

## Artículo original

# *Enterococcus* spp. aislados de queso de oveja: resistencia a los antimicrobianos de utilización clínica

Gastón Delpech<sup>a</sup>, Mónica Sparo<sup>a,b,\*</sup>, Gisela Pourcel<sup>a</sup>, Celia Schell<sup>b</sup>, María Marta De Luca<sup>b</sup>, Juan Ángel Basualdo<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Microbiología, Escuela Superior de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. <sup>b</sup>Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Recibido 7 de mayo de 2013; aceptado 26 de septiembre de 2013

**Resumen:** En *Enterococcus* spp. aislados de quesos de oveja se investigó la resistencia *in vitro* a antimicrobianos de utilización clínica. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para gentamicina, estreptomycin, vancomicina, teicoplanina, ampicilina, imipenem, linezolid y tigeciclina. Se detectó la producción de  $\beta$ -lactamasa y se realizaron experimentos de conjugación para transferir resistencia a gentamicina. En un aislamiento de *E. faecalis* y en 10 de *E. faecium* se observó resistencia a ampicilina; se demostró la producción de  $\beta$ -lactamasa en un *E. faecalis*. En *E. faecium*, 15 aislamientos fueron resistentes a imipenem; 4 a linezolid y 5 a glucopéptidos. En 4 aislamientos de *E. faecalis* se demostró alto nivel de resistencia plasmídica a gentamicina. No se observaron aislamientos resistentes a tigeciclina. El queso de oveja es un reservorio de enterococos resistentes con potencial diseminación al hombre a través de la cadena alimentaria.

**Palabras clave:** Enterococos, antimicrobianos, resistencia, horizontal, queso, oveja.

## *Enterococcus* spp. isolated from goat cheese: resistance to clinically used antimicrobials

**Abstract:** *In vitro* resistance to clinically used antimicrobials was investigated in *Enterococcus* spp. isolated from goat cheese. The gentamycin, streptomycin, vancomycin, teicoplanin, ampicillin, imipenem, linezolid and tigecyclin minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. B-lactamase production was detected and conjugation experiments were carried out for transferring gentamycin resistance. In one *E. faecalis* and in 10 *E. faecium* isolates there was ampicillin resistance and  $\beta$ -lactamase production was demonstrated in one *E. faecalis*. Fifteen *E. faecalis* were imipenem resistant; 4 linezolid resistant and 5 glucopeptide resistant. There was a high level of plasmidic resistance to tigecyclin in 4 *E. faecalis* isolates. There were no tigecyclin resistant isolates. Goat cheese is a reservoir of resistant enterococci with potencial human dissemination through the food chain.

**Keywords:** Enterococci, antimicrobial, resistance, horizontal, cheese, goat.

\* Correspondencia:

E-mail: msparo@med.unlp.edu.ar

## Introducción

Los alimentos de origen lácteo conforman uno de los principales reservorios naturales de *Enterococcus* spp., su presencia puede estar asociada al medio ambiente o a la contaminación con materia fecal de animales de granja o del hombre. Otros factores predisponentes son las condiciones de limpieza del equipo de ordeño y la pureza del agua utilizada para el procesamiento de la leche [1].

Los antimicrobianos (ATM) en los animales de cría, destinados a la producción de alimentos, se utilizan para

prevenir y tratar las enfermedades infecciosas. Sin embargo, con frecuencia, también se utilizan en dosis subterapéuticas para promover el crecimiento de los animales. Dentro de los ATM utilizados como profilaxis o como promotores de crecimiento, se incluyen familias de drogas como glucopéptidos, estreptograminas, macrólidos y tetraciclinas [2]. Estos ATM pueden favorecer la selección y amplificación de bacterias potencialmente patógenas con resistencia múltiple, como los enterococos, que pueden transmitirse al hombre a través de la cadena alimentaria [2]. En Europa y América del Norte, se han aislado enterococos con

