

# Perfil genotípico de *Enterococcus faecalis* isolados de carne de frango e de infecção urinária pela técnica molecular RAPD-PCR

Arthur Guedes Costa<sup>1</sup>,  
Ana Paula Guedes Frazzon<sup>4</sup>,  
Pedro Alves D'Azevedo<sup>2</sup>,  
Jeverson Frazzon<sup>3</sup>,  
Sueli Teresinha Van Der Sand<sup>4</sup>

[jeverson.frazzon@ufrgs.br](mailto:jeverson.frazzon@ufrgs.br), [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br)

## RESUMO

*Enterococcus faecalis* são importantes patógenos hospitalares com uma notável capacidade de expressar resistência a vários agentes antimicrobianos. Sua natureza ubíqua e resistência às condições ambientais adversas o torna de fácil propagação através da cadeia alimentar. Devido a isso, o presente estudo investigou a variabilidade genética de 38 isolados de *E. faecalis* oriundos de carne de frango e de infecção urinária, pela técnica de RAPD-PCR. Para tanto foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador M13 para verificar a existência de uma correlação genotípica entre os isolados. O dendrograma formado a partir do perfil RAPD-PCR dos isolados gerou 3 grupos (A, B e C). O grupo A foi composto de aproximadamente 74% (28/38) dos isolados clínicos e alimentares com perfil de multi-resistência a antimicrobianos e com 88% de similaridade. O grupo A foi subdividido em I e II, onde no sub-grupo I estão agrupados todos os isolados clínicos e o sub-grupo II foi composto pela maioria dos isolados alimentares de *E. faecalis*. O grupo B foi composto de 21% (8/38) dos isolados clínicos e alimentares com 90% de similaridade e subdividido em III, IV e V. O sub-grupo III foi formado por 2 isolados com perfil genético semelhante, sendo um proveniente de infecção urinária (EFAE1260) resistente à eritromicina, e outro proveniente de carne de frango (EFAECL52) sensível a todos os antimicrobianos. No sub-grupo IV com 100% de similaridade estão duas amostras provenientes de infecção urinária, com perfil de resistência à tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacino. Quatro isolados geneticamente idênticos, 3 provenientes de carne de frango (dois sensíveis a todos os antimicrobianos testados e 1 resistente à eritromicina) e 1 de infecção urinária (multi-resistente), se agruparam no sub-grupo V. O grupo C foi formado pelos isolados identificados como *Enterococcus* spp. Os isolados EFAEC617 e EFAECL51 se agruparam aos demais isolados com 80% de similaridade. Os resultados observados revelam que a técnica de RAPD-PCR pode ser empregada para estudos genotípicos de espécies de enterococos isoladas de diferentes ambientes, como as amostras clínicas e alimentares. Ainda com os resultados obtidos é possível observar que uma rota de transmissão de *Enterococcus faecalis* resistentes possa estar ocorrendo dos alimentos para humanos. Unitermos: Carne de frango, *Enterococcus faecalis*, infecção urinária, RAPD-PCR, resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* are important hospital pathogens with a remarkable ability to express resistance to multiple antimicrobial agents. Their ubiquitous nature and resistance to adverse environmental conditions makes it easy to spread through the food chain. Because of this, the present study investigated the genetic variability of 38 *E. faecalis* strains resistant to antibiotics from chicken meat and urinary tract infection by RAPD-PCR. For this, oligonucleotide primer M13 were used to verify the existence of a genetic correlation between the isolated. The dendrogram formed from RAPD-PCR profile, generated 3 groups (A, B and C). Group A was composed of approximately 74% (28/38) clinical and food isolated with multi-resistance profile to antibiotics and with 88% of similarity. Group A was subdivided into I and II, where the sub-group I are grouped all clinical isolated and the sub-group II was composed by the majority of food isolated of *E. faecalis*. Group B was composed of 21% (8/38) of clinical and food isolated with 90% similarity and it was subdivided into III, IV and V. The sub-group III was formed by two strains with similar genetic profile, one from urinary tract infection (EFAE1260) resistant to erythromycin, and another from chicken meat (EFAECL52) sensitive to all antibiotics tested. In sub-group IV with 100% similarity are two samples from urinary tract infection, with profile of resistance to tetracycline, erythromycin and ciprofloxacin. Four isolated genetically identical, three from chicken meat (two sensitive to all antibiotics tested and 1 resistant to erythromycin) and 1 of urinary tract infection (multi-resistant), were grouped in the sub-group V. Group C was formed by isolated identified as *Enterococcus* spp. The isolated EFAEC617 and EFAECL51 joined to other isolated with 80% similarity. The results observed show that the technique of RAPD-PCR can be used for studies of genotypic species of enterococci isolated from different environments, such as food and clinical specimens. Even with the results can be seen that a route of transmission of resistant *Enterococcus faecalis* may be experiencing food for humans. Key words: Chicken meat, *Enterococcus faecalis*, urinary infection, RAPD-PCR, antimicrobial resistance.

