

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Perfil de resistência antimicrobiana e análise genotípica de
Enterococcus spp. isolados de alimentos em Porto Alegre, RS.**

GUSTAVO PELICOLI RIBOLDI

**Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do
Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências.**

Orientador: Jeverson Frazzon

Porto Alegre, março de 2007.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBM) do Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Agência Financiadora:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

AGRADECIMENTOS

Ao orientador e amigo, Dr. Jeverson Frazzon, pela paciência, dedicação, atenção, incentivo e confiança.

Aos co-orientadores Dr. Pedro D'Azevedo e Dra. Ana Paula Frazzon (também membro da Comissão de Acompanhamento) pela disponibilidade, aplicação e auxílio sempre competentes.

Ao Dr. Adriano Brandelli, membro de minha Comissão de Acompanhamento.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBM) e laboratório 209N, pela amizade, companheirismo e colaboração.

A todos os demais colegas e professores do PPGBCM pela cooperação.

Aos funcionários Luciano Saucedo e Silvia Centeno pela gentileza e disposição sempre demonstradas.

Ao revisor desta dissertação, prof. Dra. Jenifer Saffi, pela atenção e sugestões apresentadas.

Finalmente, e principalmente, à minha família (meus pais, João e Doraci, e irmãs, Bianca, Bruna e Bárbara) e à Renata, pelo apoio irrestrito e incondicional, consideração, amor, amizade, dedicação, paciência. Nada disso seria possível sem vocês. A Deus, por me conceder esta oportunidade e me presentear com tais pessoas maravilhosas ao meu lado.

Muito Obrigado.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>ENTEROCOCCUS SPP.</i>	11
1.2. IMPORTÂNCIA CLÍNICA	13
1.2.1. Fatores de patogenicidade	13
1.2.1.1. Adesinas	14
1.2.1.1.1 <i>Substância de agregação (AS)</i>	14
1.2.1.1.2. <i>Proteína de superfície de Enterococcus (Esp)</i>	15
1.2.1.1.3. <i>Adesina de colágeno (Ace)</i>	16
1.2.1.2. Antígenos de parede	16
1.2.1.3. Proteínas Secretadas	17
1.2.1.3.1. <i>Citolisina</i>	17
1.2.1.3.2. <i>Proteases</i>	17
1.2.1.4. Mecanismos de transferência genética	18
1.2.2. Resistência a antimicrobianos	18
1.2.2.1. A resistência intrínseca de <i>Enterococcus spp.</i>	19
1.2.2.2. A resistência adquirida de <i>Enterococcus spp.</i>	20
1.2.3. Processos patológicos	25
1.2.4. Infecções Nosocomiais	27
1.2.5. Tratamento de infecções	29
1.3. IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL	30
1.3.1. Culturas Starter	30
1.3.2. Probióticos	33
1.3.3. Bacteriocinas	34

1.4. CONTAMINAÇÃO A PARTIR DE ALIMENTOS	35
1.4.1. Linhagens presentes em alimentos	35
1.4.1.1. Linhagens de uso na indústria	35
1.4.1.2 Alimentos contaminados	36
1.4.2. Promotores do crescimento	39
1.5. <i>ENTEROCOCCUS SPP.</i> NO BRASIL.....	41
2. OBJETIVOS	44
3. MÉTODOS E RESULTADOS	45
3.1. MANUSCRITO I: “ Antimicrobial resistance profile of <i>Enterococcus spp.</i> isolated from different foods in Porto Alegre, Brazil. ”	46
3.2. MANUSCRITO II: “ Phenotypic and genotypic heterogeneity of <i>Enterococcus</i> species isolated from food in Southern Brazil ”.....	62
4. DISCUSSÃO	84
4.1. ISOLAMENTO A PARTIR DE ALIMENTOS.....	84
4.2. PADRÃO DE RESISTÊNCIA FRENTE A ANTIMICROBIANOS.....	85
4.3. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
6. ANEXOS	102
6.1. MANUSCRITO III: “ Molecular fingerprint of <i>Enterococcus spp.</i> ampicillin resistant strains isolated from nosocomial infections in Southern Brazil ”	102
7. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO	122

LISTA DE ABREVIATURAS

Ace - *Adhesin to collagen*;

AMPR - *Ampicillin resistant enterococci*;

ARE - *Antimicrobial resistant enterococci*;

AS - *Aggregation substance*;

ATP - *Adenosine triphosphate*;

BHI - *Brain heart infusion*;

Esp - *Enterococci surface protein*;

HLAR - *High level aminoclycoside resistance*;

HLGR - *High level glycopeptide resistance*;

LAP - *Leucina-aminopeptidase*;

MGP - *α -methyl-D-glucopyranoside*;

MIC - *Minimum inhibitory concentration*;

PBP - *Penicillin binding protein*;

PFGE - *Pulsed field gel eletrophoresis*;

PYR - *Pirrolidonil- β -naftilamida*;

RAPD-PCR - *Polimerase chain reaction through random amplification of polimorphic DNA*;

TGI - *Trato gastrintestinal*;

TGU - *Trato genitourinário*;

UFC - *Unidade formadora de colônia*;

VRE - *Vancomycin resistant enterococci*.

RESUMO

Enterococcus spp são microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal de humanos. Estes microrganismos podem ser também encontrados em alimentos, onde possuem um papel benéfico durante a maturação de determinados produtos fermentados. Enterococos eram consideradas bactérias de baixa virulência; no entanto, estes microrganismos, recentemente, assumiram uma importância clínica, sendo considerados patógenos oportunistas para humanos. Esta característica dualista do microrganismo se tornou um motivo de discussão constante entre a classe científica no mundo todo. O objetivo desse estudo foi determinar a distribuição e o perfil de resistência antimicrobiana de *Enterococcus spp*. isolados de diferentes fontes de alimentos da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. Linhagens isoladas de vegetais, carne e produtos lácteos foram submetidas a análises morfológicas, bioquímicas e de identificação molecular utilizando a técnica de PCR e as linhagens positivas foram analisadas quanto à susceptibilidade a 12 antimicrobianos utilizados na clínica ou na pecuária. Ainda, estas amostras foram analisadas quanto à diversidade genotípica pela utilização da técnica de RAPD-PCR. A análise estatística dos perfis de RAPD-PCR obtidos para as amostras verificou uma presença de 42 padrões de banda diferenciados e 6 perfis diferentes de RAPD-PCR. Relacionando os testes fenotípicos clássicos previamente realizados, somente um perfil agrupou todas as linhagens de mesma espécie. Os dados aqui descritos sugerem atenção especial aos microrganismos provenientes de todos os três grupos de alimentos utilizados como fonte de isolamento, principalmente devido à presença de linhagens com altos níveis de resistência a antimicrobianos, incluindo aqueles de maior relevância clínica como a

gentamicina, estreptomicina, ampicilina e vancomicina. Além disso, análises dos dados de RAPD-PCR demonstraram uma variabilidade genética entre as linhagens de enterococos provenientes de diferentes fontes de alimentos.

ABSTRACT

Enterococcus spp. are commensal microorganisms, which colonize the gastrointestinal tract in humans. These microorganisms are natural probiotic compounds in foods, playing a beneficial role during the maturation of some fermented products. Enterococci presents, generally, relative low virulence. However, these organisms have recently assumed major importance in clinical microbiology as well. They are considered emerging pathogens for humans, with *Enterococcus faecalis* causing human enterococcal infections at high rates, and these dualistic characteristics have turned a subject of constant debate worldwide. The aim of the present study was to determine the species distribution and the antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from several food in Porto Alegre, RS, Brazil. Strains isolated from vegetables, meat and dairy products were submitted to morphological, biochemical and molecular identification using PCR technique, and positive strains were submitted to antimicrobial susceptibility tests using twelve clinical and agricultural antimicrobials. Furthermore, we investigated the genotypic diversity of enterococci strains. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR was used to study the genetic variability, which distinguished closely related isolates. After numerical analyses of the RAPD-PCR profiles obtained with M13 primer, 42 different patterns were obtained. Six different RAPD profiles were recorded for the enterococcal isolates. According to previous species determination by phenotypical tests, only one cluster associated all strains from the same species. Our data suggest a special attention to strains isolated from all the three groups of food in analysis, especially due to the presence of enterococci resistant to high level and a wide range of clinical antimicrobials that

include gentamycin, streptomycin, ampicillin and vancomycin. Results of the present study suggest that there is some genotypic variability within strains of enterococci deriving from several food sources in Southern Brazil.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *ENTEROCOCCUS SPP.*

O gênero *Enterococcus spp.* corresponde a um grupo de microrganismos conhecidos como bactérias ácido-láticas (LAB). Os microrganismos pertencentes a este gênero apresentam-se positivos sob a coloração clássica de Gram, em formas de cocos em pares ou cadeias curtas. Primeiramente classificados como membros do gênero *Streptococcus spp.*, descrito como “estreptococos de origem fecal”, ou ainda estreptococos do grupo D de Lancefield, estes microrganismos receberam uma nova caracterização a partir de estudos sorológicos e técnicas de classificação moleculares modernas, que originaram a divisão do gênero *Streptococcus spp.* em três grupos: *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Dessa forma, separou-se o gênero patogênico *Streptococcus* do não patogênico e industrialmente importante *Lactococcus*, e ao microrganismo anteriormente citado como estreptococo fecal denominou-se *Enterococcus*, pertencente à família *Enterococcaceae* (DEVRIESE *et al.*, 1995).

Enterococos são anaeróbios facultativos a uma temperatura ótima de crescimento de 35°C e tipicamente distinguíveis de outros cocos Gram positivos por admitir crescimento em temperatura variando entre 10⁰C a 45⁰C, bem como suportando variações de pH. Todos os representantes do gênero admitem crescimento em meio contendo 6,5% NaCl e na presença de 40% de sais biliares, produzem a enzima leucina-aminopeptidase (LAP) e, em sua maioria, hidrolisam o substrato pirrolidonil-β-naftilamida (PYR) . Esses microrganismos não possuem enzimas do citocromo, apresentando em sua maioria resultado negativo quando submetidos ao teste como da catalase; porém ocasionalmente produzem uma pseudo-catalase, podendo apresentar um fenótipo catalase positivo. Caracterizam-se como linhagens homofermentativas

com o ácido láctico como produto final de fermentação da glicose, sem produção de gás. O conteúdo de pirimidinas (G+C) no DNA varia de 37 a 45% (MURRAY, 1990).

Devido à capacidade desses microrganismos de crescer e sobreviver por longos períodos em condições adversas, existe uma diversidade de nichos onde já foram identificadas linhagens de enterococos. São encontrados, principalmente, em mamíferos e pássaros, também são verificados em répteis e insetos, bem como se encontram disseminados no solo, plantas e água, onde comumente são considerados contaminantes fecais (FACKLAN *et al.*, 2002).

A característica comensal em humanos de representantes deste gênero se dá principalmente pela colonização do trato gastrointestinal (TGI) e geniturinário (TGU). O ambiente do TGI humano é um ecossistema bacteriano complexo, onde um número total de aproximadamente 10^4 microrganismos/mL pode estar presente em uma média de 400 a 500 espécies, apesar de geralmente haver o predomínio de poucas espécies. A microbiota intestinal é uma rede complexa de interações mútuas ou antagônicas. Para se estabelecer no intestino, a bactéria deve primeiramente aderir a mucosa para não ser eliminada pelo mecanismo do peristaltismo, ou multiplicar-se a uma taxa que exceda a sua taxa de eliminação. O microrganismo necessita ainda competir por nutrientes, fatores de crescimento, além de afrontar uma eventual colonização de outros procariotos no local, o que gera um ambiente inibitório entre competidores em potencial. Ambientes como esses podem ser determinados pela mudança no pH e potencial de oxi-redução e pela produção de H_2S e ácidos graxos voláteis. Linhagens de enterococos estão em minoria na comunidade bacteriana que habita o intestino de humanos adultos, atingindo um número de não mais de 1% da microbiota intestinal de um adulto. Por outro lado, são os cocos Gram positivos predominantes em fezes humanas, apresentando uma taxa variando de 10^5 a 10^8 UFC/g de fezes e, dentre as espécies

de enterococos descritas, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são mais comumente encontradas (AARESTRUP *et al.*, 2002).

1.2. IMPORTÂNCIA CLÍNICA

1.2.1. Fatores de patogenicidade

A espécie *E. faecalis* é responsável pela maioria das infecções em humanos, representando 80-90% dos isolados clínicos. *E. faecium* é a segunda em números e apresenta uma frequência muito menor (abaixo de 10%), porém é altamente significativa devido à sua alta taxa de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos. *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus gallinarium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus raffinosus*, ocasionalmente, causam infecções em humanos (MURRAY, 1990). Das espécies acima descritas, apenas *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* e *E. durans* apresentam-se como comensais do TGI de humanos. As demais são comumente encontradas no TGI de outros animais, *E. hirae* e *E. gallinarium*, ou em plantas. *E. mundtii* e *E. casseliflavus*. *E. raffinosus* ainda não teve seu habitat localizado, visto que até então foi encontrado somente em espécimes clínicos (TANNOCK & COOK, 2002).

Na maioria das circunstâncias, enterococos coexistem com o hospedeiro sem maiores problemas. No entanto, ocorrem situações onde este comensalismo é rompido. Enterococos são considerados patógenos oportunistas, onde o estado imunológico do hospedeiro é fator determinante para a possibilidade do microrganismo desenvolver um processo infeccioso, visto que esta alteração na fisiologia do hospedeiro permite ao microrganismo a colonização de novos nichos (EATON & GASSON, 2001). Por outro lado, a aquisição por parte do microrganismo de fatores que favoreçam a colonização de novos locais pode levar a um fenótipo patogênico na linhagem. Diversos fatores codificados por elementos genéticos

móveis, como plasmídeos e transposons, que não são necessários para existência da bactéria como comensal, contribuem para a severidade da infecção causada pelos enterococos. Através da atuação dessa gama de fatores de virulência, estes promovem mudanças patológicas relacionadas a uma inflamação aguda, através de características quimiotáticas para as células polimorfas nucleares do hospedeiro, levando à produção de superóxido e secreção de enzimas lisossomais por parte dessas células (GILMORE *et al.*, 2002).

A virulência de linhagens de enterococos ocorre através de eventos sucessivos que levam à colonização e adesão aos tecidos, invasão e resistência a mecanismos específicos e inespecíficos da imunidade do paciente, onde atuam proteínas específicas responsáveis por cada evento. Dependendo do tipo e combinação desses fatores, estes se tornam determinantes para a patogenicidade da cepa, pois determinantes de virulência relacionados a vários estágios de infecção promovem um risco maior ao paciente em comparação à apresentação de fatores de virulência associados somente a um estágio (JETT *et al.*, 1994; JOHNSON; 1994).

1.2.1.1. Adesinas

1.2.1.1.1 Substância de agregação (AS)

A AS corresponde a uma proteína presente na superfície do microrganismo e codificada por plasmídeos de conjugação, que promove a formação de agregados celulares e pode intensificar a virulência do microrganismo através da atuação de diferenciadas maneiras. Primeiramente, atua no passo inicial essencial para colonização do microrganismo como adesina e invasina, capaz de promover a ligação do *E. faecalis* à superfície da célula epitelial devido a sua capacidade de ligação a uma grande variedade celular nas proteínas β 2-integrinas de células epiteliais intestinais e da matriz extracelular (fibronectina, colágeno tipo 1) (SARTINGEN *et al.*, 2000; ROZDZINSKI *et al.*, 2001). Além disso, promove a

internalização e sobrevivência do microrganismo em neutrófilos e macrófagos, pelo mesmo mecanismo de ligação a β 2-integrinas, resultando na internalização do agregado de enterococos por parte destas células (VANEK *et al.*, 1999). Dessa maneira, favorece uma resistência a mecanismos de defesa do hospedeiro. Em neutrófilos ativados, fagossomas contendo AS ligados em enterococos apresentam-se maiores em comparação a fagossomas contendo bactérias opsonizadas, sugerindo que a modificação na maturação do fagossoma estaria envolvida na resistência a morte de enterococos ligados ao fator de virulência AS. Além disso, o pH no interior fagossomas contendo células não opsonizadas é mantido em valor mais alto, o que impede a ativação de enzimas envolvidas na produção de componentes antibacterianos e confere maior resistência à atuação dos macrófagos (RAKITA *et al.*, 1999). A característica de resistência à fagocitose pelos enterococos é considerada uma das linhas de escape da resposta imune do hospedeiro.

Outra maneira desse fator aumentar a patogenicidade da linhagem é através da disseminação de fatores de virulência presentes em plasmídeos, visto que esta proteína possui um papel essencial no processo de conjugação destes microrganismos (CLEWELL, 1993). Desta forma, permite a troca de informações dentro da espécie e aquisição de elementos codificantes de proteínas importantes tanto quanto à patogenicidade (como citolisinas) quanto a determinantes de resistência a antimicrobianos. Além disso, a expressão conjunta de AS aumenta sensivelmente a patogenicidade da citolisina, visto o sinergismo existente entre estes dois fatores de patogenicidade (CHOW *et al.*, 1993).

1.2.1.1.2. Proteína de superfície de Enterococcus (Esp)

Esta adesina é sintetizada pelos genes cromossomais, está localizada na superfície celular e é encontrada em aproximadamente 40% das linhagens de *E. faecalis* isoladas de

infecções (SHANKAR *et al.*, 1999). A proteína de superfície atua como adesina contribuindo para a colonização e persistência do patógeno no trato genitourinário, com atividade direta na ligação com a matriz extracelular do hospedeiro humano, promovendo a colonização (SHANKAR *et al.*, 2001). Apresenta também atividade de evasão da resposta imune e é responsável pela formação de biofilmes por parte deste microrganismo (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001; CRETI *et al.*, 2006).

1.2.1.1.3. Adesina de colágeno (Ace)

Proteína envolvida na aderência da bactéria às células do hospedeiro, também atuando, portanto, no início a infecção, ligando-se ao colágeno, fibronectina e laminina da matriz extracelular do hospedeiro (RICH *et al.*, 1999; NALLAPAREDY *et al.* 2000A; NALLAPAREDY *et al.* 2000B; KOWALSKI *et al.*, 2006).

1.2.1.2. Antígenos de parede

Os enterococos possuem carboidratos, presentes na superfície celular, acessíveis ao sistema imune do hospedeiro e apresentam-se de forma variável dentro da espécie de *E. faecalis*. Essas cápsulas polissacarídicas são responsáveis por dificultar a detecção e ativação do sistema imune, ligação do complemento e de anticorpos para posterior fagocitose por parte dos neutrófilos polimorfonucleares (ARDUINO *et al.*, 1994; RICE *et al.*, 2001), visto que linhagens deficientes dessas cápsulas são rapidamente identificadas, fagocitadas e eliminadas por neutrófilos ativados (HANCOCK & GILMORE, 2002). Além disso, foi descrito o antígeno polissacarídico de *Enterococcus* spp. (Epa), um polissacarídeo da parede celular, que se apresenta disseminado em *E. faecalis*. O gene *epa* está envolvido na síntese de um antígeno

polissacarídico produzido durante a infecção em humanos, associado à resistência a fagocitose por parte de neutrófilos (TENG *et al.*, 2002).

1.2.1.3. Proteínas Secretadas

1.2.1.3.1. Citolisina

A citolisina é uma toxina bacteriana expressa exclusivamente por linhagens de *E. faecalis*, encontrada tanto em plasmídeos quanto no cromossomo. Está relacionada à estreptolisina O e a uma classe de bacteriocinas conhecidas como lantibióticos, exercendo atividade tanto citolítica quanto bactericida contra microrganismos Gram positivos (GILMORE *et al.*, 1994; HANCOCK & GILMORE, 2000). Linhagens de *E. faecalis* que expressam esta proteína apresentam-se 10 vezes mais patogênicas ao hospedeiro. O fenótipo hemolítico de linhagens deste microrganismo é elevado em isolados provenientes de infecções, atingindo uma taxa de aproximadamente 60% (GILMORE *et al.*, 2002). Na corrente sanguínea, a presença deste fator contribui para a proliferação do microrganismo e possui um papel importante na evasão do microrganismo à resposta imune do hospedeiro, visto que possui atividade citolítica não somente sobre hemácias, mas também sobre macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares (HUYCKE *et al.*, 1998).

1.2.1.3.2. Proteases

Além de fornecer nutrientes ao microrganismo, estas proteínas podem ainda atuar como fatores de virulência de diferentes maneiras. Duas proteases já foram descritas em linhagens de *E. faecalis*: a gelatinase, uma metaloprotease (também denominada coccolisina, codificada pelo gene *gelE*); e uma serina-protease (codificada por *sprE*). Ambas as proteínas

são reguladas pelo mesmo sistema (*fsr*) e causam danos ao hospedeiro atuando sobre o colágeno dos tecidos do hospedeiro de diferenciadas maneiras: através da degradação direta do tecido conjuntivo (BURNS *et al.*, 1996; OKAMOTO *et al.*, 1997); através da ativação de metaloproteases da matriz extracelular do hospedeiro; desregulando componentes essenciais do sistema imune do hospedeiro como degradação de imunoglobulinas ou proteínas da via do complemento (TRAVIS *et al.*, 1994).

1.2.1.4. Mecanismos de transferência genética

Os enterococos possuem mecanismos de transferência genética altamente efetivos, incluindo conjugação e transposição conjugativa (CLEWELL *et al.*, 2000). Genes de virulência são conhecidos por estarem associados à plasmídeos altamente transmissíveis. O processo de conjugação utilizado por plasmídeos (como o pAD1) é bastante desenvolvido e envolve um processo de sinalização sofisticado. Cepas suscetíveis ao processo de conjugação secretam pequenas moléculas de peptídeos sinalizadores conhecidos como *sex pheromones*. Esses peptídeos induzem o gene a permitir a produção de substância de agregação em células capazes de doar o plasmídeo, resultando em um fenótipo de agregação celular (WIRTH, 1994; WIRTH, 2000; CHANDLER & DUNNY, 2004). Esse processo aumenta a frequência de transferência do plasmídeo para as células receptoras.

1.2.2. Resistência a antimicrobianos

Visto que enterococos fazem parte da microbiota intestinal normal, estes possuem maior probabilidade de adquirir marcadores de resistência e/ou patogenicidade do que outros cocos Gram positivos. O desenvolvimento do aumento do fenótipo de resistência pode ocorrer

através da aquisição de genes determinantes de resistência (em plasmídeos ou transposons a partir de outros microrganismos) ou devido a mutações cromossomais espontâneas (KAYSER, 2003).

1.2.2.1. A resistência intrínseca de *Enterococcus spp.*

A resistência cromossomal de enterococos a vários antimicrobianos pode ser resultado da sua necessidade de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o trato gastrointestinal. Enterococos apresentam resistência intrínseca a diversas substâncias antimicrobianas utilizadas na clínica (SHEPARD & GILMORE, 2002):

- a resistência relativa aos **β -lactâmicos** é uma característica do gênero. Como exemplo, *E. faecalis* é 10 a 100 (MIC 4-32 $\mu\text{g/mL}$) vezes menos susceptível a penicilina do que outros estreptococos, e *E. faecium* é de 4 a 16 vezes menos susceptível a esta substância em comparação com *E. faecalis*. A baixa suscetibilidade de enterococos aos β -lactâmicos é devido principalmente à produção de uma proteína de ligação de penicilinas (PBP) particular de baixa-afinidade à penicilina.

