

毒事件分析[J]. 中国学校卫生, 2015, 36(3): 455-457.

[15] 周亚娟, 王娅芳, 朱姝, 等. 2011—2013 年贵州省食物中毒状
况分析[J]. 职业卫生与病伤, 2015, 30(1): 27-30.

[16] 张燕, 幸奠国. 重庆市 2007—2011 年突发公共卫生事件分布
特征和处置情况分析[J]. 重庆医学, 2013, 42(11):
1259-1261.

研究报告

台州市食源性单核细胞增生李斯特菌分子特征研究

沈伟伟¹, 裘丹红¹, 盛莹¹, 罗芸²

(1. 台州市疾病预防控制中心, 浙江 台州 318000; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051)

摘要:目的 了解台州市食品中分离的单核细胞增生李斯特菌的血清型、毒力基因以及基因分型情况, 建立食源性单核细胞增生李斯特菌的分子特征本底信息, 为食源性疾病的防治提供技术支持。**方法** 对近几年从食品中分离的 37 株单核细胞增生李斯特菌进行多重 PCR 血清分型、9 种毒力基因(*prfA*、*inlA*、*inlB*、*iap*、*flaA*、*hlyA*、*plcB*、*mpl* 和 *actA*) PCR 检测、PFGE 基因分型, 用 BioNumerics 6.6 软件对分型数据进行聚类分析。**结果** 37 株食源性单核细胞增生李斯特菌的血清型以 1/2a 或 3a 型别为主; 所有菌株均检出 4 种以上毒力基因, 有 15 株菌携带所有 9 种毒力基因; 37 株菌经 *Apa* I 酶切 PFGE 分型后, 共得到 22 种带型, 每种带型包含 1~5 株不等, 相似度区间为 67%~100%。**结论** 台州市食源性单核细胞增生李斯特菌存在致病流行风险, 建立的指纹图谱数据库可为食源性疾病的防治提供技术支持。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 毒力基因; 基因分型; 分子特征; 食源性致病菌; 台州

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2016)06-0734-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.06.010

Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Taizhou

SHEN Wei-wei, QIU Dan-hong, SHENG Ying, LUO Yun

(Taizhou Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Taizhou 318000, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular characteristics of the *L. monocytogenes* isolated from food in Taizhou, establish the background profile, and to provide supports for prevention and control of foodborne diseases. **Methods** Thirty-seven *L. monocytogene* strains isolated from food in recent years were divided into serogroups by a multiplex PCR assay and screened for 9 potential virulence factors including *prfA*, *inlA*, *inlB*, *iap*, *flaA*, *hlyA*, *plcB*, *mpl* and *actA* by single PCR. All strains were genotyped by PFGE results analyzed with BioNumerics 6.6 software. **Results** The serotype 1/2a or 3a was the major serovar of *L. monocytogenes* from food in Taizhou area. More than four types of virulence genes were detected in all strains. Fifteen *L. monocytogene* strains harbored all nine virulence genes. A total of 37 strains were divided into 22 PFGE patterns with *Apa* I digestion. Each pattern included 1-5 strains with similarity ranged from 67% - 100%. **Conclusion** Foodborne *L. monocytogenes* were one of the risk factors of foodborne illness in Taizhou. The established fingerprint databases could provide technical support for the prevention and control of foodborne diseases.

Key words: *Listeria monocytogenes*; virulent genes; genotyping; molecular characterization; foodborne pathogenic bacteria; Taizhou

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogene*)是一种重要的人畜共患病和食源性疾病的条件病原菌,可引起人、畜、禽类的李斯特菌病,感染人可

引起胃肠炎、败血症、脑膜炎、流产等。绝大多数人感染李斯特菌病均由 1/2a、1/2b、1/2c 和 4b 型血清型引起^[1]。单核细胞增生李斯特菌菌株的毒力基因主要包括转录调控蛋白基因(*prfA*)、内化素相关基因(*inlA*、*inlB*)、肌动蛋白聚集基因(*actA*)、金属酶蛋白基因(*mpl*)、溶血素基因(*hlyA*)、卵磷脂酶基因(*plcB*)、毒力相关基因(*iap*)、鞭毛蛋白基因(*flaA*)等,这些毒力基因主要参与菌株粘附、侵袭及在细

