

RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN ENTEROCOCOS AISLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL, PESCADO Y MARISCOS

ANTONIO SÁNCHEZ VALENZUELA, NABIL BENOMAR, RUBÉN PÉREZ PULIDO, HIKMATE ABRIOUEL, ANTONIO GÁLVEZ*

RESUMEN

La incidencia de resistencias a agentes antimicrobianos en alimentos es una preocupación de la que ya se ha hecho eco la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Dado que los enterococos están presentes con gran frecuencia en alimentos y son considerados como un reservorio de elementos genéticos transmisibles implicados en la diseminación de resistencias, hemos estudiado la incidencia de resistencia a diferentes antimicrobianos en una colección de cepas procedentes de queso, carne, pescado, y marisco. Los resultados obtenidos indican una elevada incidencia de resistencias a antimicrobianos en cepas de enterococos procedentes de queso y carne, siendo también frecuente la presencia de cepas multirresistentes. Por el contrario, las cepas de enterococos procedentes de pescado y marisco presentan una frecuencia menor de resistencia a antimicrobianos.

INTRODUCCIÓN

Los enterococos son cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos y la mayoría aglutinan con anticuerpos específicos para el grupo D de Lancefield. Debido a estas características, durante largo tiempo se los consideró como

* Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. E-mail: agalvez@ujaen.es

pertenecientes al género *Streptococcus*; sin embargo, los estudios genéticos marcaron claras diferencias con este género, por lo cual a partir de la década de 1980 los enterococos se constituyeron como un nuevo género llamado *Enterococcus* e integrado por 40 especies (tabla 1). Estos microorganismos constituyen un grupo microbiano de interés dentro de las bacterias lácticas (BAL) colonizando numerosos nichos ecológicos debido a su elevada resistencia a condiciones ambientales adversas y constituyendo una parte esencial de la microbiota intestinal de animales y personas, siendo los cocos Gram-positivos más abundantes en humanos (1,2). Por ello, han sido considerados como comensales inoocuos o bien con bajo potencial patogénico. Sin embargo, esta percepción ha sido cuestionada con frecuencia en las últimas décadas debido al incremento de su incidencia en las infecciones hospitalarias, así como de su resistencia a los antibióticos (3). Es ya un hecho que los enterococos se encuentran entre los principales agentes causantes de infecciones nosocomiales, estando implicados con mayor frecuencia en infecciones del tracto urinario, endocarditis, infecciones de heridas quirúrgicas, y bacteremia (4). Por todo ello, los enterococos han pasado de ser meros comensales de la microbiota intestinal del hombre y de estar ocasionalmente implicados en infecciones, a ser considerados un patógeno nosocomial de primer orden con una importancia creciente. Las 2 especies principales causantes de infección enterocócica son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Históricamente, las infecciones por *E. faecalis* representaban el 80–90%, mientras que las infecciones por *E. faecium* representaban el 5–10 % del total; sin embargo, actualmente la proporción de aislamientos de *E. faecium* ha aumentado respecto a *E. faecalis* y se sitúa entorno del 22,2% (5). Además el género *Enterococcus* representa un desafío terapéutico debido a su resistencia intrínseca (de carácter cromosómico y no transferible) a varios antibióticos (tabla 2). La ampicilina y la vancomicina son los tratamientos estándar para los enterococos sensibles. La combinación de ampicilina o vancomicina con un aminoglucósido es necesaria para alcanzar actividad bactericida para el tratamiento de infecciones enterocócicas graves. Además de la resistencia intrínseca, poseen una gran capacidad de adquisición de otros mecanismos de resistencia y de genes de virulencia, por transferencia de plásmidos o transposones conjugativos, intercambio cromosómico o mutaciones (tabla 2). Es de especial importancia la adquisición de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos, así como a penicilina, ampicilina o glucopéptidos. Este se presenta, actualmente, como el gran problema de resistencia emergente en este género, particularmente en *E. faecium*. Se han descrito siete genotipos de resistencia a glicopéptidos denominados vanA a vanG, de los cuales hasta el momento sólo dos (vanA y vanB) tienen impacto clínico por su capacidad de transferencia entre especies y géneros diferentes (6, 7). Las infecciones por enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se producen casi exclusivamente a nivel hospitalario.