- todas as espécies de enterococos possuem uma resistência a baixas concentrações de **aminoglicosídeos** (MIC 4-256 $\mu\text{g/mL}$). O mecanismo desta resistência parece ser devido à baixa taxa de entrada desses agentes na célula bacteriana devido à parede celular de baixa permeabilidade a tais moléculas.

- baixo nível de resistência a vancomicina (MIC 8-32 $\mu\text{g/mL}$) e susceptibilidade a teicoplanina (MIC abaixo de 4 $\mu\text{g/mL}$) (**glicopeptídeos**) é uma propriedade intrínseca das espécies *E. gallinarium* e *E. casseliflavus*. Estas linhagens dificilmente são isoladas de amostras hospitalares e são freqüentemente tratadas como sendo de pouca relevância clínica (TOYE *et al.*, 1997). O baixo nível de resistência verificado é devido à síntese de uma parede

celular modificada por parte do microrganismo, associando um resíduo do aminoácido serina no lugar do resíduo de alanina.

- a maioria das espécies apresenta resistência a baixas concentrações de **lincosamidas** (clindamicina e lincomicina) (MIC 3-100 µg/mL).

-apresentam-se susceptíveis, *in vitro*, a baixas concentrações de **Sulfametoxazol+Trimetoprim**, substâncias que interferem com o metabolismo do ácido fólico em bactérias; porém, *in vivo*, a droga não é efetiva devido à habilidade do organismo de burlar o mecanismo de ação de inibição da produção de ácido fólico por parte do antibacteriano e utilizar folato de fontes exógenas.

1.2.2.2. A resistência adquirida de *Enterococcus spp.*

Como verificado anteriormente, mecanismos de transferência genética (transposons e/ou plasmídeos) fornecem aos enterococos a capacidade de adquirir resistência a diversos antimicrobianos (KAK & CHOW, 2002).

- **β-lactâmicos**

As penicilinas são os representantes da classe com maior atividade frente à enterococos, seguidas por carbapenens e cefalosporinas, com a menor atividade. A ampicilina (MIC 1 a 16 µg/mL) é a substância mais ativa dentre as penicilinas. A resistência a ampicilina tem se tornado excessivamente alta, especialmente quanto à espécie *E. faecium*, associado a um MIC de 256 µg/mL, devido principalmente à superprodução de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) com baixa afinidade a esta substância. Já foram descritas linhagens de *E. faecalis* produtoras de β-lactamase codificadas pelo gene *blaZ*, porém estes isolados ainda são raramente isolados (MARKOWITZ *et al.*, 1991; ZSCHECK & MURRAY, 1993). Já o uso de cefalosporinas é contra indicado, visto o alto nível de resistência intrínseca a esta substância e

à possibilidade de desenvolvimento de superinfecções.

- **Aminoglicosídeos**

Antimicrobianos de amplo espectro com atividades contra microrganismos aeróbios e micoplasmas. Apresenta como representantes principais a gentamicina e a estreptomicina. Possui grande importância no tratamento de infecções por enterococos em humanos. Como mecanismo de ação, atua primariamente ao interferir a síntese protéica pela ligação à porção 16S da subunidade 30S do RNA ribossomal. A resistência intrínseca a esta substância limita o seu uso, porém a sua associação a uma substância com ação sobre a parede celular, glicopeptídeo ou β -lactâmico, que facilita a entrada do aminoglicosídeo na célula microbiana ao modificar a parede celular, permite a atuação bactericida da droga. Este sinergismo bactericida entre as duas classes de antimicrobianos é um efeito freqüentemente necessário no tratamento de infecções mais sérias (TANOCK & COOK, 2002). Porém, algumas linhagens já apresentam métodos para burlar esse mecanismo, através da aquisição de genes que codificam enzimas capazes de modificar a estrutura do aminoglicosídeo ou que medeie uma resistência ao agente da parede celular. As enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos são: fosfotransferases (fosforilam a molécula de aminoglicosídeo a partir de ATP), acetiltransferases (acetilam a molécula a partir de acetil-CoA) e nucleotidiltransferases (adiciona molécula de adenina, também proveniente de ATP). A presença dessas enzimas no microrganismo eleva o MIC a uma taxa maior de 2000 $\mu\text{g/mL}$. Frequentemente, isolados clínicos com alto nível de resistência a aminoglicosídeos apresentam três ou mais dos seguintes genes promotores de resistência: *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia (o principal, codifica enzima bifuncional que acetila e fosforila a molécula, presente em mais de 90% dos isolados com esse tipo de resistência, localizado em transposons e plasmídeos); *aph(2'')*-Ic; *aph(2'')*-Id; *aph(2'')*-Ib; *ant(4')*-Ia; *aph(3'')*-IIIa e *aac(6')*-Ii (fornecem resistência ao sinergismo

aminoglicosídeo-betalactâmico/glicopeptídeo) (MAROTHI *et al.*, 2005).

A resistência a estreptomicina, por sua vez, ocorre diretamente através de mudanças na subunidade ribossomal 30S que diminui a capacidade de ligação do antimicrobiano, ou ainda pelos genes *ant(6)-Ia* e *ant(3'')-Ia* que codificam nucleotidiltransferases e modificam a estrutura da substância. Nestes isolados, o valor de MIC observado pode ser verificado na taxa de 4000 a 16000 µg/mL.

- Glicopeptídeos

As substâncias vancomicina e teicoplanina são utilizadas para o tratamento de infecções graves por microrganismos Gram positivos resistentes. Os glicopeptídeos têm como mecanismo de ação a inibição da formação da parede celular. Diferenciam-se de outras substâncias com ação em parede celular, pois não agem na biossíntese de enzimas produtoras da parede celular, mas sim nos substratos dessas enzimas, os precursores do peptidoglicano. Atuam formando complexos com o dímero D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala), uma parte do pentapeptídeo precursor do peptidoglicano. Essa ligação leva a defeitos nas ligações entre os precursores, ocasionando perda da integridade da parede celular, seguida de morte celular (WALSH *et al.*, 1996). Existem seis mecanismos genéticos diferentes, que codificam diversos fenótipos de resistência a glicopeptídeos. São mecanismos genotipicamente e fenotipicamente distintos e envolvem uma maquinaria complexa de enzimas responsáveis pelos seguintes eventos: perceber a presença de glicopeptídeos no local, modificar a produção do peptidoglicano para o fenótipo resistente e eliminar precursores de peptidoglicano normais de modo que a célula sintetize quase que exclusivamente precursores de peptidoglicano de fenótipo resistente.

O gene *vanA* codifica uma resistência de alto nível a vancomicina (MIC \geq 64 µg/mL) e teicoplanina (MIC \geq 16 µg/mL), está presente no transposon *Tn1546*. O gene *vanB* induz uma

resistência à vancomicina (MIC 4-1000 µg/mL), porém sem resistência a teicoplanina. Apresenta-se normalmente no cromossomo, mas admite presença plasmidial. O operon *vanC* é o único que apresenta codificação cromossomal, é característico de espécies móveis de enterococos (*E. gallinarium* e *E. casseliflavus*). Apresenta um baixo nível de resistência a vancomicina (MIC 2-32 µg/mL). Estas linhagens são dificilmente isoladas de amostras hospitalares e são frequentemente tratados como de pouca relevância clínica (TOYE *et al.*, 1997). No entanto, a capacidade de adquirir o gene *vanA* pode conferir importância clínica a estas linhagens (DUTKA-MALEN *et al.*, 1994; CORSO *et al.*, 2005). O operon *vanD* medeia um nível moderado de resistência a vancomicina (MIC 64-128 µg/mL) e teicoplanina (MIC 4-64 µg/mL). Está presente no cromossomo e não parece ser transferível. Os determinantes *vanE* e *vanG* codificam um baixo nível de resistência a vancomicina (MIC <16 µg/mL), e podem ser transferíveis, embora existam poucos estudos a respeito desses determinantes até o momento. Uma vez que uma linhagem resistente a vancomicina (VRE) coloniza um paciente, esta persiste no trato gastrointestinal e pode disseminar-se horizontalmente para outros pacientes (CHENG *et al.*, 2004).

- Lincosamidas

As substâncias lincomicina e clindamicina inibem a síntese de proteínas no microrganismo pelo bloqueio da atividade da subunidade 50S ribossomal, onde o gene *lnu(B)*, de presença em plasmídeos, codifica uma nucleotidiltransferase que modifica a estrutura da molécula do antimicrobiano (TEUBER *et al.*, 2003).

- Macrolídeos

A resistência a esta substância é conferida por enzima que metila um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, o que resulta numa dificuldade na ligação do antimicrobiano (eritromicina, azitromicina, claritromicina) ao

ribossomo. Este fenótipo é codificado frequentemente pelo gene *erm(B)*, que apresenta um nível maior de resistência (MIC >32 µg/mL). Outro gene codificante para este tipo de resistência, o gene *mef(A)*, codifica uma proteína de efluxo que bombeia a molécula do antimicrobiano para fora da célula (MIC 2-16 µg/mL) (AL-TATARI *et al.*, 2006).

- Streptograminas

Também atuam inibindo a síntese protéica através da ligação à subunidade ribossomal 50S. A streptogramina A (dalfopristin) age sinergicamente ao induzir uma mudança conformacional na subunidade 50S do ribossomo, que aumenta a afinidade da streptogramina B (quinupristin) pelo seu sítio ativo. A princípio, linhagens de *E. faecalis* seriam resistentes a streptogramina e, portanto, ao quinupristin/dalfopristin. Em *E. faecium*, o gene *vat(D)* e *vat(E)* (plasmidiais) determinam um perfil resistente a esta linhagem (WERNER *et al.*, 2002).

- Tetraciclina

Apresenta-se em aproximadamente 65% dos isolados clínicos. Inibem a síntese de proteínas por interferir na ligação do aminoacil-tRNA ao ribossomo. Existem dois mecanismos principais de desenvolvimento de resistência a esta substância. Primeiramente, os genes *tet(K)* e *tet(L)* (mais comum, plasmidiais ou cromossomal) que codificam proteínas transmembrana responsáveis pelo efluxo da droga através da membrana celular. Outro mecanismo seria a proteção ribossomal, conferida pelos genes *tet(M)* (mais comum, cromossomal e presente em *Tn916* e plasmídeos conjugativos), *tet(O)* e *tet(S)* pela ligação de proteínas ao ribossomo e alteração de sua conformação, prevenindo a ligação da tetraciclina no ribossomo (ZHANEL *et al.*, 2004).

- Quinolonas

A atuação de substâncias como o ciprofloxacino sobre enterococos é apenas moderado, e a resistência as quinolonas é comum em isolados clínicos destes microrganismos.

Quinolonas atuam inibindo a replicação do DNA bacteriano através da atuação sobre as enzimas topoisomerase II, topoisomerase IV (mais comum sítio ativo em casos de Gram positivos) e DNA girase. O mecanismo de resistência ocorre basicamente por mutações nas regiões *parC* e *gyrA* do DNA bacteriano (KOLAR *et al.*, 2006).

- Bacitracina

Considerado um antibacteriano ativo principalmente contra microrganismos Gram positivos, sem maiores utilizações terapêuticas em humanos. É sugerido para o controle de linhagens de enterococos resistentes a glicopeptídeos em humanos (GARDAN & CONLY, 1999). A base genética do desenvolvimento de resistência a este antimicrobiano não está bem elucidada.

- Cloranfenicol

A alta prevalência de linhagens com resistência múltipla enfoca a hipótese de utilização do cloranfenicol no tratamento dessas infecções. No entanto, mais de 50% das linhagens de enterococos verificadas são resistentes a esta substância devido à presença da enzima cloranfenicol acetiltransferase. A enzima tem a função de modificar a estrutura da substância fazendo com que esta perca a capacidade de ligação à porção ribossomal. O gene codificante para esta enzima (*cat*) pode ser encontrado no cromossomo, bem como em plasmídeos, e a presença dos mesmos genes em linhagens de enterococos, estreptococos e estafilococos sugerem uma transferência horizontal desta resistência entre estas espécies (MAROTHI *et al.*, 2005).

1.2.3. Processos patológicos

Infecções no trato urinário são consideradas o tipo mais comum de infecção causado por este microrganismo, principalmente em idosos no trato urinário inferior (cistite, prostatite

e epididimite), e infecções no trato superior podem evoluir para bacteremia. Este tipo de infecção é mais frequentemente adquirida em ambientes hospitalares e, portanto, mais suscetíveis de serem causados por agentes resistentes a antibacterianos diferentes. Enterococos são frequentemente verificados em infecções intra-abdominais e pélvicas, porém raramente é verificado como o único agente causador deste tipo de infecção, estando quase sempre associado a uma microbiota mista (MALANI *et al.*, 2002). Bacteremia pode ocorrer com mais frequência quando relacionada ao trato urinário, podendo também ocorrer a partir de infecções intra-abdominais ou tendo como fonte cateteres intravenosos contaminados (PATTERSON *et al.*, 1995).

A endocardite é considerada uma das infecções mais sérias causadas por este microrganismo, principalmente devido à alta resistência a antimicrobianos, o que dificulta o tratamento, mesmo quando esta é causada por uma linhagem relativamente suscetível de enterococos. Duas drogas que exibem característica de sinergismo são necessárias para uma terapia eficiente (como verificado anteriormente). Em situações de infecções ocasionadas por linhagens resistentes a vancomicina, ou que apresentem alto nível de resistência a aminoglicosídeos, o tratamento com antimicrobianos é frequentemente falho, sendo necessário o procedimento cirúrgico para remoção da válvula cardíaca infectada (MALANI *et al.*, 2002).

Ao total, linhagens de enterococos são responsáveis por uma taxa de 10 a 15% dos casos de endocardite, onde *E. faecalis* apresenta-se como o agente etiológico mais frequente em comparação ao *E. faecium*, e a maioria dos casos é verificada em homens idosos. A fonte inicial que leva a bacteremia e promove uma infecção em válvulas cardíacas são infecções no trato urinário ou gastrointestinal e a taxa de mortalidade, em casos de infecções deste tipo, está entre 15 a 20% (MEGRAN, 1992). Outras infecções menos comuns verificadas com

enterococos como agentes etiológicos incluem meningite, osteomielite hematogênica, artrite séptica e pneumonia.

1.2.4. Infecções Nosocomiais

Representantes do gênero *Enterococcus spp.*, apesar de seu número relativamente baixo no trato gastrointestinal, apresentam relevante importância na medicina, pois encontram-se entre os líderes de microrganismos responsáveis pelo desenvolvimento de infecções hospitalares. Nos Estados Unidos, por exemplo, 800.000 casos anuais de infecções por este microrganismo originam um gasto de aproximadamente 500 milhões de dólares por parte do governo para o seu tratamento (TENDOLKAR *et al.*, 2003). Linhagens de enterococos apresentam-se como um dos principais microrganismos associado às infecções nosocomiais (10% em dados do Brasil) atrás apenas das espécies *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (LINDEN & MILLER, 1999; TAVARES, 2000), onde a característica de microrganismo oportunista é verificada, visto o desenvolvimento de infecção hospitalar principalmente em pacientes imunossuprimidos, onde *E. fecalis* apresenta maior prevalência, aproximadamente 80% (MORRISON *et al.*, 1997), e chegando a 90% em dados do Brasil (CEREDA, 2003), seguido por *E. faecium* (SAMUELSSON *et al.*, 2003).

Infecções hospitalares por enterococos podem ocorrer através de inoculação direta (em cateteres intravenosos ou urinários contaminados ou pela contaminação do trato gastrointestinal) ou através de contato indireto entre pacientes (através de contaminação de aparelhagem hospitalar ou ainda de funcionários do hospital) (NOSKIN *et al.*, 1995; HAYDEN, 2000). Linhagens carregando determinantes de resistência são capazes de permanecer no trato gastrintestinal por meses ou até anos auxiliados pela pressão exercida

devido ao uso de antimicrobianos de amplo espectro utilizados nestes locais. Enterococos podem crescer e sobreviver por longos períodos em condições adversas (um exemplo disso é a sua característica de persistir por até 60 minutos nas mãos) e são intrinsecamente resistentes aos poderes inibitórios e bactericidas dos antibacterianos comumente utilizados. Além disso, existe também o fato das terapias antibacterianas atuais estarem comprometidas em razão do surgimento e envolvimento dessas bactérias em processos de resistência bacteriana (MIRANDA *et al.*, 2001). A rápida emergência de linhagens resistentes, especialmente em ambiente hospitalar, pode ser atribuído ao fato da exposição a vários antibacterianos utilizados nesses ambientes (KAUFFMAN *et al.*, 2003).

De maneira especial, a presença de enterococos resistentes a vancomicina em hospitais é um assunto tido como de muita preocupação e apreensão por parte de microbiologistas médicos e comissões de controle de infecção de hospitais. A vancomicina é considerada um dos antibióticos de última escolha, utilizada quando maioria dos demais antibióticos falha no tratamento de infecção por bactéria Gram positivas (SCHENTAG, 2004). Enterococos resistentes a vancomicina (VRE) são as principais fontes de infecções em humanos e essas linhagens são carregadores de determinantes transferíveis de resistência a vancomicina (HUYCKE *et al.*, 1998). Existem duas rotas principais de disseminação de resistência a vancomicina: cepas resistentes podem disseminar-se de modo clonal de um hospedeiro para outro, ou os determinantes de resistência podem passar de uma bactéria para outra através de conjugação (SALYERS *et al.*, 1997). A grande preocupação existente ocorre devido à possibilidade de transferência de resistência aos antimicrobianos entre linhagens de enterococos, ou ainda para patógenos mais virulentos, como os estafilococos (MORRISON *et al.*, 1997). Portanto, é de extrema importância o controle contínuo por parte dos hospitais na prevenção do desenvolvimento de cepas de enterococos multi-resistentes.

1.2.5. Tratamento de infecções

O tratamento é dependente de diversos fatores, tais como: susceptibilidade do agente etiológico a substâncias como β -lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos bem como as associações de substâncias destas classes; infecção monomicrobiana (como em trato urinário) ou polimicrobiana (como em abscessos); envolvimento das válvulas cardíacas na infecção (LANDMAN & QUALE, 1997; SHEPARD & GILMORE, 2002).

- Infecções por enterococos suscetíveis:

Ampicilina e penicilina são os fármacos de escolha, podendo ser a única substância para o tratamento de infecções monomicrobianas. Em caso de infecção polimicrobiana, a associação ao β -lactâmico de substância efetiva contra microrganismos Gram negativos e estafilococos, ou simplesmente pela associação de um inibidor de β -lactamase (ampicilina+ácido clavulânico). Em caso de alergia a β -lactâmicos, utilizam-se glicopeptídeos. Utiliza-se frequentemente nitrofurantoína, ativa em infecções do trato genitourinário.

- Endocardite por linhagens suscetíveis:

O processo de endocardite necessita utilização de substância que propicie um efeito bactericida. O tratamento padrão utilizado é a associação de uma substância ativa contra a parede celular e aminoglicosídeo (ampicilina/penicilina+gentamicina). A estreptomicina geralmente é reservada para uso em infecções que apresentam alto nível de resistência à gentamicina. Em pacientes alérgicos à penicilina utiliza-se a associação com vancomicina/teicoplanina com agentes ativos em parede celular.

- Linhagens com alto nível de resistência a aminoglicosídeos:

Em tratamentos de infecções simples esta questão não é relevante visto que não impossibilita o tratamento único com β -lactâmicos, descrito anteriormente. Endocardites com linhagens com alto nível de resistência a estreptomicina e gentamicina são de difícil

tratamento, e procede-se com a administração intravenosa de estreptomicina, porém sem garantia de sucesso.

- Linhagens VRE:

Infecções por este tipo de linhagem são consideradas desafios visto que as opções terapêuticas são mínimas. Os poucos antimicrobianos disponíveis são frequentemente não efetivos ou pouco tolerados. Juntamente com o tratamento com drogas, a eliminação do foco de infecção (retirada de cateter, drenagem de abscesso) é uma ótima medida paliativa.

Drogas como fluoroquinolonas (em infecções de pele) e nitrofurantoina (trato urinário) são utilizadas, porém sem muito sucesso. Endocardites com estas linhagens são de tal dificuldade de tratamento, que a possibilidade de cirurgia para modificação da válvula infectada deve ser considerada. Linezolida, com mecanismo de ação através da inibição da porção ribossomal 30S tem sido bastante utilizada, porém apresenta o fato de ser microrganismo bacteriostático, não bactericida. De uma maneira geral, o surgimento de linhagens resistentes a vancomicina não permite tratamento com a antibioticoterapia convencional.

1.3. IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL

1.3.1. Culturas starter

Enterococos estão associados à produção de diversos tipos de queijos principalmente na Europa, região do Mediterrâneo, em países como Grécia, Itália, Espanha e Portugal, a partir de queijos produzidos de leite proveniente de diversas espécies animais, como bovinos, ovelhas e cabras (BOUTON *et al.*, 1998; GELSOMINO *et al.*, 2001). A taxa de colônias enterococci em queijos (*mediterranean-type*) pode variar entre $10^4 - 10^7$ UFC/g de queijo e seu crescimento é facilitado uma vez que esses microrganismos podem crescer em ambientes

altamente salgados e com baixo pH (FREITAS *et al.*, 1995). A presença destes microrganismos nos produtos finais é frequentemente considerada um resultante da contaminação devido a condições de baixa higiene durante a produção e processamento do leite (como contaminação pelo animal ou fezes humanas), ou ainda fontes de água, aparelhos de coleta do leite ou de estoque deste contaminados (GIRAFFA, 2003). No entanto, vários tipos de queijos podem ser produzidos de acordo com a época de produção, grau de contaminação do leite, sobrevivência do microrganismo no ambiente (dependente da temperatura, por exemplo) e crescimento sob condições particulares de manufatura e maturação do produto. Características como essas foram levadas em consideração para a verificação da atividade benéfica deste microrganismo, e, de acordo com isso, foram verificadas e caracterizadas as atividades proteolíticas e esterolíticas, bem como produção de importantes compostos voláteis promovidas por enterococos durante o desenvolvimento do produto (GIRAFFA, 2004). De fato, essas características levam a um papel positivo do microrganismo em vista a sua atuação sob a modulação de propriedades organolépticas contribuindo para o desenvolvimento de aroma e sabor característico nos produtos, desenvolvimento e qualidade não só de queijo, mas também de outros produtos fermentados (FRANZ & STILES, 2003).