resistencia a los ATM en animales destinados a la industria alimenticia [3,4]. Asimismo, se ha observado la expresión de resistencia antimicrobiana en enterococos recuperados de productos cárnicos, lácteos y alimentos listos para consumir [5-9]. En un estudio realizado en Francia sobre enterococos de origen clínico y recuperados de alimentos, se observó un patrón de electroforesis de campo pulsado (PFGE) común entre cepas resistentes a los ATM de *E. faecium* aisladas de quesos y de humanos. De esa investigación se desprende que el queso puede actuar como reservorio para estas cepas resistentes, permitiéndoles persistir y diseminarse en la comunidad [10]. También Sorensen *et al.* comprobaron que cepas de *Enterococcus* spp. con resistencia múltiple a los ATM tenían como reservorio los alimentos derivados de aves de corral y cerdos y podían resistir el pasaje gástrico; facilitando así su portación sostenida en el intestino [11].

En América del Sur aún no está documentada la presencia de enterococos con resistencia múltiple a los ATM en quesos de oveja. En la región del sudeste de la Provincia de Buenos Aires (República Argentina) una de las principales actividades económicas es la agrícola-ganadera; dónde la elaboración de productos lácteos de distinto origen (bovino, ovino, caprino) ocupa un lugar destacado [12]. El objetivo de este trabajo fue investigar en queso de oveja la presencia de *Enterococcus* spp. con resistencia a los antimicrobianos de utilización clínica.

## Materiales y métodos

**Aislamientos bacterianos:** Durante el período octubre 2011 y marzo 2012 se analizaron muestras de queso de oveja (*n*: 36), tomadas aleatoriamente a partir de tres lotes (cuatro piezas/lote) en bocas de expendio de productos de origen ovino (EE1, EE2 y EE3) de la ciudad de Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina. El aislamiento y caracterización fenotípica se realizaron de acuerdo al protocolo de Delpech *et al.* [13]. A partir de la coloración de Gram y la producción de catalasa se realizaron pruebas de hidrólisis (arginina, piruvato, metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido), tolerancia al telurito 0,04%, fermentación de carbohidratos (manitol, arabinosa, sacarosa, sorbitol, rafinosa, sorbosa), motilidad en caldo tioglicolato y producción de pigmento en agar. La genotipificación a nivel de género se realizó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de acuerdo al protocolo de Delpech *et al.* [13]. Se utilizaron cebadores derivados de regiones altamente conservadas del gen *tuf* (Tabla 1). La caracterización genotípica a nivel de especie se efectuó mediante PCR múltiple utilizando cebadores específicos (Tabla 1), de acuerdo al protocolo de Jackson *et al.* [14]. A partir de cultivos en el medio selectivo agar fluorogénico-gentamicina-talio-carbonato (fGCTC) se estudiaron 56 aislamientos compatibles con *Enterococcus* spp. (colonias fluorescentes con o sin hidrólisis de almidón), que fueron caracterizados como *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium* y *E. hirae*.

**Investigación de resistencia antimicrobiana in vitro:** Se

Tabla 1. Cebadores de genes y de cepas de referencia de *Enterococcus* spp. utilizados para la caracterización genotípica a nivel de género, especie y de resistencia a glucopéptidos.

Gen/Cepa	Cebador	Secuencia (5'-3')	Prod. (pb)	Ref <sup>a</sup>
<i>Tuf</i>	Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	29
	Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
<i>E. avium</i> ATCC 14025	AV1	GCTGCGATGAAAAATATCCG	368	14
	AV2	AAGCCAATGATCGGTGTTTTT		
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	360	14
	FL2	TAATGGTGAATCTTGGTTTGG		
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	FM1	GAAAAACAATAGAAGAATTAT	215	14
	FM2	TGCTTTTTTGAATCTTCTTTA		
<i>E. hirae</i> ATCC 8043	HI1	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	187	14
	HI2	TAAATTCTTCTTAAATGTTG		
<i>vanA</i>	A1	GGGAAAACGACAATTGC	732	30
	A2	GTACAATGCGGCCGTTA		
<i>vanB</i>	B1	ATGGGAAGCCGATAGTC	635	30
	B2	GATTTCGTTCTCGACC		