El carácter de los enterococos como patógenos oportunistas contrasta con su presencia en numerosos tipos de alimentos, especialmente los de origen animal, donde llegan como parte de la contaminación cruzada a partir del tracto digestivo y el ambiente. Otro factor adicional que contribuye a la presencia de enterococos en alimentos es la elevada capacidad de esta bacteria para soportar condiciones ambientales adversas y proliferar en sustratos ricos en proteínas y otros nutrientes de origen animal. Todo ello hace que los enterococos lleguen a desempeñar un papel importante en determinados alimentos, como son muchos tipos de quesos de la región Mediterránea. No obstante, y debido a su potencial patógeno, los enterococos no están incluidos entre los grupos de bacterias lácticas consideradas como “presuntamente seguras” por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Por consiguiente, el riesgo potencial de las cepas de enterococos presentes en un determinado tipo de alimento debe ser estudiado de forma particular, determinando como riesgo no sólo la presencia de factores de virulencia, sino también la capacidad de actuar como transmisores de genes de resistencia a antimicrobianos.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la incidencia de resistencia a antimicrobianos en poblaciones de enterococos poco estudiadas hasta la fecha en alimentos tales como queso, carne, pescado y mariscos. También es importante establecer relaciones entre los diferentes habitats, la presencia de enterococos, y la frecuencia de cepas multirresistentes a antimicrobianos.

Tabla 1. Especies descritas dentro del género *Enterococcus*.

Especie	Especie
<i>Enterococcus faecalis</i> (8)	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i> (21)
<i>Enterococcus faecium</i> (8)	<i>Enterococcus moraviensis</i> (21)
<i>Enterococcus durans</i> (9)	<i>Enterococcus porcinius</i> (22)
<i>Enterococcus malodoratus</i> (9)	<i>Enterococcus ratti</i> (22)
<i>Enterococcus avium</i> (9)	<i>Enterococcus villorum</i> (23)
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (9)	<i>Enterococcus gilvus</i> (24)
<i>Enterococcus gallinarum</i> (9)	<i>Enterococcus pallens</i> (24)
<i>Enterococcus hirae</i> (10)	<i>Enterococcus canis</i> (25)
<i>Enterococcus mundtii</i> (11)	<i>Enterococcus phoeniculicola</i> (26)
<i>Enterococcus cecorum</i> (12)	<i>Enterococcus hermannienseis</i> (27)
<i>Enterococcus pseudoavium</i> (13)	<i>Enterococcus italicus</i> (28)
<i>Enterococcus raffinosus</i> (13)	<i>Enterococcus saccharominimus</i> (29)
<i>Enterococcus solitarius</i> (13)	<i>Enterococcus aquimarinus</i> (30)
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> (14)	<i>Enterococcus canintestini</i> (31)
<i>Enterococcus dispar</i> (15)	<i>Enterococcus devriesei</i> (32)
<i>Enterococcus seriolicida</i> (16)	<i>Enterococcus caccae</i> (33)
<i>Enterococcus sulfureus</i> (17)	<i>Enterococcus silesiacus</i> (34)
<i>Enterococcus flavescens</i> (18)	<i>Enterococcus termitis</i> (34)
<i>Enterococcus columbae</i> (19)	<i>Enterococcus camelliae</i> (35)
<i>Enterococcus asini</i> (20)	<i>Enterococcus thailandicus</i> (36)

Tabla 2. Resistencia intrínseca y adquirida de *Enterococcus* a los antibióticos.

Resistencia intrínseca	Resistencia adquirida
Bajo nivel a betalactámicos: penicilina, ampicilina y piperacilina	Resistencia de alto nivel a betalactámicos
Cefalosporinas	Resistencia de alto nivel a aminoglucósidos
Penicilinas resistentes a penicilinasas:	Glicopéptidos
oxacilina, dicloxacilina	Eritromicina
Clindamicina	Tetraciclinas
Trimetoprim/sulfametoxazol	Fluorquinolonas
Bajo nivel a aminoglucósidos	Rifampicina
	Cloranfenicol
	Rifampicina
	Nitrofurantóina

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de las diferentes cepas de *Enterococcus*

