

LO SCREENING DEI GENI DELL'ENTEROCINA E DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA CONTRO I BATTERI PATOGENI NEI CEPPI DELL'ENTEROCOCCUS OTTENUTI DA DIVERSE ORIGINI

Wattana THEPPANGNA ¹, Toshiyuki MURASE ^{1,2,*}, Natsumi TOKUMARU ¹, Hiroki CHIKUMI ³, Eiji SHIMIZU ³ e Koichi OTSUKI ⁴

1) Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyama, Tottori 680-8553,

2) The Avian Zoonosis Research Center, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553,

3) Division of Medical Oncology and Molecular Respiriology, Department of Multidisciplinary Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tottori University, 36-1 Nishi-cho, Yonago-shi, Tottori-ken 683-8504

4) Faculty of Technology, Kyoto Sangyo University, Kyoto 605-8555, Japan

(Ricevuto il 3 aprile 2007 / Accettato il 21 agosto 2007)

* Corrispondenza: Murase, T., Laboratorio di Microbiologia Veterinaria, Facoltà di Agraria, Università di Tottori, 4-101 Koyama, Tottori 680-8553, Giappone. e-mail: murase@muses.tottori-u.ac.jp.

RIASSUNTO

Le attività antimicrobiche di 139 isolati dell'Enterococcus (48 *E. faecium* e 91 *E. faecalis*), ottenuti da feci canine, da campioni di carne di pollo, da feci suine, da feci di uccelli acquatici selvatici e da feci umane, sono stati esaminati per i rispettivi batteri, tra cui lo *Streptococcus pyogenes*, lo *Staphylococcus aureus*, il *Bacillus subtilis*, la *Listeria monocytogenes*, la *Salmonella Enteritidis* e l'*Escherichia coli*.

Il test di produzione delle Batteriocine (BAC) ha rivelato che l'attività antimicrobica contro almeno uno dei 6 ceppi indicatori (fenotipo BAC+) è stata trovata in 51 isolati (il 37%; 29 di *E. faecium*, e 22 di *E. faecalis*).

Dei 46 isolati, positivi per almeno uno dei geni strutturali dell'enterocina (*entA*, *entB*, *entL50AB* e *cylL*), 24 hanno mostrato un fenotipo BAC+. L'esistenza di altri fattori delle enterocine o delle nonenterocine era implicita, in quanto il fenotipo BAC+ è stato rilevato in un totale di 27 isolati di Enterococcus, che non avevano nessuno dei geni di enterocina testati.

L'attività antimicrobica contro i ceppi Gram-negativi (*Salmonella Enteritidis* ed *E. coli*) è stata rilevata nei 6 isolati di Enterococcus che avevano i geni *entA*, *entB*, *entL50AB* e *cylL*. Inoltre, la percentuale dell'attività antimicrobica contro la *L. monocytogenes* tra gli isolati *cylL*-positivi di *E. faecalis*, che mostrano una beta-emolisi (10/16), era significativamente più elevata ($p < 0,01$), rispetto a quella degli isolati privi di beta-emolisi (2/15).

I risultati suggeriscono che alcune caratteristiche sono suscettibili di essere associate all'attività antimicrobica contro specifici microrganismi.

PAROLE CHIAVE: attività antimicrobica, citolisina, enterocina, Enterococcus.

J. Vet. Med. Sci. 69(12): 1235-1239, 2007

Gli enterococchi sono batteri commensali del tratto gastrointestinale dei mammiferi e di altri animali a sangue caldo^{14,29,30}. L'*Enterococcus faecium* e l'*E. faecalis* sono occasionalmente utilizzati negli alimenti, per i formaggi stagionati^{15,24} e per le olive nere¹³, e sono utilizzati anche nei prodotti probiotici^{17,33}. Tuttavia, gli organismi del genere degli Enterococchi, in particolare l'*E. faecalis* e l'*E. faecium*, hanno rilevanza medica, a causa della loro maggiore incidenza quali cause di malattia, e sono diventati anche una causa importante di infezioni nosocomiali^{22,27}.

Un fattore espresso da molti isolati di *E. faecalis* da campioni clinici è la citolisina^{4,18,19}, che è stata associata con la virulenza di questo organismo in modelli di infezione animale²¹. Anche se la citolisina conferisce attività beta-emolitica, essa esibisce un ampio intervallo di cellule-bersaglio, che comprende sia le cellule eucariotiche, sia quelle procariotiche²⁹, soprattutto gli organismi Gram-positivi^{2,31}.

Un certo numero di enterocine (batteriocine prodotte da enterococchi) è stato caratterizzato in particolare da *E. faecalis* (citolisina³², batteriocina 31³⁴, batteriocina AS-48^{16,25}) e da *E. faecium* (enterocina A¹, enterocina B³, enterocina L50A / L50B⁶, enterocina P⁵ ed enterocina Q⁷).

Le batteriocine impediscono la crescita di altri batteri che, di solito, sono legati ad organismi produttori di batteriocine²⁰. La capacità di produrre batteriocine può svolgere un importante ruolo fisiologico nel fornire un vantaggio ecologico rispetto ad altri batteri, che abitano lo stesso ecosistema, ma che non producono questi peptidi²⁸.

Pertanto, è interessante determinare se alcuni profili genotipici e fenotipici delle enterocine siano associati con isolati di enterococchi di origini specifiche, quali gli alimenti, gli animali destinati alla produzione di alimenti e gli animali selvatici.

In questo studio, abbiamo selezionato isolati di *E. faecalis* e di *E. faecium* per i geni dell'enterocina sopra descritti e per l'attività antimicrobica contro i batteri patogeni rappresentativi, per determinare una possibile associazione tra le combinazioni dell'attività antimicrobica contro diversi batteri, i genotipi dell'enterocina, le specie di *Enterococcus* e le origini degli isolati.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici: Questo studio ha incluso 139 ceppi di *Enterococcus* (48 di *E. faecium* e 91 di *E. faecalis*) da diverse origini (46 campioni di carne di pollo, 44 campioni di feci canine, 11 campioni di feci suine, 19 campioni di feci di uccelli acquatici selvatici, e 19 campioni di feci umane).