## INTRODUÇÃO

*Enterococcus* spp. são um grupo importante de bactérias ácido-láticas (LAB) (Moreno et al. 2006). São

cocos Gram-positivos que geralmente se dispõem em pares e cadeias curtas, são anaeróbios facultativos e a temperatura ótima de crescimento é 35°C, embora possam se desenvolver entre 10°C a 45°C. Estão

<sup>1</sup>Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. <sup>2</sup>Professor adjunto do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil. <sup>3</sup>Professor do Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. <sup>4</sup>Professor do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser encontrados em fontes como solo, água e plantas. São microrganismos comensais que colonizam o trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente (Mundt 1961,1963). Podem ser isolados de diferentes tipos de alimentos, como carnes, leite e queijos onde são empregados como culturas “starters” sendo responsáveis por características organolépticas (Moreno et al. 2006). Entretanto, a presença destes microrganismos nos produtos finais pode também estar relacionada com condições de baixa higiene durante o processamento do alimento, como indicador de contaminação fecal (Stiles & Holzapfel 1997). *Enterococcus* spp. podem ser cultivados na presença de 6,5% de NaCl, toleram sais biliares a 40% e podem hidrolisar a esclulina (Levinson & Jawetz 2005). O gênero *Enterococcus* é composto de mais de 20 espécies. As mais importantes são *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* e *E. hirae* (Moreno et al. 2006). Dentre estas espécies descritas, *E. faecalis* é uma das mais prevalente em amostras de fezes de seres humanos, bem como de uma variedade de animais (Graham 1968). Na área médica *E. faecalis* e *E. faecium* são encontradas como sendo as principais causadoras de infecções em humanos, estas espécies já foram encontradas em 80-90% e 5-10% dos isolados clínicos, respectivamente (Kayser 2003). As infecções urinárias, bacteremia, endocardite e pneumonia ocorrem em pacientes internados, freqüentemente após procedimentos cirúrgicos (Murray et al. 1998). Paralelamente ao aumento da incidência de *Enterococcus* spp. nos isolados clínicos, tem se observado um rápido aumento na freqüência de cepas resistentes aos antimicrobianos de uso corrente (Willey et al. 1994). Dados revelaram que *E. faecalis*, especialmente as cepas multi-resistentes a drogas estão aumentando de número (Huycke et al. 1998). A crescente importância dos enterococos como patógenos nosocomiais pode ser atribuída, em parte, à habilidade natural deste microrganismo em adquirir plasmídeos, ou seja, elementos extra-cromossômicos que codificam características que permitem a sobrevivência ou vantagens quanto ao crescimento em ambientes não usuais e/ou estressantes, como o ambiente hospitalar (Mundy et al. 2000).

Enterococos resistentes aos antimicrobianos já foram isolados de produtos cárneos, lácteos, verduras e alimentos prontos para comer (Franz et al. 2001; Riboldi et al. 2008). Estudos sobre a cadeia epidemiológica têm mostrado que alimentos, principalmente de origem animal, podem ser reservatórios de enterococos resistentes, e assim, contribuir para a propagação da resistência antimicrobiana à população humana via cadeia alimentar (Bertrand et al. 2000).

A diferenciação entre as espécies de microrganismos através de métodos baseados apenas nas propriedades fenotípicas dos mesmos não proporcionam um potencial de resolução satisfatório. Estes métodos são incapazes de detectar alterações no genoma bacteriano, que podem ocorrer em uma mesma espécie via aquisição de plasmídeos ou mutações genéticas espontâneas, sem que haja alteração do fenótipo (On & Baggesen 1997).