收稿日期: 2016-09-07
基金项目: 台州市科技资金资助项目 (No. 111KY10)
作者简介: 沈伟伟 男 副主任技师 研究方向为病原微生物分子分型 E-mail: shengo8899@126.com

胞内感染等过程^[2-3]。单核细胞增生李斯特菌在不同区域和时间、不同样品中分离的菌株存在差异,可分成不同的亚型或基因型^[4],目前用于菌株基因分型的方法主要有脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点数目可变串联重复序列分型(MLVA)、多位点测序分析(MLST)^[5]。作为基因分型“金标准”的PFGE技术可用于评价菌株间的遗传多样性^[6],可为食源性单核细胞增生李斯特菌所致疾病提供溯源支持。

为掌握台州市食品中分离的单核细胞增生李斯特菌的分子特征,本研究通过对近几年食品中分离的37株单核细胞增生李斯特菌在血清型、毒力因子、基因分型等多方面特征进行分析,初步积累了台州市食源性单核细胞增生李斯特菌的本底特征及基因分型信息,为该菌可能引起的食源性疾病溯源分析提供本底资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

37株单核细胞增生李斯特菌由2005—2012年台州市食品中分离得到,经GB 4789.30—2010《食品安全标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》^[7]标准方法检测确认。单核细胞增生李斯特菌标准菌株(CMCC 54004)来自中国药品生物制品鉴定所,PFGE参考菌株布伦登鲁普沙门菌(Braenderup)血清型(H9812)由浙江省疾病预防控制中心微生物所赠送。

1.1.2 主要仪器与试剂

PTC-200 梯度PCR仪、Power Pac Basic 电泳仪、GD2000 凝胶成像分析系统、CHEF Mapper XA 脉冲场电泳仪均购自美国Bio-Rad,全自动细菌鉴定系统(VITEK2 Compact,法国生物梅里埃)。Premix Ex Taq™、Xba I 酶、Apa I 酶均购自宝生物 TaKaRa,低熔点琼脂糖(SeakemGold,美国Lonza),蛋白酶K(美国Merck)。

1.2 方法

1.2.1 血清分型

参考文献[8]合成4对引物(ORF2819, ORF2110, lmo0737 和 lmo1118)区分单核细胞增生李斯特菌4种主要的血清型(1/2a, 1/2b, 1/2c 和 4b),其中 lmo0737 阳性代表血清型为 1/2a 或 3a, lmo0737 和 lmo1118 双阳性代表血清型为 1/2c 或 3c, ORF2819 阳性代表血清型为 1/2b 或 3b, ORF2819 和 ORF2110 双阳性代表血清型为 4b、4d 或 4e,序列见表1。采用煮沸法提取菌株核酸,反应

体系为25 μl;反应条件为95℃预变性5 min;94℃变性40 s,53℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min。扩增产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统下拍照记录结果。

表1 血清分型和毒力基因PCR检测引物序列信息
Table 1 Sequences of primers used for detection of serotypes and virulence genes

目标基因	引物序列(5'-3')	片段大小/bp	参考文献
lmo0737	F:AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	[8]
	R:ACGATTTCTGCTTGCCATTC		
lmo1118	F:AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	[8]
	R:CGGCTTGTTCCGGCATACTTA		
ORF2819	F:AGCAAAATGCCAAACTCGT	471	[8]
	R:CATCACTAAAGCCTCCCATTC		
ORF2110	F:AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	[8]
	R:CATCCATCCCTTACTTTGGAC		
prfA	F:CCCAAGTAGCAGGACATGCTAA	571	[9]
	R:GGTATCACAAAGCTCACGAG		
inlA	F:AAAGATATAGGCACATTGGCGAG	91	[10]
	R:GACCCGACAGTGCTGCTAGATTA		
inlB	F:CATGGGAGACTAACCCAACC	433	[11]
	R:GCGGTAACCCCTTTGTCTATA		
iap	F:ACAAGCTGCACCTGTTGCAG	131	[12]
	R:TGACAGCGTGCTAGTAGCA		
flaA	F:AGCTCTTAGCTCCATGAGTT	450	[11]
	R:ACATTGTAGCTAAGCGCACT		
hlyA	F:ATTGCGCAACAACTGAAGC	110	[10]
	R:TCGATTGGCGTCTTAGACT		
plcB	F:ACCTGCCAAAGTTTGCTGTGA	795	[12]
	R:GCAAGTGTTCTAGCTCTTTCCGG		
mpl	F:CGGAATTCATGAAAAGTAACTTATTTG	1 550	[13]
	R:TATCTCGAGTCAGTTAACCCCAAC		
actA	F:CGCCGCGGAAATTAATAAAGA	839	[11]
	R:ACGAAGGAACCGGCTGCTAG		