I campioni di carne di pollo provenivano da carcasse originariamente trattate in Giappone, Cina o Brasile, dal 2000 al 2005. I campioni di feci canine sono stati ottenuti da animali ricoverati in un ospedale veterinario privato e dall'ospedale veterinario di insegnamento dell'Università di Tottori, in Giappone, tra il 2001 e il 2004. I campioni di feci suine sono stati ottenuti nel mese di ottobre 2005, da animali di età diversa, in una fattoria commerciale del Giappone.

Le feci di uccelli acquatici selvatici sono state raccolte in paludi e risaie, nel Giappone occidentale, tra il dicembre 2004 e il febbraio 2005, e tra novembre e dicembre 2005, presso cui cigni e anatre selvatiche migrano ogni inverno.

Le colture di arricchimento dei tamponi di carne di pollo e i campioni di feci di animali, ottenuti utilizzando un brodo di infusione del cuore, sono stati placcati su agar EF (*Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Giappone*); l'Esculina-bileazide Agar (*Difco, Becton Dickinson, Sparks, Md., USA*) e gli isolati di *E. faecium* o di *E. faecalis* sono stati conservati.

L'identificazione è stata effettuata mediante PCR, utilizzando primer specifici per queste specie¹¹.

Gli isolati umani sono stati selezionati in modo casuale da isolati fecali, che sono stati recuperati nel 2005 dai degenti del *Tottori University Hospital*. Un totale di 6 ceppi di sei differenti generi batterici, come segue, sono stati utilizzati come indicatori della produzione di enterocina.

Il ceppo 940055 dello *Streptococcus pyogenes* è stato isolato da un campione di tampone faringeo di un paziente umano. Il ceppo ATCC29213 dello *Staphylococcus aureus* è stato acquistato dalla *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, U.S.A.). Il ceppo L98-76P2 della *Listeria monocytogenes* è stato isolato da un campione di carne di maiale. Il *Bacillus subtilis*, utilizzato in questo studio, è stato isolato da un campione ambientale.

La *Salmonella Enteritidis* IFO3313 e l'*Escherichia coli* IFO3301 sono state acquistate presso l'Istituto di Fermentazione di Osaka. I ceppi di *S. pyogenes*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*, di cui sopra, sono stati utilizzati come organismi patogeni rappresentativi.

Rilevamento di geni strutturali di enterocina, per mezzo della PCR

La presenza dei geni dell'*entA*, dell'*entB*, dell'*entAS-48*, del *bac31* e del *cyL* è stata rilevata mediante un saggio di PCR, come riportato in precedenza³³, utilizzando le specifiche coppie di primer descritti da De Vuyst et al.¹⁰

Poiché l'attivazione della citolisina è regolata dai prodotti del gene di *cyLM*, *cyLA* e *cyLB*^{12,23}, sono stati esaminati mediante PCR anche i geni di *cyLM*¹², *cyLA*²³ e *cyLB*²³.

Per amplificare il *cyLA* e il *cyLB*, è stato eseguito un totale di 30 cicli di amplificazione, e ciascun ciclo consisteva di una denaturazione a 97° C per 1 minuto, una ricottura a 52° C per 30 secondi e un'estensione a 72° C per 1 minuto.

L'amplificazione con PCR del *cyLM* è stata effettuata con un ciclo iniziale di denaturazione a 94° C per 2 minuti, con una ricottura a 56° C per 2 minuti e con un allungamento a 72° C per 2 minuti, seguiti da 29 cicli di denaturazione a 92° C per 15 secondi, da una ricottura a 56° C per 15 secondi e da un'estensione a 72° C per 15 secondi.

Le analisi PCR sono state eseguite per determinare la presenza di geni strutturali di enterocine 50A e 50B (*entL50A/B*), di enterocina P (*entP*) e di enterocina Q (*entQ*), utilizzando le specifiche coppie di primer descritti da⁷.

La condizione dell'amplificazione era la stessa di quella usata per i geni *cyLA* e *cyLB*, ma la ricottura è stata condotta a 60° C. I prodotti della PCR sono stati risolti mediante elettroforesi su un gel di agarosio a 1,5% (tampone 1X Tris-acetato-EDTA). Il ceppo GIFU8355 dell'*E. faecium* è stato utilizzato come controllo positivo per il rilevamento dei geni dell'enterocina A (*entA*) e dell'enterocina B (*entB*).

Elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE)

Le sottotipizzazioni di isolati dell'*E. faecium* da feci suine sono state effettuate usando la PFGE con DNA cromosomico SmaI-digerito²⁶. La PFGE è stata eseguita con un gel di agarosio all'1,0%, utilizzando un apparato CHEF-DRII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) in un tampone da 0,5x Tris-borato-EDTA a 14° C a 200 V.

È stata applicata una commutazione linearmente rampata da 0,5 a 20 secondi, per 20 ore.

Saggi per l'enterocina e la beta-emolisina

Il rilevamento dell'enterocina è stato effettuato secondo il metodo precedentemente descritto da Del Campo et al.⁹ L'attività antimicrobica, dovuta alle enterocine negli isolati di enterococchi da diverse origini, è stata visivamente rilevata osservando zone chiare di inibizione attorno al ceppo produttore sulla piastra di agar, disseminata da ciascuno dei ceppi indicatori. I ceppi, in cui è stata osservata un'attività antimicrobica, sono stati designati come Bac+.

Questo test non discrimina tra la produzione singola e multipla di enterocina.

L'attività beta-emolitica è stata esaminata usando piastre a base di agar sangue della Columbia (Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD), integrate con il 5% (v/v) di sangue di pecora o di cavallo. La presenza di una zona chiara di emolisi attorno alle colonie in entrambe le piastre di sangue è stata indicata come un segnale positivo.

Analisi statistica

L'analisi statistica della percentuale di attività antilisterica, tra i *cylLMBA* che ospitavano isolati di *E. faecalis* positivi o negativi per la beta-emolisi, è stata effettuata col test esatto di Fisher, e la significatività statistica è stata determinata a $p < 0,05$.

RISULTATI

Il test dell'enterocina ha rivelato che un'attività antimicrobica contro almeno 1 dei 6 ceppi indicatori (fenotipo BAC+) è stata mostrata in 51 dei 139 isolati di *Enterococcus* testati (Tabella 1).

Su 48 *E. faecium*, 29 (il 60%) erano BAC+, mentre tale fenotipo era stato rilevato solo in 22 su 91 isolati di *E. faecalis* (il 24%); 8, su 9 isolati di *E. faecium*, ottenuti dalle feci dei suini, erano del fenotipo BAC+.