O uso de linhagens de enterococos como culturas starter, colônias adicionadas nos produtos com o devido controle tecnológico e metabólico, tem o intuito de desenvolver diferentes tipos de queijo, visto a sua capacidade de desenvolvimento de odor e aroma característicos e específicos, estando bem difundida e aditada em diversos países (CENTENO *et al.*, 1995; SUZZI *et al.*, 2000). À medida que se utilizam diferentes tipos de culturas starter, fabricam-se queijos com diferentes sabores. As características que levam esses microrganismos a serem utilizados com este propósito é que a presença de enterococos afeta

positivamente o crescimento de bactérias produtoras de ácido lático, aumenta a atividade proteolítica e a presença de grupos amino livres, fornece sabor, aroma, cor e estrutura características (SARANTINOPOULOUS *et al.*, 2002). Enterococos são microrganismos essenciais da microbiota natural de vários produtos derivados de leite e, em alguns casos, aparecem em número maior que lactobacilos e lactococos (CENTENO *et al.*, 1996). A prevalência de enterococos em derivados do leite ocorre pelas condições não higiênicas durante o processo de coleta e processamento, juntamente à sua resistência a temperaturas de pasteurização e a sua habilidade de crescimento em diferentes substratos e condições adversas, e cepas isoladas de produtos provenientes de leite são conhecidas pela sua alta sensibilidade à maioria dos antibióticos em comparação às cepas isoladas de ambiente ou amostras clínicas e têm história de uso saudável (GATTI *et al.*, 1994).

Em **carnes**, enterococos apresentam um alto potencial de contaminação no momento do abate do animal, devido a sua presença no trato gastrointestinal de animais, como porcos, gado, aves, que provêm uma gama de produtos para alimentação. No entanto, enterococos também estão associados a carnes processadas, visto que o processo de aquecimento do produto durante a produção de carnes processadas confere uma vantagem seletiva devido à sua termotolerância. Após sobreviver a etapa de eliminação pelo calor, o microrganismo pode associar-se ao processo de deterioração do produto (MAGNUS *et al.*, 1988). As atividades bioquímicas dos enterococos neste tipo de alimento não estão bem determinadas como sua atividade em alimentos lácteos, porém se acredita que o microrganismo poderia contribuir para as propriedades organolépticas (aroma, sabor) do produto, também utilizando suas propriedades descritas anteriormente. Ainda, existem dados do uso de linhagens starter neste tipo de alimento, também na região européia, em produtos fermentados como salames. No entanto, a característica de produção de bacteriocina por parte deste microrganismo,

principalmente pela atividade de competição com *Listeria monocytogenes* durante o período de fermentação do produto é considerada o principal ponto que encoraja o uso de culturas starter de enterococos nesses produtos (FRANZ & STILES, 2003).

1.3.2. Probióticos

O termo probiótico refere-se a suplementos da dieta que contêm células microbianas vivas, cepas únicas ou de diferentes espécies, freqüentemente de espécies de habitat intestinal, que quando ingeridas afetariam positivamente melhorando ou corrigindo a composição/balanco da microbiota intestinal do hospedeiro (HAVENAAR *et al.*, 1992; BRETT *et al.*, 2002). Estes freqüentemente contêm lactobacilos, apesar de alguns apresentarem linhagens de *E. faecium* (TANNOCK & COOK, 2002). Essas preparações devem conter microrganismos viáveis e em número definido que possuam a característica de através da colonização, modular a microbiota em local que ofereça efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Três mecanismos são atribuídos aos probióticos para explicar seus efeitos protetores, e todos eles são atribuídos a bactérias ácido lácticas: (a) antagonismo de outros microrganismos através da produção de substâncias que inibam ou eliminem os patógenos; (b) competição com patógenos por fontes nutricionais ou locais de adesão; (c) modulação da resposta imune do hospedeiro (PERDIGON *et al.*, 1988; BERNET *et al.*, 1994).

FRANZ *et al.*, (1999) revisaram o uso de linhagens de enterococos como probióticos para utilização em humanos ou animais, onde a linhagem de *E. faecium* SF68 é talvez a mais estudada em termos de atividade probiótica. Linhagens de *E. faecium* e *E. faecalis* utilizadas como em suplementos probióticos são aplicadas em produtos lácteos como leites e iogurtes, além do uso em fórmulas de uso infantil e preparações farmacêuticas de uso humano ou veterinário. O consumo de probióticos exerce um alto número de efeitos benéficos, incluindo

melhoramento da resposta imune, balanço da microbiota, efeitos adjuvantes em vacinas, tratamento de diarreias, infecções de TGI (colite), prevenção de úlceras relacionadas a *Helicobacter pylori*, redução de colesterol sérico, antagonismo a patógenos associados à contaminação de alimentos, microrganismos envolvidos em cáries dentárias, candidíase de trato urinário, além de outras atividades ainda em estudo ou pouco determinadas (BELLOMO *et al.*, 1980; HOLZAPFEL *et al.*, 1998; FOLQUIÉ-MORENO *et al.*, 2006). Na União Européia, dez preparações contendo nove diferentes linhagens de *E. faecium* foram autorizadas para uso com estas finalidades desde o ano de 2004.

Para ser considerado o uso de determinada linhagem como probiótico, uma série de necessidades deve ser suprida pelo microrganismo, como a capacidade de adesão às células, de excluir ou reduzir a aderência de patógenos, de persistir e se multiplicar no local, de produzir substâncias antagonistas ao crescimento de patógenos e, principalmente, ser uma linhagem confiável em termos de não apresentar características invasivas, carcinogênicas ou patogênicas. Entretanto, o uso de linhagens de enterococos para este fim é controverso, uma vez que os benefícios proporcionados por algumas linhagens bem estabelecidas se confrontam com os dados de aumento crescente de cepas de enterococos resistentes aos antibacterianos e com a sua constante associação a patologias. O temor de que genes de resistência ou determinantes de fatores de patogenicidade sejam transferidos a outras bactérias no TGI, especialmente aquelas utilizadas nestes suplementos, corroboram este fato (FRANZ & STILES, 2003).

1.3.3. Bacteriocinas

Bacteriocinas produzidas por bactérias ácidas lácticas pertencem a um grupo amplo de peptídeos microbianos naturalmente produzidos pelo microrganismo que variam em

relação a seus espectros de ação, estrutura, massa molecular, termoestabilidade e determinantes genéticos (ENNAHAR *et al.*, 1998). Estas substâncias têm como alvo principal de ação a membrana plasmática do microrganismo alvo e, através da formação de poros na membrana, modificam o potencial transmembrana e o gradiente de pH do microrganismo, o que resulta no escape de biomoléculas essenciais a sobrevivência deste (CLEVELAND *et al.*, 2001). Dessa forma, linhagens de enterococos produtoras de bacteriocinas podem vir a conferir proteção às contaminações por determinados microrganismos. Uma variedade de bacteriocinas pode ser produzida pelos enterococos. A bacteriocina AS-48, por exemplo, possui grande espectro de ação, incluindo *L. monocytogenes*, bactéria que está freqüentemente associada à contaminação de produtos alimentícios relacionada com o desenvolvimento de infecção alimentar (GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Também existe a presença de cepas de enterococos em iguarias como alguns salames, onde existe igual interesse do uso de *starter cultures* devido à produção de bacteriocinas anti-listeria (CINTAS *et al.*, 2000).

1.4. CONTAMINAÇÃO A PARTIR DE ALIMENTOS

1.4.1. Linhagens presentes em alimentos

1.4.1.1. Linhagens de uso na indústria

Atualmente, uma grande quantidade cepas é utilizada como culturas starter ou probióticos, aumentando dessa maneira o número de bactérias consumidas. Cepas de enterococos para esse uso devem ser caracterizadas como livre de todos os fatores de virulência, bem como sensíveis a antibacterianos de relevância clínica, visando uma diferenciação entre o potencial de virulência de cepas de alimentos e cepas clínicas, com o

intuito do uso consciente de determinadas cepas como probióticos ou *starter cultures*. Segundo EATON & GASSON (2001), a presença de fatores de virulência é verificada tanto em amostras clínicas como de alimentos e colônias utilizadas como *starter cultures*, embora a prevalência seja muito maior em isolados clínicos.

O consumo desses produtos proporciona uma grande população de bactérias que, através dos diferenciados mecanismos de transferência genética, poderiam adquirir determinantes de virulência e resistência a partir de outras linhagens (GIRAFFA *et al.*, 1997). Além do fato de a capacidade de transferência de informações genéticas pelo processo de conjugação (tanto de determinantes de resistência a antimicrobianos quanto de fatores de virulência) ser uma característica importante, esta se torna ainda mais relevante visto que esse processo pode ocorrer em nível de trato gastrointestinal em humanos (DUNNY *et al.*, 1995; SIMJEE *et al.*, 2002; HUMMEL *et al.*, 2007).

1.4.1.2 Alimentos contaminados

Além da utilização destes microrganismos em alimentos visando a sua utilização devido às suas características particulares, uma série de dados já verificados aponta para a presença deste tipo de microrganismo nas mais diferenciadas fontes alimentícias no mundo todo, visto a sua capacidade de desenvolvimento sob os ambientes diferenciados. Estudos atuais relacionados à resistência desses microrganismos aos antibacterianos sugerem que, apesar de algumas cepas apresentarem resistência a um ou mais antibióticos, apresentam sensibilidade aos de maior relevância clínica (como ampicilina, penicilina, estreptomicina e vancomicina). No entanto, um número cada vez maior de trabalhos descreve cepas resistentes, com especial atenção a vancomicina, o que coloca em dúvida essa afirmação (LECLERC *et al.*, 1996; BAUMGARTNER *et al.*, 2001; FRANZ *et al.*, 2001).

Uma vez que se entre em contato com essas linhagens pela ingestão, principalmente, estas podem naturalmente ser transmitidas de alimentos para animais ou para o trato gastrointestinal de humanos. Estudos através de RAPD e PFGE apresentaram uma presença de três clones com as mesmas características genotípicas (sendo 1 *E. fecalis* e 2 *E. casseliflavus*) em cepas isoladas de fezes de humanos e alimentos (leite e queijo) de uma fazenda produtora de laticínios. Além disso, também foram encontradas cepas nos tanques de estocagem e em equipamentos de ordenha, concluindo-se que a presença de bactérias em tipos de queijo e em leite ocorreu devido à contaminação dos equipamentos e, em humanos, pelo consumo desses produtos (GELSOMINO *et al.*, 2001). Em estudo realizado por GELSOMINO *et al.* (2002), realizou-se uma investigação em sujeitos que comeram queijos que continham enterococos para comparar o impacto do consumo desse queijo sobre a microbiota de enterococos das fezes. A pesquisa observou a microbiota deste microrganismo em leite (não pasteurizado) e queijo produzidos na fazenda em comparação à microbiota em fezes dos humanos e bovinos da mesma fazenda. Como resultado, queijo e fezes humanas continham duas cepas idênticas, a qual foi explicada pelo consumo de queijo e leite pelos humanos. Durante o consumo dos queijos, os sujeitos apresentaram uma mudança drástica na sua microbiota fecal. A partir disso, existe uma comprovação sobre o efeito do alimento como carreador de cepas de enterococos, possivelmente resistentes a algum antimicrobiano, ao organismo humano. Os resultados provam que um clone presente, no queijo, mesmo em pouca quantidade, foi capaz de se estabelecer no intestino do humano. Além disso, sabe-se que enterococos fazem parte da microbiota natural do trato gastrointestinal de animais, como aves e gado, o que possibilita a hipótese de uma possível transmissão de linhagens resistentes através do contato de humanos com uma eventual carne contaminada por esse microrganismo (JENSEN *et al.*, 1999; STOBBERINGH *et al.*, 1999; DONABEDIAN *et al.*, 2003).

Da mesma forma descrita anteriormente, linhagens deste tipo também poderiam realizar trocas de informações genéticas importantes para a patogenicidade do gênero (HUYCKE *et al.*, 1992; BERCHIERI *et al.*, 1999). Enterococos resistentes a glicopeptídeos contendo o gene transmissível *vanA* estão disseminados entre animais de abate bem como alimentos de origem animal. Já se verificou uma transmissão de linhagens resistentes a vancomicina partir de alimentos de fontes animais aos humanos, através do gene *vanA* presente no transposon *Tn1546*, no TGI de mamíferos. Isso indica que a resistência a vancomicina pode se disseminar no TGI humano a partir de cepa passageira para linhagens da microbiota intestinal normal humana. Isto é de extrema relevância, uma vez que a análise de produtos de varejo provenientes de galinhas apresentaram uma taxa de contaminação por VRE contendo o gene *vanA* de 70 % (VAN DEN BRAAK *et al.*, 1998). Além disso, determinantes de resistência a outras classes de antimicrobianos também já foram identificadas em amostras de alimentos. Resistência a altas concentrações de aminoglicosídeos foi observada no mundo todo em animais utilizados para abate, alimentos de origem animal e no ambiente, onde se identificaram cepas de enterococos apresentando alto nível de resistência a gentamicina (HLGR) possuindo os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (galinhas, suínos, frangos, perus, leite, armazéns e fazendas) e *aph(2'')-Id* (em alimentos de armazéns e derivados de animais em fazendas) (STERN *et al.*, 1994; AARESTRUP *et al.*, 2000).

Para minimizar o risco de transferência dessas resistências a drogas e assegurar alimentos saudáveis para a população, um programa rigoroso de acompanhamento para bactérias patogênicas é necessário, visando detectar a presença dessas bactérias em produtos de origem animal (carnes e derivados) bem como nas fazendas (locais) onde estes são produzidos.

1.4.2. Promotores do crescimento

A utilização de antibióticos como promotores do crescimento em fazendas de animais é um problema atual. Antibacterianos são adicionados à ração ou alimentação dos animais, com o intuito de aumentar sua taxa de crescimento e desempenho. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é certo. A hipótese seria que uma redução da microbiota intestinal normal ocorra devido a competição por nutrientes com bactérias prejudiciais ao intestino (a qual pode reduzir a performance do animal por causar doença subclínica). A concentração utilizada nessas ocasiões é referida como subterapêutica, porém a concentração resultante no TGI do animal é suficiente para inibir a bactéria suscetível e afetar a composição da microbiota intestinal normal de bactérias.

Diversos estudos apresentaram dados que remetem a uma ligação entre o uso do estimulante do crescimento avoparcina (glicopeptídeo) em fazendas produtoras de galinhas e suínos e o crescimento na ocorrência de cepas de enterococos VRE em humanos, bem como uma comprovação da evidência de transmissão aos humanos a partir de animais (WEGENER *et al.*, 1999). Na Europa, o uso de antimicrobianos em rações animais para promoção de crescimento era excessiva, e o uso da avoparcina, principalmente em criação de galinhas, está associado ao crescimento da resistência a glicopeptídeos em geral (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 1997). Em países onde a avoparcina foi utilizada como promotor de crescimento, apresentou-se o isolamento de VRE a partir desses animais, enquanto que países que não utilizaram essa substância não apresentaram esse isolamento. Isso é consistente com a ideia de que o uso de promotores de crescimento criou um reservatório de VRE em animais que posteriormente serão utilizados como alimento. A seleção de linhagens resistentes através do uso de agentes antimicrobianos em animais ocorre visto que, uma vez que enterococos são comensais no trato gastrointestinal, estes são expostos à seleção pela presença de

antimicrobianos toda vez que eles são utilizados, seja terapeuticamente ou com intuito de promover o crescimento dos animais. Nos Estados Unidos, a gentamicina é comumente utilizada em criação de suínos, frangos e perus para a prevenção de doenças e de morte prematura. Animais criados com o intuito de abate e produção de alimentos são importante reservatório para enterococos resistentes à gentamicina e fonte dessas bactérias aos humanos. Os genes de resistência à gentamicina, quando presentes nas bactérias do animal de origem, também se apresentam presentes nos alimentos provenientes desses animais. Da mesma forma, quando esses genes estavam ausentes nos animais, não foram encontrados genes de resistência nos alimentos. Os enterococos resistentes a gentamicina são transmitidos aos humanos através de alimentos provenientes de animais contaminados (DONABEDIAN *et al.*, 2003).

Em 1995, o uso da avoparcina como promotor de crescimento foi banido na Dinamarca devido à verificação de dados que demonstraram a seleção de linhagens VRE e o potencial risco de disseminação desta resistência pela cadeia alimentar aos humanos. A mesma atitude foi tomada em 1997 por todos os países da União Européia, que também sugeriu o banimento da utilização do promotor de crescimento bacitracina em 1999. Essas iniciativas foram tomadas seguindo recomendações de protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS) para contenção da resistência a antimicrobianos em animais utilizados na indústria alimentícia (WHO, 2001; WHO, 2002).

Agentes antimicrobianos não deveriam ser utilizados para a promoção de crescimento quando estes são usados na terapêutica em humanos ou se exista o conhecimento que apresentam processo de seleção de resistência cruzada a antibacterianos utilizados na terapêutica humana. Geralmente, não existem diferenças entre as classes de antimicrobianos utilizados como produtores de crescimento em animais e àqueles utilizados para tratamento de

infecções em humanos. Virtualmente, todas as classes de antimicrobianos estão hoje em dia aprovadas para uso na agroindústria, incluindo-se entre eles aqueles proibidos para uso em humanos (AARESTRUP *et al.*, 2002).

1.5. *ENTEROCOCCUS SPP.* NO BRASIL

No Brasil, diversos estudos têm apresentado isolamentos de linhagens resistentes em ambientes hospitalares, apresentando casos importantes de níveis elevados de resistência à aminoglicosídeos, glicopeptídeos e β -lactâmicos em todas as regiões do país (TAVARES, 2000). A detecção dessas linhagens, principalmente com relação à resistência a vancomicina, apresenta-se como dado decisivo para uma possível disseminação desses microrganismos como causadores de infecções nosocomiais no Brasil. (CEREDA *et al.*, 2001), com dados que comprovam a ocorrência de disseminação de linhagens resistentes a aminoglicosídeos dentro dos hospitais e, ainda mais importante, entre diferentes hospitais (CORDEIRO *et al.*, 2004). Apesar de relatos nos Estados Unidos e Europa no início dos anos 90, linhagens resistentes a vancomicina foram somente detectadas em países sul-americanos, recentemente.

No País, detectou-se primeiramente uma linhagem VRE em um hospital de Curitiba, no ano de 1996 e, desde então, surgiram diversos relatos de isolamentos desse tipo de microrganismo em todo o território nacional (CEREDA *et al.*, 2003). No Estado do Rio Grande do Sul, dados recentemente publicados obtidos com isolados de importante complexo hospitalar do Estado, situado em Porto Alegre, apresentaram um número de aproximadamente 40% de linhagens com alto grau de resistência a aminoglicosídeos. Dados de análise de PFGE apresentaram um clone predominante, que compreendia linhagens de diferentes espécimes clínicas obtidas em três hospitais e indicaram uma

disseminação entre hospitais e dentro do hospital de um grupo clonal predominante de *E. faecalis* (d'Azevedo *et al.*, 2006). Apesar deste estudo não ter trabalhado com nenhum isolado VRE, este tipo de microrganismo já foi descrito no Estado (d'Azevedo *et al.*, 2000).

Por outro lado, projetos focados no estudo da prevalência, variabilidade e resistência deste microrganismo isolado de fontes ambientais e, de maior importância, isolados de alimentos de uso comum pela população, ainda apresentam-se em pouco número no Brasil. Em estudo realizado por STERN *et al.*, no ano de 1994 no Rio de Janeiro, diferentes espécies de enterococci isolados de fontes humanas, animais e meio ambiente foram estudados, e não se identificaram amostras de *E. faecalis* resistentes à ampicilina, mas observaram-se 22,7% de resistência a este antibiótico no *E. faecium*, todos sensíveis à vancomicina. Dos diversos antibacterianos promotores de crescimento utilizados, a avoparcina é a que desperta maior interesse de estudo. O pequeno número de estudos deste tipo no país é algo a ser questionado, visto a importância deste microrganismo, a alta taxa de estudos deste tipo em outros países e, principalmente, a característica do Brasil de país produtor e exportador de diversos produtos alimentícios.

Na maioria dos países europeus, a avoparcina foi utilizada em locais de criação de aves e porcos e particularmente linhagens VRE derivadas de carne de porco foram capazes de colonizar indivíduos não hospitalizados. No Brasil, este antimicrobiano foi utilizado com o intuito de promoção do crescimento em aves pelo período de 10 anos, e poucos estudos enfocados na certificação de linhagens de enterococci foram realizados tanto antes como após o banimento deste antimicrobiano no país, em 1998. LEME *et al.* (2000) não verificaram nenhum isolamento de cepa VRE de um total de 100 isolados de enterococci de uma fazenda do Estado de São Paulo que utilizava este tipo de promotor de

crescimento. Em contraste a estes dados, foram identificadas cepas VRE em amostras de carne de aves exportadas para o Japão (OZAWA *et al.*, 2002). Não existem dados quanto à utilização de linhagens de *Enterococcus spp.* como culturas starter no país, e a sua atuação como probiótico é observada somente em preparações de uso veterinário no Brasil.

Em suma, a relação quanto à colonização de linhagens de enterococci resistentes por parte dos consumidores ainda não foi observada. A questão de como ocorreu uma disseminação hospitalar destes isolados resistentes a antimicrobianos no país ainda deve ser investigado. Considerando a ocorrência, a importância deste microrganismo e a falta de informações, principalmente na Região Sul do Brasil, estudos com amostras de alimentos podem elucidar a questão da atuação como possíveis reservatórios de linhagens resistentes ou transmissores de resistência a antimicrobianos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho apresenta como objetivo principal estudar a incidência do microrganismo *Enterococcus spp.* em alimentos como carnes, frutas e verduras adquiridos em pontos comerciais de Porto Alegre e a verificação dos perfis fenotípicos e genotípicos das linhagens isoladas.

Uma série de objetivos específicos foram traçados:

- Isolar o microrganismo a partir de fontes alimentícias;
- Identificar o microrganismo através de procedimentos bioquímicos clássicos;
- Caracterizar o perfil de resistência das linhagens de *Enterococcus spp.* frente a antimicrobianos de uso comum na clínica e pecuária;
- Realizar análises fenotípicas e genotípicas (RAPD-PCR) para caracterização molecular e;
- Avaliar o perfil genotípico destes microrganismos, verificando a sua diversidade genotípica.

3. MÉTODOS E RESULTADOS

A seção de materiais e métodos e a seção de resultados serão apresentadas a seguir na forma dois manuscritos.

O primeiro manuscrito, submetido à publicação no periódico *Journal of Food Protection* e intitulado “**Preliminary studies of incidence and antimicrobial susceptibility analysis of enterococci isolated from different foods in Southern Brazil**”, apresenta os procedimentos de isolamento, identificação fenotípica e o padrão de distribuição, bem como o perfil de resistência a antimicrobianos das linhagens de *Enterococcus spp.* obtidas a partir de alimentos de uso comum pela população.

O segundo trabalho, em processo de submissão e intitulado “**Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from foods in Southern Brazil**”, enfoca o estudo da diversidade genética de tais linhagens, bem como uma comparação entre as metodologias fenotípica e genotípica.

3.1. MANUSCRITO I

Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus spp.* isolated from different foods in Porto Alegre, Brazil.

Gustavo Pelicioli Riboldi¹, Ana Paula Guedes Frazzon², Pedro Alves d'Azevedo³, Jeverson Frazzon^{1,4*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

² Departamento de Microbiologia, UFRGS;

³ Departamento de Microbiologia, FFFCMPA;

⁴ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS.