Atualmente, técnicas modificadas da reação em cadeia da polimerase (PCR), como a amplificação aleatória de fragmentos de DNA (RAPD), têm demonstrado boa aplicabilidade para estudos de variabilidade genotípica e estudos epidemiológicos (Hilton et al. 1998; Nallapareddy et al. 2002). Apesar de não ser a técnica ouro para genotipagem de *Enterococcus* spp. a mesma apresenta várias vantagens práticas, que podem ser resumidas em simplicidade e rapidez. Outras vantagens são a quantidade mínima de DNA necessária para realizar uma análise genotípica e não necessitar de instalações sofisticadas de laboratório. Como já demonstrado com estudos utilizando *Enterococcus* spp. é uma tecnologia bastante acessível além de reprodutível (Teixeira et al. 1995; Moschetti et al. 2001; Riboldi et al. 2008). O oligonucleotídeo M13 tem sido utilizado por gerar um padrão de fragmentos de DNA espécie-específico e por detectar variabilidades interespecies (Suzzi et al. 2000; Riboldi et al. 2008; Gomes et al. 2008). Desta maneira, a finalidade do presente estudo foi investigar a variabilidade genética das linhagens de *Enterococcus faecalis*, resistentes a antimicrobianos, isolados de carne de frango e infecção urinária, no município de Porto Alegre - RS, pela técnica de RAPD-PCR e analisar se existe uma correlação entre os genótipos através da comparação do padrão de DNA.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras:

Foram estudados 40 isolados de enterococos, 38 da espécie *E. faecalis* e 2 *Enterococcus* spp. Todas as amostras apresentavam perfis de resistência a antimicrobianos previamente avaliados segundo as normas do NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Vinte isolados de *E. faecalis* (Tabela 1) foram obtidos de pacientes com infecção urinária hospitalizados em Porto Alegre-RS-Brasil, e cedidas pela bacterioteca do Departamento de Microbiologia da UFCSPA e 18 isolados de *E. faecalis* e 2 identificados como *Enterococcus* spp. de amostras de carne de frango (Tabela 2) foram obtidos da bacterioteca do Departamento de Microbiologia da UFRGS. A confirmação do gênero foi realizada previamente por caracterização molecular utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *tuf*, segundo Ke et al. (1999).

### Extração do DNA:

O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando-se a técnica da lise térmica (Hagen et al. 2002). Com auxílio de uma alça, previamente flambada, os isolados de *E. faecalis* e *Enterococcus* spp. foram inoculados em placas de Petri contendo meio ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubados por aproximadamente 24 h a 37°C. Para a extração do DNA foi coletado uma colônia de cada isolado e estas foram ressuscitadas em tubo de microcentrífuga contendo aproximadamente 100 µL de água estéril. Os tubos foram incubados em banho contendo água a uma temperatura de aproximadamente 100°C por 5 minutos. Após foram centrifugados por 10

minutos a 13000 rpm, 3  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante, contendo o DNA genômico, foi utilizado na reação de amplificação por PCR.

### Análise genotípica dos isolados por RAPD-PCR

Para a reação da RAPD-PCR, o oligonucleotídeo iniciador M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Huey & Hall 1989) foi usado. O volume final da reação foi de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 3 ng de DNA, 1U *Taq* DNA-polimerase (CENBIOT®), 3,0 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen™), 2,4  $\mu\text{M}$  do oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen™), 200  $\mu\text{M}$  dNTPs (Invitrogen™), e 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl. Como controle negativo foi realizada a reação sem a inclusão de DNA. As reações foram incubadas em termociclador (Eppendorf AG) e a condição de amplificação para o oligonucleotídeo iniciador utilizado seguiu o modelo descrito a seguir: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 37°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, após os ciclos, foi realizado um período final de alongação de 5 minutos a 72°C. Os produtos amplificados e o marcador 1 Kb plus DNA Ladder (invitrogen™) foram separados por eletroforese a 80V por 60 minutos em gel de agarose 1.5% (p/v) corado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em tampão TAE (1 X). O gel foi fotografado sob luz UV utilizando o *software* Kodak Digital Science™ DC120, as imagens foram capturadas e o padrão de fragmentos de DNA foi analisado. A reação de amplificação foi repetida seis vezes em experimentos separados para cada uma das amostras a fim de verificar a reprodutibilidade da técnica de RAPD-PCR.