Preparación de las muestras. Las diferentes muestras de alimentos fueron depositadas en bolsas de polipropileno estériles bajo condiciones asépticas, y adicionadas de nueve partes de diluyente estéril (NaCl al 0,85% en agua destilada) por cada parte de muestra. Las mezclas fueron homogeneizadas en un triturador de alimentos modelo Stomacher 400 durante 60 segundos a una velocidad intermedia, obteniéndose de este modo las suspensiones madre para los diferentes alimentos. A partir de las suspensiones de alimento se transfirieron 0,5 ml a tubos que contenían 4,5 ml de medio selectivo de Rothe, que fueron posteriormente incubados a 37°C durante 24 h. A partir de los tubos donde se había obtenido crecimiento, se transfirieron 50 µl a un tubo que contenía 2 ml de medio de Litsky. Tras 24 h de incubación a 37°C se observó la presencia de crecimiento, que aparecía depositado en el fondo y con una coloración violeta-azulada.

Los cultivos positivos obtenidos en este segundo medio fueron diseminados, mediante asa de siembra, en placas que contenían agar de Slanetz-Bartley. Tras 24 h de incubación a 37°C se aislaron aquellas colonias que mostraban un color rosáceo o rojizo, y se sembraron en tubos en pico de flauta para su posterior estudio.

Identificación de las cepas aisladas mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la extracción de ADN se empleó el método descrito por De Los Reyes-Gavilan *et al.* (37). La determinación de la concentración de ADN se llevó a cabo mediante medida de la absorbancia, siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.* (38). Para identificar las cepas aisladas mediante PCR se emplearon los cebadores adecuados (E₁ E₂ para *E. faecalis*, y F₁ F₂ para *E. faecium*). Para la identificación de las cepas aisladas mediante secuenciación del ADN 16S se empleó el método descrito por Cibik *et al.* (39).

Determinación de la sensibilidad a antibióticos

Este ensayo se realizó empleando galerías ATB ENTEROC 5 (BioMérieux), que permiten determinar la sensibilidad a un total de 14 antibióticos en medio semi-sólido (Tabla 3). Los microorganismos a analizar fueron cultivados en medio MRS o BHI durante 6-8 horas a 37°C (hasta alcanzar una densidad celular aproximada de 0,5 según la escala de MacFarland). A partir de dichos cultivos se adicionaron 200 µl al vial de medio ATB S (suministrado por el fabricante). La mezcla fue homogeneizada mediante una pipeta estéril, evitando la formación de burbujas. La suspensión obtenida en medio ATB S fue utilizada para la inoculación de la galería, a razón de 135 µl por cada cúpula (alrededor de 5x10⁵ bacterias/ cúpula). Tras 18-24 horas de incubación, se realizó la lectura del crecimiento de forma visual observando la turbidez.

Tabla 3. Concentración de los distintos antibióticos utilizados.

Abreviatura	Antibiótico	Concentración (mg/l)
PEE	Penicilina	8
AMPE	Ampicilina	8
ERY	Eritromicina	0,5-4
TET	Tetraciclina	4-8
CMP	Cloranfenicol	8-16
RFA	Rifampicina	1-2

CIP	Ciprofloxacina	1-2
LVX	Levofloxacina	2-4
VAN	Vancomicina	4-16
TEC	Teicoplanina	8-16
FUR	Nitrofurantoína	32-64
GEH	Gentamicina	500
STH	Estreptomina	1000
QDA	Quinupristina-Dalfopristina	1-2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los enterococos han atraído una gran atención en los últimos años como una causa importante de infecciones nosocomiales debido al aumento de su resistencia a gran variedad de agentes antimicrobianos. En este estudio se determinó la incidencia de la presencia de resistencia a antibióticos en cepas de enterococos aisladas de pescado, mariscos, queso y carne. En relación al estudio de la presencia de enterococos en diferentes tipos de pescado y mariscos crudos adquiridos en supermercados, la mayoría de las muestras positivas para enterococos correspondieron a filetes de pescado, encontrándose también algunos aislados en almejas y en intestino de pescado. Todos los aislados fueron identificados como *E. faecium*. Hay escasos trabajos sobre la incidencia de enterococos en pescado y mariscos, aunque, *E. faecium* parece ser la especie predominante (40, 41, 42).