1.2.2 毒力基因检测

参考文献[9-13]合成9对引物,检测单核细胞增生李斯特菌的9个毒力基因(prfA、inlA、inlB、iap、flaA、hlyA、plcB、mpl 和 actA),见表1。采用煮沸法提取菌株核酸,反应体系为25 μl;反应条件为95℃预变性1 min;94℃变性30 s,56℃退火45 s,72℃延伸90 s,35个循环;最后72℃延伸10 min。扩增产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统下拍照记录结果。

1.2.3 PFGE 分型

参照PulseNet网络中单核细胞增生李斯特菌PFGE分型标准化方案^[14]进行操作。用限制性内切酶Apa I 进行酶切,电泳条件:最低分子量49 kb,最高分子量450 kb,电压6 V/cm,脉冲参数4.0~40.0 s,电泳18 h。获得的PFGE电泳图像用BioNumerics 6.6软件进行数据分析,使用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类,条带匹配优化度(band matching tolerance)设为1.5%,构建

聚类树,分析不同菌株间的相似性,相似度 100% 认定为同一 PFGE 带型。

2 结果

2.1 血清分型结果

通过多重 PCR 检测分析,37 株单核细胞增生李斯特菌中 21 株 *lmo0737* 阳性,属于血清型 1/2a 或 3a,占比 56.8%;14 株 *ORF2819* 阳性,属于血清型 1/2b 或 3b,占比 37.8%;2 株 *ORF2819* 和 *ORF2110* 阳性,属于血清型 4b、4d 或 4e,占比 5.4%,按食品分离来源分类见表 2。

表 2 37 株单核细胞增生李斯特菌食品来源与血清型分类
Table 2 Serogroups of 37 *L. monocytogenes* isolated

from different foods			
食品分类	菌株数/株	血清型	占比/%
生肉类	16	1/2a 或 3a	24.3(9/37)
		1/2b 或 3b	18.9(7/37)
熟肉制品	17	1/2a 或 3a	24.3(9/37)
		1/2b 或 3b	16.2(6/37)
		4b,4d 或 4e	5.4(2/37)
鱼	2	1/2a 或 3a	5.4(2/37)
蔬菜	1	1/2a 或 3a	2.7(1/37)
米面制品	1	1/2b 或 3b	2.7(1/37)

2.2 毒力基因检测情况

通过 PCR 检测分析,9 种毒力基因(*prfA*、*inlA*、*inlB*、*iap*、*flaA*、*hlyA*、*plcB*、*mpl* 和 *actA*) 在 37 株单核细胞增生李斯特菌中均有检出,其中 *flaA* 和 *hlyA* 基因的携带率最高,其次为 *prfA* 和 *plcB* 基因,*mpl* 基因的携带率最低,毒力基因的具体携带情况见表 3。

表 3 37 株单核细胞增生李斯特菌毒力基因检测结果

Table 3 Detection rates of virulence genes in 37

<i>L. monocytogene</i> strains		
毒力基因	阳性菌株数/株	携带率/%
<i>prfA</i>	36	97.3
<i>inlA</i>	35	94.6
<i>inlB</i>	33	89.2
<i>iap</i>	29	78.4
<i>flaA</i>	37	100
<i>hlyA</i>	37	100
<i>plcB</i>	36	97.3
<i>mpl</i>	24	64.9
<i>actA</i>	33	89.2