Poiché questi isolati sono stati ottenuti da maiali di età diverse nella stessa fattoria, le possibili relazioni tra l'*E. faecium* del BAC+ sono state studiate usando la PFGE.

I modelli di PFGE Smal-digerita degli 8 isolati di *E. faecium* hanno mostrato più differenze di banda (dati non riportati), e ciò indica che questi isolati erano geneticamente non-correlati.

Uno o più geni strutturali di enterocina (*cylL*, *entA*, *entB*, ed *entL50A/B*) sono stati rilevati in 46 (33%) isolati di *Enterococcus* (12 di *E. faecium* e 34 di *E. faecalis*) (Tabella 1). Tutti gli isolati *cylL*-positivi avevano i geni *cylM*, *cylB* e *cylA*. I geni *cyl* sono stati rilevati principalmente nei ceppi di *E. faecalis*, mentre i geni *entA* ed *entB* sono stati rilevati nei ceppi di *E. faecium* e di *E. faecalis*.

Dei 33 isolati di *Enterococcus* (31 di *E. faecalis* e 2 di *E. faecium*) che avevano i geni *cyl*, 19 ceppi di *E. faecalis* non hanno mostrato BAC+. Tutti i 9 ceppi di *E. faecium*, positivi per i geni *entA* o *entB*, erano BAC+, mentre tutti i 3 ceppi di *E. faecalis* con questi geni non avevano attività antimicrobica. Nessuno degli isolati di *Enterococcus* studiati aveva geni *entP*, *entQ*, *bac31* ed *entAS-48*.

Dei 93 ceppi di *Enterococcus*, negativi per i geni di enterocina indagati, 27 ceppi (10 di *E. faecalis* e 17 di *E. faecium*) sono risultati essere BAC+. I risultati delle attività antimicrobiche contro diversi ceppi indicatori, per 51 isolati BAC+ dell'*Enterococcus*, sono riportati nella Tabella 2.

Varie combinazioni delle attività antimicrobiche contro 6 ceppi indicatori sono state trovate negli isolati di *Enterococcus* studiati. Un isolato di *E. faecalis* con i geni *cyl*, ottenuto da un cane, e uno di *E. faecium* con i geni *entL50A/B*, ottenuto da un maiale, hanno mostrato attività antimicrobiche contro tutti i 6 ceppi indicatori.

Sei isolati, che hanno mostrato attività antimicrobiche contro batteri Gram-negativi (*E. coli* e/o *Salmonella Enteritidis*), avevano uno dei geni *entA*, *entB*, *cylLMBA* ed *entL50A/B*.

Gli isolati di *Enterococcus*, ottenuti da carne di pollo, hanno mostrato attività antimicrobiche solo contro i ceppi indicatori di Gram-positivi utilizzati.

L'attività antimicrobica contro la *L. monocytogenes* è stata trovata in un'elevata percentuale di isolati di *E. faecalis*, ottenuti da esseri umani (4/4), da cani (8/9) e da feci di uccelli acquatici selvatici (3/3). Dei 18 isolati di *E. faecalis*, positivi all'attività antilisterica, 12 avevano geni *cyl* (Tabella 3).

I restanti 6 isolati (2 dalle feci di uccelli acquatici selvatici, 3 da carne di pollo ed 1 da un cane) sono risultati negativi per tutti i geni di enterocina testati. La beta-emolisi è stata trovata in 16 isolati di *E. faecalis* e in 2 di *E. faecium* con i geni *cyl*, anche se 15, dei 31 isolati di *E. faecalis* positivi per questi geni, non mostravano beta-emolisi (Tabella 3).

L'incidenza dell'attività antimicrobica contro la *L. monocytogenes*, trovata negli isolati di *E. faecalis* positivi ai geni *cyl*, che mostravano un'attività beta-emolitica (10/16), era significativamente maggiore ($p < 0,01$) di quella riscontrata negli isolati senza attività beta-emolitica (2/15). Dei 7 isolati di *E. faecium*, positivi per l'attività antilisterica (Tabella 2), 1 isolato dalle feci di cane era positivo per i geni *cyl*; 1 e 3 isolati, rispettivamente, da feci di un essere umano e di cane, avevano l'*entA*, e 1 isolato dalle feci suine aveva il gene *entL50AB*.

Tabella 1. Attività antimicrobica e geni dell'enterocina rilevati negli isolati di *Enterococcus* di diversa origine

| Isolati da: | | | | | | | | |
|--------------------|---------------|----------------------|----------------|-------------|------------|-------------------------------------|------|---|
| Specie | Fenotipo BAC+ | Gene dell'enterocina | Carne di pollo | Feci canine | Feci suine | Feci di uccelli acquatici selvatici | Uomo | |
| <i>E. faecium</i> | BAC+ | cyLLMBA | | 2 | | | | |
| | | entA+entB | | 1 | | 1 | | |
| | | entA | | 4 | | 2 | | 1 |
| | | entL5OAB | | | | 1 | | |
| | | nessuno | 7 | 4 | 5 | 1 | | |
| | Non-BAC+ | nessuno | 10 | 7 | 1 | 1 | | |
| <i>E. faecalis</i> | BAC+ | cyLLMBA | | 7 | | 1 | 4 | |
| | | nessuno | 6 | 2 | | 2 | | |
| | | Non-BAC+ | cyLLMBA | 3 | 9 | | 3 | 4 |
| | | entA+entB | 1 | 1 | | | | |
| | | entA | | 1 | | | | |
| | | nessuno | 19 | 6 | 2 | 10 | 10 | |

Tabella 2. Attività antimicrobica contro una serie di 6 ceppi indicatori rilevati negli isolati BAC+

E. faecium (sinistra) ed *E. faecalis* (destra) da:

| Ceppo indicatore | Carne di pollo | | Feci canine | | Feci suine | | Feci di uccelli acquatici selvatici | | Uomo | |
|-------------------------|-------------------|-----|-------------|-----|------------|-----|-------------------------------------|-----|------|-----|
| | | | | | | | | | | |
| <i>S. pyogenes</i> | 7/7 ^{a)} | 0/6 | 5/11 | 1/9 | 5/8 | 0/0 | 1/2 | 0/3 | 0/1 | 2/4 |
| <i>S. aureus</i> | 7/7 | 0/6 | 8/11 | 1/9 | 8/8 | 0/0 | 1/2 | 0/3 | 0/1 | 0/4 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 0/7 | 0/6 | 4/11 | 8/9 | 1/8 | 0/0 | 1/2 | 3/3 | 1/1 | 4/4 |
| <i>B. subtilis</i> | 0/7 | 5/6 | 0/11 | 4/9 | 1/8 | 0/0 | 0/2 | 1/3 | 0/1 | 3/4 |
| <i>S. Enteritidis</i> | 0/7 | 0/6 | 0/11 | 1/9 | 3/8 | 0/0 | 1/2 | 0/3 | 0/1 | 1/4 |
| <i>E. coli</i> | 0/7 | 0/6 | 0/11 | 1/9 | 1/8 | 0/0 | 1/2 | 0/3 | 0/1 | 0/4 |

a) Numero di isolati con attività antimicrobica contro ciascuno dei ceppi indicatori/numeri di isolati BAC+.