Respecto a la sensibilidad a antibióticos, la mitad de las cepas de *E. faecium* fueron resistentes a nitrofurantoína, un tercio a eritromicina y rifampicina, y en menores proporciones a quinupristina/dalfopristina, ciprofloxacina y levofloxacina (figura 1). Ninguno de los aislados ensayados mostró resistencia a ampicilina, penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina, teicoplanina, gentamicina o estreptomina. Un aislado fue resistente a eritromicina, nitrofurantoína y quinupristina/dalfopristina. Se detectó resistencia simultánea a eritromicina y nitrofurantoína en varios aislados. Por el contrario, ninguna cepa mostró resistencia a vancomicina, aunque otros estudios han detectado enterococos resistentes a vancomicina en mariscos (43).

La resistencia a antibióticos detectada en enterococos procedentes de pescado y mariscos del presente estudio suscita preguntas sobre el origen de los genes de resistencia. Como es bien sabido, los enterococos son intrínsecamente resistentes a un amplio rango de agentes antimicrobianos; esto ha limitado siempre las opciones de tratamiento frente a estos organismos. A causa del aumento mundial de la incidencia de los enterococos como patógenos en infecciones nosocomiales, los antimicrobianos

han sido utilizados en mayor frecuencia en hospitales. Además, los mismos agentes antimicrobianos se han utilizado ampliamente como promotores de crecimiento en la cría de animales, por tanto, los enterococos han adquirido genes de resistencia (en plásmidos o transposones) procedentes de otros organismos, o mediante mutaciones espontáneas que les confieren un nivel añadido de resistencia. Es posible que bacterias fecales resistentes a antibióticos de aguas residuales domésticas vertidas al mar puedan transferir sus determinantes de resistencia a antibióticos a la microbiota autóctona de pescado, provocando su diseminación y prevalencia en el ambiente marino. Sewart y Koditschek (44) observaron que la resistencia a β -lactámicos podía ser debida a la diseminación de plásmidos con resistencia a antibióticos en el ambiente marino. La diseminación de caracteres de resistencia a antibióticos en acuicultura es de una preocupación considerable (45, 46). Recientemente, se ha visto que los plásmidos de resistencia a antibióticos pKL10018 del patógeno de pescado *Lactococcus garviae* y pRE25 de *E. faecalis* (aislado de embutidos) son altamente homólogos y tienen un amplio rango de hospedador, lo cual hace que pudieran diseminar en su entorno elementos genéticos móviles que contengan genes de resistencia a antibióticos (47).

En cuanto a las cepas aisladas de queso y carne los resultados obtenidos indicaron perfiles de resistencia bastante diferentes entre las diferentes cepas aisladas (figura 1). Los enterococos aislados revelaron una elevada incidencia de resistencia a rifampicina, ciprofloxacina, levofloxacina y nitrofurantoina en este último, siendo solo dos aislados sensibles a todos los antibióticos probados.

La incidencia de resistencia a tetraciclina y eritromicina en los aislados de carne fue bastante superior que en los aislados de queso. Los plásmidos y transposones portadores de resistencia a eritromicina son frecuentes en enterococos (48). La resistencia a tetraciclina ha sido observada con frecuencia entre enterococos aislados de diferentes fuentes (49, 50, 51), habiéndose descrito varios mecanismos de resistencia, incluyendo bombas de exporte [*tet*(K), *tet*(L)], proteínas de protección ribosómica [*tet*(M), *tet*(O), *tet*(S)], y otros [*tet*(U)] (52). La resistencia mediada por *tet*(M) fue descrita como la más frecuente (49), ya que este determinante podía ser diseminado mediante transposones del tipo Tn916. Sin embargo, en un estudio más reciente el determinante más frecuente responsable de la resistencia a tetraciclina fue *tet*(L) (52). Los determinantes genéticos responsables de la resistencia a tetraciclina en los aislados correspondientes al presente estudio deben ser estudiados, a fin de evaluar su transmisibilidad mediante elementos genéticos móviles.