* Correspondence and reprints:

jeverson.frazzon@ufrgs.br

phone: +5551 – 33086072

Abstract

Enterococcus spp are commensal microorganisms, which colonize the gastrointestinal tract in humans. These microorganisms are natural probiotic compounds in foods, playing a beneficial role during the maturation of some cheeses and sausages. However, enterococci are related with nosocomial infections, and these dualistic characteristics have turned a subject of constant debate worldwide. The aim of the present study was to determine the species distribution and the antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from several foods in Porto Alegre, RS, Brazil. Strains isolated from vegetables, meat and dairy products were submitted to morphological, biochemical and molecular identification using PCR technique, and positive strains were submitted to species determination. The antimicrobial susceptibility tests for the fifty-six isolates were performed using twelve clinical and agricultural antimicrobials. Our data suggest a special attention to the strains isolated for all the three groups of food in analysis due specially the presence of resistant enterococci to high level and a wide range of clinical antimicrobials that include gentamycin, streptomycin, ampicillin and vancomycin.

Keywords: *Enterococcus spp*, antibiotic resistant enterococci (ARE), vancomycin resistant enterococci (VRE).

1. Introduction

Enterococcus spp are Gram-positive bacteria able of growing and surviving under harsh conditions. They are ubiquitous in nature and can be found in soil, waters, raw plant and animal products, where their intrinsic ruggedness allows them to persist and spread in the environment (11, 12). Enterococci are also found as a component of the natural microbial flora of foods, developing important roles in ripening and flavor enhancement in cheese and sausage. It has been applied as probiotics as well, to improve the microbial balance of the intestine and to treat gastroenteritis in humans and animals. Despite the fact that *Enterococcus* genus present beneficial effects in foods, they are not considered “generally recognized as safe” (GRAS), due to its use as an indicator of fecal contamination, and the frequently association with food-borne illnesses by production of biogenic amines (5, 15).

An important characteristic in *Enterococcus spp.* would be the resistance to a wide range of antimicrobial agents, showed in clinical, food and water isolates (3, 6, 7). In addition, these bacteria are able to acquire resistance determinants through gene transference by plasmids and transposons. Researchers showed natural transformation assays using pure DNA into soil and various types of food and feed, and this DNA was not immediately degraded, but could persist for hours to days this under such environmental circumstances (21). These conditions, associated with the use of antimicrobials in animal feed as growth promoters, have created large reservoirs of transferable antibiotic resistance in various ecosystems. Consequently, a possible relation between enterococcal nosocomial infections with antimicrobial resistant *Enterococcus spp* and its transmission via food chain, or vice-versa, could be suggested (20). In this way, the aim of the present study was to determine the species distribution and the antibiotic resistance patterns of enterococci

isolated from *in natura* food and dairy products in Porto Alegre, Brazil.

2. Materials and methods

Isolation of enterococci. The enterococcal strains were isolated from *in natura* food as cassava, beetroot, potato, sweet potato, parsley, cabbage, raw meat and dairy products, such as milk, soft cheese and colonial type cheese. Food samples were purchased from different popular markets in Porto Alegre, Brazil. The first isolation step consisted of inoculation of 25 g of food in sterile buffered peptone water (225 ml) and incubation at 37°C for 16 h. From this, 125 µl was plated in brain heart infusion (BHI) agar, supplemented with azide 0,02% and NaCl (w/v) 6,5% and incubated at 37°C for 72 h. Phenotypic criteria (such as size/volume, shape, color, haemolytic profile) were used for strains isolation and colony picking of presumable streptococcal/enterococcal strains. Sequential phenotypical tests (described below) divided possible the enterococci group and the non-enterococcal strains. A rate of 10 colonies was picked per food sample; each food sample from each group was screened three times; each screening time used three different unities (generating three plates) of each food supply. For example, the cabbage isolation were realized with three samples of cabbage provided by the market A, and each sample generate 1 plate. This proceeding was realized other two times, with markets B and C as providers. Foods were purchased always in different days, alternating the provider market. Overall, thirty six food samples were analyzed. Afterwards, colonies with typical enterococci morphology were identified at genus level by the following methods: Gram staining, catalase production, esculin hydrolysis tests in combination with resistance to bile salts, production of pyrrolidonylarylamidase (PYR test) and growth at 10°C and 45°C. The selected strains were stored in BHI containing 50% glycerol at -20°C.

Genus-specific determination by PCR method. Strains phenotypically determined as *Enterococcus* genus were submitted to PCR reaction using genus specific primer pair, with targets and amplify the 112 bp fragment coded by the *tuf* gene (ribosomal tRNA elongation factor, involved in peptide chain formation and constitutive gene of the bacterial genome). Primers sequences were described as the following: *sense* (5'-TACTGACAAACCATTCATGATG-3') and *anti-sense* (5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3') (13). Genomic DNA was extracted by boiling method, as described by Hagen *et al.* (8). All PCR amplification were performed in final volume of 25 μ L containing: 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μ M of each primer, 1.0 U of *Taq* polymerase, 25 ng template DNA. A Thermal Cycler (MJ Research, Inc. PTC-100) was utilized to PCR reaction. The cycling parameters used were: 3 min at 95°C and then 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C, and 1 min at 72°C, and a 5 min final extension at 72°C. PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 1.5 % agarose stained with ethidium bromide (0,5 μ g mL⁻¹), observed in UV transillumination and photographed using Kodak Digital Science™ DC120. Negative controls include all reagents except DNA and a *E. faecalis*, reference strain were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), catalog number 51299, was used as positive control.

Species identification. Isolated strains were submitted for species identification by phenotypical trial tests: presence of arginine and pyruvate dehydrogenases; acid production from 1% L-arabinose, raffinose, mannitol, α -methyl-D-glucopyranoside (MGP), sorbitol and L-sorbose; motility and yellow pigmentation characteristics (according to protocol described by Facklam & Collins, 1989)(4). The *E. faecalis* (ATCC 51299) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) were used as control strains.

Antimicrobial susceptibility tests. Antimicrobial susceptibility was determined using the disk diffusion, according to the recommendations of NCCLS (17). Twelve antibiotics commonly used in the treatment of clinical infection and agricultural procedures were tested (concentration are expressed in $\mu\text{g ml}^{-1}$): ampicillin-10 (AMP), vancomycin-30 (VAN), erythromycin-15 (ERI), tetracycline-30 (TET), ciprofloxacin-5 (CIP), norfloxacin-10 (NOR), nitrofurantoin-300 (NIT), cloranphenicol- 30 (CLO), gentamycin-120 (GEN), streptomycin-300 (ET), quinupristin-dalfopristin-15 (QD), bacitracin - 0,04UI (BC) and lincomycin-15 (MY). The appropriate antibiotic dosage was purchased from Oxoid (Hampshire, United Kingdom), bioMérieux (Marcy-l'Etoile, France) and Difco (Detroit, USA). Inhibition zone diameters were measured and strains were classified according to the criteria from NCCLS (for AMP, VAN, ERI, TET, CIP, NOR, NIT, CLO, GEN, ET, QD) and Hart *et al.* (9) and Moyaert *et al.* (16) (for BAC and MY).

3. Results

A total of 150 Gram-positive, catalase negative cocci were isolated from vegetables, raw meat and dairy products during March to July, 2004. Among these isolates, 82 strains were determined as *Enterococcus* spp. by phenotypical methods based on their ability to grow and produce blackening on BEA, and to grow at 45 °C and in the presence of 6.5% NaCl, after 48 h of incubation and submitted to molecular analysis based on DNA amplification of *tuf* gene. Fifty-six isolates was confirmed as genus by PCR amplification. Twenty-six isolates produced negative reactions to at least one of these tests and therefore were considered to represent non enterococci strains (Figure 1).

Species characterizations was performed and the isolates were classified as *E. faecalis* (27 strains), *E. faecium* (23 strains), *Enterococcus* spp (6 strains) (Figure 2). In the vegetables group *E. faecium* was the most abundant species detected, mainly in

beetroot and potato (100 %) and parsley (80%) whereas *E. faecalis* was largely observed in cabbage (65%). Only cassava and sweet potato did not present any *Enterococcus spp.* isolate.

Antibiotic susceptibility tests of *Enterococcus spp* isolated are shown in Table 1. Almost all enterococcus strains present resistance to at least one antibiotic tested, with the exception for milk isolates, where all were susceptible. The resistance phenotype found with high frequency in *Enterococcus* isolated from food was to bacitracin (34 isolates) and lincomycin (12 isolates), both antimicrobials commonly used in agriculture (Table 1). Resistance to nitrofurantoin, an antibiotic used for the treatment of genitourinary tract infections was observed in isolates from soft cheese and cabbage. However, none of the *Enterococcus spp* isolated strains was resistant to norfloxacin, substance used in urinary infection treatments as well. In the vegetable group, enterococcus isolated from cabbage showed the resistance phenotype several of antimicrobials used in human clinical such as tetracycline, ciprofloxacin, nitrofurantoin, and quinupristin/dalfopristin. Elevated amount of high-level of aminoglycosides resistance (HLAR) was observed in both *E. faecalis* and *E faecium* strains isolated from all food analyzed.

4. Discussion

Data here presented aimed in isolation and antimicrobial susceptibility determinations have presented several important situations. Interestingly, in raw meat and colonial type cheese *E. faecalis* was the major finding species, and this could be explained because this two kinds o food are too much manipulated, and probably the presence of this bacterial is due the simplicity of contamination of this product during the manufactory process. The industrial soft presented equal numbers of *E. faecalis*, *E. faecium* and

Enterococcus spp. Enterococci constitute a group of bacteria associated with the mammalian gastrointestinal tract and, once present in the environment, they are able to colonize diverse niches due to their exceptional ability to resist and grow in hostile environments. This microorganism is widespread in food and its presence in dairy products has been considered an indication of insufficient sanitary conditions during the production and processing of milk; however, certain strains are highly desirable in the maturation of some cheeses considering their positive contribution to the final product through the development of organoleptic characteristic.

On the other hand, the presence of resistant bacterial in vegetable group, could be explained by some hypotheses. First of all, it has been shown that the contaminated irrigation water used to wet the plants could result in the spread of resistance to bacterial specimens in the soil (1, 18). Secondly, depending on the cultivation practice used for plant growth, the organic debris from chicken feces contaminated with enterococcal resistant strains could contaminate the product (10, 19).

Three strains of *E. faecalis* isolated from cheese and meat showed ampicillin-resistant (AMPR) pattern, a clinical relevant antibiotic. In colonial type cheese, the presence of *E. faecalis* vancomycin-resistant (VRE) strain was detected (Table 2), and this could be, perhaps, considered the most relevant resistance phenotype observed in this study, once vancomycin is the last antibiotic alternative utilized on the treatment of nosocomial infections. Also, other important point in that some isolates show multi-resistance phenotype. One reason that could explain the emergence of antibiotic resistant enterococci in food samples would be the massive use of antibiotic in agriculture (e.g., avoparcin as animal growth promoters). Some studies have shown that the same resistance

gene was found in bacteria isolated from food and from human patients (2, 3). Experimental investigations showed that resistance plasmid pAM β 1 have been transferred among *E.faecalis*, *E. faecium*, and *Lactobacillus reuteri* in the digestive tracts of mice, and this plasmid have also been transferred between *Lactobacillus curvatus* strains in fermenting sausages (14). These observations support the hypothesis that enterococci carried on food could either colonize humans and/or exchange antibiotic resistance genes with commensal bacteria. The association of these events and the emergence of enterococci antibiotic resistance have become a theme of debate and constant worrying on scientist society, once there seems to be a correlation between antibiotic resistant enterococci isolated from human infection in hospitals and strains isolated from food (6).

Emergence of antimicrobial resistant enterococci and its spreading on food signify a situation of risk for community, and a possible correlation between strains present in hospitals with those isolated from food must be considered. Here, we described the first report of antibiotic resistant enterococci isolated from foods in Porto Alegre, Brazil. The focus of our next studies will be aimed at elucidating a possible route of enterococci transmission, verifying possible similarities between strains isolated from human infections (inside hospitals) and food samples (acquired from public market and hospitals) by phenotypic and genetic characterization.

Acknowledgements

J.F. (CNPq, 301131/2003-1) is research awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil and G.P.R. is a Master Degree fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

5. References

1. da Silva, M.F.; Tiago, I.; Veríssimo, A.; Boaventura, R.A.R.; Nunes, O.C.; Manaia, M.M. (2005). Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an Urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 322–329.
2. Donabedian, S.M.; Thal, L.A.; Hershberger, E.; Perri, M.B.; Chow, J.W.; Bartlett, P.; Jones, R.; Joyce, K.; Rossiter, S.; Gay, K.; Johnson, J.; Mackinson, C.; Debess, E.; Madden, J.; Angulo, F.; Zervos M.J. (2003). Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1109-1113.
3. Eaton, T.J.; 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.
4. Facklan, R.R.; Collins M.D. (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27, 731-734.
5. Franz, C.M.; Stiles, M.E.; Schleifer, K.H.; Holzappel W.H. (2003). Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105-122.
6. Giraffa, G.; Carminati, D.; Neviani E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Protec.* 60, 732-738.
7. Gold, H.S.; Moellering Jr., R.C. (1996). Antimicrobial-drug resistance. *N. Engl. J. Med.* 335, 1445-1453.
8. Hagen, R.M.; Gauthier, Y.P.; Sprague, L.D.; Vidal, D.R.; Zysk, G.; Finke, E.J.;

- Neubauer, H. (2002). Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. *Mol. Pathol.* 55, 398-400.
9. Hart, S.W.; Heuzenroeder, M.W.; Barton, M.D. (2004). Antimicrobial resistance in *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* and *Enterococcus*, associated with pigs in Australia. *J.Vet. Med.* 51, 216-221.
 10. Harwrod, V.J.; Brownell, M.; Perusek, W.; Whitlock, J. (2001). Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10), 4930-4933.
 11. Johnston, L.M.; Jaykus, L. (2004). Antimicrobial resistance to *Enterococcus* species isolated from produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3133-3137.
 12. Kayser, F.H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 255-262.
 13. Ke, D.; Picard, F.J.; Martineau, F.; Ménard, C.; Roy, P.H.; Ouellelette, M.; Bergeron, M.G. (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3497-3503.
 14. Marcinek, H.; Wirth, R; Muscholl-Silberhorn, A.; Gauer, M. (1998). *Enterococcus faecalis* Gene Transfer under Natural Conditions in Municipal Sewage Water Treatment Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2), 626-632.
 15. Moreno, M.R.F.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E; De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1-24.
 16. Moyaert, H.; De Graef, E.M.; Haesebrouck, F.; Decostere, A. (2006). Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. *Res.Vet. Science.* 81, 1-7.
 17. National Committee on Clinical Laboratory Standards. (2002). Performance

Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 12th Informational Supplement.
National Committee on Clinical Laboratory Standards. Wayne, P.A.

18. Nwosu, V.C. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res. Microbiol.* 152(5), 421-430.
19. Poeta, P.; Antunes, T.; Rodrigues, J. (2005). Vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated from feces of poultry, pigeons, deers and rats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(3), 412-414.
20. Shepard, B.D.; Gilmore, M.S. (2002). Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 4, 215-224.
21. Thomas, C.M.; Nielsen, K.M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(9), 711-21.

Table 1: Antibiotic resistant profile of the isolated strains.

Antimicrobial agent	<i>E. faecalis</i> (n=27)			<i>E. faecium</i> (n=23)			<i>E. mundtii</i> (n=1)			<i>Enterococcus spp.</i> (n=5)		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
Ampicillin (a)	88,9	0	11,1	23	0	0	100	0	0	5	0	0
Vancomycin (a)	88,9	7,4	3,7	23	0	0	1	0	0	5	0	0
Erythromycin (a)	77,8	11,1	11,1	52,2	34,8	13	0	1	0	0	60	40
Tetracycline (a)	66,67	0	33,33	82,6	8,7	8,7	100	0	0	5	0	0
Ciprofloxacin (a)	63	29,6	7,4	78,3	21,7	0	0	1	0	40	40	20
Norfloxacin (a)	85,2	14,8	0	87	13	0	1	0	0	80	20	0
Nitrofurantoin (a)	100	0	0	87	0	13	1	0	0	80	0	20
Chloramphenicol (a)	88,9	3,7	7,4	70	30	0	0	1	0	40	20	40
Quinupristin/Dalfopristin (a)	- ²	- ²	- ²	91,3	0	8,7	1	0	0	60	40	0
Gentamicin (a) ¹	77,8	0	22,2	87	0	13	1	0	0	5	0	0
Estreptomycin (a) ¹	77,8	3,7	18,5	87	3,7	9,3	1	0	0	5	0	0
Bacitracin (b)	0	40,7	59,3	0	39	61	0	0	1	0	20	80
Lincomycin (b)	48,1	0	51,9	91,3	0	8,7	1	0	0	5	0	0

Breakpoints: (a) NCCLS (14) ; (b) Hart *et al.* (8) ; Moyaert *et al.* (13).

¹ High level resistance.

² Not tested due to the intrinsic resistance of the species against the substance.

Table 2: Antibiotic resistance phenotypes recovered from food sources

Antibiotic resistance phenotype ^a	Enterococcal isolates	
	species (samples)	Food source
AMP-ERI-TET-CLO-QD-ET-BC-MY	<i>E. faecalis</i> (1)	Soft cheese
TET-CIP-QD-GN-ET-BC-MY	<i>E. faecalis</i> (1)	Cabbage
AMP-TET-QD-GN-ET-BC-MY	<i>E. faecalis</i> (1)	Cabbage
ERI-TET-QD-GN-ET-BC-MY	<i>E. faecalis</i> (2) <i>E. faecium</i> (1)	Soft cheese
TET-QD-GN-BC-MY	<i>E. faecalis</i> (2)	Cabbage
NIT-QD-GN-BC-MY	<i>E. faecium</i> (1)	Cabbage
ERI-TET-GN-ET-MY	<i>E. faecium</i> (1)	Soft cheese
ERI-CLO-BC	<i>Enterococcus spp.</i> (2)	Soft cheese
CIP-NIT-BC	<i>Enterococcus spp.</i> (1)	Soft cheese
TET-BC-MY	<i>E. faecalis</i> (2)	Colonial type
NIT-BC	<i>E. faecium</i> (1)	Soft cheese
CLO-BC	<i>E. faecalis</i> (1)	Soft cheese
CIP-BC	<i>E. faecalis</i> (1)	Colonial type
NIT	<i>E. faecium</i> (1)	Cabbage
AMP	<i>E. faecalis</i> (1)	Meat
VAN	<i>E. faecalis</i> (1)	Soft cheese
BC	<i>E. faecium</i> (2) <i>E. faecium</i> (4) <i>E. faecium</i> (2) <i>E. faecalis</i> (1) <i>E. mundtii</i> (1) <i>E. faecalis</i> (5) <i>E. faecium</i> (1)	Beetroot Potato Parsley Soft cheese Colonial type
	<i>Lactococcus spp.</i> (6)	

^aAntibiotics: AMP, ampicillin; BC, bacitracin; CIP, ciprofloxacin; CLO, cloranphenicol; ERI, erythromycin; ET, streptomycin; GN, gentamycin, MY, lincomycin, NIT, nitrofurantoin; QD, quinupristin/dalfopristin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin.

Figure 1:

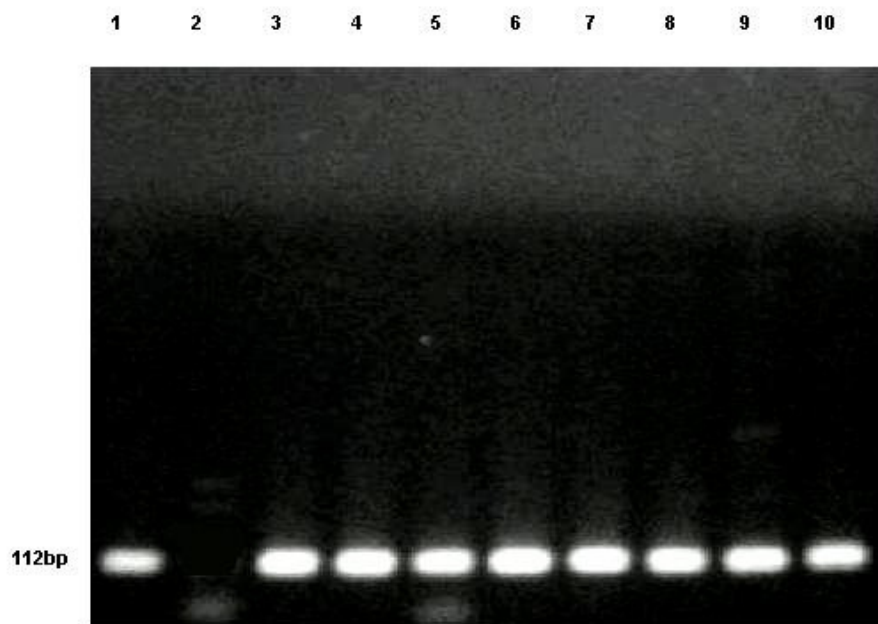


Fig. 1: *Enterococcus spp.* genus specific PCR reaction using *tuf* primer, generating an 112pb product. (1) *E. faecalis* ATCC (51299); (2) *Staphylococcus aureus* ATCC (25923); (3) - (10) food *Enterococcus spp.* isolates.

Figure 2:

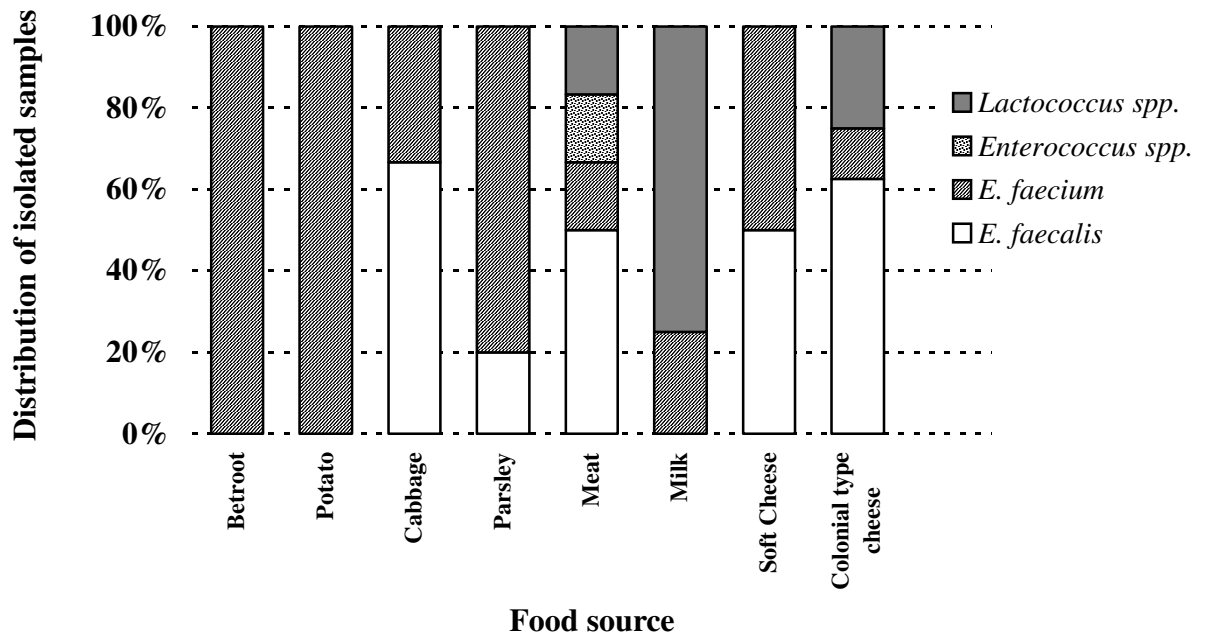


Fig .2: Percentage distribution of enterococci species isolated from several sources of food according to its source of isolation.

