숙*
삼육대학교 약학대학

Analysis of Antimicrobial Resistance Pattern and Distribution of Multi-drug Efflux Pump Genes and Virulence Genes in *Enterococcus faecalis* Isolated from Retail Meat in Seoul

MinKyung Choi and SungSook Choi*
College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul, Korea
(Received November 21, 2016/Revised January 5, 2017/Accepted February 7, 2017)

ABSTRACT - The aim of this study was to investigate the distribution of genes that encode multi-drug efflux pumps and virulence factors in *Enterococcus faecalis* isolated from retail meat and antibiotic resistance patterns of these strains. Of the 277 retail meat samples, 93 *Enterococcus faecalis* were isolated. The strains exhibited resistance to ampicillin (35.5%), chloramphenicol (6.4%), ciprofloxacin (4.3%), erythromycin (18.3%), levofloxacin (0%), quinupristin-dalfopristin (76.3%), tetracycline (45.2%), teicoplanin (0%) and vancomycin (0%). The strains were positive for MFS type *eme*(A) (100%), ABC type *efr*(A) (100%), ABC type *efr*(B) (98.9%) and ABC type *lsa* (91.4%) efflux pump gene. The strains were positive for *gelE* (68.8%), *ace* (90.3%), *asa*1 (47.3%), *efaA* (91.4%) and *esp* (12.9%) virulence gene. This research will help to assess the hazards associated with the occurrence of drug resistance among enterococci from retail meat. Therefore, it is necessary to monitor *enterococcus* spp. isolated from retail meat continuously.

Key words : Multidrug efflux pump gene, Virulence gene, *Enterococcus faecalis,* Antibiotic resistance, Retail meat sample

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*)는 그람 양성세균으로 사람과 동물에 존재하는 정상 세균군 무리의 일종으로 보통 사람과 동물의 장관, 채소, 육류 및 축산식품 등에서 쉽게 검출되는 균이다[1,2]. *E. faecalis*는 면역력이 정상인 건강한 사람에게는 질병의 위험이 없으나 면역성이 약한 만성 질환자의 경우 수술 후 원내 감염, 비뇨기 감염 및 균혈증의 주요 원인 균으로 알려지기 시작하였다[3]. 또한 *E. faecalis*가 동물성 식품에 존재한다는 것은 분변오염의 지표가 되며 식품의 보존 기간에 영향을 주는 위생학적 요인이 되기도 한다[4,5]. *E. faecalis*는 여러 항생제에 본태성 내성을 나타내며 감수성 항생제에 대해서도 쉽게 내성을 획득하는 경우가 많아 장알균 감염치료의 어려움이 되고 있다[3]. 이러한 문제는 임상영역에서뿐 아니라 축산분야에서도 가축 질병 치료의 어려움이 되고 있으며, 축산 식품을 통한 내성균 또는 내성유전자의 사람에게로의 전달 가능성이 제기되며 공중보건학적으로 중요하게 대두되고 있다[6]. 최근의 연구에 따르면 *E. faecalis*는 항생제 내성 유전자와 병독인자를 획득 또는 전달하는 능력이 뛰어난 세균으로 알려졌다[7-9]. 세균이 항생제에 내성을 나타내는 기전은 1)항생제의 불활성화 2)약물의 표적 부위의 변화 3)세포내 투과도 변화에 의한 약물의 세포내 농도 감소 4) 약물의 능동적 유출 등으로 분류할 수 있다[10]. 특히 다제내성균(multi-drug resistant bacteria)에 의한 항생제 내성 문제가 심각한 현실에서 항생제 내성인자중 하나인 능동적 약물 유출에 관여하는 펌프의 중요성은 점점 증가하고 있다. 이러한 펌프는 항생제의 종류에 상관없이 다양한 항생제, 살균제 및 각종 중금속과 같은 독성 물질들도 동시에 유출시키며 따라서 한번도 노출된 적이 없는 서로 다른 계열의 항생제를 유출할 수 있어 동시에 여러 항생제에 내성을 나타내도록 한다[11,12]. 세균에서 알려진 다중약

*Correspondence to: SungSook Choi, College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 01795, Korea
Tel: 82-2-3399-1606, Fax: 82-2-3399-1617
E-mail: sschoi@syu.ac.kr