2.3 PFGE 指纹图谱分型

对 37 株单核细胞增生李斯特菌的全基因组 DNA 经 *Apa* I 酶切电泳后得到 22 种带型,分别命名为 P1~P22,带型聚类分析见图 1。各带型包含菌株数 1~5 株不等,带型相似度在 67%~100% 之间,其中 P3、P6、P8、P9、P15、P17、P20 各包含 2 株菌, P7、P18 各包含 3 株菌, P5 包含 5 株菌,其余 12 种带型仅包含 1 株菌,相同带型(P5、P6、P7、P8、P9、P18) 中均有分离自不同食品的菌株。PFGE 带型中 P1~P3 共 4 株菌,占总菌数的 10.8%,分离自 2006—2007 年,可能来源于同一克隆;P5~P8 带型共有 12 株菌,占总菌数的 32.4%,分离自 2005—2008 年,可能来源于同一克隆;P18~P22 带型共有 8 株菌, 占总菌数的 21.6%,分离自 2005—2012 年,可能来源于同一克隆。

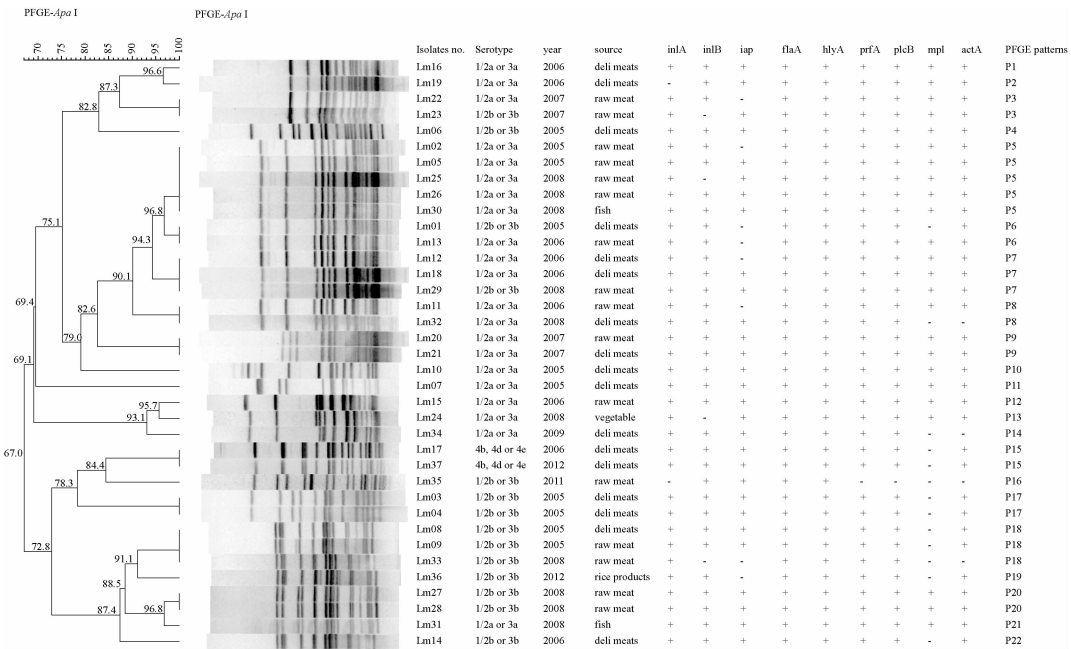


图 1 37 株单核细胞增生李斯特菌 *Apa* I 酶切 PFGE 指纹图谱
Figure 1 PFGE patterns with *Apa* I digestion in 37 *L. monocytogene* strains

3 讨论

本研究对食品中分离的单核细胞增生李斯特菌的血清型、毒力基因和分子分型等进行分析,研究其致病性和分布规律。结果显示台州市食品中单核细胞增生李斯特菌的主要流行血清型为 1/2a 或 3a (56.8%),其次是 1/2b 或 3b (37.8%),血清型 4b、4d 或 4e 占比最低 (5.4%),WANG 等^[15]在 2005—2007 年中国 8 个省份的食品专项调查的结果显示血清型 1/2a 占 52.1%、1/2b 占 22.9%,本研究结果与该报道较一致,但是血清型 1/2a 或 3a 比例稍低于王文凯等^[16]在上海食品中血清型 1/2a 或 3a (67.5%) 的调查结果。多项独立的调查研究结果^[1,17]显示 95% 以上分离自人李斯特菌病和食品的单核细胞增生李斯特菌的血清型为 4b、1/2a、1/2b、1/2c,说明台州市从食品分离的单核细胞增生李斯特菌血清型均为人群易感染的型别,该菌有引起人群散发或暴发的可能性。