Tabella 3. Presenza di attività beta-emolitica e di attività antilisterica negli isolati di *E. faecalis* positivi per cyLLMBA di origini diverse.

| Isolati cyLLMBA-positivi da: | | | | | |
|------------------------------|------------------------|----------------|-------------|-------------------------------------|------|
| Beta-emolisi | Attività antilisterica | Carne di pollo | Feci canine | Feci di uccelli acquatici selvatici | Uomo |
| Sì | Sì | | 7 | 1 | 2 |
| Sì | No | | 2 | 3 | 1 |
| No | Sì | | | | 2 |
| No | No | 3 | 7 | | 3 |

DISCUSSIONE

Quasi il 37% degli isolati di *Enterococcus*, utilizzati in questo studio, ha mostrato un'attività BAC+. L'incidenza degli isolati BAC+ era più alta tra gli isolati di *E. faecium* (60%) che non tra quelli di *E. faecalis* (24%). Secondo Poeta et al.²⁸, il 49% degli isolati di *E. faecium* e il 37% di quelli di *E. faecalis*, da animali selvaggi di diversa origine, mostrava un'attività antimicrobica contro almeno uno dei ceppi indicatori esaminati.

Al contrario, Del Campo et al.⁹ hanno trovato una maggior percentuale di isolati BAC+ tra gli isolati di *E. faecalis* (80,6%) che non tra quelli di *E. faecium* (21,6%), ottenuti da campioni umani clinici e fecali, da liquame e da campioni di pollo.

Allo stesso modo, De Vuyst et al.¹⁰ hanno riportato che la produzione di batteriocine è stata trovata rispettivamente nel 58,7% e nel 68,3% dei ceppi di *E. faecium* e di *E. faecalis*, di diversa origine, tra cui alimenti, mangimi, animali, e isolati di umani (clinici e non-clinici). L'inconsistenza dell'incidenza del fenotipo BAC+, tra queste specie, può essere in parte dovuta alla differenza nei ceppi indicatori utilizzati.

Inoltre, i fattori ambientali, come ad esempio i cibi, le condizioni trovate nel tratto gastrointestinale e l'equilibrio degli organismi nella flora intestinale, sono suscettibili di influenzare la presenza e la persistenza degli enterococchi, poiché, nel nostro studio, il fenotipo BAC+ è stato trovato in 8 dei 9 isolati di *E. faecium* geneticamente non correlati, che sono stati conseguiti da suini ospitati in un'unica azienda.

I risultati dell'attività antimicrobica e della PCR implicano l'esistenza di altri geni dell'enterocina, che non sono stati testati in questo studio. Nessuno dei geni di enterocina testati è stato trovato in tutti i 7 isolati di *E. faecium* e i 6 di *E. faecalis* con fenotipo BAC+, ottenuti da carne di pollo. Cinque degli 8 isolati da feci di maiale con fenotipo BAC+ (esclusivamente contro ceppi indicatori Gram-positivi) non avevano geni rilevabili di enterocina.

Le sostituzioni del nucleotide, nei geni di enterocina, possono impedire l'amplificazione PCR con i primer selezionati, utilizzati in questo studio, poiché è stata suggerita²⁹ un'eventuale divergenza nella sequenza dei geni *cyl*.

Fatta eccezione per l'osservazione di cui sopra, non sono state trovate tendenze simili nella distribuzione dei geni di enterocina testati, tra gli isolati di enterococchi di diversa origine.

Sono state mostrate marcate variazioni degli spettri inibitori, tra gli isolati di *Enterococcus* con identici genotipi di enterocina. Tuttavia, sono state trovate attività antimicrobiche contro batteri Gram-negativi (*E. coli* e *Salmonella Enteritidis*) in 6 isolati di *Enterococcus* che avevano uno dei geni *cyl*-MBA, *entA* ed *entL50AB*.

Abbiamo in precedenza dimostrato³³ che l'attività inibitoria contro la *Salmonella Enteritidis* è stata trovata in un ceppo di *E. gallinarum*, che era negativo per tutti i geni di cui sopra³³.

Pertanto, non può essere esclusa un'associazione di altri fattori delle enterocine o delle nonenterocine con effetto inibitorio contro la *Salmonella Enteritidis* in questo studio.

È stato segnalato che l'enterocina A ha mostrato un'attività antimicrobica contro la *L. monocytogenes*¹, anche se, in questo studio, nessuna attività antilisterica è stata rilevata in più della metà (5/9) degli isolati di *E. faecium*, né in tutti e 3 gli isolati di *E. faecalis* che possiedono il gene *entA*. Altri ricercatori hanno notato che il test fenotipico ha rivelato l'esistenza di geni apparentemente silenti^{10, 12}.

In questo studio, è stata dimostrata la possibile correlazione tra i ceppi beta-emolitici di *E. faecalis*, positivi per i geni *cyl*-MBA, e le attività antimicrobiche contro la *L. monocytogenes*.

L'incidenza dell'attività antilisterica tra gli isolati positivi ai geni-*cyl* sull'attività beta-emolitica era significativamente più alta di quella tra gli isolati negativi alla beta-emolisi. In questo studio, un'attività beta-emolitica è stata mostrata esclusivamente nei ceppi con il gene *cyl*.

È interessante notare che la citolisina non è considerata come attiva contro la *L. monocytogenes*⁸. Così, resta da stabilire se la beta-emolisi e l'attività antilisterica siano in realtà mediate dallo stesso agente, anche se la caratteristica beta-emolitica può essere intimamente associata con la produzione di agenti sconosciuti, che possiedono attività antilisterica, ed anche di nuove enterocine.