물 유출 펌프(multi-drug efflux pump)는 다음의 다섯 가지로 구분할 수 있다: 1) ATP binding cassette (ABC) superfamily[13], 2) major facilitator superfamily (MFS)[14], 3) small multi-drug resistance (SMR) superfamily[15], 4) multi-drug and toxic compound extrusion (MATE) superfamily[16], 5) resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily[17]. 이중 그람양성세균인 *E. faecalis*는 ABC 타입의 EfrAB, Lsa와 MFS 타입의 EmeA를 보유한 것으로 보고되었다[18]. 최근 연구에 따르면 임상분리균이 아닌 축산식품 유래 *E. faecalis*에서 항생제 내성에 관여하는 다중약물 유출 펌프 유전자와 병독인자(virulence factor)가 존재함을 확인하는 보고들이 있다[18,19]. 이러한 현상은 축산업 현장에서 동물성 의약품으로 사용되는 항생제를 사용한 결과로 해석되며 따라서 본 연구에서는 서울시내에서 시판되고 있는 식육(소고기, 돼지고기 및 닭고기)을 대상으로 *E. faecalis*을 분리하고 이들의 주요 항생제에 대한 내성 패턴, 다중약물 유출 펌프 유전자와 병독성인자 유전자를 분석하였다.

Materials and Methods

식육 시료의 수집 및 장알균속 세균의 분리

2014년 5월부터 2015년 1월까지 시료의 다양성을 고려하여 서울시내 25개 행정자치구에 위치한 대형마트, 재래시장 및 백화점 등에서 소고기 시료 142개, 돼지고기 시료 106개 및 닭고기 시료 29개 등 총 277개의 식육시료를 구입하여 실험에 사용하였으며 구입 후 즉시 냉장 운반하여 균 분리를 위한 실험을 수행하였다. 동일 상표 식육제품의 경우는 지리적으로 다른 곳이라도 중복 사용하지 않는 것을 원칙으로 하였다. 균의 분리는 각 식육 1 g에 증균 배지인 EC broth (Oxoid, Cambridge, UK) 9 mL을 가하여 37°C에서 15~18시간 배양 후 이 배양액을 Enterococosel agar (Difco, Sparks, MD, USA)에 0.1 mL을

Table 1. Sequences of primers used for this study

Genes		Sequences (5 → 3)	Amplicon (bp)	Annealing Temp. (°C)
Enterococci sp. identification	*ddl* $_{E.\ faecalis}$	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	941	48
	ddl $_{E.\ faecium}$	TAGAGACATTGAAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	550	48
	vanC1	GGATACAAGGAAACCTG CTTCCGCCATCATAGCT	822	50
	vanC2/C3	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	439	50
	ITS	CAAGGCATCCACCGT GAAGTCGTAACAAGG	various	50
efflux pump gene	*eme*(A)	AGCCCAAGCGAAAAGCGGTTT CCATCGCTTTCGGACGTTCA	123	55
	efr(A)	GTCTGTTTCGTTTAATGGCAGCAGCC CGAATAGCTGGTTCATGTCTAAGGC	258	57
	efr(B)	ATGTTCTTAATCAATCCGCTGATGGC CATAGTAACTACCAAGGACAGCTACCC	345	57
	lsa	GTGACTTCTTTTGAACAGTGGGA TTCAGCCACTTGTTGTCTGCC	232	55
virulence gene	*gelE*	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGAGTGCACCCGAAATAATATA	212	48
	ace	GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	1,007	48
	*asa*1	CCAGCCAACTATGGCGGAATC CCTGTCGCAAGATCGACTGTA	529	55
	efaA	GCCAATTGGGACAGACCCTC CGCCTTCTGTTCCTTCTTTGGC	688	55
	esp	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	954	55

도말 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 형성된 집락 중 장구균 특유의 집락을 순수 배양하여 균주 동정에 사용하였다.

*E. faecalis*의 유전자 분리

*E. faecalis*의 genomic DNA는 GeneAll Cell SV kit (진올바이오테크놀로지, 서울, 대한민국)을 이용하여 분리하였으며 균의 세포벽의 분해를 용이하게 하기 위하여 lysozyme (30 mg/mL, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하였다.

