

Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos

Virulence factors of Enterococcus strains isolated from ovine cheese

► Emilio Rogelio Marguet^{1*}, Marisol Vallejo^{2*}, Nelda Lila Olivera^{2*}

-
1. Doctor en Bioquímica
 2. Doctora en Biología

* Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia. Roca 115, (9100) Trelew.

** Centro Nacional Patagónico. Blvd. Brown s/n, (9120) Puerto Madryn.

Resumen

Los enterococos son utilizados en la industria alimenticia como cultivos iniciadores o probióticos y constituyen contaminantes naturales de los alimentos. Sin embargo, el género *Enterococcus* ha cobrado relevancia como causal de infecciones nosocomiales, tendencia exacerbada por el desarrollo de resistencia antibiótica. Con el objetivo de estudiar la virulencia potencial de ocho cepas de *Enterococcus faecium* y de dos cepas de *Enterococcus faecalis* aislados de quesos ovinos se investigó la resistencia a vancomicina, la actividad hemolítica y la actividad de gelatinasa. En forma adicional se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia de los genes *cytB* de la citolisina, *gelE* de la gelatinasa, *cpd* de la feromona sexual y *agg* de la proteína de agregación. Ninguna de las cepas mostró resistencia a la vancomicina o actividad hemolítica. El gen *cytB* no pudo ser identificado mediante amplificación por PCR en ninguna de las cepas estudiadas. La presencia del gen *gelE* fue detectada en siete cepas de *E. faecium* y en una cepa de *E. faecalis*, sin embargo en ningún caso se detectó actividad de la enzima. El gen *cpd* fue detectado en *E. faecium* ETw7 y *E. faecalis* ETw23, mientras que el gen *agg* fue hallado en las cepas de *E. faecium* ETw7 y *E. faecalis* ETw27. Estos resultados sugieren que la introducción de productos alimenticios o probióticos basados en el uso de cepas de enterococos requiere una cuidadosa evaluación sobre su seguridad.

Palabras clave: *Enterococcus* * quesos ovinos * factores de virulencia

Summary

Enterococci are used as starter and probiotic cultures in the food industry, and they occur as natural food contaminants. However, the genus *Enterococcus* is of increased significance as a cause of nosocomial infections, exacerbated by the development of antibiotic resistance. In order to study the potential virulence of eight *Enterococcus faecium* strains and two *Enterococcus faecalis* strains isolated from ovine cheese, vancomycin resistance, hemolytic activity and gelatinase activity were investigated. In addition, polymerase chain reaction (PCR) tests were carried out in order to

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

determine the presence of cytotoxic gene *cylB*, gelatinase gene *gelE*, sex pheromone gene *cpd* and aggregation protein gene *agg*. None of the strains showed vancomycin resistance or hemolytic activity. Gene *cylB* could not be identified by PCR amplification in any of the strains studied. The presence of gene *gelE* was found in seven *E. faecium* strains and in one *E. faecalis* strain, however in no case was gelatinase activity detected. Gene *cpd* was detected in *E. faecium* ETw7 and *E. faecalis* ETw23, while gene *agg* was found in *E. faecium* ETw7 and *E. faecalis* ETw27. These results suggest that the introduction of food products or probiotics based on the use of enterococcal strains requires careful safety evaluations.

Key words: *Enterococcus* * ovine cheese * virulence factors

Introducción

Los enterococos son microorganismos ubicuos, habitantes normales del tracto gastrointestinal de humanos y animales. Debido a su alta tolerancia a condiciones adversas ocupan una gran variedad de nichos conformando parte de la flora del suelo, aguas naturales y plantas (1) (2). Su presencia en alimentos puede resultar perjudicial debido a que son responsables del deterioro de carne, cerveza, jugo de fruta (3) (4) o potencialmente beneficiosa como en el caso de quesos que requieren de su actividad metabólica para lograr características sensoriales particulares (5) (6).

Como la mayoría de las bacterias ácido lácticas, algunas cepas de enterococos son aplicadas en el proceso de fermentación de alimentos con el propósito de mejorar la calidad sensorial y como probióticos en alimentos y suplementos dietarios (1) (6). En contraste con estas características positivas, los enterococos son reconocidos como importantes patógenos nosocomiales y están dentro de los organismos más prevalentes en infecciones hospitalarias (7) (8).