Otro antibiótico de interés, debido a su importancia clínica, es la vancomicina. En el presente trabajo, una cepas de *E. faecalis* aislada de carne y dos de *E. faecium*

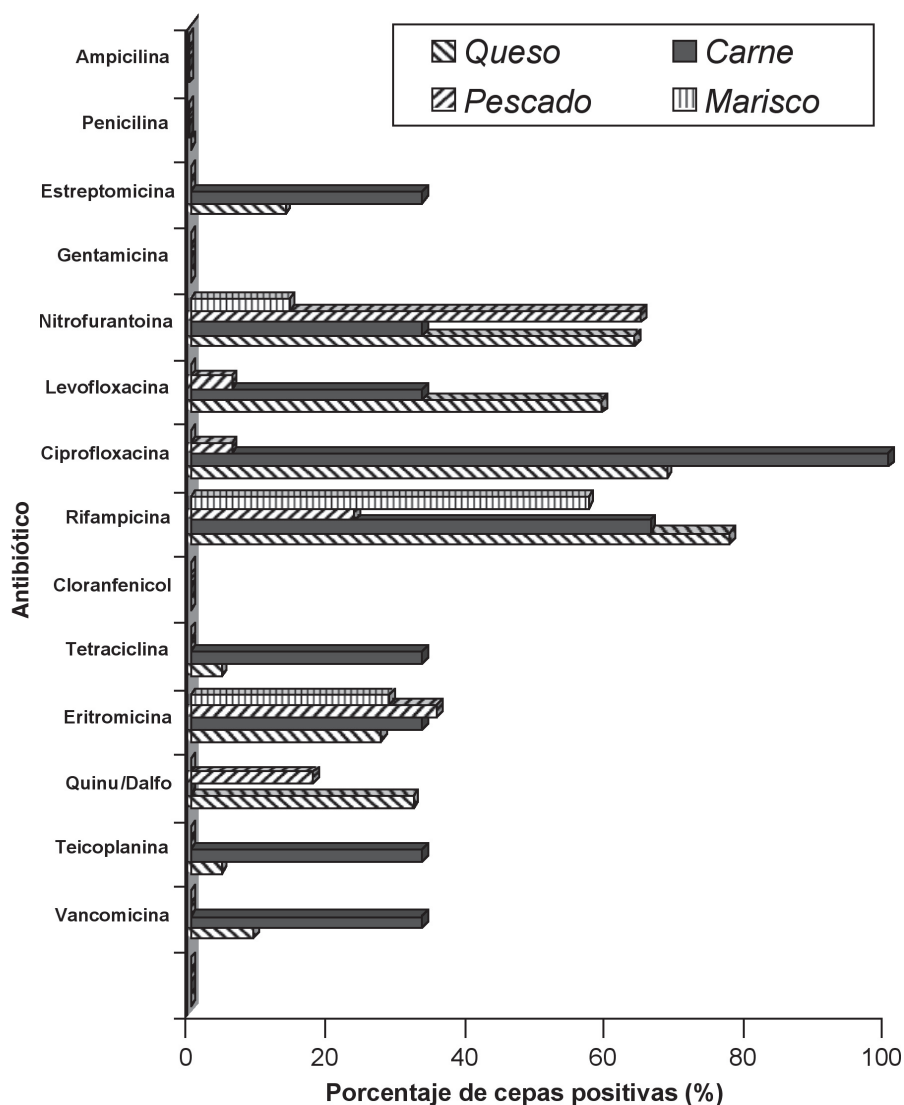


Figura 1. Incidencia de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de alimentos (queso, carne, pescado y marisco).

aisladas de queso mostraron resistencia a vancomicina, solo las dos cepas de *E. faecium* mostraron también resistencia a teicoplanina. Un estudio reciente sugiere que el fenotipo predominante de resistencia a vancomicina (VanA) tanto en aislados clínicos de humanos y animales, como en aislados lácteos, no ocurre por diseminación clonal de cepas resistentes, sino más bien por transferencia del gen *vanA* mediante elementos

genéticos transponibles, como el Tn1546 (53). Esto podría ser, probablemente, el caso de las tres cepas de enterococos resistentes a vancomicina aisladas de alimentos.

Todas las cepas de enterococos aisladas de queso y carne (tanto de *E. faecalis* como de *E. faecium*) fueron sensibles a ampicilina, penicilina, gentamicina y cloranfenicol. Algunos aislados mostraron resistencias múltiples, como por ejemplo la resistencia a eritromicina, rifampicina, ciprofloxacina, levofloxacina, nitrofurantoina, furantoinina y quinupristina/dalfopristina en *E. faecalis*. Un aislado resistente a vancomicina, fue también resistente a eritromicina, tetraciclina, rifampicina, estreptomina y quinupristina/dalfopristina.