<sup>a</sup>Ref: referencia bibliográfica

investigó la resistencia antimicrobiana *in vitro* mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por dilución en agar, utilizando drogas de pureza analítica certificada. Se ensayaron vancomicina, teicoplanina, ampicilina, imipenem, gentamicina, estreptomycin, linezolid y tigeciclina. Se utilizaron las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299 como control negativo y positivo, de resistencia a glucopéptidos y aminoglicósidos, respectivamente. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las recomendaciones del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* [15]. Se determinó la producción de  $\beta$ -lactamasa mediante el método de la cefalosporina cromogénica (Cefinase BBL, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Detección de genes *vanA* y *vanB* de resistencia a glucopéptidos:** Mediante la técnica de PCR se estudió la portación de los genes de resistencia a glucopéptidos *vanA* y *vanB* (Tabla 1), siguiendo el protocolo de Delpech *et al.* [13].

**Transferencia in vitro de alto nivel de resistencia a gentamicina:** Se realizaron experimentos de conjugación *in vitro* entre *E. faecalis* de queso de oveja con alto nivel de resistencia a gentamicina (ANR-G; donantes) y la cepa *E. faecalis* JH2-SS (Colección del Dr. M. Gilmore; EE.UU) de origen humano con resistencia cromosómica a estreptomycin (receptora) y sin ANR-G, de acuerdo al protocolo de Sparo *et al.* [16]. En las cepas donantes se confirmó el origen plasmídico de la ANR-G mediante la ausencia de desarrollo en agar infusión cerebro-corazón (BHI) con gentamicina

(500 mg/L), posterior al tratamiento con novobiocina. Para la transferencia plasmídica *in vitro* los aislamientos con ANR-G provenientes de queso donantes y la cepa receptora se incubaron en caldo BHI, en una relación 1/10, a 35 °C durante 5 h. Luego se agregó estreptomina (300 mg/L) y se incubó durante 9 h a 35 °C. El sedimento se resuspendió en caldo BHI. A partir de diluciones seriadas en solución salina estéril se inoculó en agar BHI con estreptomina (300 mg/L) y gentamicina (500 mg/L), incubando a 35 °C durante 48 h. Se realizaron recuentos de bacterias viables en agar BHI, agar BHI con gentamicina (500 mg/L) y agar BHI con estreptomina (300 mg/L). Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizó el equipo QIAGEN<sup>6</sup>.

## Resultados

Los enterococos fueron aislados de muestras obtenidas en las tres bocas de expendio de productos ovinos: EE2 (30/56), EE1 (18/56) y EE3 (8/56). Se recuperaron 56 aislamientos caracterizados por métodos fenotípicos y genotípicos como *E. faecium* (45), *E. faecalis* (9), *E. avium* (1) y *E. hirae* (1). *E. faecalis*, *E. avium* y *E. hirae* no presentaron resistencia a vancomicina y teicoplanina, sin embargo en 5/45 de los *E. faecium* aislados se observó resistencia (Tabla 2). En el total de los enterococos resistentes a glucopéptidos se detectó la portación del gen *vanA* (CIM<sub>van</sub>: 32-512 mg/L; CIM<sub>tei</sub>: 32-256 mg/L).

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para antimicrobianos de uso clínico en *Enterococcus* spp. aislados de queso de oveja.

ATM <sup>a</sup>	<i>E. faecium</i> (n: 45)	<i>E. faecalis</i> (n: 9)	<i>E. avium</i> (n:1)	<i>E. hirae</i> (n:1)
Van <sup>b</sup>	0,50-512 <sup>c</sup>	0,12-0,50	0,12	0,25
Tei	0,25-256	0,25-1,00	0,06	0,06
Amp	1,00-64	0,25-64	0,50	0,12
Imp	1,00-32	0,06-0,25	0,25	0,06
Gen	4,00-64	32-1024	16	32
Str	64-128	64-1024	64	64
Lzd	0,12-32	0,50-1,00	0,06	0,03
Tgc	0,01-0,12	0,01-0,06	0,03	0,03

<sup>a</sup> ATM: antimicrobianos. <sup>b</sup> Van: vancomicina; Tei: teicoplanina; Amp: ampicilina; Imp: imipenem; Gen: gentamicina; Str: estreptomina; Lzd: linezolid; Tgc: tigeciclina. <sup>c</sup> Valores expresados en mg/L.