Las diferencias entre cepas de enterococos patógenos y aparentemente inocuas no resultan lo suficientemente claras. El conocimiento actual sobre la patogenicidad es incompleto y no se han investigado con profundidad los mecanismos o variables involucrados que permiten a este grupo bacteriano una eficiente transferencia genética de factores de virulencia (7) (8).

Además de su reconocida capacidad para adquirir resistencia a antibióticos (9-11) los enterococos desarrollan, gracias al intercambio de información genética por conjugación, características que aumentan su virulencia (12) (13). Dentro de estas características se puede mencionar: la adherencia a tejidos del huésped, la invasión y formación de abscesos (14) (15), la modulación de la respuesta inflamatoria, la secreción de productos tóxicos (8) y la síntesis de enzimas hidrolíticas (16) (17).

Se ha observado que cepas de enterococos aisladas de alimentos o del medio ambiente poseen factores de virulencia que se creían restringidos a las cepas aisla-

das de humanos o a ambientes relacionados con actividades humanas. Es frecuente aislar en alimentos, especialmente productos lácteos, enterococos que poseen características vinculadas con patologías humanas o animales (8) (18).

Se ha propuesto y demostrado en modelos animales experimentales el intercambio de información genética en el intestino, en consecuencia, existiría la posibilidad de que cepas inocuas provenientes de alimentos se transformen en patógenas gracias a la transferencia de plásmidos (16). Esta posición es considerada exagerada en la industria alimenticia ya que hasta el momento no se han demostrado casos clínicos de enfermedades transmitidas por alimentos que involucren a los enterococos (1).

Sin embargo, es necesario conocer el estado actual de cepas aisladas de alimentos para contar en el futuro con la posibilidad de realizar estudios retrospectivos que permitan afirmar o rechazar la hipótesis de una eventual transferencia de factores de virulencia.

En este trabajo se determinó la sensibilidad a vancomicina y las actividades de citolisina (hemolisina) y gelatinasa en 10 cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos elaborados en el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh). También se investigó, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la presencia de los genes *cylB* de la citolisina, *gelE* de la gelatinasa, *cpd* de la feromona sexual y *agg* de la proteína de agregación.

Materiales y Métodos

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

Se seleccionaron, luego de un periodo de maduración de 90 días, quesos ovinos semiduros de queserías del VIRCh elaborados con fermentos comerciales de tipo mesófilo-homofermentativo. Las muestras de queso se sembraron en caldo púrpura de bromocresol-azida con una concentración de NaCl de 6,5%. Luego de 48 h de incubación a 35 °C los cultivos se repicaron a agar de Man Rogosa Sharp (MRS) suplementado con

NaCl (6,5%), ácido nalidíxico (40 µg/mL) y cicloheximida (10 µg/mL). Las colonias sospechosas se estudiaron mediante la coloración de Gram, prueba de la catalasa, crecimiento a 45 °C, crecimiento en bilis al 40%, hidrólisis de la esculina y actividad de pirrolidonoil aminopeptidasa (PYR).

Las colonias pertenecientes al género *Enterococcus* se identificaron a nivel de especie según las recomendaciones de Manero *et al.* (19), esquema basado en claves dicotómicas que incluyen fermentación de azúcares, detección de actividad enzimática y presencia de pigmentos. Las cepas se conservaron en leche descremada al 10% y glicerol al 10% a -30 °C y se ingresaron al cepario perteneciente a la cátedra de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia) de acuerdo con los códigos establecidos por el laboratorio.

ENSAYO DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

La producción de hemolisina de las cepas de *Enterococcus* fue evaluada en agar Cerebro-corazón (BHI) suplementado con sangre humana al 5% luego de una incubación a 35 °C durante 48 h.

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE GELATINASA

La actividad de la gelatinasa se realizó en el agar BHI suplementado con 0,4% de gelatina. Luego de 48 horas de incubación a 35 °C las placas se revelaron con una solución compuesta por 15% HgCl₂ en 20% v/v de HCl concentrado (20).

SENSIBILIDAD A LA VANCOMICINA

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó por el método de dilución en caldo según las recomendaciones de Sahn y Washigton II (21).

PURIFICACIÓN DE ADN

Luego de una incubación a 35 °C durante 12 h en caldo MRS, las cepas de enterococos se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics, Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.)

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LOS GENES *cytB*, *gelE*, *agg* y *cpd*

Los cebadores y protocolos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes *cytB*, *gelE*, *agg* y *cpd* fueron los descritos por Eaton y Gasson (8). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La electroforesis de los productos de la amplificación genética se realizó en gel de agarosa

al 1%, a 70 V durante 1 h en *buffer* TAE (Tris, ácido acético, EDTA, pH 8). Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 min en una solución de *buffer* TAE y bromuro de etidio de 05 µg/mL; posteriormente se lo visualizó con luz UV en un transiluminador, se fotografió y se archivó.

Resultados

Las claves dicotómicas descritas por Manero *et al.* permitieron clasificar 8 cepas como *E. faecium* (Etw 6, Etw 7, Etw 15, Etw 16, Etw 17, Etw 20, Etw 21 y Etw 22) y 2 como *E. faecalis* (Etw23 y Etw27).

Todas las cepas examinadas presentaron una CIM de vancomicina $\geq 0,25$ µg/mL, excepto la cepa de *E. faecium* Etw17 y las dos cepas de *E. faecalis* Etw23 y Etw27 (CIM $\geq 0,5$ µg/mL).

Utilizando la técnica descrita las cepas estudiadas no exhibieron actividad hemolítica, resultado que coincide con los obtenidos por medio de la PCR que no reveló la presencia del gen *cytB* en ningún caso (Fig. 1).

Como en el caso de la hemolisina, tampoco fue posible la detección de actividad degradativa sobre la gelatina, sin embargo en este caso la amplificación genética demostró la presencia del gen *gelE* en 8 de las 10 cepas estudiadas (Fig. 2).

La PCR permitió revelar la presencia del gen *agg* en las cepas *E. faecium* Etw7 y *E. faecalis* Etw27 (Fig. 3), mientras que el gen *cpd* se detectó en las cepas *E. faecium* Etw7 y *E. faecalis* Etw23 (Fig. 4).

Discusión

La poca diversidad encontrada a nivel de especie es característica en los aislamientos de quesos; *E. faecium* y *E. faecalis*, en forma conjunta con *E. durans*, son las especies más frecuentemente aisladas en este tipo de nicho ecológico. Estos resultados se condicen con los hallados



Figura 1. Amplificación por PCR del gen *cytB* (843 pb).

6: *E. faecium* Etw6; 7: *E. faecium* Etw7; 15: *E. faecium* Etw15; 16: *E. faecium* Etw16; 17: *E. faecium* Etw17; 20: *E. faecium* Etw20; 21: *E. faecium* Etw21; 22: *E. faecium* Etw22; 23: *E. faecalis* Etw23; 27: *E. faecalis* Etw27; ST: marcador estándar.



Figura 2. Amplificación por PCR del gen *gelE* (419 pb).
6: *E. faecium* ETw6; 7: *E. faecium* ETw7; 15: *E. faecium* ETw15; 16: *E. faecium* ETw16; 17: *E. faecium* ETw17; 20: *E. faecium* ETw20; 21: *E. faecium* ETw21; 22: *E. faecium* ETw22; 23: *E. faecalis* ETw23; 27: *E. faecalis* ETw27; ST: marcador estándar.



Figura 3. Amplificación por PCR del gen *agg* (1533 pb).
6: *E. faecium* ETw6; 7: *E. faecium* ETw7; 15: *E. faecium* ETw15; 16: *E. faecium* ETw16; 17: *E. faecium* ETw17; 20: *E. faecium* ETw20; 21: *E. faecium* ETw21; 22: *E. faecium* ETw22; 23: *E. faecalis* ETw23; 27: *E. faecalis* ETw27; ST: marcador estándar.



Figura 4. Amplificación por PCR del gen *cpd* (782 pb).
6: *E. faecium* ETw6; 7: *E. faecium* ETw7; 15: *E. faecium* ETw15; 16: *E. faecium* ETw16; 17: *E. faecium* ETw17; 20: *E. faecium* ETw20; 21: *E. faecium* ETw21; 22: *E. faecium* ETw22; 23: *E. faecalis* ETw23; 27: *E. faecalis* ETw27; ST: marcador estándar.

en diversos quesos artesanales europeos, en los que *E. faecalis* es la especie predominante (22) (23), mientras que la mayor frecuencia de *E. faecium* se ha informado en quesos como el Feta y Kefalotyri (24) (25).

Los valores de CIM muestran una alta sensibilidad a vancomicina e indican que las cepas estudiadas no pueden ser incluidas en ninguno de los genotipos de

resistencia descritos hasta la actualidad (26) (27). La aparición de fenotipos resistentes en alimentos, en especial productos lácteos, puede deberse a su manipulación en condiciones de higiene deficientes en algunos de los puntos críticos del proceso de elaboración. La presión selectiva que impone el uso indiscriminado de antibióticos en salud humana ejerce un papel importante en la incidencia de bacterias resistentes. Las personas tratadas con antibióticos pueden actuar como reservorios naturales y fuentes de diseminación de genotipos resistentes (28).

Las cepas estudiadas no revelaron la presencia del gen *cytB* cuya expresión es estrictamente necesaria para el transporte y posterior actividad de la hemolisina. En algunos casos puede detectarse la presencia de un gen o más genes relacionados con el operón *cyt*, condición necesaria pero no suficiente para que se exprese la capacidad hemolítica de la enzima (29) (30). En consecuencia, la hemólisis en placa sigue siendo la "regla de oro" para evaluar la posible virulencia de cepas de *Enterococcus* (18).

La expresión de la gelatinasa, como en el caso de la hemolisina, no sólo depende de un gen estructural sino que otros productos del operón que constituye, son necesarios para su expresión. En este caso la amplificación genética permitió detectar la presencia del gen *gelE* en 8 de las 10 cepas estudiadas, coincidiendo con los datos hallados en trabajos anteriores (2) (8) y evidenciando que la prevalencia del gen es alta dentro de la especie *Enterococcus*, aunque este fenómeno no implique necesariamente la expresión de su actividad. Se ha demostrado que aún en el caso de la transcripción total del operón es posible no detectar actividad enzimática, situación que establece la posible existencia de un control postranscripcional (31).

La sustancia de agregación (SA) es una proteína de superficie codificada por el gen *agg*, que forma parte de un plásmido inducible por feromonas (7). Su expresión incrementa la capacidad invasiva de cepas patógenas (32) pero en el caso de cepas probióticas amplifica sus propiedades benéficas (33). La presencia del gen *agg* se detectó en las cepas *E. faecalis* ETw27 y *E. faecium* ETw7, hallazgo que resulta curioso ya que hasta la fecha el mencionado gen se ha encontrado exclusivamente en cepas de *E. faecalis* (3). En los 2 casos no fue posible detectar actividad hemolítica o degradación de la gelatina, mientras que ambas cepas exhibieron actividad antagonista contra cepas de *Listeria monocytogenes* (datos no mostrados). Estas características particulares permiten pensar que en estos casos la expresión de SA puede ser considerada un aspecto positivo.

Las cepas *E. faecium* ETw7 y *E. faecalis* ETw23 exhibieron el gen *cpd*, característica genética que les permitiría, bajo determinadas condiciones, inducir la transferencia de plásmidos dependiente del mecanismo mediado por feromonas. Se debe prestar atención a la

presencia de este gen en la cepa *E. faecium* ETw7 ya que su frecuencia en esta especie es considerada muy baja (34). Por el contrario, se ha demostrado que la mayoría de las cepas de *E. faecalis* aisladas de fermentos iniciadores y alimentos exhiben el gen *cpd* (8). Sin embargo, desde el punto de vista alimentario este factor no debe considerarse potencialmente peligroso ya que la transferencia de factores de virulencia a través de elementos móviles inducibles por feromonas no ha podido ser demostrada en las condiciones encontradas en alimentos fermentados o en el intestino (1) (6) (8). En cambio, este fenómeno de transferencia genética es hallado frecuentemente en cepas aisladas de muestras clínicas (12) o en poblaciones que han sido sometidas a una presión selectiva, como el tratamiento antibiótico en concentraciones subinhibitorias (14).

Conclusiones

Los enterococos son aislados en forma frecuente de alimentos y en especial de productos lácteos fermentados, pero su aplicación deliberada en procesos de fermentación es discutida debido a su alta prevalencia como patógenos humanos. Aunque existe dificultad para distinguir entre cepas inocuas y patógenas a través de métodos moleculares, hasta la actualidad no ha sido posible establecer una correlación entre la ingestión de alimentos que contienen enterococos e infecciones de origen alimentario.

Sin embargo, este trabajo demuestra como otros anteriores, que los productos lácteos pueden constituir reservorios de cepas que exhiben genes vinculados con factores de virulencia que podrían ser transferidos a cepas humanas en el tracto gastrointestinal. En consecuencia, se deberá, en el futuro, tener en cuenta este aspecto de seguridad alimentaria mediante el examen exhaustivo de las cepas de *Enterococcus* que potencialmente puedan ser utilizadas como probióticos o aisladas de alimentos con el objeto de evitar la diseminación de características patogénicas, especialmente la resistencia antibiótica.

CORRESPONDENCIA

DR. EMILIO R. MARGUET
Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew)
Universidad Nacional de la Patagonia
Roca 115,
9100 TRELEW, Argentina
E-mail: emarguet@yahoo.com.ar

Referencias bibliográficas

1. Ogier JC, Serror P. PART VI: The *Enterococcus* genus. Int J Food Microbiol 2008; En prensa.

2. Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods — a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol 2003; 88: 105-22.
3. Foulquié Moreno M, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microbiol 2006; 106: 1-24.
4. Sarantinopoulos P, Andrighetto C, Georgalaki MD, Rea MC, Lombardi A, Cogan TM, et al. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. Int Dairy J 2001; 11: 621-47.
5. Centeno JA, Menéndez S, Hermida MA, Rodríguez-Otero JL. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. Int J Food Microbiol 1999; 48: 97-101.
6. Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. Int J Food Microbiol 2003; 88: 215-22.
7. Smedo T, Santos MA, López MF, Figueiredo Marques JJ, Barreto Crespo MT, Tenreiro R. Virulence factors in food, clinical and referente enterococci: A common trait in the genus? Syst Appl Microbiol 2003; 26: 13-22.
8. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 1628-35.
9. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. J Hosp Infect 2003; 53: 159-71.
10. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. Int J Food Microbiol 2002; 88: 269-90.
11. Francia MA. Glycopeptide-resistant *Enterococcus* in Europe: an increasing nosocomial problem. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 457-9.
12. Clewell DB. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. Plasmid 2007; 58: 205-27.
13. Wirth R. Sex pheromones and gene transfer in *Enterococcus faecalis*. Res Microbiol 2000; 151: 493-6.
14. Wu K, An FY, Clewell DB. *Enterococcus faecalis* pheromone-responding plasmid pAD1 gives rise to an aggregation (clumping) response when cells are exposed to subinhibitory concentrations of chloramphenicol, erythromycin, or tetracycline. Plasmid 1999; 41: 82-8.
15. Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. Microb Pathog 2001; 30: 211-20.
16. Clewell DB. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. Plasmid 2007; 58: 205-27.
17. Kanemitsu K, Nishino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H, et al. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. J Microbiol Methods 2001; 47: 11-6.

18. Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, Silva Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, *et al.* Comparative study using type strains and clinical and food isolated to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2569-76.
19. Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4425-30.
20. Pattus A, Massotte D, Wilmsen HU, Lakey J, Tsernoglou D, Tucker A, *et al.* Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia* 1990; 46: 180-92.
21. Sahm DF, Washington II JA. Mechanisms susceptibility test: dilution methods. In: Ballows A. (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM; 1992.
22. Tornadijo ME, Fresno JM, Bernardo A, Martín Sarmiento R, Carballo J. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (armada variety). *Lait* 1995; 75: 551-70.
23. Fontecha J, Pelaez C, Juárez M, Requena T, Gómez C. Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. *J Dairy Sc* 1990; 73: 1150-7.
24. Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two greek cheeses from ewes' milk. *J Dairy Sci* 1992; 75: 1389-93.
25. Litopoulou-Tzanetaki E. Changes in numbers and kind of lactic acid bacteria during ripening Kefalotyri cheese. *J Food Sc* 1990; 55: 111-13.
26. Clewell DB, Francia VM, Flannagan SE, An FY. Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid* 2002; 48: 193-201.
27. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* 2003; 53: 159-71.
28. Houben JH. The potential of vancomycin-resistant enterococci to persist in fermented and pasteurized meat products. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 11-8.
29. Haas W, Gilmore MS. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytotoxin of *Enterococcus faecalis*. *Med Microbiol Immunol* 1999; 187: 183-90.
30. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to antibiotic determinants. *J Bacteriol* 1994; 176: 7335-44.
31. Lopes MF, Simoes AP, Tenreiro R, Figueiredo Marques JJ, Barreto Crespo MT. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol* 2006; 112: 208-14.
32. Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog* 2001; 30: 211-20.
33. Jacobsen C, Nielsen R, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, *et al.* Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4949-56.
34. Wirth R. Sex pheromones and gene transfer in *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol* 2000; 151: 493-6.

Acceptedo para su publicación el 4 de julio de 2008