In sintesi, le osservazioni nel nostro studio suggeriscono che l'attività antimicrobica può essere associata ad altri geni di enterocina che non sono stati studiati, o a fattori di nonenterocina.

È probabile che l'indagine sulla correlazione tra una certa caratteristica e l'attività antimicrobica contro un organismo specifico sia un primo passo per identificare nuovi farmaci che presentino tale attività.

RINGRAZIAMENTI. Gli autori sono grati al Dr. Peter S. Holt per la revisione di questo manoscritto.

Il ceppo 940.055 di *S. pyogenes* è stato gentilmente fornito dal *Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory*.

Il ceppo L98-76P2 di *L. monocytogenes* è stato gentilmente fornito dal *Prof. R. Hondo, Nippon Veterinary and Life Science University*.

Screening of the Enterocin Genes and Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria in *Enterococcus* Strains Obtained from Different Origins

Wattana THEPPANGNA¹⁾, Toshiyuki MURASE^{1,2)*}, Natsumi TOKUMARU³⁾, Hiroki CHIKUMI³⁾, Eiji SHIMIZU³⁾ and Koichi OTSUKI⁴⁾

¹⁾Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyama, Tottori 680-8553,

²⁾The Avian Zoonosis Research Center, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553, ³⁾Division of Medical Oncology and Molecular Respiratory, Department of Multidisciplinary Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tottori University, 36-1 Nishi-cho, Yonago-shi, Tottori-ken 683-8504 and ⁴⁾Faculty of Technology, Kyoto Sangyo University, Kyoto 603-8555, Japan

(Received 3 April 2007/Accepted 21 August 2007)

ABSTRACT. Antimicrobial activities of 139 *Enterococcus* isolates (48 *E. faecium* and 91 *E. faecalis*) obtained from canine feces, boiler meat samples, swine feces, wild waterfowl feces, and human feces were examined against respective bacteria, including *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, and *Escherichia coli*. Bacteriocin (BAC) production assay revealed that the antimicrobial activity against at least one of 6 indicator strains (BAC+ phenotype) was found in 51 (37%) isolates (29 *E. faecium* and 22 *E. faecalis*). Twenty-four of 46 isolates positive for at least one of the enterocin structural genes (*entA*, *entB*, *entL50AB*, and *cytL*) showed a BAC+ phenotype. The existence of other enterocins or nonenterocin factors was implied because the BAC+ phenotype was detected in a total of 27 *Enterococcus* isolates that had none of the enterocin genes tested. The antimicrobial activity against Gram-negative strains (*Salmonella* Enteritidis and *E. coli*) was detected in the 6 *Enterococcus* isolates that had either the *entA*, *entB*, *entL50AB* or *cytL* genes. Moreover, the proportion of the antimicrobial activity against *L. monocytogenes* among the *cytL*-positive *E. faecalis* isolates showing beta-hemolysis (10/16) was significantly ($p < 0.01$) higher than among those lacking beta-hemolysis (2/15). The results suggested that certain characteristics are likely to be associated with the antimicrobial activity against specific organisms.

KEY WORDS: antimicrobial activity, cytolysin, enterocin, *Enterococcus*.

J. Vet. Med. Sci. 69(12): 1235–1239, 2007

Enterococci are commensal bacteria of the gastrointestinal tract of mammals and other warm-blooded animals [14, 29, 30]. *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* are occasionally used in foods for the purpose of the ripening cheeses [15, 24] and black olives [13], and also used in probiotic products [17, 33]. However, organisms of the genus *Enterococcus*, in particular *E. faecalis* and *E. faecium*, are of medical relevance because of their increased incidence as a cause of disease, and have also become a significant cause of nosocomial infections [22, 27]. One factor expressed by many *E. faecalis* isolates from clinical specimens is cytolysin [4, 18, 19] which has been associated with virulence of this organism in animal infection models [21]. Although cytolysin confers beta-hemolytic activity, it exhibits a broad target cell range, including both eukaryotic and prokaryotic cells [29], especially Gram-positive organisms [2, 31].

A number of enterocins, bacteriocins produced by enterococci, have been characterized especially in *E. faecalis* (cytolysin [32], bacteriocin 31 [34], and bacteriocin AS-48 [16, 25]) and *E. faecium* (enterocin A [1], enterocin B [3], enterocin L50A/L50B [6], enterocin P [5], and enterocin Q [7]). Bacteriocins inhibit the growth of other bacteria that are usually related to bacteriocin-producing organism [20]. The ability to produce bacteriocins may play an important

physiological role in providing an ecological advantage over others that inhabit the same ecosystem but do not produce these peptides [28]. Thus, it is of interest to determine whether certain genotypic and phenotypic profiles of enterocins are associated with enterococcal isolates from specific origins, such as foods, food animals, and wild animals. In this study, we screened *E. faecalis* and *E. faecium* isolates for the enterocin genes described above and antimicrobial activity against representative pathogenic bacteria to determine a possible association between combinations of antimicrobial activity against different bacteria, the enterocin genotypes, species of *Enterococcus*, and origins of the isolates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains: This study included 139 *Enterococcus* isolates (48 *E. faecium* and 91 *E. faecalis*) from different origins (46 boiler meat samples, 44 canine fecal samples, 11 swine fecal samples, 19 wild waterfowl feces, and 19 human fecal samples). The broiler meat samples were from carcasses originally processed in Japan, China, or Brazil from 2000 to 2005. Canine fecal samples were obtained from animals admitted to a private veterinary hospital and the veterinary teaching hospital of Tottori University in Japan between 2001 and 2004. Swine fecal samples were obtained in October 2005 from different-aged animals on a commercial farm in Japan. Wild waterfowl feces were collected in

* CORRESPONDENCE TO: MURASE, T., Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyama, Tottori 680-8553, Japan.
e-mail: murase@muses.tottori-u.ac.jp.

marshes and paddy fields in the western Japan between December 2004 and February 2005, and between November and December 2005 where swans and wild ducks migrate every winter. Enrichment cultures of swab samples from broiler meat and animal fecal samples using heart-infusion broth were plated onto EF agar (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and bile esculin azide agar (Difco, Becton Dickinson, Sparks, Md., U.S.A.) and *E. faecium* or *E. faecalis* isolates were retained. Identification was carried out by PCR using specific primers for these species [11]. Human isolates were randomly selected from fecal isolates that were recovered from in-patients in Tottori university hospital in 2005. A total of 6 strains of six different bacterial genera, as follows, were used as enterococci production indicators. *Streptococcus pyogenes* strain 940055 was isolated from a throat swab sample from a human patient. *Staphylococcus aureus* strain ATCC29213 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, U.S.A.). *Listeria monocytogenes* strain L98-76P2 was isolated from a pork meat sample. *Bacillus subtilis* used in this study was isolated from an environmental sample. *Salmonella* Enteritidis IFO3313 and *Escherichia coli* IFO3301 were purchased from the Institute of Fermentation, Osaka. *S. pyogenes*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* Enteritidis strains above were used as representative pathogenic organisms.