单核细胞增生李斯特菌为侵袭性胞内菌,菌株的致病性与毒力基因密切相关,其感染过程都受到毒力基因的调控。本研究结果显示有 15 株菌株携带所有 9 种毒力基因 (占 40.5%),说明这 15 株菌在特定的条件下,具有较强的致病能力。其他 22 株菌除 *flaA* 和 *hlyA* 基因之外的 7 个毒力基因携带率从 64.9% ~ 97.3% 不等,每个基因的携带水平与杨洋等^[12]的研究结果并不完全相同,可能与菌株分离的地域、样品来源不同有关。有研究表明毒力基因的缺失可导致菌株感染、侵袭和传播能力的降低^[3,13,18],这些毒力基因缺失的菌株的致病能力有待进一步研究。本次研究说明在台州市食品中存在致病力强的单核细胞增生李斯特菌,人群有可能从食品中感染毒力强的菌株而产生致病的潜在风险。

PFGE 基因分型结果显示 37 株单核细胞增生李斯特菌可分成 22 种基因带型,基因带型呈现多样性,存在可能来源于同一克隆菌株的基因带型 (P1 ~ P3、P5 ~ P8 与 P19 ~ P22),同一带型的菌株在不同年份不同食品中均有出现,与祝仁发等^[19]的研究结果基本一致,说明台州市食品中分离的单核细胞增生李斯特菌以散发流行的克隆株为主,存在同一克隆的菌株持续流行情况。结果还显示 21 株 1/2a 或 3a 血清型菌株既有相同的基因带型 (P5),也有不同的基因带型 (P1 与 P8),不同的血清型也可有相似的基因带型 (P6 与 P7 带型均含有两种血清型),这与 WANG 等^[20]的研究结果较一致,说明 PFGE 的分型与血清学分型并无一定的关联性。PFGE 分型方法作为单核细胞增生李斯特菌基因分

型的“金标准”,其分辨率高、重复性好,可及时发现聚集性菌株,对台州市食品中单核细胞增生李斯特菌引起的食源性疾病流行病学溯源调查与分析具有重要意义。

本研究从血清型、毒力基因及基因分型等方面对台州市食品中分离的单核细胞增生李斯特菌进行分子生物学特性研究,初步掌握了台州市食源性单核细胞增生李斯特菌的主要流行的血清型、毒力基因携带水平及 PFGE 指纹图谱聚类特征,建立了食源性单核细胞增生李斯特菌的分子生物学特征及基因分型本底信息,为李斯特菌病等食源性疾病的防治及预警提供技术支持。

参考文献

- [1] Lopez-Valladares G, Tham W, Parihar V S, et al. Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958-2010) [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142 (11): 2251-2260.
- [2] Lemon K P, Higgins D E, Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189 (12): 4418-4424.
- [3] 江玲丽, 陈健舜, 方维焕. 单核细胞增多性李斯特菌主要毒力因子研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23 (7): 733-735.
- [4] Datta A R, Laksanalamai P, Solomotis M. Recent developments in molecular sub-typing of *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2013, 30 (8): 1437-1445.
- [5] 连凯, 叶舒扬, 殷月兰, 等. 分子分型方法在单核细胞增生性李斯特菌流行病学研究中的应用 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2015, 31 (8): 757-762.
- [6] Felix B, Niskanen T, Vingadassalon N, et al. Pulsed-field gel electrophoresis proficiency testing trials: toward European harmonization of the typing of food and clinical strains of *Listeria monocytogenes* [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10 (10): 873-881.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.30—2010 食品安全标准食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [8] Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (8): 3819-3822.
- [9] 张岳灿, 于纪棉, 张玉琳, 等. 进口水产品中单增李斯特菌毒力基因调查 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23 (15): 3117-3118.
- [10] 白帆, 陈健舜, 程昌勇, 等. 单核细胞增生李斯特菌弱毒株主要毒力基因表达水平分析 [J]. *动物医学进展*, 2010, 31 (S): 108-111.
- [11] Indrawattana N, Nibaddhasobon T, Sookrung N, et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods [J]. *J Health Popul Nutr*, 2011, 29 (1): 26-38.
- [12] 杨洋, 付萍, 郭云昌, 等. 2005 年中国食源性单核细胞增生李斯特菌毒力基因分布 [J]. *中华预防医学杂志*, 2010, 44 (12):

1097-1101.