En conclusión, la incidencia de resistencias a antimicrobianos en cepas de enterococos procedentes de queso y carne es elevada, siendo también frecuente la presencia de cepas multiresistentes. Las cepas de enterococos procedentes de pescado y marisco presentan una frecuencia menor de resistencia a antimicrobianos. Sin embargo, pensamos que el riesgo de los enterococos debe ser interpretado como una suma de varios factores de virulencia así como de resistencia a antimicrobianos. Por esta razón, es muy importante realizar otros estudios para analizar el número de factores de virulencia encontrados por cada cepa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Deibel, R.H., J.H. Silliker. 1963. Food poisoning potential of the enterococci. *J. Bacteriol.* 85: 827-832.
2. Deibel, R.H. 1964. The group D streptococci. *Bacteriol. Rev.* 28: 330-366.
3. Fariñas, M.C., C. Torres. 2007. Enterococo ¿un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25: 500-502.
4. Malani, P.N., C.A. Kauffman, M.J. Zervos. 2002. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. In: Gilmore, M.S., D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray, L.B. Rice, (Eds.). The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM Press, Washington, D.C., p. 385-408.
5. Conde-Estevez, D. Sorli, L., Morales-Molina, J.A., Knobel, H., Terradas, R., Mateu-DeAntonio, J., Pablo Horcajada, J., Grau, S. 2010. Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. In press.
6. Woodford, N., Johnson, A., Morrison, D., Speller, D.C. 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8(4): 585-615.
7. McKessar, S.J., Berry, A.M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Paton, J.C. 2000. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(11): 3224-8.
8. Schleifer, K.H., R. Kilpper-Bälz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 31-34.

9. Collins, M.D., D. Jones, J.A.E. Farrow, R. Kilpper-Balz, K.H. Schleifer. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov., *E. gallinarum* comb. nov., and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 220-223.
10. Farrow, J.A.E., M.D. Collins. 1985. *Enterococcus hiraе*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 73-75.
11. Collins, M.D., J.A.E. Farrow, D. Jones. 1986. *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 8-12.
12. Williams, A.M., J.A.E. Farrow, M.D. Collins. 1989. Reverse transcriptase sequencing of 16s ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 185-189.
13. Collins, M.D., R.R. Facklam, J.A.E. Farrow, R. Williamson. 1989b. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 48: 283-288.
14. Rodrigues, U., M.D. Collins. 1991. Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 71: 231-234.
15. Collins, M.D., U.M. Rodrigues, N.E. Pigott, R.R. Facklam. 1991. *Enterococcus dispar* sp. nov., a new *Enterococcus* species from human sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 12: 95-98.
16. Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C.R. Banner, J.L. Fryer. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 406-409.
17. Martínez-Murcia, A.J., M.D. Collins. 1991. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 80: 69-74.
18. Pompei, R., F. Berlutti, M.C. Thaller, A. Ingianni, G. Cortis, B. Dainelli. 1992. *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 365-369.
19. Devriese, L.A., B. Pot, M.D. Collins. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408.
20. De Vaux, A., G. Laguerre, C. Diviès, H. Prévost. 1998. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 383-387.
21. Svec, P., L.A. Devriese, I. Sedlacek, M. Baele, M. Vancanneyt, F. Haesebrouck, J. Swings, J. Doskar. 2001. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., new species isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1567-1574.
22. Teixeira, L.M., M.G. Carvalho, M.M.B. Espinola, A.G. Steigerwalt, M.P. Douglas, D.J. Brenner, R.R. Facklam. 2001. *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov. associated with enteric disorders in animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1737-1743.
23. Vancanneyt, M., C. Snauwaert, I. Cleenwerck, M. Baele, P. Descheemaeker, H. Goossens, B. Pot, P. Vandamme, J. Swings, F. Haesebrouck, L.A. Devriese. 2001. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 393-400.
24. Tyrrell, G.J., L. Turnbull, L.M. Teixeira, J. Lefebvre, M.G. Carvalho, R.R. Facklam, M. Lovgren. 2002. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1140-1145.
25. De Graef, E.M., L.A. Devriese, M. Vancanneyt, M. Baele, M.D. Collins, K. Lefebvre, J. Swings, F. Haesebrouck. 2003. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a later synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1069-1074.
26. Law-Brown, J., P.R. Meyers. 2003. *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 683-685.