Detection of enterococci structural genes by PCR: Presence of the *entA*, *entB*, *entA5-48*, *bac31*, and *cylL* genes were detected by a PCR assay as reported previously [33], using the specific primer pairs described by De Vuyst *et al.* [10]. Because activation of cytolysin is regulated by the *cylM*, *cylA*, and *cylB* gene products [12, 23], the *cylM* [12], *cylA* [23], and *cylB* [23] genes were also screened by PCR. To amplify the *cylA*, and *cylB*, a total of 30 cycles of amplification were carried out and each of cycle consisted of 97°C denaturation for 1 min, 52°C annealing for 30 sec, and 72°C extension for 1 min. PCR amplifications of the *cylM* was performed by an initial cycle of denaturation at 94°C for 2 min, annealing at 56°C for 2 min, and elongation at 72°C for 2 min, followed by 29 cycles of denaturation at 92°C for 15 sec, annealing at 56°C for 15 sec and extension for 72°C for 15 sec. PCR analyses were performed to determine the presence of structural genes of enterococci 50A and 50B (*entL50A/B*), enterococci P (*entP*), and enterococci Q (*entQ*) using the specific primer pairs described by [7]. Amplification condition was the same that used for the *cylA* and *cylB* genes, except that annealing was carried out at 60°C. PCR products were resolved by electrophoresis on a 1.5% agarose gel (1X Tris-acetate-EDTA buffer). *E. faecium* strain GIFU8355 was used as positive control for detection the enterococci A (*entA*), and enterococci B (*entB*) genes.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): Subtyping of *E. faecium* isolates from swine feces were carried out using PFGE with *SmaI*-digested chromosomal DNA [26]. PFGE was performed with a 1.0% agarose gel by using a CHEF-DRII apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) in 0.5× Tris-borate-EDTA buffer at 14°C at 200 V. A linearly

ramped switching from 0.5 to 20 sec was applied for 20 hr.

Enterococci and beta-hemolysin assay: Enterococci detection was carried out by the method previously described by Del Campo *et al.* [9]. The antimicrobial activity due to enterococci in enterococcal isolates from different origins was visually detected by observing clear inhibition zones around the producer strain on the agar plate seeded with each of the indicator strains. Those strains in which antimicrobial activity were observed, were designated Bac+. This assay does not discriminate between single and multiple enterococci production. Beta-hemolytic activity was examined using Columbia blood agar base (Becton, Dickinson and Co., Sparks, MD) plates supplemented with 5% (v/v) of either sheep blood or horse blood. The presence of a clear zone of hemolysis around the colonies in both the blood plates was referred as a positive.

Statistical analysis: Statistical analysis of the proportion of antilisterial activity among the *cylMBA* harboring *E. faecalis* isolates positive or negative for beta-hemolysis was done by the Fisher's exact test, and statistical significance was determined at $p < 0.05$.

RESULTS

The enterococci assay revealed that antimicrobial activity against at least 1 of 6 indicator strains (BAC+ phenotype) was shown in 51 of the 139 *Enterococcus* isolates tested (Table 1). Of 48 *E. faecium*, 29 (60%) were BAC+, whereas this phenotype was detected in only 22 of 91 (24%) *E. faecalis* isolates. Eight of 9 *E. faecium* isolates obtained from pig feces were BAC+ phenotype. Because these isolates were obtained from different-aged pigs in the same farm, the possible relationships among the BAC+ *E. faecium* were investigated using PFGE. *SmaI*-digested PFGE patterns of the 8 *E. faecium* isolates showed multiple band differences (data not shown), indicating that these isolates were genetically unrelated.

One or more enterococci structural genes (*cylL*, *entA*, *entB*, and *entL50A/B*) were detected in 46 (33%) *Enterococcus* isolates (12 *E. faecium* and 34 *E. faecalis*) (Table 1). All the *cylL*-positive isolates had the *cylM*, *cylB*, and *cylA* genes. The *cyl* genes were mainly detected in *E. faecalis* strains, while the *entA* and *entB* genes were detected in strains of both *E. faecium* and *E. faecalis*. Of 33 *Enterococcus* isolates (31 *E. faecalis* and 2 *E. faecium*) that had the *cyl* genes, 19 *E. faecalis* strains did not show BAC+. All the 9 *E. faecium* strains positive for the *entA* or *entB* genes were BAC+, whereas all the 3 *E. faecalis* strains with these genes had no antimicrobial activities. None of *Enterococcus* isolates studied had the *entP*, *entQ*, *bac31*, and *entA5-48* genes. Of 93 *Enterococcus* strains negative for the enterococci genes investigated, 27 strains (10 *E. faecalis* and 17 *E. faecium*) were found to be BAC+.