*E. faecalis*의 동정

순수 분리한 장알균속 세균을 그람 염색, 생화학적 성상시험을 실시한 후 장알균 동정에 사용하는 *ddl* primer를 사용하여 PCR 법으로 동정하였다[20]. 본 실험에 사용한 동정용 primer 염기서열은 Table 1에 나타내었으며 *E. faecalis ddl* primer에 반응한 균주만 선택하여 다음 실험을 진행하였다. 양성 대조균으로는 *E. faecalis* ATCC29212 균주를 사용하였다.

항생제 감수성 검사

식육식료에서 분리한 93균주의 *E. faecalis*을 대상으로 ampicillin, chloramphenicol (Sigma Co. St. Louis, MO, USA), ciprofloxacin (Korea United Pharm Inc., Seoul, Korea), erythromycin (Sigma Co. St. Louis, MO, USA), levofloxacin (KukJe Pharm. Corp, Seongnam, Korea), quinupristin-dalfopristin (Handok, Seoul, Korea), tetracycline, teicoplanin 및 vancomycin (Sigma Co. St. Louis, MO, USA)에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 감수성 검사는 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, Wayne, PA, USA)의 고체배지 희석법으로 실시하였으며[21], Muller-Hinton (Difco, Detroit, MI, USA) 배지를 사용하였고 정도관리를 위한 표준균으로는 *E. faecalis* ATCC29212를 사용하였다. 본 실험에 사용한 항생물질은 최고 농도를 64 μg/mL로 하고 2배 계열 희석하여 최저 농도가 0.03 μg/mL 되도록 항생물질 희석계열을 만들었다. 여기에 하룻밤 전 배양한 균액을 10^7 CFU/mL되도록 희석한 후 5 μL 씩 항생제 배지에 접종하여 배양하고 균주의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 항생제의 농도를 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)로 결정하였다.

다중약물 유출 펌프 유전자 및 병독성 유전자의 검출

다중약물 유출 펌프 유전자 후보군으로는 *eme*(A), *efr*(A), *efr*(B) 및 *lsa*를 대상으로 하였다. 병독성 유전자 후보군으로는 *gelE*, *ace*, *asa*1, *efaA* 및 *esp*를 대상으로 하였다. 유전자의 검출은 gene specific PCR 반응을 실시하였으며 primer는 Genotech (제노텍, 대전, 대한민국)에서 제작하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 primer의 염기서열과 반응조건을 Table 1에 나타내었다. PCR반응은 AccuPower™ premix (바이오니아, 대전, 대한민국)를 사용하여 95°C, 5분간 denaturation 후 95°C, 30초, Table 1에 표시된 annealing 조건에서 30초, 72°C, 1분간 extension반응을 30회 반복 후 마지막 72°C, 7분간 elongation 하였다.

다중약물 유출 펌프 및 병독성 유전자의 DNA염기서열 분석

PCR 반응으로 증폭한 DNA 절편이 해당 약물 유출 펌프 및 병독성 유전자인지 확인하기 위하여 DNA 염기서열을 확인하였다. PCR 반응 후 전기영동을 실시하여 해당 크기의 DNA 절편을 agarose gel에서 잘라낸 후 GeneAll PCR purificaiotn kit(진올바이오테그놀로지, 서울, 대한민

Table 2. MIC values against *Enterococci faecalis* isolated from retail meat

Abs	Number of isolates with MIC (μg/mL)													MIC range (μg/mL)			Interpretation (%)		
	≦0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	range	MIC_{50}	MIC_{90}	S	I	R
AMP	0	0	0	0	4	12	26	5	13	21	4	5	3	0.5~>64	4	32	64.5	-	35.5
CAM	3	0	0	0	1	1	2	72	6	2	1	5	0	≦0.03~64	4	16	91.4	2.2	6.4
CIP	0	0	0	0	20	47	22	3	1	0	0	0	0	0.5~8	1	2	72.0	23.7	4.3
EM	5	0	2	9	9	16	28	7	1	0	1	0	15	≦0.03~>64	2	>64	26.9	54.8	18.3
LEV	0	0	0	0	19	56	13	5	0	0	0	0	0	0.5~4	1	2	94.6	5.4	0
QD	0	0	0	2	11	5	4	31	40	0	0	0	0	0.25~8	4	8	19.4	4.3	76.3
TC	1	0	0	11	9	14	16	0	0	2	5	5	30	≦0.03~>64	2	>64	54.8	0	45.2
TEI	1	0	0	33	44	8	4	3	0	0	0	0	0	≦0.03~4	0.5	1	100	0	0
VAN	0	0	0	0	2	54	12	23	0	2	0	0	0	0.5~16	1	4	97.8	2.2	0