27. Koort, J., T. Coenye, P. Vandamme, A. Sukura, J. Björkroth. 2004. *Enterococcus hermanniensis* sp. nov. from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1823-1827.
28. Fortina, M.G., G. Ricci, D. Mora, P.L. Manachini. 2004. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1717-1721.
29. Vancanneyt, M., M. Zamfir, L.A. Devriese, K. Lefebvre, K. Engelbeen, K. Vandemeulebroecke, M. Amar, L. De Vuyst, F. Haesebrouck, J. Swings. 2004. *Enterococcus saccharominimus* sp. nov. from dairy products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2175-2179.
30. Svec, P., M. Vancanneyt, L.A. Devriese, S.M. Naser, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste, J. Swings. 2005b. *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2183-2187.
31. Naser, S.M., M. Vancanneyt, E. de Graef, L.A. Devriese, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste, P. Svec, A. Decostere, F. Haesebrouck, J. Swings. 2005. *Enterococcus canintestini* sp. nov. from faecal samples of healthy dogs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2177-2182.
32. Svec, P., M. Vancanneyt, J. Koort, S.M. Naser, B. Hoste, E. Vihavainen, P. Vandamme, J. Swings, J. Björkroth. 2005a. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2479-2484.
33. Carvalho, M.G.S., P.L. Shewmaker, A.G. Steigerwalt, R.E. Morey, A.J. Sampson, K. Joyce, T.J. Barrett, L.M. Teixeira, R.R. Facklam. 2006. *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1505-1508.
34. Svec, P., M. Vancanneyt, I. Sedlacek, S.M. Naser, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste, J. Swings. 2006. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 577-581.
35. Sukontasing, S., S. Tanasupawat, S. Moonmangmee, J.S. Lee, K. Suzuki. 2007. *Enterococcus camelliae* sp. nov. isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2151-2154.
36. Tanasupawat, S., S. Sukontasing, J.S. Lee. 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov. isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1630-1634.
37. De los Reyes-Gavilán, C.G., G.K. Limsowtin, P. Tailliez, L. Sechaud, J.P. Accolas. 1992. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3429-3432.
38. Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1659.
39. Cibik, R., Lepage, E., Tailliez, P. 2000. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *System Appl. Microbiol.* 23: 267-278.
40. Campos, C.A., O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado, J. Barros-Velazquez. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39: 356-364.
41. Tomé, E., V.L. Pereira, C.I. Lopes, P.A. Gibbs, P.C. Teixeira. 2008. In vitro tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control.* 19: 535-543.
42. Al Bulushi, I.M., S.E. Poole, R. Barlow, H.C. Deeth, G.A. Dykes. 2010. Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 32-38.
43. Wilson, I.G., G.G. McAfee. 2002. Vancomycin-resistant enterococci in shellfish, unchlorinated waters, and chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 143-151.
44. Stewart, K.R., L. Koditschek. 1980. Drug resistance transfer in *Escherichia coli* in New York Bight. *Marine Pollution Bulletin.* 5: 71-74.

45. Smith, P. 2008. Antimicrobial resistance in aquaculture. *Ver. Sci. Tech.* 27: 243-264.
46. Sapkota, A., A.R. Sapkota, M. Kucharski, J. Burke, S. McKenzie, P. Walker, R. Lawrence. 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ. Int.* 34: 1215-1226.
47. Maki, T., M.D. Santos, H. Kondo, I. Hirono, T. Aoki. 2009. A transferable 20-kilobase multiple drug resistance-conferring R plasmid (pKL0018) from a fish pathogen (*Lactococcus garvieae*) is highly homologous to a conjugative multiple drug resistance-conferring enterococcal plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3370-3372.
48. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46-65.
49. Aarestrup, F.M. 2000. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS Supplement.* 101: 1-48.
50. Butaye, P., K. Van Damme, L.A. Devriese, L. Van Damme, M. Baele, S. Lauwers, F. Haesebrouck. 2000. In vitro susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 54: 181-187.
51. Pavia, M., C.G. Nobile, L. Salpietro, I.F. Angelillo. 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Protect.* 63: 912-915.
52. Hummel, A., W.H. Holzapfel, C.M.A.P. Franz. 2007. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 1-7.
53. Ribeiro, T., M. Abrantes, M.F. Silva Lopes, M.T. Barreto Crespo. 2007. Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry *vanA* and *vanB* genes. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 289-295.