The results of antimicrobial activities against different indicator strains for 51 BAC+ *Enterococcus* isolates are shown in Table 2. Various combinations of antimicrobial activities against 6 indicator strains were found in *Entero-*

Table 1. Antimicrobial activity and enterocin genes detected in *Enterococcus* isolates from different origins

| Species | BAC+ phenotype | Enterocin gene | Isolates from: | | | | |
|--------------------|----------------|------------------|----------------|--------------|-------------|----------------------|-------|
| | | | Broiler meat | Canine feces | Swine feces | Wild waterfowl feces | Human |
| <i>E. faecium</i> | BAC+ | <i>cytLMBA</i> | | 2 | | | |
| | | <i>entA+entB</i> | | 1 | | 1 | |
| | | <i>entA</i> | | 4 | 2 | | 1 |
| | | <i>entL50AB</i> | | | 1 | | |
| | None | | 7 | 4 | 5 | 1 | |
| | Non-BAC+ | None | 10 | 7 | 1 | 1 | |
| <i>E. faecalis</i> | BAC+ | <i>cytLMBA</i> | | 7 | | 1 | 4 |
| | | None | | 6 | 2 | 2 | |
| | Non-BAC+ | <i>cytLMBA</i> | | 3 | 9 | 3 | 4 |
| | | <i>entA+entB</i> | | 1 | 1 | | |
| | | <i>entA</i> | | | 1 | | |
| | None | | 19 | 6 | 2 | 10 | |

Table 2. Antimicrobial activity against a series of 6 indicator strains detected in BAC+ isolates

| Indicator strain | <i>E. faecium</i> (left) and <i>E. faecalis</i> (right) from: | | | | | |
|-------------------------|---|--------------|-------------|----------------------|---------|--|
| | Broiler meat | Canine feces | Swine feces | Wild waterfowl feces | Human | |
| <i>S. pyogenes</i> | 7/7 ^a 0/6 | 5/11 1/9 | 5/8 0/0 | 1/2 0/3 | 0/1 2/4 | |
| <i>S. aureus</i> | 7/7 0/6 | 8/11 1/9 | 8/8 0/0 | 1/2 0/3 | 0/1 0/4 | |
| <i>L. monocytogenes</i> | 0/7 0/6 | 4/11 8/9 | 1/8 0/0 | 1/2 3/3 | 1/1 4/4 | |
| <i>B. subtilis</i> | 0/7 5/6 | 0/11 4/9 | 1/8 0/0 | 0/2 1/3 | 0/1 3/4 | |
| <i>S. Enteritidis</i> | 0/7 0/6 | 0/11 1/9 | 3/8 0/0 | 1/2 0/3 | 0/1 1/4 | |
| <i>E. coli</i> | 0/7 0/6 | 0/11 1/9 | 1/8 0/0 | 1/2 0/3 | 0/1 0/4 | |

a) Number of isolates with antimicrobial activity against each of the indicator strains/number of BAC+ isolates.

Table 3. The presence of beta-hemolytic activity and antilisterial activity in the *cytLMBA*-positive *E. faecalis* isolates from different origins

| Beta-hemolysis | Antilisterial activity | <i>cytLMBA</i> -positive isolates from: | | | |
|----------------|------------------------|---|--------------|----------------------|-------|
| | | Broiler meat | Canine feces | Wild waterfowl feces | Human |
| Yes | Yes | | 7 | 1 | 2 |
| Yes | No | | 2 | 3 | 1 |
| No | Yes | | | | 2 |
| No | No | 3 | 7 | | 3 |

coccus isolates studied. One *E. faecalis* isolate with the *cyt* genes obtained from a dog and one *E. faecium* with the *entL50A/B* genes obtained from a pig showed antimicrobial activities against all 6 indicator strains. Six isolates that showed antimicrobial activities against Gram-negative bacteria (*E. coli* and/or *Salmonella* Enteritidis) had one of the *entA*, *entB*, *cytLMBA*, and *entL50A/B* genes. *Enterococcus* isolates obtained from broiler meat showed antimicrobial activities only against the Gram-positive indicator strains used. The antimicrobial activity against *L. monocytogenes* was found in a high proportion of *E. faecalis* isolates obtained from humans (4/4), dogs (8/9), and wild waterfowl feces (3/3). Of the 18 *E. faecalis* isolates positive for the antilisterial activity, 12 isolates had the *cyt* genes (Table 3). Remaining 6 isolates (2 from wild waterfowl feces, 3 from

boiler meat and 1 from dog) were negative for all enterocin genes tested. Beta-hemolysis was found in 16 *E. faecalis* isolates and 2 *E. faecium* isolates with the *cyt* genes, although 15 of the 31 *E. faecalis* isolates positive for these genes did not show beta-hemolysis (Table 3). The incidence of antimicrobial activity against *L. monocytogenes* found in the *cyt* genes-positive *E. faecalis* isolates showing beta-hemolytic activity (10/16) was significantly ($P < 0.01$) higher than that found in the isolates without beta-hemolytic activity (2/15). Of 7 *E. faecium* isolates positive for antilisterial activity (Table 2), 1 isolate from dog feces was positive for the *cyt* genes, 1 and 3 isolates from a human and dog feces, respectively, had the *entA*, and 1 isolate from swine feces had the *entL50A/B* gene.

DISCUSSION

Almost 37% of *Enterococcus* isolates used in this study showed BAC+ activity. The incidence of BAC+ isolates was higher among *E. faecium* (60%) than among *E. faecalis* (24%) isolates. According to Poeta *et al.* [28], 49% of *E. faecium* and 37% of *E. faecalis* isolates of different wild animal origin showed antimicrobial activity against at least one of the tested indicator strains. On the contrary, Del Campo *et al.* [9] found a higher proportion of BAC+ isolates among *E. faecalis* (80.6%) than among *E. faecium* (21.6%) isolates obtained from human clinical and fecal samples, sewage, and chicken samples. Similarly, De Vuyst *et al.* [10] reported that bacteriocin production was found among 58.7% and 68.3% of *E. faecium* and *E. faecalis* strains, respectively, of different origins, including food, feed, animals, and clinical and nonclinical human isolates. Inconsistency of the BAC+ phenotype incidence among these species may be partly due to difference in indicator strains used. Moreover, environmental factors, such as feeds, conditions found in the gastrointestinal tract, and the balance of organisms in the intestinal flora are likely to affect the presence and persistence of enterococci because BAC+ phenotype was found in 8 of 9 genetically unrelated *E. faecium* isolates in our study that were obtained from pigs kept in a single farm.

The results of the antimicrobial activity and the PCR results imply the existence of other enterocin genes that were not tested in this study. None of enterocin genes tested were found in all of the 7 *E. faecium* and 6 *E. faecalis* with BAC+ phenotype that were obtained from broiler meat. Five of the 8 isolates with BAC+ phenotype (exclusively against Gram-positive indicator strains) from pig feces had no detectable enterocin genes. Nucleotide substitutions in the enterocin genes may prevented PCR amplification with the selected primers used in this study because possible sequence divergence of the *cyl* genes were suggested [29]. Except for the above observation, similar tendencies in distribution of enterocin genes tested were not found among enterococcal isolates of different origins.