AMP: ampicillin, CAM: chloramphenicolm, CIP: ciprofloxacin. EM: erythromycin, LEV: levofloxacin, QD: quinupristin-dalfopristin, TC: tetracycline, TEI: teicoplanin, VAN: vancomycin, MIC_{50} and MIC_{90}: the minimum concentrations of antibiotics required to inhibit 50% and 90% of the tested isolates.

S: sensitive, I: intermediate, R: resistant (Interpreations are based on CLSI guide line).

Table 3. Distribution of multidrug efflux pump genes and virulence genes in *Enterococci faecalis* isolated from retail meat

Genes		No. of isolates (%)
Multi-drug efflux pump genes	*eme*(A)	93 (100)
	efr(A)	93 (100)
	efr(B)	92 (98.9)
	lsa	85 (91.4)
	tet(K)	19 (20.4)
	tet(L)	1 (1.1)
virulence genes	*gelE*	64 (68.8)
	ace	84 (90.3)
	*asa*1	44 (47.3)
	efaA	85 (91.4)
	esp	12 (12.9)

Table 4. Frequency of different virulence genes in *E. faecalis* isolated from retail meat

No. of genes	No. of isolates	Virulence genes					%	
		gelE	*ace*	*asa*1	*efaA*	*esp*	each	total
1	0	+		+		+	0	3.3
	1		+				1.1	
	2				+		2.2	
2	1	+	+				1.1	20.5
	3	+			+		3.2	
	1		+	+			1.1	
	14		+		+		15.1	
3	5	+	+	+			5.4	42.0
	21	+	+		+		22.6	
	3	+		+	+		3.2	
	9		+	+	+		9.7	
	1		+		+	+	1.1	
4	23	+	+	+	+		24.7	33.4
	1	+		+	+	+	1.1	
	6	+	+		+	+	6.5	
	1		+	+	+	+	1.1	
5	1	+	+	+	+	+	1.1	1.1

국)을 이용해 agarose gel에서 DNA를 추출, 정제 후 Genotech(제노텍, 대전, 대한민국)에 의뢰 하여 염기서열을 결정 후 미국국립의학도서관(PubMed)에서 제공하는 염기서열분석(Nucleotide Blast)을 사용하여 동질성을 확인하였다.

Results

시판 식육시료에서 분리한 장알균속 세균의 분포 및 동정

총 277개의 식육 시료에서 93개의 *E. faecalis*을 분리하였다. 이중 48균주는 소고기, 6균주는 닭고기, 39균주는 돼지고기에서 분리되었다.

*E. faecalis*의 항생제 감수성 유형

식육시료에서 분리한 *E. faecalis*의 항생제 내성을 조사한 결과 ampicillin은 35.5%, chloramphenicol은 6.4%, ciprofloxacin은 4.3%, erythromycin은 18.3%, levofloxacin은 0%, quinupristin-dalfospristin은 76.3%, tetracycline은 45.2%, teicoplanin은 0%, vancomycin은 0%의 내성 양상을 나타내었다(Table 2).

다중약물 유출 펌프 유전자 및 병독성 유전자의 분포

다중약물 유출펌프 유전자인 *eme*(A) 및 *efr*(A)는 총 93개의 *E. faecalis*균주 중 93 균주(100%)가 보유하고 있음을 알 수 있었으며 병독성 유전자의 경우 *efaA* 유전자는 전체균주의 91.4%, *ace* 유전자는 전체균주의 90.3%, *gelE* 유전자는 전제균주의 68.8% 에 분포하고 있었다(Table 3). 각 균주별로 병독성 유전자를 2개 이상 보유하는 비율을 확인한 결과 1균주가 5개 유전자를 모두 보유하고 있었으며, 31균주가 4개 유전자, 39균주가 3개의 유전자, 19균주가 2개의 유전자를 가지고 있었으며, 1개의 유전자만을 가지고 있는 균주는 3균주에 불과 하였다(Table 4).