Se detectó resistencia a la ampicilina en 10/45 *E. faecium* aislados; con expresión simultánea de resistencia a glucopéptidos en 5 aislamientos. En 1/9 *E. faecalis* se detectó resistencia a la ampicilina mediante la producción de β-lactamasa (CIM<sub>amp</sub>: 64 mg/L). *E. avium* y *E. hirae* no expresaron resistencia a este agente β-lactámico. Se observó resistencia a imipenem en 15/45 aislamientos de *E. faecium*.

Se recuperaron 4 aislamientos de *E. faecium* con resistencia a linezolid (CIM<sub>lin</sub>: 16-32 mg/L), sin expresión conjunta

de resistencia a los glucopéptidos y a la ampicilina.

Se observó la expresión de ANR-G en 4 *E. faecalis* (CIM<sub>gen</sub>: 1024 mg/L), así como alto nivel de resistencia a estreptomina en 2/9 aislamientos (CIM<sub>str</sub>: 512-1024 mg/L). No se comprobó la expresión simultánea de alto nivel de resistencia a los dos aminoglucósidos. Se observó la transferencia horizontal *in vitro* de ANR-G mediante conjugación plasmídica entre 4/4 *E. faecalis* de queso de oveja y la cepa receptora humana *E. faecalis* JH2-SS (Figura 1). La totalidad de los aislamientos fueron sensibles a tigeciclina.

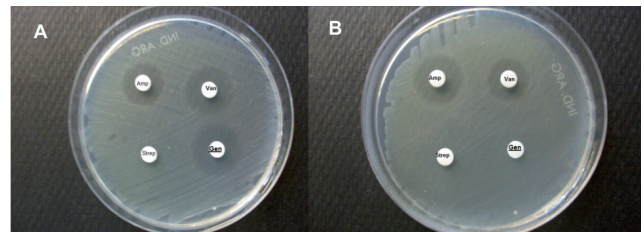


Figura 1. Transferencia *in vitro* de resistencia plasmídica a gentamicina. A: *E. faecalis* JH2-SS salvaje. B: *E. faecalis* JH2-SS transconjugada. Amp: ampicilina; Van: vancomicina; Gen: gentamicina; Str: estreptomina.

## Discusión

En Argentina es escasa la documentación sobre la presencia de enterococos en alimentos de origen animal. En un estudio realizado en la región noroeste del país, para evaluar la calidad microbiológica de productos cárnicos fermentados, se observó una baja prevalencia (2/17) de enterococos resistentes a los ATM [17]. Sin embargo, en quesos ovinos elaborados en la Patagonia argentina (región sur del país) no se detectó resistencia a glucopéptidos en la totalidad de los aislamientos caracterizados como enterococos [18]. Recientemente, en la región del sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina) se comprobó la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a los ATM en quesos artesanales de cabra y de vaca [13]. Es importante destacar que hasta el presente trabajo no se disponía de comunicaciones sobre la presencia de enterococos resistentes a los ATM en quesos de oveja elaborados en la región del sudeste de la provincia de Buenos Aires.

Las especies de *Enterococcus* más prevalentes en esta investigación fueron *E. faecium* (45/56) y *E. faecalis* (9/56). Estudios previos coincidieron en que al menos una o ambas especies eran las predominantes entre las recuperadas en quesos elaborados en Argentina y en otros países [18-21]. Sin embargo, en estas investigaciones previas los autores no detectaron aislamientos de *E. avium* y *E. hirae*.