3.2. MANUSCRITO II

Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from foods in Southern Brazil

Gustavo Pelicioli Riboldi¹, Eduardo Preusser de Matos, Ana Paula Guedes Frazzon², Pedro Alves d'Azevedo³, Jeverson Frazzon^{1,4*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

² Departamento de Microbiologia, UFRGS;

³ Departamento de Microbiologia, FFFCMPA;

⁴ Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, UFRGS.

* Correspondence and reprints:

jeverson.frazzon@ufrgs.br

phone: +5551 – 33086072

Abstract

The genus *Enterococcus*, or enterococci, is an important group of lactic acid bacteria (LAB), which have a predominant habitat in the gastrointestinal tract of humans and animals. In addition, enterococci occur in large numbers in foods, where it can play a beneficial role during the maturation process. However, these organisms have recently assumed major importance in clinical microbiology, and these dualistic characteristics have turned a subject of constant debate worldwide. The aim of this study was to investigate and determine the genetic diversity of 66 previously isolated enterococci from several food sources. Data analysis of phenotypical evaluation observed differences related to substrate hydrolysis. In total, 13 different carbohydrate fermentation profiles were observed and the enterococci biochemical profile 6 (EBP6), related to the *E. faecalis*, presented the higher prevalence. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) was used to study the genetic variability. The diversity of RAPD products and its reproducibility was of great extent, giving between three to eight strong and well-separated DNA fragments. After numerical analyses of the RAPD-PCR profiles obtained with M13 primer, 42 different patterns were obtained. Six different RAPD-PCR profiles were recorded for the enterococcal isolates. According to the previous phenotypical tests to species determination, only one cluster associated all strains from the same species. The results of the present study suggest that there is some genotypic variability within strains of enterococci deriving from several food sources in Southern Brazil.

Keywords: *Enterococcus spp*, PCR-RAPD fingerprinting, food source, genetic variability.

1. Introduction

Enterococcus spp are Gram-positive bacteria, facultative anaerobic cocci that occur singly, in pairs or in chains growing optimally at a temperature of 35°C. These bacteria are able to support an environment of 6,5% NaCl of salinity, at a pH 9.6, and have the characteristic of hydrolyzing esculin in the presence of 40% bile salts. The ability of growing and surviving under harsh conditions enable the occurrence of enterococci in a remarkable array of environmental sources such as soil, surface waters, raw plant and animal products, where their intrinsic ruggedness allows them to persist and spread in the environment. Enterococci develop important roles in ripening and flavor enhancement in several foods, such as cheese and sausage. It has been applied as probiotics to improve the microbial balance of the intestine and to treat gastroenteritis in humans and animals (22, 25).

Enterococcus spp are commensal microorganisms that colonize the gastrointestinal and vaginal tract and, occasionally the oral cavity in humans, and can be isolated in a number of 10^5 - 10^8 CFU/g faeces (14). *Enterococcus spp* are known as the major microorganism associated to the development of nosocomial infections, which include infections of the urinary tract, wounds, bloodstream and endocardium (24, 28). A clinically important characteristic in *Enterococcus spp*. would be the resistance to a wide range of antimicrobial agents, since their emergence in nosocomial infections has paralleled the emergence of resistant strains to most of the clinically important antimicrobial drugs (20). These conditions, associated with the use of antimicrobials in animal feed as growth promoters, have created large reservoirs of transferable antibiotic resistance in various ecosystems. Consequently, a possible relation between nosocomial infections present in hospitals transmitted via food chain, or vice-versa, could be suggested (11, 33).

The identification of enterococci present in food products to the species level and its variability is of great importance for the food industry. Accurate species identification and strain typing could be used to estimate the microbial diversity present in populations. Such classifications are also important to evaluate the genetic diversity among enterococci populations in order to select nonpathogenic bacteria for further use in food technology and probiotics (13, 15, 17, 19). Species identification in routine and clinical laboratories use mainly phenotypic methods. Classical biochemical and physiological tests frequently fail to separate biotypes of phenotypically related species, and this is especially true for the genus *Enterococcus* spp. (2, 9, 35). Nevertheless, these methods are often unreliable and can take several days (5).

DNA-based methods allow discrimination of the isolates at the species or strain level. The randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR genetic typing technique has been widely used to characterize clinical and dairy isolates of enterococci (6, 8). RAPD analysis is rapid and inexpensive technique, easy to perform and can be used for determination of genetic heterogeneity based on DNA sequence (3, 4, 37, 38). In spite of the fact that pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is a widely used technique, which allows differentiation of strains with a high discriminatory power (10), studies comparing the less expensive technique RAPD and PFGE have concluded that both generate highly congruent results (23, 36). Thus, the aim of the present study was to analyze and to determine the heterogeneity of enterococci present in several food sources isolated from South Brazil.

2. Materials and methods

Bacterial isolation and species identification. The enterococcal strains were isolated between 2005 and 2006 (Table 2). The isolation consisted of previously described processes, which included incubations in peptone water and brain heart infusion (BHI) media, followed by phenotypical methods for identification of the *Enterococcus* spp using azide 0,02%; NaCl (w/v) 6,5%; Gram staining; catalase production; esculin hydrolysis tests in combination with resistance to bile salts; PYR test; growth at 10°C and 45°C. The selected strains were conserved in BHI containing 50% glycerol at -20°C. Isolated strains were submitted for species identification by trial tests: presence of arginine and pyruvate dehydrolases; acid production from 1% L-arabinose, raffinose, mannitol, α -methyl-D-glucopyranoside (MGP), sorbitol and L-sorbose; motility and yellow pigmentation characteristics (31).

RAPD-PCR. Genomic DNA was extracted from the strains by the boiling method (21). One single isolated bacterial colony was suspended in 1 mL of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 and 1 mM EDTA pH 8,0) and boiled for 10 minutes. The samples were then centrifuged and the aliquot was used into the PCR mix reaction. The RAPD-PCR was performed in a total volume of 25 μ L. The RAPD reaction consisted of 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.2 μ M primer of M13 primer (34) and 1.0 μ l DNA. The reaction mixture with no DNA template was included as a negative control. Amplifications were carried out in a thermalcycler MJ Research PTC 100 (MJ Research's Inc, USA). The reaction was submitted to the following amplification conditions: first step at 94 °C for 5 min, and 35 cycles at 94°C for 1 min, 40°C for 30s, and 72°C for 1 min. and final

elongation of 72⁰C for 5 min. Amplification products were separated by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels stained with ethidium bromide (0,5 µg/mL). The stained gels were then visualized in UV light and photographed using a Kodak EDAS 120 (Kodak, Connecticut, USA). All amplifications were repeated three times for each strain in separate experiments.

Determination of DNA molecular weight and statistical analysis. DNA fragments were analyzed in software Gel Analyzer-Pro 3.2. Dendrograms were constructed based on phenotype characterization and using the Statistic Package of the Social Science (SPSS) software 8th edition. Calculating the simple association coefficient and cluster analysis using the Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) clustering algorithm assessed similarity between samples. The presence or absence of DNA fragments coded as one or zero, respectively, was used in this work.

3. Results

Phenotypical profiles. The data analysis of phenotypical evaluation observed differences related to substrate hydrolysis, where arginine was only substrate hydrolyzed for all strain. In total, 13 different carbohydrate fermentation profiles were observed (Table 1), and the enterococci biochemical profile 6 (EBP6) presented the higher prevalence. This profile is related to the *E. faecalis* species, according to Facklan and Collins (12). Other phenotypical characteristics, such as motility and pigmentation presence were screened, though only few isolates presented pigmentation and the motility characteristic was not verified. According to these data, strains were classified to a species level (Table 2), where one specific profile was determined as lactococcal isolates (EBP3).

RAPD analysis. To study intraspecies diversity of enterococci isolated from several

sources of food, all strains were subjected to RAPD-PCR analysis. The diversity of RAPD products generated by primer M13 and its reproducibility was of great extent, giving between three to eight strong and well-separated bands (Fig. 1a). Most of the isolates shared two intense bands of 650 and 750 base pairs (bp). RAPD-PCR profiles allowed to determine a minimum repeatability of 85% for the experiments. Hence, it was deduced that only clusters with values of the correlation coefficient expressed as a percentage value below 85% were considered different. After numerical analysis of the RAPD-PCR profiles obtained with M13 primer, 42 different patterns (Fig1b) and six different RAPD profiles were recorded for the enterococcal isolates (Table 2)

According to previous phenotypical tests for species determination, only cluster that associated all strains from the same species was Cluster V (ERCV), which presented 100% of *E. faecium* isolated from potatoes. Among other clusters, Cluster I (ERCI) was the major RAPD group and presented the most variability group with several subgroups. In this cluster were grouped *E. faecium*, *E. faecalis* and *Lactococcus spp.* from several food sources as dairy food, meat and vegetables, presenting the highest variability. Cluster II (ERCII) shown almost all cabbage isolates (group I) and two other isolates provided from soft cheese, with the predominance of *E. faecalis* and the presence of two *E. faecium* samples. The Cluster III (ERCIII) presented isolates from several food sources either, which comprised *E. faecium*, *E. faecalis* and *Lactococcus spp.* strains. In the Cluster IV (ERCIV) were grouped some strains that presented unusual pattern in phenotypical tests and therefore were not able to be differentiated at species level; in this cluster was included only one single strain assigned to *Lactococcus spp.* The Cluster VI (ERCVI) presented just one isolate that was not related to soft cheese and was associated to cabbage. As reported in a previous study by Andrighetto et al. (2001) (1), ours assignation in this work were not

consistent concerning species when phenotypic classification and RAPD-PCR were compared.

4. Discussion

In the present work, RAPD-PCR analyses have been applied in order to assess the genetic diversity of sixty-six strains isolated from several food sources phenotypically characterized at the species level. Both phenotypic and genotypic analyses were used for comparison and identification of the isolates. Preliminary data have shown the pattern of distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from a broad field of essential human food supplies, such as dairy food, meat and vegetables. To confirm the enterococci isolates a molecular characterization using genus-specific amplification of the *tuf* gene region was performed (26). However, the PCR reaction was unable to separate *Lactococcus spp.* of *Enterococcus spp.* since they are lactic acid bacteria (LAB) and have a related genus. In this way, we used both isolates to investigate the genotypic variability.

Traditional classification procedures have been routinely applied to enterococci and rely on the ability of microorganisms to utilize different carbohydrates. However, these are labour-intensive methods, time consuming and there is great variability in the fermentation patterns with questionable results (7, 29). A large percentage of the strains isolated are misclassified by the classical phenotypic procedure. In our study, strains of lactococci and enterococci isolated by traditional method were grouped in the same RAPD clusters with just one exception (M12).

On the other hand, some clusters, such as cluster V (ERC V), presented only one species type. The term LAB is not limited to a strictly defined taxonomic group of microorganisms but it comprises a wide range of phylogenetically related genera of Gram-positive bacteria with several biochemicals and ecological features in common. The

metabolic conduct of the isolates, inoculated in several media indicated the species determination. However, this characterization includes a number of groups with different hydrolysis patterns, where more than one group could contain the same species, differing in a determined hydrolysis profile. For example, the best way to separate the enterococcal species is into five groups on the basis of acid formation in mannitol and sorbose broths and hydrolysis of arginine. In this case, the sample could be identified as *E. faecalis* either hydrolysing arginine (Group 2) or not (Group 5). Species that can be clustered in different groups are *E. faecalis* (Groups 2, 3 and 5), *E. faecium* (Groups 2 and 3), *E. casseliflavus* (Groups 2 and 5) and *E. gallinarium* (Groups 2 and 5). At this point, strains of different species clustered in the same biochemical group that could be genotypically related remain to be determined. Data presented here reveal numerous strains with the same EBP clustering in different ERC, different EBP clustering in the same ERC and the same EBP clustering in the same ERC (Table 2).

In many cases, therefore, assigning a name to a LAB isolate can be a difficult task. In response, more robust genetic methods based upon molecular biology have been developed for the identification and subtyping of bacteria, providing tools for the typing of bacteria involved in food processes (18). RAPD-PCR is one of the most popular typing techniques applied to food ecosystems and several studies have reported success in using RAPD-PCR for differentiation of LAB strains (27, 30). Although variability of RAPD fingerprints has been observed, reproducibility could be achieved under carefully controlled conditions. In general, however, more than one genotypical method is usually needed to obtain both identification and typing of unknown isolates. Otherwise, Rossetti *et al.* (32) published interesting data, where LAB identification and subtyping approach based on M13 primer RAPD-PCR fingerprint was proposed. The study identified and typed LAB

isolated from dairy food by species-specific PCR and RAPD-PCR, and the RAPD-PCR profiles allowed the implementation of a large database of different fingerprints. Though, the main advantage of this study relies on the fact that, with the high percent of correct identifications reached by M13 primer RAPD-PCR presented, it should offer any further identification unnecessary, especially when the identification scores are in the range 40–80% or higher. Consequently, since a high reproducibility of the RAPD-PCR experiments is reached, the method is extremely easy to perform, providing excellent data.

Here, enterococcal isolates studied showed wide phenotypic and genetic variability and a predominant profile in Cluster I (ERC I), which grouped approximately 45% of the isolates with representatives of all food sources analyzed including all milk and meat isolates and mostly of colonial type cheese and beetroot. *Enterococcus* RAPD cluster II (ERCII) showed 83% of cabbage isolates and two isolates belongs of set J that include soft cheese. Although, there was not species definition in this cluster, both *E. faecalis* and *E. faecium* grouped corresponded to EBP6 and EBP2, respectively (Table 2 and 3), shared common biochemical characteristics, which turns them representatives of the Group 2 of Facklan and Collins determination. The third cluster (ERCIII) presents all isolates from parsley and the set K of soft cheese, and some representatives of colonial type cheese, instead of strains isolated from variable sources. Cluster IV (ERCIV) is represented a single strain, *Lactococcus spp.*, showing a few similarities with enterococcal strains. All strains isolated from potato were clustered together in cluster V (ERCV), in turn of 90% of similarity. Finally, the last cluster VI (ERCVI) grouped all strains from set E of soft cheese and only one exception of cabbage isolate. This cluster contains isolates, which were not able to be determined through phenotypical method, and are denoted here as *Enterococcus spp.* In addition, this cluster presents an unusual enterococci species, *E. mundtii*.

Numerous researchers have reported RAPD-PCR as a reliable technique to verify the microbiological composition and distinguish starter and non-starter species in food or monitoring changes in the LAB community (7, 16). Until today, there is not much study using RAPD aimed in analyzing the genetic diversity and the variability of enterococci as food contaminant strains, which have been found in several food supplies worldwide. Here, we presented primary data of contaminant strains isolated from food, which made possible the analysis of enterococcal strains variety that could be consumed by general population in Southern Brazil. Furthermore, this enterococcal genotype using M13 primer RAPD-PCR fingerprinting results can be grateful use in future studies aimed in genetic comparison with enterococci obtained from other niches, such as hospital strains.

Acknowledgements

J.F. (CNPq, 306397/2006-4) is research awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil and G.P.R. is a Master Degree fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

5. References

1. Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vascanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Swings, J., Dellaglio, F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 68: 303–316.
2. Bascom, S. and Manafi, M. 1998. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 318– 340.
3. Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G. and Braun, M.J. 1993. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods. Enzymol.* 224: 294-309.
4. Caetano-Anolles, G. 1991. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods. Appl.* 3: 85-94.
5. Cheng, S., McCleskey, F.K., Gress, M.J., Petroziello, J.M., Liu, R., Namdari, H., Beninga, K. and Salmen, A. 1997. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1248–1250.
6. Cocconcelli, P.S., Porro, D., Galandini, S. and Senini, L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Let. Appl. Microbiol.* 21: 376–379.
7. Delgado, S. and Mayo, B. 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus spp.* strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 309– 319.
8. Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P. and Goossens, H. 1997. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 555–561.

9. Devriese, L.A., Pot, B., Vandamme, P., Kersters, K. and Haesebrouck, F. 1995. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 26:187-197.
10. Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus spp.* 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol* 88: 165-188.
11. 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.
12. Facklan, R.R. and Collins, M.D. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27: 731-734.
13. Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H. and Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1 –24.
14. Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. and Holzappel, W.H. 2003. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105-122.
15. Garg, S.K. and Mital, B.K. 1991. Enterococci in milk and milk products. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 15– 45.
16. Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J. and Cogan, T.M. 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 177–188.
17. Giraffa, G., Carminati, D. and Neviani, E., 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Protec.* 60: 732-738.

18. Giraffa, G., Olivari, A.M. and Neviani, E. 2000. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiol.* 39: 2354–2355.
19. Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215– 222.
20. Gold, H.S. and Moellering R.C. 1996. Antimicrobial-drug resistance. *N. Engl. J. Med.* 335: 1445-1453.
21. Hagen, R.M., Gauthier, Y.P., Sprague, L.D., Vidal, D.R., Zysk, G., Finke, E.J. and Neubauer, H. 2002. Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. *Mol. Pathol.* 55: 398-400.
22. Johnston, L.M. and Jaykus, L. 2004. Antimicrobial resistance to *Enterococcus* species isolated from produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3133-3137.
23. Jureen, R., Harthug, S., Sornes, S., Digranes, A., Willems, R.J.L. and Langeland, N. 2004. Comparative analysis of amplified fragment length polymorphism and pulsed field gel electrophoresis in a hospital outbreak and subsequent endemicity of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40: 33-39.
24. Kauffman, C.A. 2003. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 23-30.
25. Kayser, F.H. 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 255-262.
26. Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Ménard, C., Roy, P.H., Ouelleette, M., and M.G. Bergeron. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3497-3503.

27. Klein, G., Pack, A. and Reuter, G. 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1825–1830.
28. Martone, W.J. 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States? *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 19: 539-545.
29. Mundt, J.O. 1986. Lactic acid streptococci, p. 1064-1071. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
30. Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 109–120.
31. Riboldi, G., Frazzon, A.P.G., d'Azevedo, P.A., Frazzon, J. 2007. Preliminary studies of incidence and antimicrobial susceptibility analysis of enterococci isolated from different foods in Southern Brazil. Submitted to *J. Food Protec.*
32. Rossetti, L. and Giraffa, G. 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J. Microbiol. Methods.* 63: 135-144.
33. Shepard, B.D. and Gilmore, M.S. 2002. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 4: 215-224.
34. Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C. and Lanorte, M.T. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J. Appl. Microbiol.* 89: 267-274.

35. Teixeira, L.M., Merquior, V.L.C., Vianni, M.C.E., Carvalho, M.G.S., Fracalanza, S.E.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. and Facklam, R.R. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus lactis* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garviae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 664–668.
36. van den Braak, N., Power, E., Anthony, R., Endtz, H.P., Verbrugh, H.A. and van Belkum, A. 2000. Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of *SmaI* DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 192: 45-52.
37. Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic. Acids. Res.* 18: 7213-7218.
38. Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acids Res.* 18: 6531-6535.

Table 1: Enterococci biochemical profiles (EBP) according to phenotypical methodology.

Substrates	EBP1	EBP2	EBP3	EBP4	EBP5	EBP6	EBP7	EBP8	EBP9	EBP10	EBP11	EBP12	EBP13
L-arabinose (ARA)	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Mannitol (MAN)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Raffinose (RAF)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
α -methyl-D-glucopyranoside (MGP)	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Sorbitol (SBL)	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L-sorbose (SOR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine (ARG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigment (PIG)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Motility (MOT)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of Isolates	08	12	10	02	03	22	01	01	01	01	03	01	01

(+) positive result for the substrate tested; (-) negative result for the substrate tested.

Table 2: Food source, phenotypical and genotypical profiles of lactic acid bacteria isolated between 2005 and 2006.