### Determinação do peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados e análise estatística dos dados:

A determinação do peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada através de *softwares* que analisa os fragmentos em géis de agarose (Gel Analyzer-Pro 3.2 e Kodak EDAS 120).

A similaridade entre as amostras foi calculada pelo coeficiente de associação simples. A análise de agrupamento foi realizada por *Unweight pair group method with arithmetic mean* (UPGMA). A presença ou ausência dos fragmentos de DNA geradas pela RAPD-PCR foi considerada como uma característica alternativa e codificada com 1 (presença) ou zero (ausência). Os dendrogramas foram construídos a partir dos dados gerados usando o *Statistic Package of the Social Science (SPSS) 8<sup>th</sup> edition*.

## RESULTADOS

A diversidade genotípica dos 40 isolados resistentes a antimicrobianos foi realizada utilizando a análise de RAPD-PCR. O oligonucleotídeo iniciador M13 produziu 1 a 3 fragmentos de DNA reprodutíveis e de intensidade forte, os quais foram selecionados para as análises (Figura 1). Na maioria dos isolados foram observados os fragmentos de DNA de 850 e 1000 pares de base (Figura 2A). A análise do coeficiente de similaridade entre os isolados foi de 100% a 80%. O dendrograma formado a

partir do perfil RAPD-PCR gerou 3 grupos (A, B e C) com similaridade de 80 % entre eles, com 100 % de homologia, como mostra a figura 2B. O grupo A foi composto de aproximadamente 74% (28/38) dos isolados clínicos e alimentares de *E. faecalis* multi-resistentes a maioria tinha em comum a resistência à tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacino. Este grupo se dividiu em dois sub-grupos (I e II) ambos apresentam 100% de similaridade. O sub-grupo I representa 60% (12/20) dos isolados provenientes de pacientes com infecção urinária e o sub-grupo II apresenta aproximadamente 67% (12/18) dos isolados provenientes de carne de frango e 10% (2/20) de infecção urinária. A amostra EFAECL14 agrupou-se a ambos sub-grupos com similaridade de 93%. A amostra clínica EFAEC581 participa do grupo A com 88% de similaridade. O grupo B é composto de 21% (8/38) dos isolados de *E. faecalis*, a maioria sensível ou resistente a um antimicrobiano, com exceção de três amostras clínicas (EFAEC603, EFAE1225 e EFAE1252) que eram multi-resistentes e tinham em comum a resistência à tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacino. Este grupo se dividiu em três sub-grupos (III, IV e V). O grupo III foi formado por 2 isolados com perfil genético semelhante, sendo um proveniente de infecção urinária (EFAE1260) resistente à eritromicina, e outro proveniente de carne de frango (EFAECL52) sensível a todos os antimicrobianos. No grupo IV com 100 % de similaridade estão duas amostras provenientes de infecção urinária, com perfil de resistência à tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacino. Quatro isolados geneticamente idênticos, 3 provenientes de carne de frango, sendo dois sensíveis aos antimicrobianos testados e 1 resistente à eritromicina, e 1 de infecção urinária multi-resistente, se agruparam no sub-grupo V. O grupo C foi formado pelos isolados identificados como *Enterococcus* spp. Os isolados EFAEC617 e EFAECL51 se agruparam ao demais isolados com 80% de similaridade.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo, foi observada uma elevada similaridade entre as amostras clínicas e alimentares de *E. faecalis*. A técnica de RAPD-PCR foi utilizada por ser uma ferramenta já descrita em outros estudos que buscavam observar variabilidade genética em isolados de enterococos de amostras de alimentos e clínicas (Descheemacker et al. 1997; Suzzi et al. 2000; Vancanneyt et al. 2002; Domig et al. 2003; Riboldi et al. 2008). Métodos genéticos baseados na biologia molecular têm sido desenvolvidos para identificação e sub-tipagem de microrganismos, pois são ferramentas que fornecem resultados mais rápidos e mais seguros (Giraffa et al. 2000; Suzzi et al. 2000; Gelsomino et al. 2001).