En las muestras analizadas se observó la expresión de resistencia a la ampicilina en *E. faecium* (10/45) y en *E. faecalis* (1/9). Malek *et al.* en un estudio sobre resistencia antimicrobiana en quesos egipcios no registraron resistencia a esta droga en enterococos [22]. En un estudio sobre quesos europeos se observó resistencia a la ampicilina (2,1%) en *E. faecalis*, mientras que la totalidad de los aislamientos de *E. faecium* fue susceptible a este antimicrobiano [23]. Es



importante destacar la producción de  $\beta$ -lactamasa por *E. faecalis* de queso de oveja, considerando que su detección es muy poco frecuente incluso en enterococos de origen humano [24].

En 15/45 aislamientos de *E. faecium* se detectó resistencia a imipenem. Sin embargo, en un estudio reciente realizado en quesos de origen egipcio se observó resistencia a este antimicrobiano en el 100% de los enterococos investigados [22].

Se registró la expresión de resistencia a linezolid (4/45) en *E. faecium* aislados de queso de oveja. En una publicación reciente nuestro grupo detectó la expresión de resistencia a este antimicrobiano (13,6%) en *E. faecium* de productos cárnicos y de origen bovino [13]. En un estudio sobre enterococos resistentes a los ATM en animales de cría de origen europeo, se comunicó una frecuencia de resistencia menor (1%) a linezolid [4]. Esta droga ha sido aprobada para el tratamiento de ciertas infecciones causadas por enterococos resistentes a vancomicina y su utilización para el tratamiento de infecciones invasivas por enterococos es controvertida [24].

En *E. faecalis* se observó ANR-G (4/9) y alto nivel de resistencia a estreptomina (2/9). Jamet *et al.* [25], en Francia, en estudios realizados en quesos elaborados con leche no pasteurizada detectaron ANR-G en el 7% de los *E. faecalis* recuperados. Asimismo, en Brasil, Fracalanza *et al.* [26] comunicaron una menor prevalencia de alto nivel de resistencia a estreptomina (10,6%) para *E. faecalis* de origen lácteo. En un estudio colaborativo de seis países europeos, se observó en *E. faecalis* de quesos un menor porcentaje de resistencia a gentamicina (25,5%) aunque un mayor porcentaje de resistencia a estreptomina (46,8%), los autores detectaron, asimismo, resistencia a los dos aminoglucósidos en aislamientos de *E. faecium* [23].

En el período analizado se detectó resistencia (5/45) a glucopéptidos en aislamientos de *E. faecium*. Sin embargo, estudios realizados en España, en enterococos recuperados de quesos de origen ovino, comunicaron una menor frecuencia (1,5%) de resistencia a glucopéptidos [27]. En un estudio multicéntrico realizado a nivel nacional en Argentina se observó que la mayoría (97,9%) de las cepas de *E. faecium* de origen humano eran portadoras del gen *vanA* [28]. La portación del gen *vanA* en aislamientos alimentarios tiene gran relevancia pues es posible su transferencia horizontal entre enterococos de distinto origen [2].

La expresión conjunta de resistencia a la ampicilina y a la vancomicina junto con la demostración *in vitro* de la transferencia horizontal de determinantes genéticos vinculados con el ANR-G tienen gran importancia clínica debido a que la resistencia a estos agentes determina la pérdida de sinergia entre aminoglucósidos y agentes activos sobre la pared celular, fundamental para el tratamiento de infecciones invasivas causadas por enterococos [24].

El hallazgo del fenotipo VanA y la comprobación de ANR-G de origen plasmídico habilitan la transferencia horizontal entre diversas cepas, pudiendo transmitirse *in vivo* hacia enterococos de la microbiota intestinal, como fue

probado previamente por nuestro grupo [16].

El queso de oveja es un reservorio de enterococos con resistencia a los antimicrobianos de utilización clínica, con potencial diseminación al hombre a través de la cadena alimentaria.