Discussion

*E. faecalis*는 그람 양성의 정상 정상세균군으로 사람과 동물의 장관, 채소, 육류 및 낙농제품 등 환경중에서 쉽게 검출되는 균이다[1,2]. 축산 식품에 존재하는 *E. faecalis*가 과거 감수성이었던 항생제에 대한 내성이 증가하는 것은 이 세균들이 치료나 예방의 목적으로 사용한 동물성 의약품중 항생제에 노출되었을 가능성이 있음을 의미한다[4]. 따라서 본 연구에서는 서울시내 시판 식육 중 존재하는 *E. faecalis*의 항생제 내성, 항생제 내성 유전자 및 병독성 유전자의 분포를 분석하였다. 분리된 *E. faecalis*은 검사 항생제중 quinupristin-dalfoprisitn (76.3%) 및 tetracycline (45.2%)에 대한 내성 비율이 높게 나타났으며 이러한 결과는 다른 국내, 외 다른 연구 결과와도 유사한 경향을 보이고 있음을 알 수 있었다(Table 2)[22-25]. *E. faecalis*은 여러 항생제에 본태성 내성을 나타내며 감수성 항생제에 대해서도 쉽게 내성을 획득하는 경우가 많아 장알균 감염치료의 어려움이 되고 있다[5]. 최근 연구에 따르면 *E. faecalis*은 항생제 내성 유전자와 병독인자를 획득 또는 전달하는 능력이 뛰어난 세균으로 보고되고 있다[7-9]. *E. faecalis*에서 알려진 대표적인 다중약물 유출 펌프인 EmeA는 MFS 계열에 속하는 펌프로 각종 항생제와 염화벤잘코니움등의 살균소독제 내성에 관여하고 있음이 알려져 있다[26]. 본 실험에 사용한 전체 *E. faecalis*중 100%에 *eme*(A) 유전자가 분포하고 있었다. *eme*A는 원래 *E. faecalis*에 존재하는 MFS 타입의 약물 유출 펌프로 식육에서 분리된 모든 균에서 본유전자가 검출 되었다. 한편 ABC 타입의 다중약