O oligonucleotídeo M13 apresentou resultados satisfatórios para o estudo do perfil genético dos isolados de *E. faecalis* visto que o padrão dos fragmentos de DNA foram reprodutíveis nas 6 repetições. Os sub-grupos I e IV foram formados apenas de amostras clínicas multi-resistentes sugerindo a presença de amostras clonais no ambiente hospitalar. Nos sub-grupos II, III e V os

isolados de *E. faecalis* clínicos e de carne de frango apresentavam o mesmo perfil genético. Um estudo semelhante foi realizado na Holanda, no período de junho a setembro de 1996 com amostras de frango adquiridas em mercados deste país que foram comparadas com amostras isoladas de pacientes hospitalizados através da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsante (PFGE). A comparação dos padrões de fragmentos de DNA gerados pelo PFGE entre os isolados demonstrou uma homologia de 60 % entre algumas cepas (Van Den Braak et al. 1998).

Dois isolados pertencentes ao gênero *Enterococcus* e os isolados EFAEC617 e EFAECL51 identificados bioquimicamente como *E. faecalis* apresentaram um perfil genotípico distinto dos demais isolados de *E. faecalis*. O resultado encontrado no presente estudo pode sugerir que estes isolados pertencem a uma outra espécie. Um estudo do perfil proteico destes isolados poderia auxiliar na identificação da espécie, entretanto se os resultados confirmarem a espécie estes isolados poderão ser classificados como *E. faecalis* atípicos. Riboldi et al. (2008) utilizaram o mesmo oligonucleotídeo e observaram através do perfil dos fragmentos de DNA que o oligonucleotídeo M13 era espécie-específico e esta técnica permitiu diferenciar as amostras de *Enterococcus spp.* isolados de alimentos no sul do Brasil.

Não houve correlação do perfil genotípico gerado por RAPD-PCR com o perfil fenotípico de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados analisados. A seguinte correlação poderia ser investigada com a utilização de múltiplos oligonucleotídeos iniciadores a fim de aumentar o número de fragmentos de DNA e melhorar a discriminação (Barbier et al. 1996).

Os resultados do trabalho revelam que a técnica de RAPD-PCR, empregando o oligonucleotídeo M13, pode ser empregada na identificação das espécies de enterococos isoladas dos mais diferentes ambientes, como as amostras clínicas e alimentares. Este resultado levanta a hipótese de que uma possível rota de transmissão de *Enterococcus spp.* resistentes a antimicrobianos através dos alimentos de origem animal para humanos pode ter ocorrido.

#### Referências Bibliográficas:

BARBIER, N. et al. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, Paris, v. 34, n. 5, p.1096-1099, mai. 1996.

BERTRAND, X. et al. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. *Food Microbiology*, Besancon, v. 17, n. 5, p. 543-551, out. 2000.

DESCHEEMAECCKER, P. et al. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Ghent, v. 47, n. 2, p. 555-561, abr. 1997.

DOMIG, KJ. et al. Methods used for isolation, enumeration, characterization and identification of

*Enterococcus spp.* 2. Pheno-and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, Vienna, v. 88, n. 2-3, p. 165-188, dez. 2003.

FRANZ, CMAP. et al. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, Ghent , v. 67, p. 4385-4389, set. 2001.

GELSOMINO, R. et al. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal of Food Microbiology*, Cork, v. 71, n. 2-3, p. 177-188, dez. 2001.

GIRAFFA, G. et al. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiology*, Lodi, v. 17, n. 6, p.671-677, dez. 2000.

GOMES, BC. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, Lodi, v. 25, n. 5, p.668-675, ago. 2008.

HAGEN, RM. et al. Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. *Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology*, Munich, v. 55, n. 6, p.398-400, dez. 2002.

HILTON, AC and PENN, CW. Comparison of ribotyping and arbitrarily primed PCR for molecular typing of *Salmonella enterica* and relationships between strains on the basis of these molecular markers. *Journal of Applied Microbiology*, Midlands, v. 85, n. 6, p.933-940, dez. 1998.

HUEY, B and HALL, J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli* minisatellite probe from bacteriophage M13. *Journal of Bacteriology*, Berkeley, v. 171, n. 5, p.2528-2532, mai. 1989.

HUYCKE, MM. et al. Multiple-drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases*, Oklahoma, v.4, n. 2, p.239-249, abr./jun. 1998.

IVERSEN, A. et al. Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environmental Microbiology*, Stockholm, v. 6, n. 1, p.55-59, jan. 2004.