Food source	Phenotype determination	Sample	Biochemical profile	RAPD cluster	
Betroot	<i>E. faecium</i>	A6 ^a	EBP1	ERC I	
	<i>E. faecium</i>	A7 ^a	EBP2	ERC I	
Milk	<i>E. faecium</i>	D6 ^a	EBP2	ERC I	
	<i>Lactococcus</i>	D7 ^b	EBP3	ERC I	
	<i>Lactococcus</i>	D8 ^b	EBP3	ERC I	
	<i>Lactococcus</i>	D9 ^b	EBP3	ERC I	
Parsley	<i>E. faecium</i>	H1 ^a	EBP2	ERC III	
	<i>E. faecium</i>	H2 ^a	EBP2	ERC III	
	<i>E. faecium</i>	H3 ^a	EBP1	ERC III	
	<i>E. faecalis</i>	H5 ^a	EBP6	ERC III	
	<i>E. faecium</i>	H6 ^a	EBP2	ERC III	
Cabbage	<i>E. faecium</i>	I1 ^a	EBP10	ERC VI	
	<i>E. faecalis</i>	I8a ^a	EBP6	ERC II	
	<i>E. faecalis</i>	I8b ^a	EBP6	ERC II	
	<i>E. faecium</i>	I9 ^a	EBP2	ERC II	
	<i>E. faecalis</i>	I10a ^a	EBP6	ERC II	
	<i>E. faecalis</i>	I10b ^a	EBP6	ERC II	
	<i>E. faecalis</i>	G1 ^a	EBP6	ERC I	
Meat	<i>Lactococcus</i>	G2 ^b	EBP3	ERC I	
	<i>Enterococcus spp</i>	G3 ^a	EBP9	ERC I	
	<i>E. faecalis</i>	G4 ^a	EBP6	ERC I	
	<i>E. faecium</i>	G5 ^a	EBP2	ERC I	
	<i>E. faecalis</i>	G6 ^a	EBP6	ERC I	
	Potato	<i>E. faecium</i>	B1 ^a	EBP2	ERC V
		<i>E. faecium</i>	B2 ^a	EBP1	ERC V
<i>E. faecium</i>		B3 ^a	EBP1	ERC V	
<i>E. faecium</i>		B4 ^a	EBP1	ERC V	
<i>E. faecium</i>		B5 ^a	EBP1	ERC V	
<i>E. faecium</i>		B6 ^a	EBP1	ERC V	
Soft cheese		<i>E. faecium</i>	E1 ^a	EBP4	ERC VI
	<i>Enterococcus spp</i>	E2 ^a	EBP5	ERC VI	
	<i>Enterococcus spp</i>	E3 ^a	EBP5	ERC VI	
	<i>E. faecalis</i>	E4 ^a	EBP6	ERC VI	
	<i>Enterococcus spp</i>	E5 ^a	EBP7	ERC VI	
	<i>E. faecium</i>	E6 ^a	EBP4	ERC VI	
	<i>Enterococcus spp</i>	E7 ^a	EBP5	ERC VI	
	<i>E. mundtii</i>	E8 ^a	EBP8	ERC VI	
	<i>E. faecalis</i>	E9 ^a	EBP6	ERC VI	
	<i>E. faecium</i>	J5a ^a	EBP2	ERC II	
	<i>E. faecalis</i>	J5b ^a	EBP6	ERC II	
	<i>E. faecalis</i>	K2 ^a	EBP6	ERC III	
	<i>E. faecium</i>	K3 ^a	EBP2	ERC III	
Colonial type cheese	<i>E. faecalis</i>	L2 ^a	EBP6	ERC I	
	<i>E. faecalis</i>	L3a ^a	EBP11	ERC I	

<i>E. faecalis</i>	L3b ^a	EBP6	ERC III
<i>E. faecalis</i>	L4 ^a	EBP12	ERC I
<i>E. faecium</i>	L5 ^a	EBP2	ERC I
<i>E. faecalis</i>	L6 ^a	EBP6	ERC I
<i>Lactococcus spp.</i>	L7 ^b	EBP3	ERC III
<i>Lactococcus spp.</i>	L8 ^b	EBP3	ERC I
<i>E. faecalis</i>	L9 ^a	EBP6	ERC I
<i>E. faecalis</i>	L10 ^a	EBP6	ERC I
<i>E. faecium</i>	L11 ^a	EBP2	ERC I
<i>E. faecalis</i>	L12 ^a	EBP6	ERC III
<i>E. faecalis</i>	M1 ^a	EBP6	ERC I
<i>E. faecalis</i>	M2a ^a	EBP6	ERC I
<i>E. faecalis</i>	M2b ^a	EBP11	ERC III
<i>E. faecalis</i>	M3 ^a	EBP6	ERC I
<i>E. faecalis</i>	M4 ^a	EBP11	ERC I
<i>E. faecium</i>	M5 ^a	EBP1	ERC I
<i>E. faecalis</i>	M7 ^a	EBP6	ERC III
<i>Lactococcus spp.</i>	M8 ^b	EBP3	ERC I
<i>Lactococcus spp.</i>	M9 ^b	EBP3	ERC I
<i>E. faecalis</i>	M10 ^a	EBP13	ERC I
<i>Lactococcus spp.</i>	M11 ^b	EBP3	ERC I
<i>Lactococcus spp.</i>	M12 ^b	EBP3	ERC IV

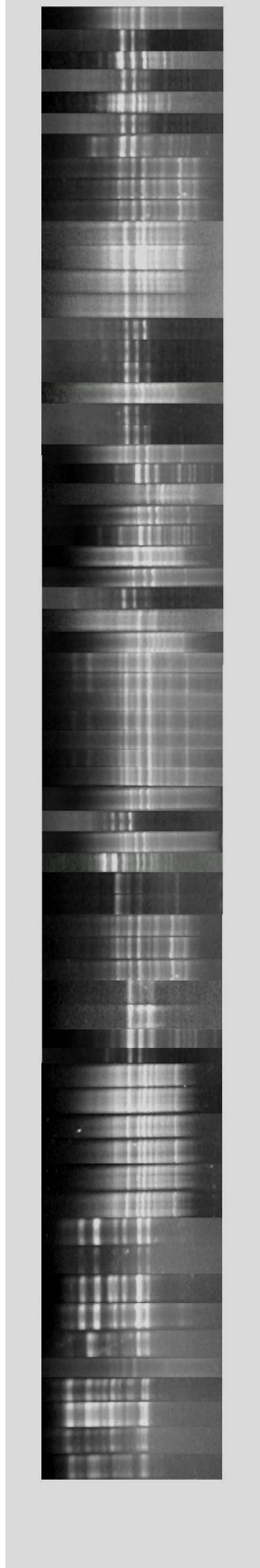
(EBP) enterococci biochemical profile determined by pheotypical methods; (ERC) enterococci RAPD cluster; ^(a) (31); ^(b) this work.

Fig. 1: Genotypical analysis of LAB isolated from food source.

(A) RAPD profiles of isolates integrated in each of the six clusters;

(B) Dendrogram expressing the RAPD-based similarity between isolates calculated through a Dice coefficient correlation represented using an average linkage method, with the six enterococci RAPD cluster (ERC) distinguished.

(A)



4. DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO A PARTIR DE ALIMENTOS

Enterococos são microrganismos comensais do trato gastrointestinal de mamíferos e, uma vez presentes no meio ambiente, são capazes de colonizar diversos nichos devido à sua excepcional capacidade de resistir e proliferar em ambientes hostis. Este microrganismo está disseminado em alimentos, podendo ser um simples contaminante e servir, então, como indicativo de baixas condições sanitárias durante a produção e processamento do produto. Por outro lado, linhagens de enterococos têm sido adicionadas aos alimentos com o intuito de produzir alimentos diferenciados devido ao desenvolvimento de propriedades organolépticas nos mesmos (GIRAFFA, 2003). A associação dessas duas características, bem como o número emergente de isolamentos de linhagens de *Enterococcus spp.* resistentes a diversos antimicrobianos a partir de alimentos tem se mostrado bastante relevante. Além disso, dados que apontam uma possível correlação entre isolados de alimentos e linhagens provenientes e causadores de infecções em ambientes hospitalares corrobora este fato (GIRAFFA *et al.*, 1997). Devido à severidade das infecções causadas por enterococos, existem diversos planos para controlar a disseminação deste microrganismo nos ambientes hospitalares. Por outro lado, em alimentos, a prevalência deste microrganismo é muito pouco estudada, gerando uma ausência de dados científicos.

Neste estudo, provas fenotípicas e genotípicas nos possibilitaram obter o isolamento de 56 linhagens representantes do gênero *Enterococcus spp.* a partir de alimentos de diversas fontes, como vegetais, animais e produtos lácteos (manuscrito 1). Através da caracterização bioquímica, 27 isolados foram identificados como *E. faecalis*, 23

como *E. faecium*, 1 *E. mundtii* foi isolado e 5 outros isolados (*Enterococcus spp.*) não puderam ser caracterizados, visto a sua variabilidade bioquímica. Além disso, 10 outras linhagens caracterizadas previamente como pertencentes do gênero *Enterococcus spp.*, foram posteriormente agrupadas como *Lactococcus spp.*, através do perfil bioquímico.

Das amostras de alimentos vegetais utilizadas neste estudo, todas apresentaram um alto número de isolados caracterizados fenotipicamente como *E. faecium*. Somente amostras de aipim e batata doce não apresentaram isolado algum de *Enterococcus spp.* No grupo de isolados de carne, a principal espécie encontrada foi *E. faecalis*. Já com relação aos alimentos lácteos, os queijos industriais apresentaram números aproximadamente iguais de *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus spp.* Queijos do tipo colonial apresentaram altos valores de *E. faecalis*, provavelmente devido à alta taxa e facilidade de contaminação do produto final durante a produção.

4.2. PADRÃO DE RESISTÊNCIA FRENTE A ANTIMICROBIANOS

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos realizados apresentaram dados preocupantes, visto que todas as linhagens isoladas foram resistentes a, no mínimo, um antibacteriano testado. A maior parte da resistência foi verificada às substâncias bacitracina e lincomicina, antimicrobianos freqüentemente utilizados na agricultura. Cerca de 65% dos isolados apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano, e 10% das linhagens apresentaram um padrão de 5 ou mais resistências aos antibióticos testados, especialmente em produtos como queijos industriais e, interessantemente, o repolho, com uma predominância, dentre as resistentes, de linhagens *E. faecalis*.

Substâncias como a nitrofurantóina, muito utilizada para o tratamento de infecções causadas por *Enterococcus spp.* no trato genitourinário, não teve efeito bactericida sobre

diversas linhagens tanto de *E. faecalis* como *E. faecium* isoladas. Verificaram-se também padrões de resistência a diversos outros antimicrobianos de uso clínico, como tetraciclina, ciprofloxacina, nitrofurantoina, e quinupristin/dalfopristin. Além disso, uma grande quantidade de linhagens isoladas apresentando altos níveis de resistência a aminoglicosídeos (HLAR), bem como fenótipo resistente à ampicilina (AMPR) e, um isolado apresentou perfil de resistência à vancomicina (VRE). Tais padrões de resistência em amostras provenientes de alimentos são dados importantes e de extrema relevância, visto que estes microrganismos, uma vez ingeridos, possuem a capacidade tanto de permanecerem no trato gastrointestinal (WEGENER *et al.*, 1999; DONABEDIAN *et al.*, 2002), como de trocar informações genéticas com outros representantes do gênero (HUMMEL *et al.*, 2007), podendo desta forma colonizar o consumidor e, por conseguinte, disseminar o perfil resistente. Particularmente, o fato de linhagens provenientes de alimentos isoladas neste trabalho terem apresentado fenótipo resistente aos principais antimicrobianos utilizados na terapêutica, como os padrões HLAR, AMPR e VRE, devem ser considerados preocupantes pela comunidade científica. A presença de tais padrões é determinante de que estudos posteriores devem ser realizados e uma maior preocupação quanto à utilização de antimicrobianos no tratamento de infecções deve ser observada. Dados na literatura mostraram que o mesmo gene de resistência em microrganismos estava presente, tanto em isolados de alimentos como de microrganismos causadores de infecções em humanos. A hipótese de que linhagens de enterococos carregadas em alimentos possam colonizar os consumidores e trocar informações genéticas deve ser considerada. (EATON & GASSON, 2001; DONABEDIAN *et al.*, 2003).

4.3. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS

As análises visando verificar o perfil genotípico das amostras de enterococos isolados de alimentos foram realizadas utilizando a técnica de RAPD-PCR. O objetivo desta análise foi verificar a diversidade genética dos isolados, bem como compará-los com resultados previamente obtidos de determinação fenotípica, devido ao contínuo questionamento de métodos utilizados para a classificação bioquímica (GIRAFFA & NEVIANI, 2000; DELGADO & MAYO, 2004; PSONI *et al.*, 2006). A técnica de RAPD-PCR tem sido bastante utilizada na verificação da variabilidade genética e controle de linhagens utilizadas como culturas iniciadores de *Enterococcus spp.*, principalmente em produtos fermentados. No entanto, não se observam dados na literatura relacionados à utilização desta técnica no estudo de linhagens de enterococos presentes como contaminantes em alimentos de uso geral da população. Neste trabalho, as reações de PCR foram realizadas utilizando-se o oligonucleotídeo universal M13. Este tem sido bastante utilizado neste tipo de ensaio por conferir um bom número de padrões de bandas e, uma alta reprodutibilidade, características essenciais para uma adequada diferenciação dos perfis genotípicos observados no RAPD (ROSSETTI *et al.*, 2005).

Os dados obtidos permitiram conferir a existência de uma variabilidade genética entre os isolados de enterococos presentes como contaminantes em alimentos. Tais perfis genéticos nos possibilitaram verificar uma inespecificidade com relação à fonte de isolamento, observando-se linhagens com perfis genotípicos parecidos em fontes de alimentos de origem diferenciados, embora algumas exceções, como em batatas, tenham sido observadas. Diversos estudos focados na avaliação de enterococos presentes como contaminantes em diferenciadas fontes alimentícias foram descritos nos últimos anos e diversos países (FRANZ *et al.*, 2003; JOHNSTON & JAYKUS, 2004; FOLQUIÉ-

MORENO *et al.*, 2006). No Brasil, no entanto, um número muito baixo de pesquisas é focado no que diz respeito ao isolamento de enterococos, nos mais variados alimentos e, a sua caracterização quanto à sua diversidade genotípica e fenotípica. A diversidade genotípica apresentada pelos isolados, o isolamento de linhagens de enterococos nos alimentos observados, bem como a resistência apresentada por estes microrganismos frente a antimicrobianos importantes de uso clínico são dados que devem ser relevados. Para minimizar o risco de contaminação dos produtos e assegurar alimentos saudáveis para a população, um programa rigoroso de acompanhamento para estas e diversas outras bactérias patogênicas é necessário, o que por sua vez vai assegurar a população uma maior segurança alimentar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M. & JENSEN LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37(2):127-37, 2000.
- AARESTRUP, F.M.; BUTAYE, P. & WITTE, W. Nonhuman reservoirs of enterococci. In: Gilmore, M.S. (Ed.), *The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, Washington DC: ASM Press, pp. 55-100, 2002.
- AL-TATARI, H.; ABDEL-HAQ, N.; CHEARSKUL, P. & ASMAR, B. Antibiotics for treatment of resistant gram-positive coccal infections. *Indian J. Pediatr.* 73:323-34, 2006.
- ARDUINO, R.C.; JAQUES-PALAZ, K.; MURRAY, B.E. & RAKITA, R.M. Resistance of *Enterococcus faecium* to neutrophil-mediated phagocytosis. *Infect. Immun.* 62: 5587–5594, 1994.
- BAUMGARTNER, A.; KUEFFER, M. & ROHNER, P. Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in various ready-to-eat foods. *Arch. Lebensm. Hyg.* 52: 1– 24, 2001.
- BELLOMO, G.; MANGIAGLE, A.; NICASTRO, L. & FRIGERIO, L. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in paediatrics. *Curr. Ther. Res.* 28: 927–934, 1980.
- BERCHIERI, A.; CLARK, N.C.; COOKSEY, R.C.; HILL, B.C.; SWENSON, M. & TENOVER, F.C. Intestinal colonization of a human subject by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* 5(2):97-100, 1999.
- BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R. & SERVIN, AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 35(4):483-9, 1994.
- BOUTON, Y.; GUYOT, P. & GRAPPIN, P. Preliminary characterization of microflora of Comte cheese. *J. Appl. Microbiol.* 85: 123– 131, 1998.
- BRETT, D.; SHEPARD, B.D. & GILMORE, M.S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection.* 4: 215–224, 2002.

- BURNS, E.H.; MARCIEL, A.M.J. & MUSSER, J.M. Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infect. Immun.* 64: 4744-4750, 1996.
- CENTENO, J.A.; CEPEDA, A. & RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. Identification and preliminary characterization of strains of enterococci and micrococci isolated from Arzua raw cows'-milk cheese. *Die Nahrung* 39: 55-62, 1995.
- CENTENO, J. A.; MENENDEZ S. & RODRIGUEZ-OTERO, J.L. Main microbial microbiota present in natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese, Northwest Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 307-313, 1996.
- CEREDA, R.F.; SADER, H.S. & JONES, R.N. *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and teicoplanin (VanA phenotype) isolated from a bone marrow transplanted patient in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 5: 40-46, 2001.
- CEREDA, R.F.; GALES, A.C.; SILBERT, S.; JONES, R.N. & SADER, H.S. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil. *Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.* 23(1): 19-22, 2003.
- CHANDLER, J.R. & DUNNY, G.M. Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity. *Peptides.* 25: 1377-1388, 2004.
- CHENG, A.C.; HARRINGTON, G.; RUSSO, P.; LIOLIOS, L. & SPELMAN, D. Rate of nosocomial transmission of vancomycin-resistant enterococci from isolated patients. *Intern. Méd. J.* 34:510-512, 2004.
- CHOW, J.W.; THAL, L.A.; PERRI, M.B.; VAZQUEZ, J.A.; DONABEDIANM, S.M.; CLEWELL, D.B. & ZERVOS, M.J. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(11): 2474-2477, 1993.
- CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HERRANZ, C.; HAVARSTEIN, L.S.; HOLO, H.; HERNANDEZ, P. & NES, I.F. 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, 2000.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F. & CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 4;71(1):1-20, 2001.

- CLEWELL, D.B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*. 73(1):9-12, 1993.
- CLEWELL, D.B.; AN, F.Y.; FLANNAGAN, S.E.; ANTIPOORTA, M. & DUNNY, G.M. Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. *Mol. Microbiol.* 35: 246–247, 2000.
- CORDEIRO, J. C. R.; SILBERT, S.; REIS, A.O. & SADER, H. S. Inter-hospital dissemination of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* in Brazil. *Clin. Microb. Infec.* 10(3) 260-262, 2004.
- CORSO, A.; FACCONEA, D.; GAGETTIA, P.; TOGNERIA, A.; LOPARDOC, H.; MELANO, R.; RODRIGUEZ, R.; RODRIGUEZA, M. & GALASA, M. First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25: 51–56, 2005.
- CRETI, R.; KOCH, S.; FABRETTI, F.; BALDASSARRI, L. & HUEBNER, J. Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiology.* 6:60, 2006.
- d'AZEVEDO, P.A.; KACMAN, S.B.; SCHMALFUSS, T. & RODRIGUES, L.F. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente à vancomicina isolado em Porto Alegre. *J. Bras. Patol. Méd. Laboratorial.* 36(3):258, 2000.
- d'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G. & TEIXEIRA, L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 48(1):11-16, 2006.
- DELGADO, S. & MAYO, B. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus spp.* strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 309– 319, 2004.
- DEVRIESE, L.A.; POT, B.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K. & HAESEBROUCK, F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 26:187-197, 1995.
- DONABEDIAN, S. M.; THAL, L. A.; HERSHBERGER, E.; PERRI, M. B.; CHOW, J. W.; BARTLETT, P.; JONES, R.; JOYCE, K.; ROSSITER, S.; GAY, K.; JOHNSON, J.; MACKINSON, C.; DEBESS, E.; MADDEN, J.; ANGULO, F. & ZERVOS, M. J. Molecular Characterization of Gentamicin-Resistant *Enterococci* in the United States: Evidence of Spread from Animals to Humans through Food. *J. Clin. Microbiol.* 41(3): 1109–1113, 2003.

- DUNNY, G.M.; LEONARD, B.A. & HEDBERG, P.J. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host – parasite chemical communication. *J. Bacteriol.* 177: 871– 876, 1995.
- DUTKA-MALEN, S.; BLAIMONT, B.; WAUTERS, G. & COURVALIN, P. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38(7):1675-1677, 1994.
- EATON, T.J. & GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4): 1628-35, 2001.
- ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; ASSOBEI, O. & HASSELMANN, C. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol.* 85: 521–526, 1998.
- FACKLAN, R.R.; CARVALHO, M.G.S. & TEIXEIRA, L.M. History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore, M.S. (Ed.), *The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, Washington DC: ASM Press, pp. 1-54, 2002.
- FOULQUIÉ MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E. & DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1 – 24, 2006.
- FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H. & STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1 –24, 1999.
- FRANZ, C.M.A.P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.B.; YOUSIF, N.M.K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. & HOLZAPFEL, W.H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4385– 4389, 2001.
- FRANZ, C.M.A.P. & STILES, M.E. Enterococci in foods--a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88(2-3): 105-22, 2003.
- FREITAS, A.C.; PAIS, C.; MALCATA, F.X. & HOGG, T.A. Microbiological characterization of Picante de Beira Baixa cheese. *J. Food Prot.* 59: 155– 160, 1995.

- GARDAM, M.A. & CONLY, J.M. An Update on the Emergence of Glycopeptide Resistance in Enterococci. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 1(4): 319-327, 1999.
- GATTI, M.; FORNASARI, E.; GIRAFFA, G.; CARMINATI, D. & NEVIANI, E. Enterococchi nei formaggi Italiani: attività biochimiche e significato tecnologico. *Ind. Latte.* 30: 11– 29, 1994.
- GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, J. & COGAN, T.M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 177–188, 2001.
- GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; COGAN, T.M.; CONDON, S. & SWINGS, J. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3560–3565, 2002.
- GILMORE, M.S.; SEGARRA, R.A.; BOOTH, M.C.; BOGIE, C.P.; HALL, L.R. & CLEWELL, D.B. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335–7344, 1994.
- GILMORE, M.S.; COBURN, P.S.; NALLAPAREDDY, R. & MURRAY, B.E. Enterococcal virulence. In: Gilmore, M.S. (Ed.), *The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, Washington DC: ASM Press, pp. 301-354, 2002.
- GIRAFFA, G.; CARMINATI, D. & NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Protec.* 60: 732-738, 1997.
- GIRAFFA, G.; OLIVARI, A.M. & NEVIANI, E. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiol.* 39: 2354–2355, 2000.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215– 222, 2003.
- GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews.* 28: 251–260, 2004.

- GONZÁLEZ, C.; LANGDON, G.M.; BRUIX, M.; GALVEZ, A.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M. & RICO, M. 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, 2000.
- HANCOCK, L.E. & GILMORE, M.S. Pathogenicity of enterococci. In: Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A.; Rood J.I. (Eds.), *Gram positive pathogens*, Washington, D.C.: ASM Press, pp. 251-258, 2000.
- HANCOCK, L.E. & GILMORE, M.S. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(3):1574-9, 2002.
- HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B. & HUIS, I.N. Probiotics, The Scientific Basis. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics*, London: Chapman & Hall, pp. 209– 224, 1992.
- HAYDEN, M.K. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 31(4):1058-65, 2000.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U. & HUIS, J.H.J. Overview of gut microbiota and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85–101, 1998.
- HUMMEL A.; HOLZAPFEL, W.H. & FRANZ, C.M.A.P. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. App. Microbiol.* 30: 1-7, 2007.
- HUYCKE, M.M.; GILMORE M.S.; JETT, B.D. & BOOTH, J.L. Transfer of pheromone-inducible plasmids between *Enterococcus faecalis* in the Syrianhamster gastro-intestinal tract. *J. Infect. Dis.* 166: 1188–1191, 1992.
- HUYCKE, M.M.; SAHM, D.F. & GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4(2):239-249, 1998.
- JENSEN, L.B.; HAMMERUM, A.M.; POULSEN, R.L. & WESTH, H. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns containing similar Tn1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 724– 725, 1999.

- JETT, B.D.; HUYNCKE, M.M.; & GILMORE, M.S. Virulence of Enterococci. *Clin., Microb. Rev.* 7: 462-478, 1994.
- JOHNSON, A. P. The pathogenicity of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 33: 1083–1089, 1994.
- JOHNSTON, L.M. & JAYKUS, L. Antimicrobial resistance to Enterococcus species isolated from produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5): 3133-3137, 2004.
- KAK, V. & CHOW, J.W. Acquired antibiotic resistances in enterococci. In: Gilmore, M.S. (Ed.), *The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, Washington DC: ASM Press, pp. 355-384, 2002.
- KAUFFMAN, C.A. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *J. Antimicrobial Chemother.* 51: Suppl. S3, iii23–iii30, 2003.
- KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 255– 262, 2003.
- KOLAR, M.; URBANEK, K.; VAGNEROVA, I. & KOUKALOVA, D. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Pharm. Ther.* 31:67-72, 2006.
- KOWALSKI, W.J.; KASPER, E.L.; HATTON, J.F.; MURRAY, B.E.;NALLAPAREDDY, S.R. & GILLESPIE, M.J. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J. Endod.* 32(7): 634-637, 2006.
- LANDMAN, D. & QUALE, J.M. Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *J. Antimicrob. Chemother.* 40(2): 161-70, 1997.
- LECLERC, H.; DEVRIESE, L.A. & MOSSEL, D.A.A. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 459–466, 1996.
- LEME, I.L.; FERREIRA, A.J.P.; BOTTINO, J.A. & PIGNATARI, A.C. Glycopeptide susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). *Braz. J. Microbiol.* 31: 53–57, 2000.

