

닭 분변유래 *Enterococcus* spp.의 Fluoroquinolone계 내성관련 *gyrA* 및 *parC* Gene의 변이

대구광역시 보건환경연구원¹, 경북대학교 수의과대학², 국립수의과학검역원³

조재근¹ · 김기석² · 이영주^{2*} · 박청규² · 곽동미² · 김애란³
강민수³ · 김종원³ · 김병한³ · 구복경³

Alteration in *gyrA* and *parC* Gene Associated with Fluoroquinolone Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from Feces of Chicken

Jae-Keun Cho¹, Ki-Seuk Kim², Young-Ju Lee^{2*}, Cheong-Kyu Park², Dong-Mi Kwak²,
Ae-Ran Kim³, Min-Su Kang³, Jong-Wan Kim³, Byoung-Han Kim³ and Bok-Kyung Ku³

¹Daegu Metropolitan City Research Institute of Health & Environment, Daegu, 706-732, Korea,

²College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea,

³National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, 430-824, Korea

Received : May 4, 2006

Accepted : June 15, 2006

The purpose of this study was to investigate the fluoroquinolone resistance frequency of *Enterococcus* spp. from normal chicken feces and to analyse mutations of the *gyrA* and *parC* gene associated with fluoroquinolone resistance. Among 52 *Enterococcus faecalis* and 25 *E. faecium* isolates, 23 (44.2%) *E. faecalis* and 7 (28.0%) *E. faecium* were resistant to ciprofloxacin (CIP) by disc diffusion method. Genetic exchange in *gyrA* and *parC* gene among 2 CIP intermediate isolates and 15 CIP resistant isolates were found in the amino acid codon of Ser-83 and Asp-87, and Ser-80 and Glu-84, respectively. These mutants contained a change from Ser to Phe, Val, Tyr, Ile, Thr or Pro at codon 83 and from Glu to Gly or Leu at codon 87 in *gyrA* gene, and a change from Ser to Ile or Thr at codon 80 and from Glu to Asp or Lys at codon 84 in *parC* gene. The isolates with mutation in *gyrA* regardless of a mutation in *parC* showed high resistance (MIC ≥ 32 μ g/ml) to CIP, enrofloxacin, norfloxacin and ofloxacin. These results suggested that *gyrA* gene is the primary target for 4 fluoroquinolones resistance in *Enterococcus* spp.

Key Words: *Enterococcus*, fluoroquinolone, *gyrA*, *parC*

서 론

Fluoroquinolone계 항균제는 1980년대말 이후 의학 및 수의학분야에 도입되어 현재까지 널리 사용되고 있는 광범위 합성항균제이다. 이들 약제는 경구투여가 가능하고 *Escherichia coli*를 포함한 그람음성균뿐만 아니라 *Staphylococcus*

aureus 등의 그람양성균에 대해서도 강력한 항균력을 가지는 장점 때문에 여러 세균 감염증의 치료를 위해 널리 사용하고 있다 (13). 국내에서도 닭대장균증 및 소설사병 치료를 위하여 1990년대에 도입되었으며, 최근에는 가축유래 *E. coli*, *Campylobacter jejuni* 및 *Salmonella* spp. 등에서 fluoroquinolone 내성균 출현이 증가하고 있음이 보고된 바 있다 (3,4,8,11).

Quinolone은 주로 세균의 DNA 합성에 필요한 효소인 DNA gyrase (topoisomerase II) 또는 topoisomerase IV의 작용을 억제하여 DNA 복제를 저해함으로써 항균작용을 나타내며, DNA gyrase는 *gyrA* 및 *gyrB* subunit로, topoisomerase IV는

*교신저자: 이영주. 702-701, 대구광역시 북구 산격동 1370번지,
경북대학교 수의과대학
Phone: 82-53-950-7793, Fax: 82-505-950-7793,
e-mail: youngju@mail.knu.ac.kr

parC 및 *parE* subunit로 구성되어 있다 (12,15). 특히, fluoroquinolone계 항균제에 대한 내성은 *gyrA* 또는 *parC* 유전자의 돌연변이와 관련된다고 알려져 있으며, *gyrA* 유전자의 67번부터 106번은 *E. coli*와 동일하게 quinolone resistance determining region (QRDR)으로 알려져 fluoroquinolone의 내성 형성에 중요한 역할을 하고 있다 (9,10,19,21,26).