KAYSER, FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*, Zurich, v. 88, n. 2-3, p.255-262, dez. 2003.

KE, DB. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, Quebec, v. 37, n. 11, p.3497-3503, nov. 1999.

LEVINSON, W. and JAWETZ, E. Microbiologia Médica e Imunologia. trad. José Procópio M. Senna, 7ª ed., Porto Alegre: Artmed, 451pp, 2005.

MORENO, MRF. et al. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, Brussels, v. 106, n. 1, p.1-24, jan. 2006.

MOSCHETTI, G. et al. Comparison of statistical methods for identification for *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from randomly amplified polymorphic DNA patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, Potenza, v. 67, n. 5, p.2156-2166, mai. 2001.

- MUNDY, LM. et al. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, St. Louis, v.13, n. 4, p. 513-522, out. 2000.
- MUNDT, JO. et al. Occurrence of enterococci - bud, blossom and soil studies. *Applied Microbiology*, v. 9, n. 6, p.541-&, 1961.
- MUNDT, JO. And GRAHAM, WF. Streptococcus faecium var. Casseliflavus nov. var. *Journal of Bacteriology*, v. 95, n. 6, p.2005-&, 1968.
- MURRAY, BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases*, Houston, v. 4, n. 1, p.37-47, jan./mar. 1998.
- NALLAPAREDDY, SR. et al. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: Pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, Houston, v. 40, n. 3, p.868-876, mar. 2002.
- ON, SLW and BAGGESEN, DL. Determination of clonal relationships of *Salmonella typhimurum* by numerical analysis of macrorestriction profiles. *Journal of Applied Microbiology*, Copenhagen, v. 83, n. 6, p.699-706, dez. 1997.
- RIBOLDI, GP. et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, Porto Alegre, v. 48, n. 1, p.31-37, fev. 2008.
- STILES, ME and HOLZAPFEL, WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, Karlsruhe, v. 36, n. 1, p.1-29, abr. 1997.
- SUZZI, G. et al. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, Bologna, v. 89, n. 2, p.267-274, ago. 2000.
- TEIXEIRA, LM. et al. Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Atlanta, v. 33, n. 6, p.1520-1523, jun. 1995.
- VAN DEN BRAAK, N. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, Rotterdam, v. 36, n. 7, p.1927-1932, jul. 1998.
- VANCANNEYT, M. et al. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, Ghent, v. 68, n. 3, p.1381-1391, mar. 2002.
- WILLEY, BM. Et al. The use of molecular typing techniques in the epidemiologic investigation of resistant enterococci. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, Ontario, v. 15, n. 8, p.548-556, ago. 1994.

Tabela 1. Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados de *E.faecalis* oriundos de pacientes hospitalizados com infecção urinária.

Isolados	Tet. <sup>a</sup>	Vanco. <sup>b</sup>	Amp. <sup>c</sup>	Imp. <sup>d</sup>	Gent. <sup>e</sup>	Clo. <sup>f</sup>	Estrep. <sup>g</sup>	Cip. <sup>h</sup>	Eri. <sup>i</sup>	Norf. <sup>j</sup>	Nit. <sup>k</sup>
EFAEC498	I	S	S	S	R	I	S	I	R	R	S
EFAEC507	S	S	S	S	S	S	R	R	I	I	S
EFAEC529	R	S	S	S	S	S	S	I	I	I	S
EFAEC581	R	S	S	S	S	R	R	I	R	I	S
EFAEC598	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
EFAEC603	R	S	S	S	S	R	R	I	R	S	S
EFAEC617	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
EFAEC619	I	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S
EFAEC621	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S
EFAEC625	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S
EFAEC633	R	S	S	S	I	R	I	I	R	S	S
EFAE1225	R	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
EFAE1240	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S
EFAE1244	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S
EFAE1246	R	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
EFAE1251	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S
EFAE1252	I	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
EFAE1255	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
EFAE1260	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
EFAE1291	R	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S

<sup>a</sup>Tetraciclina; <sup>b</sup>Vancomicina; <sup>c</sup>Ampicilina; <sup>d</sup>Imipenem; <sup>e</sup>Gentamicina; <sup>f</sup>Cloranfenicol; <sup>g</sup>Estreptomicina; <sup>h</sup>Ciprofloxacino; <sup>i</sup>Eritromicina; <sup>j</sup>Norfloxacino; <sup>k</sup>Nitrofurantoína; R= resistente; I= intermediário; S= sensível.