- LINDEN, P.K. & MILLER, C.B. Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33: 113–120, 1999.
- MAGNUS, C.A.; MCCURDY, A.R. & INGLEDEW, W.M. Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. *J. Can. Inst. Food Sci. Technol.* 21: 209–212, 1988.
- MALANI, P.N.; KAUFFMAN, C.A. & ZERVOS, M.J. Enterococcal disease, epidemiology and treatment. In: Gilmore, M.S. (Ed.), *The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, Washington DC: ASM Press, pp. 385-408, 2002.
- MARKOWITZ, S.M.; WELLS, V.D.; WILLIAMS, D.S.; STUART, C.G.; COUDRON, P.E. & WONG, E.S. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of beta-lactamase-producing, aminoglycoside-resistant isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 35: 1075–80, 1991.
- MAROTHI, Y.A.; AGNIHOTRI, H. & DUBEY, D. Enterococcal resistance - an overview. *Indian. J. Med. Microbiol.* 23:214-219, 2005.
- MEGRAN, D.W. Enterococcal endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 15(1):63-71, 1992.
- MIRANDA, G.; LEE, L.; KELLY, C.; SOLÓRZANO, F.; LEAÑOS, B.; MUÑOZ, O. & PATTERSON, J.E. Antimicrobial resistance from enterococci in a pediatric hospital. Plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin and streptomycin resistance. *Arch. Med. Res.* 32(2):159-63, 2001
- MORRISON, D.; WOODFORD, N. & COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 83: 89–99, 1997.
- MURRAY, B.E. The life and times of the Enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46–65, 1990.
- NALLAPAREDDY, S.R.; QIN, X.; WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect. Immun.* 68: 5218–5224, 2000A.
- NALLAPAREDDY, S.R.; SINGH, K.V.; DUH, R.W.; WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ace during human infections. *Infect. Immun.* 68: 5210–5217, 2000B.

- NOSKIN, G.A.; STOSOR, V.; COOPER, I. & PETERSON, L.R. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 16(10):577-81, 1995.
- OKAMOTO, T.; AKAIKE, T.; SUGA, M.; TANASE, S.; HORIE, H.; MIYAJIMA, S.; ANDO, M.; ICHINOSE Y. & MAEDA, H. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J. Biol. Chem.* 272(9):6059-66, 1997.
- OZAWA, Y.; TANIMOTO, K.; NOMURA T.; YOSHINAGA, M.; ARAKAWA, Y. & IKE, Y. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *App. Environmen. Microbiol.* 6457-6461, 2002.
- PATTERSON, J.E.; SWEENEY, A.H.; SIMMS, M.; CARLEY, N.; MANGI, R.; SABETTA, J. & LYONS R.W. An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine (Baltimore).* 74(4):191-200, 1995.
- PERDIGON, G.; DE MACIAS, M.E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G. & DE RUIZ HOLGADO, A.P. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology.* 63(1):17-23, 1988.
- PSONI, L.; KOTZAMANIDES, C.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; TZANETAKIS, N. & LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 109–120, 2006.
- RAKITA, R.M.; VANEK, N.N.; JAQUEZ-PALAS, K.; MEE, M.; MARISCALCO, M.M.; DUNNY, G.M.; SNUGGS, M.; VAN WINKLE, W.B. & SIMON, S.I. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect. Immun.* 67: 6067–6075, 1999.
- RICH, R.L.; KREIKEMEYER, B.; OWENS, R.T.; LABRENZ, S.; NARAYANA, S.V.L.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. & HOOK, M. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 274: 26939– 26945, 1999.
- RICE, K.; PERALTA, R.; BAST, D.; DE AZEVEDO, J. & MCGAVIN, M.J. Description of staphylococcus serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine-protease. *Infect. Immun.* 69:159-169, 2001.

- 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.* 30: 211–220, 2001.
- SALYERS, A.A. & AMABILE-CUEVAS, C.F. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(11):2321-5, 1997.
- SAMUELSSON, A.; JONASSON, J.; MONSTEIN, H.J.; BERG, S. & ISAKSSON, B. Clustering of enterococcal infections in a general intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 54(3):188-95, 2003.
- SARANTINOPOULOUS, P.; KALANTZOPOULOUS, G. & TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 93– 105, 2002.
- SARTINGEN, S.; ROZDZINSKI, E.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. & MARRE, R. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 68: 6044– 6047, 2000.
- SCHENTAG, J.J. Antimicrobial management strategies for Gram-positive bacterial resistance in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* 29(4 Suppl):N100-7, 2004.
- SHEPARD, B.D. & GILMORE, M.S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 4: 215-224, 2002.
- SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A.S.; HUYCKE, M.M.; LINDAHL, G. & GILMORE, M.S. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* 67: 193–200, 1999.
- SHANKAR, N.; LOCKATELL, C.V.; BAGHDAYAN, A.S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M.S. & JOHNSON, D.E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* 69(7): 4366-72, 2001.
- SIMJEE, S.; WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F.; WAGNER, D.D.; ZERVOS, M.J.; DONABEDIAN, S.M.; ENGLISH, L.; HAYES J.R. & WALKER, R.D. Characterization of Tn1546 in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Canine Urinary Tract Infections: Evidence of Gene Exchange between Human and Animal Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 40(12): 659–4665, 2002.

- STERN, C.S.; CARVALHO, MDA. G. & TEIXEIRA, L.M. Characterization of enterococci isolated from human and nonhuman sources in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 20(2):61-7, 1994.
- STOBBERINGH, E.; VAN DEN BOGAARD, A.; LONDON, N.; DRIESSEN & WILLEMS, R. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2215– 2221, 1999.
- SUZZI, G.; CARUSO, M.; GARDINI, F.; LOMBARDI, A.; VANNINI, L.; GUERZONI, M.E.; ANDRIGHETTO, C. & LANORTE, M.T. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J. Appl. Microbiol.* 89(2): 267-74, 2000.
- TANNOCK, G.W. & COOK, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: Gilmore, M.S. (Ed.), *The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, Washington DC: ASM Press, pp. 101-132, 2002.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33(3):281-301, 2000.
- TENDOLKAR P.M.; BAGHDAYAN A.S. & SHANKAR, N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2622–2636, 2003.
- TENG, F.; JACQUES-PALAZ, K.D.; WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (epa) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. *Infect. Immun.* 70(4):2010-2015, 2002.
- TEUBER, M.; SCHWARZ, F. & PERRETEN, V. Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw-fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 88:325-9, 2003.
- TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.L.; CACARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADE´S, J.R. & LASA, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4538–4545, 2001.

- TOYE, B.; SHYMANSKI, J.; BOBROWSKA, M.; WOODS, W. & RAMOTAR, K. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the vanC genotype). *J. Clin. Microbiol.* 35(12): 3166-70, 1997.
- TRAVIS, J.; PIKE, R.; IMAMURA, T. & POTEMPA, J. The role of proteolytic enzymes in the development of pulmonary emphysema and periodontal disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: S143-S146, 1994.
- VAN DEN BOGAARD, A.E.; JENSEN, L.B. & STOBBERINGH, E.E. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. *N. Engl. J. Med.* 337:1558-1559, 1997.
- VAN DEN BRAAK, N.; VAN BELKUM, A.; VAN KEULEN, M.; Vliegenthart, J.; VERBRUGH, H.A. & ENDTZ, H.P. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 36(7): 1927-32, 1998.
- VANEK, N.N.; SIMON, S.I.; JACQUES-PALAZ, K.; MARISCALCO, M.M.; DUNNY, G.M. & RAKITA, R.M. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 26: 49– 60, 1999.
- WALSH, C.T.; FISHER, S.L.; PARK, I.S.; PRAHALAD, M. & WU Z. Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chem. Biol.* 3(1):21-28, 1996.
- WEGENER, H.C.; AARESTRUP, F.M.; HAMMERUN, A.M. & BAGER, F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Perspectives.* 5(3): 329-334, 1999.
- WERNER, G.; KLARE, I. & WITTE, W. Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 81-94, 2002.
- WIRTH, R. The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*: more than 'just' a plasmid collection mechanisms? *Eur. J. Biochem.* 222: 235–246, 1994.
- WIRTH, R. Sex pheromones and gene transfer in *Enterococcus faecalis*. *Res. Microbiol.* 151: 493–496, 2000.

World Health Organization. *The medical impact of the use of antimicrobials in food animals*. Berlin, 2001.

World Health Organization. *WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food*. Geneva, 2002.

ZHANEL, G.G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J.A. & HOBAN, D.J. The glycylcyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs*. 64:63-88, 2004.

ZSCHECK, K.K. & MURRAY, B.E. Genes involved in the regulation of beta-lactamase production in enterococci and staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(9):1966-701, 1993.

6. ANEXOS

6.1. MANUSCRITO III

Molecular fingerprinting of *Enterococcus spp.* ampicillin resistant strains isolated from nosocomial infections in Southern Brazil

Gustavo Pelicioli Riboldi^a, Ana Paula Guedes Frazzon^b, Pedro Alves d'Azevedo^c, Jeverson Frazzon^{a,d,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

^b Departamento de Microbiologia, UFRGS;

^c Departamento de Microbiologia, FFFCMPA;

^d Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, UFRGS.

* Correspondence and reprints:

jeverson.frazzon@ufrgs.br

phone: +5551 – 33086072

Abstract

Widely distributed in environment, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are important pathogens involved in nosocomial infections and characterized as multiresistant antibiotic strains. The aim of this study was to test a molecular technique for characterization of *Enterococcus spp* strains resistant to ampicillin. Twelve strains of were analyzed by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) by using M13 primer, which enables the detection of interspecies genetic variability. Data demonstrated to be efficient in differentiating intraspecies *Enterococcus spp* strains resistant to ampicillin. Comparing to previous biochemical classification, three samples did not match with RAPD typing, and one other presented a third cluster. Phenotype tests for species differentiation were repeated in order to species reevaluation. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) experiments were performed in order to compare and confirm RAPD results. Although samples have been isolated from several patients, of different hospitals in distinct periods of time, both RAPD and PFGE showed low genetic variability and the presence of identical representatives, possibly belonging to a single strain. In conclusion, M13 primer generated RAPD profiles that allowed discrimination of nosocomial strains. We suggest that this simple RAPD technique could be used for the epidemiological typing of AMPR enterococci and monitoring of its nosocomial spread.

Keywords: Enterococcus, antibiotic resistance, RAPD-PCR, nosocomial infection, PFGE.

1. Introduction

Enterococcus spp are commensal microorganisms that colonize the gastrointestinal and vaginal tract and, occasionally the oral cavity in humans, and can be isolated in a number of 10^5 - 10^8 CFU/g faeces (Franz et al. 2003). *Enterococcus spp* are known as the major microorganism associated to the development of nosocomial infections mainly in immunosuppressed patients, where *Enterococcus faecalis* is the most prevalent followed by *Enterococcus faecium* (Samuelsson et al. 2003). The pathological processes of these microorganisms include infections of the urinary tract, wounds, bloodstream and endocardium (Kauffman 2003). Studies have demonstrated a widespread and persistent environmental contamination by enterococci in surfaces of medical instruments, in spite of rigorous protocols for cleaning and sterilization (Shepard & Gilmore 2002). These bacteria also demonstrate the ability to survive outside the commensal organism, once they resist to environment with wide ranges of temperature, pH, salinity and the bactericidal effects of detergents (Flahaut et al. 1996).

The pathogenicity of *Enterococcus spp* is mainly due to factors like cytolysin, aggregation substance, proteases, hyaluronidase and bacteriocins which enable the adherence of the microorganism to host tissues, facilitating tissue invasion, and the immunomodulation effect and toxin-mediated damage (Jett et al. 1994). A second clinically important characteristic in *Enterococcus spp* would be the resistance to a wide range of antimicrobial agents. Enterococci appearance in nosocomial infections has paralleled the emergence of resistant strains to most of the clinically important antimicrobial drugs (Gold & Moellering 1996). Enterococci are intrinsically resistant to many agents frequently used to treat infections with Gram-positive cocci, which include clindamycin, cephalosporins, co-trimoxazole, low levels of aminoglycosides and β -lactams

(Shepard & Gilmore 2002). The resistance β -lactams is related to the synthesis specifically penicillin binding proteins (PBPs) (Martone 1998). High-level ampicillin resistance may be due to either increased expression of PBP5 or alterations in the *pbp5* gene that result in a lower affinity for ampicillin. In addition, these bacteria are able to acquire resistance through gene transference by plasmids and transposons providing resistance to cloranfenicol, erythromycin, tetracycline, fluoroquinolones, glycopeptides and high levels of β -lactams and aminoglycosides (Gold & Moellering 1996). The emergence of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolates is another worldwide problem because the therapeutic options for VRE infections are limited, and the ampicillin is the last step for the multi-resistant enterococci treatment before the use of vancomycin (Murray 2000).

Different DNA fragment techniques have been used in order to identify and typing enterococci samples. The randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) is a rapid, inexpensive and easy to perform technique and can be used for determination of genetic diversity based on DNA sequence (Bowditch et al. 1993, Caetano-Anolles 1991, Welsh & McClelland 1990, Williams et al. 1990). This method requires no previous genetic knowledge of the target organism, relies on the presence of low stringency priming sites for a single arbitrary primer on both strands of the DNA molecule, close enough to permit PCR amplification. This DNA fingerprinting has been successfully used to type enterococci strains (Quednau et al. 1986) and other bacteria including *Escherichia coli* (Chansiripornchai et al. 2001), *Pasteurella multocida* (Dziva et al. 2001) and *Staphylococcus aureus* (Hermans et al. 2001). Despite the fact that pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is a widely used technique allowing differentiation of strains with a high discriminatory power (Domig et al. 2003), studies comparing RAPD and PFGE have

concluded that both generate highly congruent results and those techniques for typing can be used for identifying circulating clones within a 5-year period (Jureen et al. 2004, van den Braak et al. 2000). Furthermore, Rossetti & Giraffa (2005) have proposed identification and subtyping approach based only on M13 primer RAPD-PCR fingerprint. RAPD has also been used to analyze antibiotic susceptibility in *Enterococcus spp* (Galdiero et al. 2005, Malathun et al. 1998). The present study reports on the use of RAPD technique to identify the heterogeneity in strains of nosocomial infections caused by *E. faecalis* and *E. faecium* ampicillin resistant strains from South Brazil.

2. Materials and methods

Bacterial strains and DNA preparation. A total of twelve *Enterococcus spp* AMPR clinical samples with a minimum inhibitory concentration (MIC) of ≥ 16 mg/L for ampicillin were examined, the samples were isolated from patients of nosocomial infections occurred at Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), a complex of seven distinct hospitals between 1996 and 2000. All samples had already been previously screened and characterized as *E. faecalis* and *E. faecium* (table 1), according to biochemical tests taken place at the Gram-Positive Coccus Laboratory of Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre - FFFCMPA, Porto Alegre/ Brazil. Two wild-type *E. faecalis* clinical samples without resistance to any antimicrobial agent were used as a matter of comparison of DNA fragments. The *E. faecalis* (VanR) and *S. aureus* reference strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Genomic DNA was extracted from the strains by the boiling method (Hagen et al. 2002). One single isolated bacterial colony was suspended in 1mL of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA pH 8.0) and boiled for 10 minutes. The samples were then centrifuged and the aliquot was used into the PCR mix reaction.

Phenotypic characterization. Strains were previously screened and characterized by biochemical reactions. This species differentiation followed the protocol described by Facklam & Collins (1989), which include trials of arginine hydrolysis and carbohydrates fermentation of manitol, sorbitol, sorbose, arabinose, methyl- α -D-glucopyranoside (MGP) and raffinose.

RAPD-PCR. The RAPD-PCR was performed in a total volume of 25 μ L using M13 primer (5'GAGGGTGGCGGTTCT3') (Suzzi et al. 2000). The M13 primer was selected by generate specific DNA amplification products to enterococci (Burnie et al. 2002, Pernice et al. 1998, Sloos et al. 2000, Ulijasz et al. 2000). The RAPD reaction consisted of 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0.2 μ M primer of M13 primer and 1.0 μ l DNA. The reaction mixture with no DNA template was included as a negative control. Amplifications were carried out in a thermalcycler MJ Research PTC 100 (MJ Research's Inc, USA). The primer was submitted to the following amplification conditions: first step at 94 °C for 5 min, and 35 cycles at 94 °C for 1 min, 40 °C for 30s, and 72 °C for 1 min. Finally, a final elongation of 72 °C for 5 min. Amplification products were separated by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels stained with ethidium bromide (0,5 μ g/mL). The stained gels were then visualized in UV light and photographed using a Kodak EDAS 120 (Kodak, Connecticut, USA). All amplifications were repeated three times for each strain in separate experiments.

PFGE procedures. PFGE was used as gold standard and performed for strains with doublet band patterns obtained in RAPD. Samples of genomic DNA extracted from the strains were digested with *Sma*I and compared by PFGE as described previously (van den Braak et al. 2000). Electrophoresis (1.2% agarose in 0.5 X TBE) was performed using a

BioRad CHEF mapper with the following program: block 1; runtime 22 h; initial time: 5 s; final time: 35s; 6v. The gel was stained with ethidiumbromide for 15 min and then destained in distilled water before photography under UV irradiation. The PFGE patterns were interpreted according to Tenover et al. (1995).

Determination of DNA molecular weight and statistical analysis. DNA fragments (bands) were analyzed in software Gel Analyzer-Pro 3.2. Dendrograms were constructed based on phenotype characterization and using the Statistic Package of the Social Science (SPSS) software 8th edition. Calculating the simple association coefficient and cluster analysis using the Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) clustering algorithm assessed similarity between samples. The presence or absence of DNA bands coded as one or zero, respectively, was used in this work.

3. Results

The RAPD-PCR analysis using the M13 primer revealed the presence of amplicons of a variety of sizes in *Enterococcus spp* strains and the amplified DNA fragments presented species-specific profiles. Taking into account the previous phenotypic characterization, the samples have been divided in two groups, A (*E. faecalis*) and B (*E. faecium*) (Table 1). In this way, seven *E. faecalis* samples and five *E. faecium* samples were differentiated. The dendrogram analysis (Fig. 1) presented a subdivision in two groups of the samples previously phenotypically characterized. Comparing to the previous biochemical classification, the B5 and B1 samples were inserted to the *E. faecalis* group; the A4 sample inserted to the *E. faecium* group; and the B6, phenotypically characterized as an *E. faecium*, presented a third cluster, which may represent a variable biotype. Therefore, the genotypic analysis of the samples previously characterized as *E. faecium* by the mean of phenotypic characterization, the B1, B5 and B6 samples have presented a

doubtful DNA band-pattern, and from *E. faecalis* samples, only A4 has shown a discussable DNA band-pattern. In such cases, the phenotype tests for species differentiation were repeated in order to determine the correct species. In regards to the phenotypic reevaluation and the genotypic analysis, three up to four doubtful isolates were reclassified: the A4 isolate that was previously classified as *E. faecalis*, corresponded to *E. faecium*; and the B1 and B5 samples, before classified as *E. faecium*, corresponded to *E. faecalis*. In this way, the only sample which was not reclassified is B6. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) experiments confirmed such classification, with the A4 isolate positioning in *E. faecium* cluster, and the B6 sample positioning in the same cluster, though presenting a variable biotype (Fig. 4).

In order to differentiate *Enterococcus spp* AMR, VanR and wild-type, the RAPD-PCR technique was performed using the M13 primer and the two clinical samples (A7 and A8) phenotypically characterized as *E. faecalis* and susceptible to all clinical antimicrobials were paralleled with the DNA band-patterns of four other samples: *E. faecalis* AMPR (A1), *E. faecium* AMPR (B2), *E. faecium* VanR (ATCC 51299) and *S. aureus* (ATCC 25923) (Table 1). The analysis of agarose gel (Fig. 2) presented several differences such as the distinct DNA band-patterns of *E. faecium* and *E. faecium* easily identifiable, presence of additional DNA bands when comparing to wild-type and resistant strains of *Enterococcus spp.* and differences among *Enterococcus spp.* and *S. aureus*.

4. Discussion

The aim of this work was to test the RAPD-PCR technique for species identification of clinical samples of AMPR enterococci, and make it useful for investigating the source of outbreaks of infection, the relatedness of strains recovered from different patients, and the identities of multiple strains recovered from the patients from

similar localities.

The major application of RAPD-PCR is its ability to trace the origin, determine the diversity and identify enterococcal subtypes (Aslanzadeh et al. 1998, Carretto et al. 2000, Dautle et al. 2002, Monstein et al. 1998, Rodriguez-Calleja et al. 2006, van Belkum et al. 1995, Vancanneyt et al. 2002). Comparisons with respect to the resolving power and epidemiological concordance for RAPD versus PFGE have been made and the overlap in the data suggested that RAPD analysis is well suited for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci (VRE). However, there is not any study comparing such methodologies in typing of AMPR enterococci.

PFGE technique is based on restriction enzyme polymorphism and analyzes the whole chromosomal DNA. In contrast, RAPD analyzes, within the chromosomal and plasmid DNA, the sequence polymorphism of the regions corresponding to the primers and the length polymorphism of the regions, which are amplified. Since vancomycin resistance is determined by plasmidial components and the ampicillin resistance is chromosomally encoded, studies focused in the comparison of these two methodologies and the determination of RAPD technique for typing of AMPR enterococci become significant. Adequate molecular typing schemes are especially relevant in cases of pathogens that either increase in clinical prevalence or gain specific features increasing their disease-causing capacity.

Phenotypical differences among the enterococci may misrepresent the phylogenetic relationships, complicating the classification of enterococcal species or even doing it in an erroneous way. Although phenotype-based methods are still of importance for daily routine (Domig et al. 2003), genotypic methods have contributed to the characterization of microorganisms and their identification. The focus of the DNA-based identification

techniques on the unique nucleic acid composition rather than on the phenotypic expression of products is considered the greatest advantage of these methodologies.

As shown in Fig. 1 and Fig. 3, RAPD generated lower number of band-patterns when compared with PFGE. Due to the more discriminant characteristics of PFGE, such methodology was used to especially analyze samples A4 and B6, which did not present the same band pattern in RAPD. Such study included the doubtful isolates and six others (A3, A6, B1, B2, B3, B4) that had already been well characterized through RAPD, in order to compare band patterns of such sample either (data not shown). According to Tenover et al. (1995), isolates are considered identical and representative of a single strain whether they show identical PFGE patterns. Isolates that differ by 1-3 bands are assigned a subtype, and such bands represent a single differentiating genetic event. Four or more band differences between two strains define different genotypes. The sample A4 showed profile patterns identical of B2, B3 and B4 samples (Fig. 3B). The B6 isolate presented a profile of bands that included it in *E. faecium* cluster (Fig. 3A).