물 유출 펌프인 *lsa, efr*(A) 및 *efr*(B) 유전자의 분포는 *lsa*의 경우 85균주(91.4%) 에서 관찰되었다. Singh 등[27]의 보고에 따르면 환자에게서 분리된 장알균을 대상으로 한 연구 결과 *E. faecalis* 균은 100%가 *lsa*유전자를 보유하고 있었으며 이 유전자는 특히 quinupristin/dalfopristine (QD)에 대한 내성과 관계됨을 보고하였다. 본 연구 결과 QD에 대한 내성률이 높은 것도 *lsa*유전자 분포와 밀접한 연관이 있는 것으로 사료된다[28]. 가장 최근에 알려진 새로운 ABC 타입의 유출 펌프인 EfrAB 펌프 유전자인 *efr*(A)는 100%에 해당하는 93균주에서, *efr*(B)는 92균주에서(98.9%) 관찰되었다. *E. faecalis*에 존재하는 *efr*(A)와 *efr*(B) 유전자 분포를 보고한 Sanchez 등[29]의 연구에 따르면 *E. faecalis*에서는 96%, *E. faecium*에서는 13%의 균에 본 유전자가 분포한다고 보고하고 있어 본 연구 결과와도 유사함을 알 수 있었다. *E. faecalis* 의 병독성인자 관련 유전자의 분포를 분석한 결과 젤라틴 분해효소 *gelE* 유전자는 64균주(68.8%), 부착인자인 *ace* 유전자는 84균주(90.3%), 응집인자인 *asa*1 유전자는 44균주(47.3%), 심내막염 항원인자인 *efaA* 유전자는 85균주(91.4%) 및 장알균 표면 단백질인자인 *esp* 유전자는 12균주(12.9%)에 분포하였다. 최근 보고된 연구 결과에 따르면 임상분리 균주의 경우 96.9%에서 *ace* 유전자가 존재한다는 보고가 있었으며[30], 축산식품인 돼지에서 분리된 균주에서 *gelE* 유전자는 65.2%, *ace* 유전자는 48.7%, *asa*1 유전자는 7.7%, *efaA* 유전자는 15.4% 및 *esp* 유전자는 6.8% 존재하였고[31]. 소에서 착유한 원유 시료에서 분리한 균의 경우 *gelE* 유전자는 75%, *asa*1 유전자는 100%, *esp* 유전자는 13.3% 존재하였다[32]. 또한 대부분의 경우 병독성인자는 한개 이상을 가지고 있는 것으로 보고되고 있는데[32] 본 연구에서도 5개 모두 보유한 균이 1균주, 4개 보유한 균이 31균주, 3개 보유한 균이 39균주, 2개 보유한 균이 19균주로 확인되었다(Table 4). 따라서 우리나라 식육시료에서 분리한 *E. faecalis*에 존재하는 병독성인자 관련 유전자의 분포도는 기존 외국의 사례와 유사한 것으로 확인되었다. 본 연구는 우리나라의 시판 식육에서 분리한 장알균속 세균에서 다중약물 유출 펌프 유전자의 분포비율 및 병독성인자 유전자의 분포에 관한 첫 보고라 사료되며 추후에도 지속적인 모니터링이 필요한 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2016년 삼육대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 것으로 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 서울시내에서 시판중인 식육에서 *E. faecalis*를 분리하고 이 균들의 항생제 내성 패턴, 항생제 유출 펌프 유전자 및 병독성 유전자의 분포를 분석하였다. 총 277개의 식육시료에서 93균주의 *E. faecalis* 를 분리하였다. 이 균주들의 항생제 내성비율은 ampicillin에는 35.5%, chloramphenicol에 6.4%, ciprofloxacin에 4.3%, eryhtromycin에 18.3%, quinupristin-dalfopristin에 76.3%, tetracycline에 45.2%의 내성이었으며 levofloxacin, teiconplanin 및 vancomycin에는 모든 균이 감수성이었다. 약물 유출펌프인 MFS 타입의 *eme*(A)와 ABC 타입의 *efr*(A)유전자는 모든 균주(100%)에서 확인되었으며 *efr*(B)는 98.9%, lsa는 91.4%의 균주에서 확인되었다. 병독성 인자인 *gel*(E)는 68.8%, *ace*는 90.3%, *asa*1는 47.3%, *efaA*는 91.4%, *esp*는 12.9%의 균주에서 확인되었다. 본 연구는 시판 식육에서 분리한 지표 미생물의 하나인 *E. faecalis*의 항생제 내성, 약물유출 펌프 및 병독서 유전자의 분포를 분석한 연구로 지속적인 모니터링을 하여야 할 것으로 사료된다.

References

1. Devriese, L.A., Collins, M.D., Wirth, R.: The genus Enterococcus. 2nd edn., vol. 2, Springer-Verlag. NewYork. pp. 1465-1478 (1992).
2. Flahaut, S., Boutibonnes, P., Auffray, Y.: Les enterocoques dans I'environnement proche de I'homme. *Canad. J. Microbio*., **43**, 699-708 (1997).
3. Malani, P.N., Kauffman, C.A., Zervos, M.J.: Enterococcal disease, epidemiology and treatment. In: Gilmore, M. S. (Ed.) The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antimicrobtiotic resistance. Amercan Society for Mcirobiology. Washington, DC pp. 385-408 (2002).
4. Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T.: A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J. Appl. Microbiol.,* **89**, 267-274 (2000).
5. Klein, G., Pack, A., Reuter, G.: Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol*., **64**, 1825-1830 (1998).
6. OIE. European Scientific Conference. The use of antibiotics in animal ensuring the protection of public health. pp. 8-142 (2001).
7. Klibi, N., Gharbi, S., Masmoudi, A., Ben Slama, K., Poeta, P., Zarazaga, M., Fendri, C., Boudabous, A., Torres, C.: Antibiotic resistance and mechanisms implicated in clinical enterococci in a Tunisian hospital. *J. Chemother*., **18**, 20-26 (2006).
8. Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A., Lo Nostro, A.: Prevalence and antibiotic resistance of Enterococcus spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiol*., **41**, 1-7 (2014).
9. Silva, N., Igrejas, G., Figueiredo, N., Gonçalves, A., Radh-

ouani, H., Rodrigues, J., Poeta, P.: Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (Oryctolagus cuniculus). *Sci. Total Environ.,* **408**, 4871-4876 (2010).
10. Putman, M., Veen, van H.W., Konings, W.N.: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 672-693 (2000).
11. Levy, S.B.: Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.,* **36**, 695-703 (2002).
12. Saier, M.H.Jr, Tam, R., Reizer, A., Reizer, J.: Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol*., **11**, 841-847 (1994).
13. Lubelski, J., Konings, W.N., Driessen, A.J.: Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 463-476 (2007).
14. Pao, S.S., Paulsen, I.T., Saier, M.H.Jr.: Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1-34 (1998).
15. Jack, D.L., Yang, N.M., Saier, M.H.Jr.: The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem*., **268**, 3620-3639 (2001).
16. Kuroda, T., Tsuchiya, T.: Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta*., **1794**, 763-768 (2009).
17. Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J.: The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*., **1**, 107-125 (1999).
18. Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P.: Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbio. Rev.*, **20**, 79-114 (2007).
19. Gaglio, R., Couto, N., Marques, C., de Fatima Silva Lopes, M., Moschetti, G., Pomba, C., Settanni, L.: Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *Int. J. Food Microbiol.,* **236**, 107-114 (2016).
20. Brtkova, A., Filipova, M., Drahovska, H., Bujdakova, H.: Characterization of enterococci of animal and environmental origin using phenotypic methods and comparison with PCR based methods *Veterinarni. Medicina.,* **55**, 97-105 (2010).
21. CLSI.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. ASM press, Washington D.C., USA. (2007).
22. Jeong, S.H., Lim, S.K., Lee, H.S., Jeong, B.Y., Lee, J.Y., Yang, C.B., Shin, H.C.: The present situation of antibiotics used in animal and resistant bacteria. *Infect. Chemother.*, **40**, Suppl. 2, 144-149 (2008).
23. Kwon, Y.I., Kim, T.W., Kim, H.Y., Chang, Y.H., Kwak, H.S., Woo, G.I., Chung, Y.H.: Monitoring of antimicrobial resistant bacteria from animal farm environments in Korea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*., **35**, 17-25 (2007).
24. Nam, H.M., Lim, S.K., Moon, J.S., Kang, H.M., Kim, J.M., Jang, K.C., Kim, J.M., Kang, M.I., Joo, Y.S., Jung, S.C.: Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *Zoonoses Public Health*, **57**, e59-64 (2009).
25. Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè I., Sechi, L.A.: Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.,* **88**, 291-304 (2003).
26. Jonas, B.M., Murray, B.E., Weinstock, G.M.: Characterization of *emeA*, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 3574-3579 (2001).
27. Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E.: An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1845-1850 (2002).
28. Arias, C.A., Contreras, G.A., Murray, B.E.: Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin. Microbiol. Infect*., **16**, 555-562 (2010).
29. Sánchez, V.A., Lavilla, L.L., Benomar, N., Gálvez, A., Pérez P.R., Abriouel H.: Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne Pathog. Dis*., **10**, 143-149 (2013).
30. Lysakowska, M.E., Denys, A., Sienkiewicz, M.: Frequency of *ace, epa* and *elrA* Genes in clinical and environmental strains of *Enterococcus faecalis. Indian J. Microbiol*., **52**, 612-616 (2012).
31. Zou, L.K., Wang, H.N., Zeng, B., Li, J.N., Li, X.T., Zhang, A.Y., Zhou, Y.S., Yang, X., Xu, C.W., Xia, Q.Q.: Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiol.,* **34**, 73-80 (2011)
32. Wu, X., Hou, S., Zhang, Q., Ma, Y., Zhang, Y., Kan, W., Zhao, X.: Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows. *J. Vet. Med. Sci*., **78**, 1663-1668, (2016).