Enterococcus spp.는 사람과 동물의 장관내에 서식하는 정상세균총으로 식품위생상 분변오염의 지표세균으로 간주되고 있으며, 사람에서는 심내막염, 균혈증, 요로감염 및 수막염과 같은 원내감염의 중요한 병원체로 알려져 있다 (17,18). 또한 최근 들어서는 vancomycin에 내성을 형성한 *Enterococcus* spp.가 사회적 문제로 대두되고 있는 등, 이들 균종에 대한 항생제 내성 획득에 대한 우려가 커지고 있는 실정이다.

본 연구의 목적은 국내 양계분야에서 최근 많이 사용되고 있는 fluoroquinolone계 항균제에 대한 내성경향을 파악하기 위하여 닭의 정상 분변으로부터 분리한 *Enterococcus* spp.의 fluoroquinolone계 항균제에 대한 내성과 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 QRDR에서의 돌연변이 양상을 분석함으로써 그 특성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 균분리

2003년 3월부터 11월까지 국내 6개 육계농장 및 4개 종계농장을 대상으로 균분리를 실시하였다. 각각의 농장별로 계사바닥에 떨어져 있는 신선한 분변 5 g을 하나의 시료로 하여 멸균 시험관에 담았으며, 각 농장별로 10개의 시료를 채취하여 즉시 실험실로 냉장 운반하여 *Enterococcus* spp.의 분리를 실시하였다. *Enterococcus* spp.의 동정은 Enterococcal agar상에 나타난 검은색 집락에 대하여 Lleo 등 (6) 및 Cheng 등 (5)이 보고한 PCR법을 이용하여 *E. faecalis*와 *E. faecium*로 최종 확인하였다.

2. 항균제 감수성 검사

Enterococcus spp. 분리주 77주에 대하여 ciprofloxacin (CIP)의 sensi disk (BBL, Becton-Dickinson, USA)을 이용한 디스크

확산법을 실시하였으며, 또한 CIP, enrofloxacin (ENO), norfloxacin (NOR) 및 ofloxacin (OF)에 대한 minimal inhibitory concentration (MIC) 측정을 E test (AB Biodisk, Solna, Sweden)를 이용하여 실시하였다. 즉, Mueller hinton broth에 35℃에서 2~6시간 배양한 균액을 McFarland No. 0.5로 조정하여 멸균된 면봉으로 mueller hinton agar에 도말하고 gradient strip을 항균제의 저농도 표시가 있는 쪽부터 배지표면 위에 올려놓은 후, 35℃에서 16~18시간 배양하였다. 타원형 억제대의 경계가 E test strip의 눈금과 만나는 교차점을 MIC로 판정하였다.

3. DNA 추출

Chromosomal DNA의 추출은 Pitout 등 (23)의 방법에 준하여 boiling법으로 실시하였다. 즉, 공시균을 5 ml LB broth (Difco, Detroit, USA)에 접종하고 37℃에서 20시간 진탕배양한 후, 배양액 1.5 ml을 eppendorf tube에 취하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였으며 상층액을 제거 후 500 µl 멸균 증류수로 재부유시켰다. 이를 95℃에서 10분간 열처리하고 13,000 rpm에서 5분간 재원심분리하였으며 상층액을 -4℃에서 보관하면서 PCR에 사용하였다.

4. *gyrA* 및 *parC* 유전자의 증폭 및 염기서열 분석

Enterococcus spp.의 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 증폭을 위한 primer는 Amin 등 (7)이 보고한 방법에 따라 합성하였다 (Table 1). *Enterococcus* spp.의 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 증폭을 위하여 2.5 U Taq polymerase, 25 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl 및 1.5 mM MgCl₂를 포함하는 AccuPower PCR Premix (Bioneer Co., Korea)에 primer 각각 1 µl씩과 DNA 5 µl를 첨가하고 최종량이 50 µl가 되도록 멸균 증류수를 넣은 후, thermal cycler (Biometra, Germany)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분간 pre-denaturation시킨 후, denaturation (94℃, 1분), annealing (55℃, 1분), extension (72℃, 1분)의 과정을 총 30회 반복 실시하였으며 최종 extension은 72℃에서 10분간 실시하였다. PCR 산물은 1.2% agarose에서 전기영동을 실시한 후, ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색하여 UV transilluminator (Biometra, Germany)에서 특이

Table 1. Primers sequences used for the amplification of *gyrA* and *parC* gene

Target genes	F/R	Primer sequence (5'→3')	Fragment size (bp)
<i>gyrA</i>	Forward	CGGGATGAACGAATTGGGTGTGA	241
	Reverse	AATTTTACTCATACGTGCTTCGG	
<i>parC</i>	Forward	AATGAATAAAGATGGCAATA	191
	Reverse	CGCCATCCATACTTCCGTTG	

band를 확인하였으며, 증폭산물에 대한 염기서열 분석은 (주)Takara사에 의뢰하였다.

결과 및 고찰

E. faecalis 52주 및 *E. faecium* 25주의 CIP에 대한 디스크 확산시험 결과는 Table 2와 같다. *E. faecalis* 및 *E. faecium* 각각 44.2% 및 28.0%가 CIP에 내성을 나타내었으며, 44.2% 및 44.2%는 부분 내성을 나타내었다. Fluoroquinolone계 항균제에 대한 국내분리 병원성 세균의 내성율은 최근에 많이 보고되고 있으며, 특히 *Enterococcus* spp.처럼 분변지표세균인 *E. coli*에 대하여 많이 알려진 바, 송 등 (1)은 2003년 국내 도축장에서 분리한 *E. coli*의 항균제 감수성 결과 소 도체유래 분리주는 모두 감수성을 나타내었으나 돼지 도체유래 *E. coli*의 8.1% 및 닭 도체유래 *E. coli*의 42.3~44.7%가 내성을 보여 특히 닭에서의 내성이 크게 높은 것으로 보고하였다. 이 등 (2) 또한 닭 분변유래 *E. coli*의 57.1~59.2%가 fluoroquinolone계에 내성을 나타냄을 보고한 바 있다. 가축유래 *Enterococcus* spp.에 대한 fluoroquinolone계 내성율은 현재까지 국내에서는 보고된 바가 없어 본 성적과 비교할 수는 없었지만, 동일한 분변지표세균의 하나인 *E. coli*와 비교시 본 성적에서 나타난 *Enterococcus* spp.의 내성 정도는 타당한 것으로 판단되며, 이러한 내성균의 출현은 fluoroquinolone계가 양계분야

에서 치료 및 예방목적으로 광범위하게 사용되었기 때문인 것으로 사료된다.

77주의 *Enterococcus* spp. 중 감수성, 부분 내성 또는 내성을 나타내는 17주의 *E. faecalis* 및 7주의 *E. faecium*에 대하여 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 염기서열을 분석한 결과는 Table 3과 같다. *gyrA* QRDR 유전자의 염기서열 67번부터 106번 사이 중 Ser83과 Glu87번 위치에서 변이가 관찰되었으며, *parC* 유전자에서는 염기서열 67번부터 103번 사이 중 Ser80 및 Glu84번 위치에서 변이가 관찰되었다. CIP에 대한 디스크 확산시험에서 중간 내성을 보인 2주의 *Enterococcus* spp.는 모두 *parC* 유전자에서만 변이가 관찰되었으며, 그 중 1주는 Ser80 및 Glu84 유전자 모두에서 이중변이를 보였다. 또한 CIP에 내성을 보인 15주 중 6주는 *gyrA* 유전자에서만 변이를 보였고, 2주는 *parC* 유전자에서만, 나머지 7주는 *gyrA*와 *parC* 유전자 모두에서 이중변이를 보였다. CIP에 감수성을 보인 1주에서도 *gyrA*의 Ser83 유전자에서 변이가 관찰되었다.

Enterococcus spp.의 fluoroquinolone에 대한 내성유무는 *gyrA* 유전자의 변이와 밀접한 관련이 있다는 보고도 있으나 (16), Kanematsu 등 (14)은 *E. faecalis*와 같은 그람양성균에서는 *parC* 유전자의 변이가 *gyrA* 유전자의 변이에 앞서 일어나며, 아울러 topoisomerase IV가 fluoroquinolone에 대한 내성 형성의 주표적임을 보고하기도 하였다. 그러나 본 연구에서는 내성을 보인 15주 중 6주가 *parC* 유전자의 변이와 무관하게 *gyrA* 유전자에서만 변이만을 보여 Kanematsu 등 (14)의 보고와는 일치하지 않는 것으로 나타났다. Pan과 Fisher (22)는 *Streptococcus pneumoniae*의 fluoroquinolone계에 대한 내성 형성은 제제의 종류에 따라 달라짐을 보고하였던 바, 즉 CIP에 대한 주표적은 *parC* 유전자이나 sarafloxacin의 주표적은 *gyrA* 유전자라고 밝혔고, Onodera 등 (20)은 *E. faecalis*의 levofloxacin에 대한 내성 형성의 주표적 또한 *gyrA*

Table 2. Ciprofloxacin resistance frequency of 52 *E. faecalis* and 25 *E. faecium* isolates from chicken

Isolates	No. (%) of isolates			
	Resistant	Intermediate	Susceptible	Total
<i>E. faecalis</i>	23 (44.2)	23 (44.2)	6 (11.6)	52 (100)
<i>E. faecium</i>	7 (28.0)	12 (44.2)	6 (24.0)	25 (100)

Table 3. Prevalence of mutations within *gyrA* and *parC* genes of 24 *Enterococcus* spp. isolates

Pattern against ciprofloxacin	No. of isolates	No. (%) of mutants in amino acid position						
		<i>gyrA</i>		<i>parC</i>		<i>gyrA/parC</i>		
		Ser83	Glu87	Ser80	Ser80 & Glu84 ^a	Ser83/Ser80 ^b	Ser83/Glu84 ^c	Ser83 & Glu87/Ser80 ^d
Susceptible	7	1 (14.3)						
Intermediate	2			1 (50.0)	1 (50.0)			
Resistant	15	5 (33.3)	1 (6.7)	2 (13.3)		5 (33.3)	1 (6.7)	1 (6.7)
Total	24	6 (25.0)	1 (4.2)	3 (12.5)	1 (4.2)	5 (20.8)	1 (4.2)	1 (4.2)

^a Mutation at Ser80 and Glu84 of *parC* gene.

^c Mutation at Ser83 of *gyrA* and Glu84 of *parC* gene.

^b Mutation at Ser83 of *gyrA* and Ser80 of *parC* gene.

^d Mutation at Ser83 and Glu87 of *gyrA*, and Ser80 of *parC* gene

유전자라고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 내성이 형성된 15주 중 2주는 *parC* 유전자에서만 변이가 일어났으나 13주는 *gyrA* 유전자의 변이를 보여 본 시험에 사용된 4종의 fluoroquinolone 제제에 대한 내성 형성의 주표적은 *gyrA* 유전자가 더 밀접한 것으로 보였다.

24주의 *Enterococcus* spp.에 대하여 fluoroquinolone에 대한 MIC와 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 돌연변이 양상을 비교한 결과는 Table 4와 같다. CIP에 대한 디스크 확산시험 결과에서 감수성이 있는 것으로 나타난 7주의 *Enterococcus* spp. 중 1주

에서 Ser83이 Cys로 변이되었으나, CIP, ENO, NOR 및 OFL에 대한 MIC가 0.75~2 µg/ml로 나타나 본 돌연변이 양상은 fluoroquinolone계의 내성 형성과는 무관한 것으로 판단된다. 또한 부분 내성을 보인 2주는 *parC* 유전자의 Ser80이 모두 Ile로 변이되었으며, 그 중 1주는 Ser80의 변이와 함께 Glu-84가 Asp로 변이되어 이중변이가 관찰되었다. CIP에 대한 디스크 확산시험에서 내성을 보인 15주의 *Enterococcus* spp. 모두 CIP, ENO, NOR 및 OFL에 대하여 12~≥32 µg/ml의 MIC를 나타내었으며, *gyrA* 유전자의 Ser83은 Phe, Val, Tyr,

Table 4. Minimal inhibitory concentration for fluoroquinolones and mutations in the *gyrA* and *parC* genes of 24 *Enterococcus* spp. isolates

Isolates ^a	CIP disc ^b	MIC (µg/ml) ^c				Amino acid at position ^d			
		CIP	ENO	NOR	OFL	<i>gyrA</i>		<i>parC</i>	
						83 (Ser)	87 (Glu)	80 (Ser)	84 (Glu)
Efs 26	S	0.5	0.38	2	1.5				
Efs 31	S	0.5	0.5	1.5	1.5				
Efs 54	S	0.75	0.75	2	1.5				
Efs 9	S	0.75	0.75	2	2	Cys			
Efm 18	S	0.5	0.38	2	2				
Efm 24	S	0.5	1	1.5	3				
Efm 38	S	0.5	0.38	1.5	1.5				
Efs 20	I	3	3	16	4			Ile	
Efm 36	I	2	4	3	6			Ile	Asp
Efs 47	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Phe			
Efs 51	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Phe			
Efs 33	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Val			
Efs 38	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Tyr			
Efs 39	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Ile			
Efs 40	R	≥32	≥32	≥32	≥32		Gly		
Efs 4	R	≥32	≥32	≥32	≥32			Ile	
Efs 6	R	≥32	12	≥32	≥32			Ile	
Efs 18	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Phe		Ile	
Efs 16	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Ile		Ile	
Efs 30	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Val		Ile	
Efs 56	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Tyr			Lys
Efm 29	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Phe		Thr	
Efm 10	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Thr		Ile	
Efm 28	R	≥32	≥32	≥32	≥32	Pro	Leu	Ile	

^aEfs, *E. faecalis*; Efm, *E. faecium*.

^bS, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

^cCIP, ciprofloxacin; ENO, enrofloxacin; NOR, norfloxacin; OFL, ofloxacin.

^dFor those isolates with no amino acid shown, the codon is identical to that of the wild type isolates

Ile, Pro 및 Thr로 변이가 확인되었고, Glu87은 Gly 또는 Leu로 변이가 나타났다. 또한 *parC* 유전자의 Ser80은 Ile 또는 Thr로 변이되었고, Glu84는 Lys로 변이가 관찰되었다. CIP에 대한 디스크 확산시험에서 내성을 보인 2주의 경우 *parC* 유전자의 Ser80에서만 변이를 보여 부분 내성을 보인 분리주와 동일한 양상을 나타내었으나, MIC에서는 12~≥32 µg/ml로 부분 내성주 분리주의 2~16 µg/ml와는 큰 차이를 나타내었다.

Sylvain 등 (24)은 fluoroquinolone에 내성인 *E. faecium*의 *gyrA* 유전자의 Ser83은 Arg 또는 Leu로, Glu87은 Leu 및 Gly로 변이되었고, *parC* 유전자의 Ser80은 Ile 또는 Arg로, Gly84는 Lys 또는 Thr로 변이됨을 보고하였다. 또한 Amin 등 (12)은 Sylvain 등이 보고한 변이 이외에 *gyrA*의 Ser83이 Ile 또는 Tyr로 변이됨을 보고한 바 있다. 본 조사에서는 *gyrA*의 Ser83이 지금까지 보고된 변이양상 이외에 Phe, Val, Thr 또는 Pro로도 변이됨을 확인하였으며, 이러한 양상을 나타내는 분리주 모두 감수성균의 MIC인 0.38~3 µg/ml와 비교시 모두 ≥32 µg/ml을 보여 내성 형성과 관련이 있는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 MIC 최대회석배율이 32배인 관계로 단일돌연변이와 이중돌연변이 사이의 MIC 차이에 대한 비교분석을 실시할 수 없었으며, 따라서 이에 대한 연구가 추후 추가적으로 실시되어야 할 것으로 판단됨과 아울러 *gyrA* 및 *parC* 유전자 이외에 fluoroquinolone계열의 내성 형성에 관련이 있는 여러 유전자에 대한 실험도 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Kanematsu 등 (14)은 *E. faecalis*의 고도 내성은 *parC* 유전자의 단일돌연변이 또는 *parC* 유전자와 *gyrA* 유전자의 이중돌연변이와 관련된다고 보고한 바 있으며, Korten 등 (16) 및 Tankovic 등 (25)은 *gyrA* 유전자의 단일돌연변이만으로도 고도 내성이 나타남을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 *parC* 유전자의 변이와 무관하게 *gyrA* 유전자의 단일변이로도 고도 내성이 출현함을 알 수 있었으며, 또한 *gyrA* 유전자가 시험에 사용된 4종의 fluoroquinolone계 항균제의 내성유발에 일차적인 표적이 됨을 추측할 수 있었다.

결 론

E. faecalis 52주 및 *E. faecium* 25주의 CIP에 대한 디스크 확산시험 결과, 각각 44.2% 및 28.0%가 CIP에 내성을 나타내었으며, 44.2% 및 44.2%는 부분 내성을 나타내었다. 77주의 *Enterococcus* spp. 중 감수성, 부분 내성 또는 내성을 나타내는 *E. faecalis* 17주 및 *E. faecium* 7주에 대하여 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 염기서열을 분석하였을 때, *gyrA* 유전자의 Ser83과 Glu87번 위치에서, *parC* 유전자의 Ser80 및 Glu84

번 위치에서 변이가 관찰되었다. 이들 분리주의 MIC와 *gyrA* 및 *parC* 유전자의 돌연변이 양상을 비교한 결과, *gyrA* 유전자의 Ser83의 Cys로 변이는 fluoroquinolone계 항생제에 대한 내성유발에 관여하지 않는 것으로 판단되며, Ser83의 Phe, Val, Tyr, Ile, Pro 및 Thr로 변이 및 Glu87의 Gly 또는 Leu로 변이, *parC* 유전자 Ser80의 Ile 또는 Thr로 변이 및 Glu84의 Lys로의 변이는 fluoroquinolone계열에 대한 내성유발과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. CIP 디스크 확산시험에서 부분내성을 보인 2주는 *parC* 유전자의 변이만 관찰된 반면, 내성을 보인 15주 중 2주는 *parC* 유전자에서만, 6주는 *gyrA* 유전자에서만 변이를 보였고 7주는 *gyrA*와 *parC* 유전자 모두에서 이중돌연변이가 관찰되었다. 본 연구 결과, 국내 닭의 정상세균총의 하나인 *Enterococcus* spp.가 fluoroquinolone계열 항생제에 대하여 이미 높은 내성을 형성하고 있는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 *parC* 유전자의 변이와 무관하게 *gyrA* 유전자의 단일변이로도 고도내성이 나타남과 아울러 *gyrA* 유전자가 CIP, ENO, NOR 및 OFL 항균제의 내성유발에 일차적인 표적이 됨을 추측할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 송시욱, 정석찬, 김성일, 정명은, 김계희, 이지연, 임숙경, 이영주, 조남인, 박종명, 박용호: 2003년도 국내 도축장에서 분리한 세균의 항생제 감수성 조사 1. 도축장의 식육으로부터 분리한 *E. coli*의 항생제 감수성. 한국수의공중보건학회지 **28**: 215-221, 2004.
- 2) 이영주, 김애란, 정석찬, 송시욱, 김재홍: 닭 분변유래 *E. coli* 및 *Salmonella* spp.의 항생제 내성패턴. 대한수의학회지 **45**: 75-83, 2005.
- 3) Bazile-Pham-Khac S, Truong QC, Lafont JP, Gutmann L, Zhou XY, Osman M, Moreau NJ: Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1504-1507, 1996.
- 4) Chaslus-Dancla E, Martel JL, Carlier C, Lafont JP, Courvalin P: Emergence of aminoglycoside 3-N-acetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from animals in France. *Antimicrob Agents Chemother* **29**: 239-243, 1986.
- 5) Cheng S, McCleskey FK, Gress MJ, Petroziello JM, Liu R, Namdari H, Beninga K, Salmen A, DelVecchio VG: A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* **35**: 1248-1250, 1997.
- 6) del Mar Lleo M, Tafi MC, Signoretto C, Dal Cero C, Canepari P: Competitive polymerase chain reaction for quan-

- tification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 345-353, 1999.
- 7) **el Amin NA, Jalal S, Wretling B**: Alterations in *gyrA* and *parC* associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 947-949, 1999.
 - 8) **Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP**: Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother* **27**: 199-208, 1991.
 - 9) **Ferrero L, Cameron B, Crouzet J**: Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1554-1558, 1995.
 - 10) **Ferrero L, Cameron B, Manse B, Lagneaux D, Crouzet J, Famechon A, Blanche F**: Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol Microbiol* **13**: 641-653, 1994.
 - 11) **Garau J, Xercavins M, Rodriguez-Carballeira M, Gomez-Vera JR, Coll I, Vidal D, Llovet T, Ruiz-Bremon A**: Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2736-2741, 1999.
 - 12) **Gellert M, Mizauchi K, O'Dea MH, Nash HA**: DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 3872-3876, 1976.
 - 13) **Hooper DC, Wolfson JS**: Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N Engl J Med* **324**: 384-394, 1991.
 - 14) **Kanematsu E, Deguchi T, Yasuda M, Kawamura T, Nishino Y, Kawada Y**: Alterations in the *gyrA* subunit of DNA gyrase and the *parC* subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 433-435, 1998.
 - 15) **Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H**: New topoisomerase essential for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Cell* **63**: 393-404, 1990.
 - 16) **Korten V, Huang WM, Murray BE**: Analysis by PCR and direct DNA sequencing of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2091-2094, 1994.
 - 17) **Morrison AJ Jr, Wenzel RP**: Nosocomial urinary tract infections due to *Enterococcus* Ten years experience at a university hospital. *Arch Intern Med* **146**: 1549-1551, 1986.
 - 18) **Murray BE**: The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* **3**: 46-65, 1990.
 - 19) **Na EY, Trucksis M, Hopper DC**: Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1881-1888, 1996.
 - 20) **Onodera Y, Okuda J, Tanaka M, Sato K**: Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1800-1804, 2002.
 - 21) **Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM**: Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2321-2326, 1994.
 - 22) **Pan XS, Fisher LM**: Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 471-474, 1997.
 - 23) **Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Coudron P, Sanders CC**: Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 596-600, 1998.
 - 24) **Sylvain B, Fluit AC, Wagner U, Heisig P, Milatovic D, Verhoef J, Scheuring S, Kohrer K, Schmitz FJ**: Association of alteration in *parC* and *gyrA* proteins with resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecium* to nine different fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2513-2516, 1999.
 - 25) **Tankovic J, Mahjoubi F, Courvalin P, Duval J, Leclercq R**: Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2558-2561, 1996.
 - 26) **Tankovic J, Perichon B, Duval J, Courvalin P**: Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2505-2510, 1996.