RAPD analysis in this study presented genotypical diversity in AMPR enterococci isolates from nosocomial infections showing both similarities and differences among *Enterococcus spp* strains. Although samples here discussed have been isolated from several patients, of different hospitals and in distinct periods of time, both RAPD and PFGE showed low genetic variability and, in some cases, the presence of identical representatives possibly belonging to a single strain (Fig. 3A).

Epidemiological typing of the enterococci samples has the PFGE technique as the gold standard methodology, and that is the one recommended for epidemiological typing of enterococci due to its highly discriminatory and good reproducibility results (Malathum

et al. 1998). However, it is a labour-intensive method, and other methods may be more suitable when investigating clonal relationships of isolates. Here, the RAPD-PCR technique presented a fast and reliable mechanism for typifying the nosocomial *Enterococcus spp.* AMPR samples. We conclude that the RAPD method using the universal M13 primer could be a powerful tool for microbiologists wishing to investigate AMPR enterococci isolates in cases of nosocomial infection.

Acknowledgements

J.F. (CNPq, 306397/2006-4) is research awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil and G.P.R. is a Master Degree fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

5. References

1. Aslanzadeh J, de la Viuda M, Fille M, Smith WB, Namdari, H 1998. Comparison of culture and acid-fast bacilli stain to PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Mol Cell Probes* 14: 207-211.
2. Bowditch BM, Albright DG, Williams JG, Braun MJ 1993. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods Enzymol* 224: 294-309.
3. Burnie J, Carter T, Rigg G, Hodgetts S, Donohoe M, Matthews R 2002. Identification of ABC transporters in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* as potential targets for antibody therapy. *FEMS Immunol. Med Microbiol* 33: 179-189.
4. Caetano-Anolles G 1991. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl* 3: 85-94.
5. Carretto E, Barbarini D, Locatelli F, Giraldi E, Pellegrini N, Perversi L 2000. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in three children given allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: clinical and microbiologic features. *Haematologica* 85: 1158-1164.
6. Chansiripornchai N, Ramasoota P, Sasipreeyajan J, Svenson S 2001. Differentiation of avian pathogenic *E. coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet Microbiol* 80: 75-83.
7. Dautle MP, Ulrich RL, Hughes TA 2002. Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification. *J Clin Microbiol* 40: 414-421.

8. Domig, KJ, Mayer HK, Kneifel W 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus spp.* 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol* 88: 165-188.
9. Dziva F, Christensen H, Olsen JE, Mohan K 2001. Random amplification of polymorphic DNA and phenotypic typing of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 82: 361-372.
10. Facklan RR, Collins MD 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 27: 731-734.
11. Flahaut S, Frere J, Boutibonnes P, Auffray Y 1996. Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* 62: 2416-2420.
12. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapel WH 2003. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 88: 105-122.
13. Galdiero E, Villari P, Di Onofrio V, Pisciotta MG, Lucarello A, Sommese L 2005. Characterization of glycopeptide resistant enterococci isolated from a hospital in Naples (Italy). *New Microbiol* 28: 171-176.
14. Gold HS, Moellering RC 1996. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 335: 1445-1453.
15. Hagen RM, Gauthier YP, Sprague LD, Vidal DR, Zysk G, Finke EJ, Neubauer H 2002. Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. *Mol Pathol* 55(6): 398-400.
16. Hermans K, De Herdt P, Baele M, Devriese LA, Haesebrouck F 2001. Sequence analysis of a RAPD band differentiating high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet Microbiol* 82: 61-67.
17. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol*

Rev 7: 462-478.

18. Jureen R, Harthug S, Sornes S, Digranes A, Willems RJL, Langeland N 2004. Comparative analysis of amplified fragment length polymorphism and pulsed field gel electrophoresis in a hospital outbreak and subsequent endemicity of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. FEMS Immunol Med Microbiol 40: 33-39.
19. Kauffman CA 2003. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. J Antimicrob Chemother 51: 23-30.
20. Malathum K, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE 1998. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. J Clin Microbiol 36: 211-215.
21. Martin B, Garriga M, Hugas M, Aymerich T 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. J Appl Microbiol 98: 1177-1190.
22. Martone WJ 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States? Infect Control Hosp Epidemiol 19: 539-545.
23. Monstein HJ, Quednau M, Samuelsson A, Ahrne S, Isaksson B, Jonasson J 1998. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. Microbiology 144: 1171-1179.
24. Murray BE 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Engl J Med 342: 710-721.
25. Pernice I, Lo Passo C, Criseo G, Pernice A, Todaro-Luck F 1998. Molecular subtyping of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety neoformans serotype A isolated from southern Italy. Mycoses 41: 117-124.
26. Quednau M, Ahrne S, Molin G 1999. Genomic relationships between *Enterococcus faecium* strains from different sources and with different antibiotic resistance

- profiles evaluated by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using EcoRI and PvuII. *Appl Environ Microbiol* 65: 1777-1780.
27. Rodriguez-Calleja JM, Garcia-Lopez I, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML 2006. Molecular and phenotypic typing of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit meat. *Res Microbiol* 157: 496-502.
 28. Rossetti L, Giraffa G 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J Microbiol Methods* 63: 135-144.
 29. Samuelsson A, Jonasson J, Monstein HJ, Berg S, Isaksson B 2003. Clustering of enterococcal infections in a general intensive care unit. *J Hosp Infect* 54: 188-195.
 30. Shepard BD, Gilmore MS 2002. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect* 4: 215-224.
 31. Sloos, JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Boven CP 2000. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol* 38: 2488-2493.
 32. Suzzi G, Caruso M, Gardini F, Vanini L, Guerzoni ME, Andrighetto C, Lanorte MT 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *J Appl Microbiol* 89: 267-274.
 33. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
 34. Ulijasz AT, Kay BK, Weisblum B 2000. Peptide analogues of the VanS catalytic

- center inhibit VanR binding to its cognate promoter. *Biochemistry* 39: 11417-11424.
35. Van Belkum A, Kluytmans J, van Leeuwen W, Bax R, Quint W, Peters E 1995. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 33: 1537-1547.
36. van den Braak N, Power E, Anthony R, Endtz HP, Verbrugh HA, van Belkum A 2000. Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of *SmaI* DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol Lett* 192: 45-52.
37. Vancanneyt M, Snauwaert C, Cleenwerck I, Baele M, Descheemaeker P, Goossens H 2002. *Enterococcus villorum* sp., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 393-400.
38. Welsh J, McClelland M 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218.
39. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.

Table 1: List of bacterial samples examined in this study.

Samples	Phenotypical determination	Antimicrobial susceptibility	Origin
Clinical			
<i>E. faecalis</i>	A1	AMPR	No identification
	A2	AMPR	Female
	A3	AMPR	Urine
	A4	AMPR	Urine
	A5	AMPR	No identification
	A6	AMPR	Urine
	A7	- ^b	Blood, female
	A8	- ^b	Blood, female
<i>E. faecium</i>	B1	AMPR	Urine, female, 8 months
	B2	AMPR	Urine
	B3	AMPR	Urine, female, 11 months
	B4	AMPR	Urine
	B5	AMPR	Feces
	B6	AMPR	Urine, female, newborn
ATCC			
<i>E. faecalis</i>	51299 ^a	VanB ^c	
<i>S. aureus</i>	25923 ^a	- ^b	

Group A and B correspond to samples of nosocomial infections isolated at Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA); ^a ATCC catalog number; ^b susceptibility to all clinical antimicrobials tested; ^c low level vancomycin resistance.

Fig. 2:

(A) Agarose gel electrophoresis of RAPD-PCR products generated with primer M13. Lane 1: DNA molecular marker (100bp DNA ladder, Invitrogen). Lanes 2 and 6 contained specific RAPD-PCR product from genomic DNA of wild-type *E. faecalis*; lane 3: *E. faecalis* AMPR; lane 4: *E. faecium* AMPR; lane 5: *E. faecalis* VanR ATCC (51299); lane 7: *S. aureus* ATCC (25923);

(B) Dendrogram constructed according to the DNA band-patterns using primer M13. VAN corresponds to *E. faecalis* VanR ATCC (51299) and SAUREUS correspond to *S. aureus* ATCC (25923). The tree was constructed using the distance matrix clustering with the UPGMA.

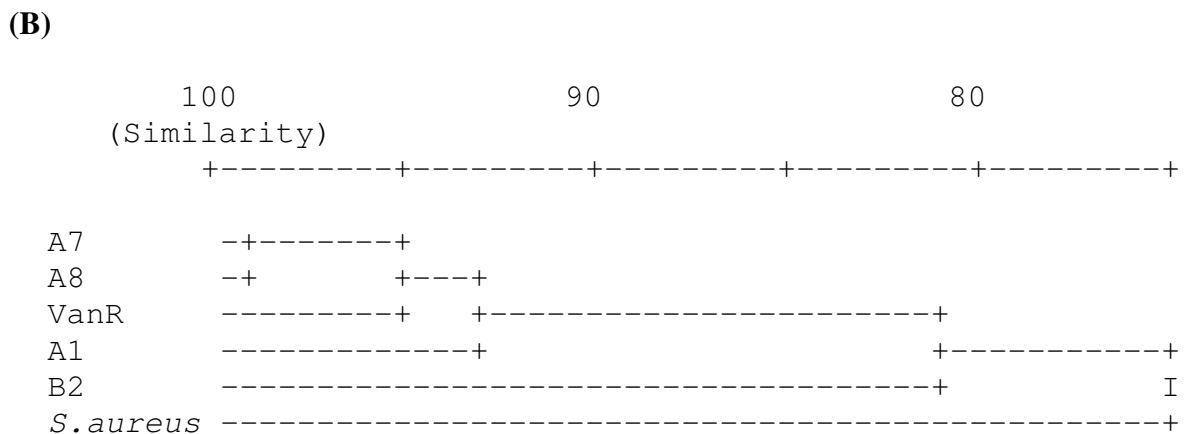
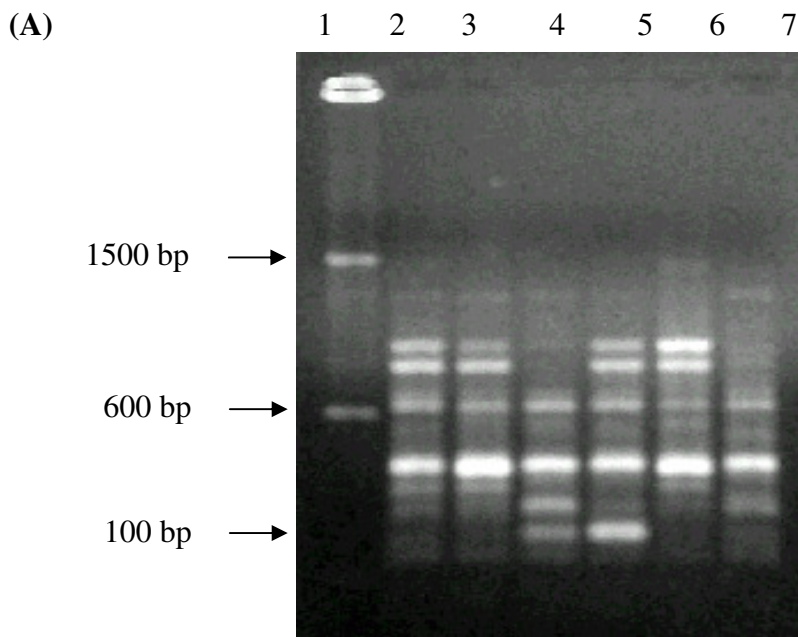
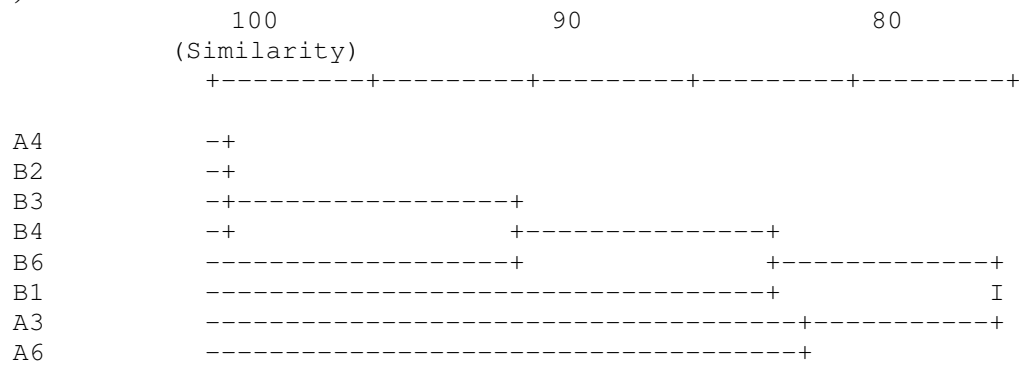


Fig. 3:

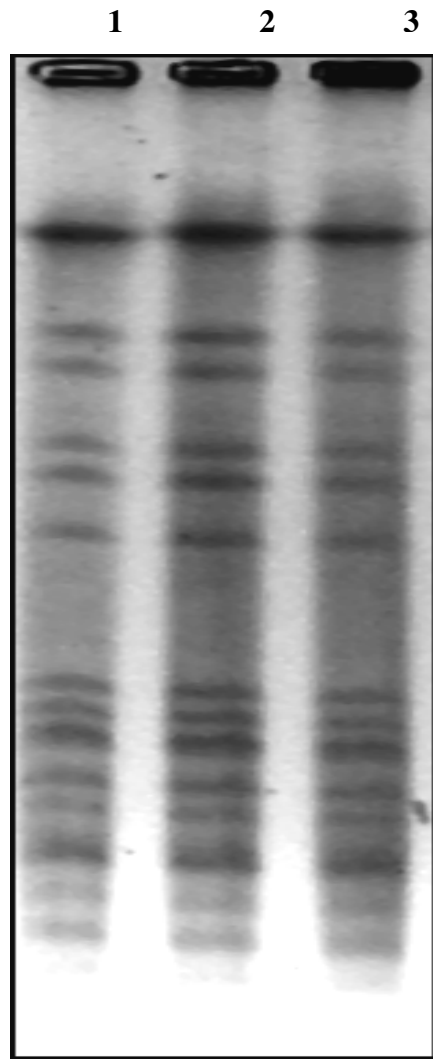
(A) Dendrogram constructed from enterococci samples with doubtful patterns in RAPD, according to band patterns obtained through PFGE technique. The tree was constructed using the distance matrix clustering with the UPGMA;

(B) *Sma*I PFGE typing of *E. faecium* samples B3 (1), B4 (2) and A4 (3) revealing identical patterns.

(A)



(B)



7. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO

RIBOLDI, G.P.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Gustavo Pelicioli Riboldi

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 11 de março de 1983.

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500; Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBM), nº 209N, Centro de Biotecnologia (CBIOT) – Agronomia, CEP: 90501-970 - Porto Alegre, RS – Brasil.

Telefone profissional: (51) 33086072 **E-mail:** riboldi@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO: Farmácia Bioquímica (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2000-2004).

3. ESTÁGIOS:

*Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA),
Setor de Patologia Clínica*

Supervisão: Dra. Carmen Pilla

Período: Jan 2003 – Jul 2003 (Estágio voluntário).

Atuação: Laboratório de Bioquímica – análise de marcadores bioquímicos em amostras clínicas.

*Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA),
Laboratório Central*

Supervisão: Dr. César Voegeli

Período: Jan 2004 – Jul 2004 (Estágio curricular).

Atuação: análises de amostras clínicas nos diferenciados setores do laboratório clínico: Laboratórios de Bioquímica, Uroanálise, Hematologia e Coagulação, Imunologia, Bacteriologia e Parasitologia.

Laboratório de Pesquisa Bioquímica (PUCRS)/Laboratório de Enzimologia, (Depto. Bioquímica, ICBS – UFRGS)

Orientação: Prof. Dra. Carla Denise Bonan

Período: - Mar 2002 – Fev 2003 (Iniciação Científica – Voluntário);

- Mar 2003 – Dez 2003 (Bolsista do Programa de Bolsas/Pesquisa para Alunos da PUCRS - BPA/PUCRS);

- Jan 2004 – Jul 2004 (Iniciação Científica – Voluntário).

Projetos de Pesquisa:

- “Estudo da influência da via das ectonucleotidases sobre a atividade locomotora”;
- “Efeito da habituação em campo aberto sobre as atividades ectonucleotidásicas em sinaptossomas de hipocampo, córtex entorrinal e córtex cingulado de ratos”.

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

- Farmacêutico Responsável Técnico (CRF/RS: I – 9457):

Local: Drogaria Sempre Bem Ltda. – Matriz, Viamão, RS.

CNPJ: 03.173.250/0001-11

Período: Ago 2004 – Fev 2005

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

E.L. PEDRAZZA, **G. P. RIBOLDI**, G.S. PEREIRA, I. IZQUIERDO, C.D. BONAN.

Habituation to an open field alters ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 8;413(1):21-4, 2007.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

G.P. RIBOLDI, A.P. FRAZZON, P.A. D’AZEVEDO, J. FRAZZON. Molecular characterization of *Enterococcus spp.* isolated from *in natura* food and dairy products in southern Brazil through the polymerase chain reaction by random amplification of polymorphic DNA technique. In: 52º Congresso Brasileiro de Genética (CBG), 2006, Foz do Iguaçu, Brasil.

G.P. RIBOLDI, A.P. FRAZZON, J. FRAZZON. Desenvolvimento de método diagnóstico baseado na técnica de RAPD-PCR para diferenciar linhagens de *Enterococcus faeium* e *Enterococcus faecalis* resistentes a ampicilina, In: XXI Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (Fesbe), 2006, Águas de Lindóia, Brasil.

G.P. RIBOLDI, A.P. FRAZZON, P.A. D’AZEVEDO, J. FRAZZON. Molecular characterization of *Enterococcus spp.* isolated from *in natura* food and dairy products in southern Brazil through the RAPD-PCR technique. In: VIII Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre, Brasil.

B.A. GAMA, **G.P. RIBOLDI**, C.G. BIERHALS, J. FRAZZON, A.P. FRAZZON, P.A. D’AZEVEDO. Análise molecular dos genes de resistência antimicrobiana e de virulência do microrganismo *Enterococcus spp.*

In: VIII Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre, Brasil.

G.P. RIBOLDI, A.P. FRAZZON, P.A. D’AZEVEDO, J. FRAZZON. Caracterização molecular e avaliação da rota de transmissão de *Enterococcus spp.* a partir de alimentos. In: VII Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre, Brasil.

E.P. de MATOS, **G.P. RIBOLDI**, J. FRAZZON, A.P. FRAZZON. Análise da rota de transmissão de *Enterococcus spp.* em infecções nosocomiais a partir de alimentos. In: XVIII Salão de Iniciação Científica (SIC-UFRGS), 2006, Porto Alegre, Brasil.

G.P. RIBOLDI. Isolation, characterization and antimicrobial resistance determination in *Enterococcus spp.* from in natura food and dairy products in southern Brazil.. In: I Congresso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria, 2006, Sevilla, Espanha.

G.P. RIBOLDI. Produção de beta-lactamase em *Haemophilus spp.* e resistência aos antimicrobianos em um hospital geral de Porto Alegre, RS (2001-2005). In: 39° Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2005, Curitiba, Brasil.

G.P. RIBOLDI, E.L. PEDRAZZA, R.S. SILVA, J.J.F. SARKIS, I. IZQUIERDO, G.S. PEREIRA, C.D. BONAN, A.M.O. BATTASTINI. Memory consolidation in posterior cingulate cortex requires a different Task-dependent involvement of adenosine A1 receptors.. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2003, Caxambu, Brasil.

E.L. PEDRAZZA, **G.P. RIBOLDI**, C.D. BONAN, G.S. PEREIRA, A.M.O. BATTASTINI, I. IZQUIERDO, J.J.F. SARKIS. Participação de ectonucleotidases hipocâmpais na evocação de uma tarefa de aprendizado não-associativo em ratos. In: XVIII Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), 2003, Curitiba, Brasil.

E.L. PEDRAZZA, **G.P. RIBOLDI**, I. IZQUIERDO, C.D. BONAN, A.M.O. BATTASTINI, J.J.F. SARKIS. Efeito da sessão de teste na atividade de ectonucleotidases em hipocampo de ratos submetidos à tarefa de habituação em campo aberto. In: IV Salão de Iniciação Científica da PUC-RS (SIC-PUCRS), 2003, Porto Alegre, Brasil.

G.P. RIBOLDI, I. IZQUIERDO, C.D. BONAN, A.M.O. BATTASTINI, J.J.F. SARKIS. Ingesta materna de cafeína diminui a hidrólise de nucleotídeos em fatias de hipocampo de ratos neonatos. In: IV Salão de Iniciação Científica da PUC-RS (SIC-PUCRS), 2003, Porto Alegre, Brasil.

G.P. RIBOLDI, R.S. SILVA, G.P. COGNATO, A.M.O. BATTASTINI, J.J.F. SARKIS, D.R. LARA, C.D. BONAN. Evidências para um efeito do MK-801 (Maleato de Dizolcipina) sobre a produção de adenosina a partir da via das ectonucleotidases. In: XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS (SIC-UFRGS), 2003, Porto Alegre, Brasil.

E.L. PEDRAZZA, **G.P. RIBOLDI**, A.M.O. BATTASTINI, J.J.F. SARKIS, G.S. PEREIRA, I. IZQUIERDO, C.D. BONAN. Estudo da atividade das ectonucleotidases hipocâmpais após a sessão de teste em ratos submetidos à tarefa de habituação ao campo aberto. In: XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS (SIC-UFRGS), 2003, Porto Alegre, Brasil.

G.P. RIBOLDI, R.S. SILVA, A.N. BRUNO, A.M.O. BATASTINI, J.J.F. SARKIS, D.R. LARA, C.D. BONAN. Efeito da cafeína sobre a hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas de hipocampo e estriado de ratos. In: XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS (SIC-UFRGS), 2002, Porto Alegre, Brasil.

E.L. PEDRAZZA, **G.P. RIBOLDI**, J.J.F. SARKIS, I. IZQUIERDO, C.D. BONAN, A.M.O. BATTASTINI. Efeito da habituação em campo aberto na atividade das ectonucleotidases em hipocampo e córtex parietal de ratos. In: XIV salão de iniciação científica da UFRGS (SIC-UFRGS), 2002, Porto Alegre, Brasil.

G.P. RIBOLDI, E.L. PEDRAZZA, A.M.O. BATTASTINI, I. IZQUIERDO, J.J.F. SARKIS, C.D. BONAN. Efeito da habituação em campo aberto na atividade das ectonucleotidases em hipocampo e córtex parietal de ratos. In: IV Salão de Iniciação Científica da PUC-Rs (SIC-PUCRS), 2002, Porto Alegre, Brasil.

G.P. RIBOLDI, E.L. PEDRAZZA, J.J.F. SARKIS, I. IZQUIERDO, A.M.O. BATTASTINI, C.D. BONAN. Effect of habituation to an open field on ectonucleotidase activities in hippocampus and parietal córtex of rats. In: In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2002, Caxambu, Brasil.