Marked variations of inhibitory spectra were shown among *Enterococcus* isolates with identical enterocin genotypes. Nevertheless, antimicrobial activities against Gram-negative bacteria (*E. coli* and *Salmonella* Enteritidis) were found in 6 *Enterococcus* isolates that had one of the *cylLMBA*, *entA*, and *entL50AB* genes. We have previously demonstrated [33] that the inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis was found in one *E. gallinarum* strain that was negative for all of the above genes [33]. Therefore, association of other enterocins or nonenterocin factors with the inhibitory effect against *Salmonella* Enteritidis in this study can not be excluded. Enterocin A has been reported to show antimicrobial activity against *L. monocytogenes* [1], although in the current study, no antilisterial activity was detected in more than half (5/9) of *E. faecium* and all of the 3 *E. faecalis* isolates possessing the *entA* gene. Other researchers have noted that phenotypic testing revealed the

existence of apparently silent genes [10, 12].

Possible correlation between beta-hemolytic strains of *E. faecalis* positive for the *cylLMBA* genes and antimicrobial activities against *L. monocytogenes* was demonstrated in the present study. The incidence of antilisterial activity among the *cyl* genes-positive isolates with beta-hemolytic activity was significantly higher than among beta-hemolysis negative isolates. In this study, beta-hemolytic activity was exclusively shown in the strains with the *cylL* gene. Interestingly, cytolysin is not considered to be active against *L. monocytogenes* [8]. Thus, it remains to be determined whether beta-hemolysis and antilisterial activity are actually mediated by the same agent, although the beta-hemolytic characteristic may be intimately associated with the production of unknown agents possessing antilisterial activity, even new enterocins.

In summary, observations in our study suggest that the antimicrobial activity may be associated with other enterocin genes that was not studied or nonenterocin factors. Investigating the correlation between a certain characteristic and antimicrobial activity against specific organism is likely to offer a first step in identifying novel agents exhibiting such activity.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors are grateful to Dr. Peter S. Holt for reviewing this manuscript. *S. pyogenes* strain 940055 was kindly provided from Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory. *L. monocytogenes* strain L98-76P2 was kindly provided by Professor R. Hondo, Nippon Veterinary and Life Science University.

REFERENCES

1. Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I. F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676-1682.
2. Brock, T. D. and Davie, J. M. 1963. Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocine. *J. Bacteriol.* 86: 708-712.
3. Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernandez, P. E. and Holo, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287-2294.
4. Chow, J. W., Thal, L. A., Perri, M. B., Vazquez, J. A., Donabedian, S. M., Clewell, D. B. and Zervos, M. J. 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2474-2477.
5. Cintas, L. M., Casaus, P., Havarstein, L. S., Hernandez, P. E. and Nes, I. F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321-4330.
6. Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F. and Havarstein, L. S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988-1994.
7. Cintas, L. M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L. S., Holo,

- H., Hernandez, P. E. and Nes, I. F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
8. Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F. and Hernandez, P. E. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* 7: 281–305.
 9. Del Campo, R., Tenorio, C., Jimenez-Diaz, R., Rubio, C., Gomez-Lus, R., Baquero, F. and Torres, C. 2001. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 905–912.
 10. De Vuyst, L., Foulquie Moreno, M. R. and Revets, H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 299–318.
 11. Dutka-Malen, S., Evers, S. and Courvalin, P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 24–27 (Erratum, 33, 1434).
 12. Eaton, T. J. and Gasson, M. J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628–1635.
 13. Franz, C. M., Schillinger, U. and Hozapfel, W. H. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 255–270.
 14. Gilmore, M. S. and Ferretti, J. J. 2003. Microbiology. The thin line between gut commensal and pathogen. *Science* 299: 1999–2002.
 15. Giraffa, G. 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12: 301–307.
 16. Gonzalez, C., Langdon, G. M., Bruix, M., Galvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M. and Rico, M. 2000. Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 11221–11226.
 17. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J. H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85–101.
 18. Huycke, M. M., Spiegel, C. A. and Gilmore, M. S. 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1626–1634.
 19. Ike, Y., Hashimoto, H. and Clewell, D. B. 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1524–1528.
 20. Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171–200.
 21. Jett, B. D., Jensen, H. G., Nordquist, R. E. and Gilmore, M. S. 1992. Contribution of the pAD1-encoded cytotoxin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 60: 2445–2452.
 22. Jett, B. D., Huycke, M. M. and Gilmore, M. S. 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 462–478.
 23. Khan, S. A., Nawaz, M. S., Khan, A. A., Hopper, S. L., Jones, R. A. and Cemiglia, C. E. 2005. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. From poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Mol. Cell. Probes.* 19: 27–34.
 24. Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. 1992. Microbiology of white brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.* 9: 13–19.
 25. Maqueda, M., Galvez, A., Martinez-Bueno, M. and Valdivia, E. 1998. Widespread production of AS-48 like bacteriocins in strains of *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* 29: 1318–1319.
 26. Murase, T., Mito, Y., Otsuki, R. and Yamai, S. 2002. Nucleotide substitutions in *vanC-2* gene of *Enterococcus casseliflavus* isolates obtained from chickens. *Epidemiol. Infect.* 129: 421–424.
 27. Murray, B. E. 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New Engl. J. Med.* 342: 710–721.
 28. Poeta, P., Costa, D., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Klibi, N., Rodrigues, J. and Torres, C. 2006. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol. Res.* 162: 257–263.
 29. Smedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R. and Barreto Crespo, M. T. 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2569–2576.
 30. Shankar, N., Coburn, P., Pillar, C., Haas, W. and Gilmore, M. 2004. Enterococcal cytotoxin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 609–618.
 31. Stark, J. M. 1960. Antibiotic activity of haemolytic enterococci. *Lancet* i: 733–734.
 32. Tanimoto, K., Florence, Y. and Clewell, D. B. 1993. Characterization of the *traC* determinant of the *E. faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmid pAD1: binding to sex pheromone. *J. Bacteriol.* 175: 5260–5264.
 33. Theppangna, W., Otsuki, K. and Murase, T. 2006. Inhibitory effect of *Enterococcus* strains obtained from a probiotic product on in vitro growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strain IFO3313. *J. Food Prot.* 69: 2258–2262.
 34. Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K. and Ike, Y. 1996. Cloning and genetic sequence analysis of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* 79: 7843–7855.