Tabela 2. Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados de *E.faecalis* e *Enterococcus* spp. provenientes de carne de frango.

Isolados	Tet. <sup>a</sup>	Vanco. <sup>b</sup>	Amp. <sup>c</sup>	Imp. <sup>d</sup>	Gent. <sup>e</sup>	Clo. <sup>f</sup>	Estrep. <sup>g</sup>	Cip. <sup>h</sup>	Eri. <sup>i</sup>	Norf. <sup>j</sup>	Nit. <sup>k</sup>
EFAECL2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EFAECL4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EFAECL5	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
EFAECL14	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
EFAECL15	R	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
EFAECL17	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
EFAECL18	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EFAECL19	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
EFAECL22	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
EFAECL24	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
EFAECL27	R	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
EFAECL32	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
EFAECL34	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
EFAECL36	R	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S
EFAECL37	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EFAECL42	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
EFAECL47	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
EFAECL50	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EFAECL51	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
EFAECL52	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

<sup>a</sup>Tetraciclina; <sup>b</sup>Vancomicina; <sup>c</sup>Ampicilina; <sup>d</sup>Imipenem; <sup>e</sup>Gentamicina; <sup>f</sup>Cloranfenicol; <sup>g</sup>Estreptomicina; <sup>h</sup>Ciprofloxacino; <sup>i</sup>Eritromicina; <sup>j</sup>Norfloxacino; <sup>k</sup>Nitrofurantoína; R= resistente; I= intermediário; S= sensível.

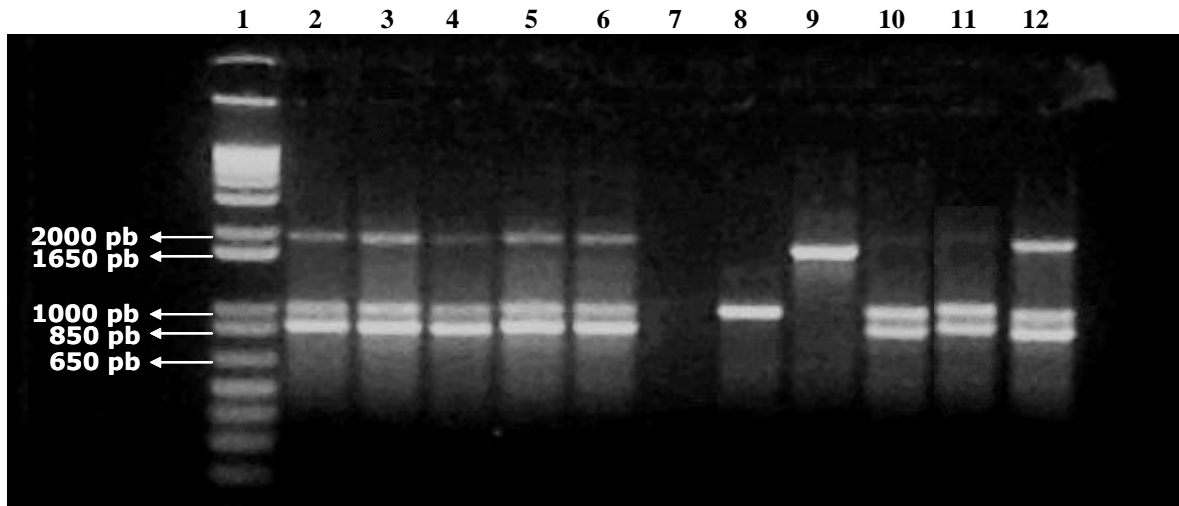


Figura 1. Fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR, utilizando o oligonucleotídeo iniciador M13, aplicados em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídio ( $0,5\mu\text{g mL}^{-1}$ ). (1) Marcador 1 kb plus DNA ladder; (2) *E. faecalis* EFAECL17; (3) *E. faecalis* EFAECL18; (4) *E. faecalis* EFAECL19; (5) *E. faecalis* EFAECL22; (6) *E. faecalis* EFAECL24; (7) Controle negativo; (8) *E. faecalis* EFAEC603; (9) *E. faecalis* EFAEC617; (10) *E. faecalis* EFAEC619; (11) *E. faecalis* EFAEC621; (12) *E. faecalis* EFAEC625.