## Referencias

- Gelsomino R, Vancanneyt M, Cogan TM, Condon S, Swings J. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:3560-5.
- Hammerum AM. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:619-25.
- Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MB, Chow JW, Bartlett P, Jones R, Joyce K, Rossiter S, Gay K, Johnson J, Mackinson C, Debess E, Madden J, Angulo F, Zervos MJ. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:1109-13.
- Ruzauskas M, Virgailis M, Šlugždinienė R, Sužiedėlienė V, Daugelavičius R, Zieinius D, Šengaut J, Pavilonis A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from livestock in Lithuania. *Vet Arhiv.* 2009; 79:439-49.
- Hayes JR, English LL, Carter PJ, Proescholdt T, Lee KY, Wagner DD, White DG. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:7153-60.
- Rizzotti L, Simeoni D, Cocconcelli P, Gazzola S, Dellaglio F, Torriani S. Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *J Food Prot.* 2005; 68:955-65.
- McGowan-Spicer LL, Fedorka-Cray PJ, Frye JG, Meinersmann RJ, Barrett JB, Jackson CR. Antimicrobial resistance and virulence of *Enterococcus faecalis* isolated from retail food. *J Food Prot.* 2008; 71:760-9.
- Templer SP, Rohner P, Baumgartner A. Relation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from foods and clinical specimens. *J Food Prot.* 2008; 71:2100-4.
- Ruzauskas M, Sužiedėlienė E, Šlugždinienė R, Seputiene V, Pavilonis J. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. spread in poultry products in Lithuania. *J Food Safety.* 2010; 30:902-15.
- Bertrand X, Mulin B, Viel JF, Thouverez M, Talon D. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. *Food Microbiol.* 2000; 17:543-51.
- Sorensen T, Blom M, Monnet D, Frimodt-Moller N, Poulsen R, Espersen F. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N Engl J Med.* 2001; 345:1161-6.
- Ghezán G, Acuña AM. Caracterización y evolución de las agroindustrias alimentarias regionales. Área de influencia del CERBAS. Boletín Técnico No 158. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-EEA Balcarce Argentina; 2007.
- Delpech G, Pourcel G, Schell C, De Luca M, Basualdo J, Bernstein J, Grenovero S, Sparo M. Antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from artisanal food of animal origin in Argentina.

- Foodborne Pathog Dis. 2012; 9: 939-44.
14. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific Multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:3558-65.
  15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2012. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. Disponible en: [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/previous\\_versions\\_of\\_tables/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/previous_versions_of_tables/). Acceso 15 de diciembre 2012.
  16. Sparo M, Urbizu L, Solana MV, Pourcel G, Delpech G, Confalonieri A, Ceci M, Sánchez Bruni SF. High-level resistance to gentamicin: Genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. *Lett Appl Microbiol.* 2012; 54:119-25.
  17. Fontana C, Gazzola S, Coconcelli PS, Vignolo G. Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 49:411-4.
  18. Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioq Clin Latinoam.* 2008; 42:543-8.
  19. Pimentel LL, Semedo T, Tenreiro R, Crespo MTB, Pintado MME, Malcata FX. Assessment of safety of Enterococci isolated throughout traditional Terrincho cheesemaking: virulence factors and antibiotic susceptibility. *J Food Prot.* 2007; 70:2161-7.
  20. Tuncer Y. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish Tulum cheese. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8:7008-16.
  21. Fontana C, Cappa F, Rebecchi A, Coconcelli PS. Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2010; 138:205-11.
  22. Malek R, El-Attar A, Mohamed M, Anwar S, El-Soda M, Béal C. Technological and safety properties display biodiversity among enterococci isolated from two Egyptian cheeses, "Ras" and "Domiat". *Int J Food Microbiol.* 2012; 153:314-22.
  23. Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:4385-9.
  24. Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multi-drug resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16:555-62.
  25. Jamet E, Akadie E, Poisson MA, Chamba JF, Bertrand X, Serror P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiol.* 2012; 31:191-8.
  26. Fracalanza SAP, Scheidegger EMD, dos Santos PF, Leite PC, Teixeira LM. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102:853-9.
  27. Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Chicón R, Cabezas L, Pallop L. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol.* 2011; 28:891-9.
  28. Corso AC, Gagetti PS, Rodríguez MM, Melano RG, Ceriana PG, Faccione DG, Galas MF. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *Int J Infect Dis.* 2007; 11:69-75.
  29. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3497-503.
  30. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:24-7.