[13] 王璐璐.单核细胞增生性李斯特菌 Mpl 蛋白的原核表达及免疫原性研究[D].黑龙江:黑龙江八一农垦大学,2009.

[14] PulseNet International. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*[S]. 2013.

[15] WANG P,YANG H R,HU Y,et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates in import food products of China from 8 provinces between 2005 and 2007[J]. J Food Sci,2012,77(4): M212-M216.

[16] 王文凯,史贤明.上海市食品中单核细胞增生李斯特菌污染状况调查及血清分型[G].中国食品科学技术学会第十一届年会论文集,杭州,2014:20-21.

[17] Pontello M, Guaita A, Sala G, et al. *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010) [J]. Ann Ist Super Sanita,2012,48(2):146-150.

[18] Tamburro M,Sammarco M L,Ammendolia M G,et al. Evaluation of transcription levels of *inlA*, *inlB*, *hly*, *bsh* and *prfA* genes in *Listeria monocytogenes* strains using quantitative reverse-transcription PCR and ability of invasion into human CaCo-2 cells[J]. FEMS Microbiol Lett,2015,362(6):doi: 10.1093/femsle/fnv018.

[19] 祝仁发,宫照龙,叶长芸,等.中国八省市食品来源单核细胞增生李斯特菌的脉冲场凝胶电泳分析[J].中华流行病学杂志,2007,28(5):464-467.

[20] WANG Y,ZHAO A L,ZHU R F,et al. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China [J]. BMC Microbiol,2012(12):119.

研究报告

北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌的耐药特征分析

彭子欣¹,张爽²,王伟¹,胡豫杰¹,吕涵阳¹,张建中³,李凤琴¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021; 2. 北京农学院食品科学与工程学院,北京 102206; 3. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206)

摘要:**目的** 了解北京市某大型集贸市场内部环境样品和零售生鲜猪肉中分离肠球菌的耐药性特征。**方法** 采用肉汤稀释法测定 86 株肠球菌对 10 种临床常用抗生素的药物敏感性。**结果** 86 株肠球菌对四环素、红霉素、高浓度链霉素、环丙沙星、高浓度庆大霉素和氯霉素的耐药率分别为 67.44% (58/86)、54.65% (47/86)、38.37% (33/86)、26.74% (23/86)、23.26% (20/86) 和 20.93% (18/86),耐 3 种以上抗生素的多重耐药肠球菌有 30 株,占 34.88%,耐药谱共有 22 种。所有肠球菌对氨苄西林、青霉素和万古霉素均敏感。耐药谱型分析发现,不同样品来源肠球菌的耐药谱差异较大。另外,本研究从国内食品中分离到对达托霉素耐药的肠球菌,此前我国未见相关报道。**结论** 北京市集贸市场内部环境和零售生鲜猪肉中分离的肠球菌耐药严重,并呈现一定的耐药谱型差异,而且分离到达托霉素耐药株,应引起关注。

关键词:肠球菌;药敏试验;耐药性;生鲜猪肉;集贸市场;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2016)06-0738-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.06.011

Antimicrobial susceptibility analysis of *Enterococcus* spp. collected from a raw pork free trade market in Beijing

PENG Zi-xin, ZHANG Shuang, WANG Wei, HU Yu-jie, LYU Han-yang, ZHANG Jian-zhong, LI Feng-qin
(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To evaluate the antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. using samples from the environment and retailed raw pork from free markets in Beijing. **Methods** The susceptibility of 86 isolated *Enterococcus* spp. to 10 antibiotics was determined by broth microdilution method according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Results** In all 86 isolates tested, 67.44% (58/86), 54.65% (47/86), 38.37% (33/86), 26.74% (23/86), 23.26% (20/86) and 20.93% (18/86) of *Enterococcus* spp. were resistant to tetracycline, erythromycin, ciprofloxacin,