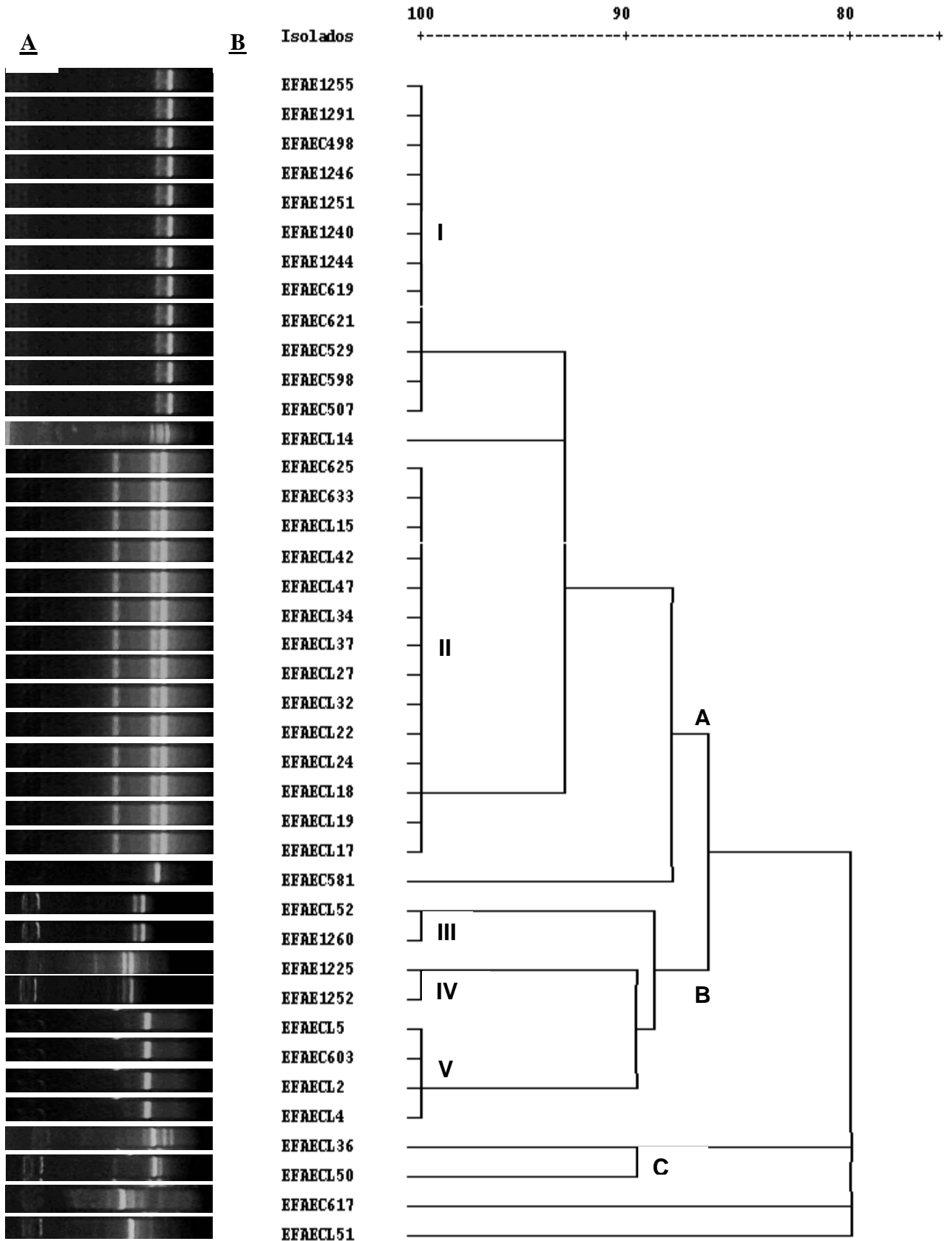


Figura 2: (A) Padrão de fragmentos de DNA amplificados, pela técnica de RAPD-PCR, dos isolados de *E. faecalis* (B) Dendrograma obtido pelo método average linkage a partir da análise numérica dos fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR.