

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de  
*Enterococcus* spp.**

**BIANCA ALMEIDA GAMA**

**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, Janeiro de 2008.**

**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).**

## **AGRADECE**

Atravessaste provas  
Que não imaginavas...  
Deixaste para trás  
Tantas dificuldades...  
Venceste desafios  
Que quase te arrasaram...  
Sustentaste o equilíbrio  
Ante a queda iminente...  
Lutaste a vida inteira,  
Sempre fiel ao bem...  
Agradece ao Senhor,  
Que te amparou as forças.

**Irmão José**

Autor: Francisco Cândido Xavier

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus por ter me concedido a vida, e permitir que hoje eu atinja mais um objetivo nesta caminhada e ao lado de pessoas tão especiais.

Ao orientador, Dr. Jeverson Frazzon, pela orientação, dedicação, atenção e apoio científico.

Aos co-orientadores Dr. Pedro D'Azevedo e Dra. Ana Paula Frazzon pela disponibilidade e apoio científico.

Aos membros da minha Comissão de acompanhamento, Dr. Rogério Margis e Dr. Marco Antonio Zachia Ayub.

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

Um especial agradecimento: ao colega Gustavo Riboldi que sempre me auxiliou e me ensinou muitas técnicas laboratoriais, a minha querida amiga e competente bolsista Chris pela sua dedicação e ajuda na realização dos experimentos e finalmente a minha colega e amiga Fernanda pela amizade e apoio irrestrito.

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

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

Ao revisor desta dissertação, prof. Dr. Adriano Brandelli, pela atenção e sugestões apresentadas.

Finalmente, e principalmente, à minha família (meus pais, Paulo e Vera, e irmão, Márcio, cunhada Cleonice e meu querido afilhado Marcelinho) e ao Gustavo, por nunca permitir que eu desanimasse, por sempre confiar em mim, pelo apoio irrestrito, compreensão, consideração, amor, amizade, dedicação, paciência. Nada disso seria possível, sem vocês, amores da minha vida.

Muito Obrigada.

## ÍNDICE

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1- Importância dos <i>Enterococcus</i> spp. em alimentos</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.1 - Culturas Iniciadoras (starters)</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.2 - <i>Enterococcus</i> spp. como probiótico</b> .....	<b>12</b>
<b>3 - CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>Enterococcus</i> spp.</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 - Resistência Bacteriana</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2 - Resistência em microrganismos do gênero <i>Enterococcus</i> spp.</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2.1 - Resistência a <math>\beta</math>-lactâmicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2.2 - Resistência a aminoglicosídeos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.3 - Resistência a glicopeptídeos</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.4 - Resistência a tetraciclina</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.5 - Resistência ao cloranfenicol</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.6 - Resistência a macrolídeos</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.7 - Resistência a quinolonas</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.8 - Resistência a estreptograminas</b> .....	<b>25</b>
<b>4 - FATORES DE VIRULÊNCIA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1 - Hemolisina/Citolisina</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2 - Adesinas</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2.1 - Substância de agregação</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2.2 - Adesina de colágeno (Ace)</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.3 - Proteína de superfície de <i>Enterococcus</i> (Esp)</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3 - Gelatinase</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4 – Bacteriocinas</b> .....	<b>31</b>
<b>5 - DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Enterococcus</i> spp</b> .....	<b>32</b>
<b>6 - RESERVATÓRIOS NATURAIS</b> .....	<b>33</b>
<b>6.1 - Colonização e infecção por <i>Enterococcus</i> resistentes a antibióticos</b> .....	<b>34</b>
<b>7 - TRATAMENTO</b> .....	<b>34</b>

<b>8 - OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>8.1 - Objetivos específicos</b> .....	<b>36</b>
<b>9 - MÉTODOS E RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>9.1 - Manuscrito</b> .....	<b>38</b>
<b>9.2 - Figures and legends</b> .....	<b>54</b>
<b>10 - CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>
<b>11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>57</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS:**

- Ace** - *Adhesin to collagen;*
- β** - Beta;
- Agg** - Substância de agregação;
- ATP** - *Adenosine triphosphate;*
- Esp** - *Enterococci surface protein;*
- HLAR** - *High level aminoglycoside resistance;*
- LAP** - Leucina-aminopeptidase;
- kDa** - Kilo Dalton;
- MIC** - Concentração Mínima Inibitória;
- PBP** - Proteína de ligação a Penicilina
- PYR** - *Pirrolidonil-β-naftilamida;*
- TGI** - Trato gastrintestinal;
- TGU** - Trato geniturinário;
- UTI** - Unidade de Tratamento Intensivo;
- VRE** - *Enterococcus* resistente a Vancomicina ;

## RESUMO

As bactérias do gênero *Enterococcus* spp. estão amplamente distribuídas na natureza, atuando como patógenos oportunistas e freqüentemente causam infecções em pacientes imunocomprometidos. Uma característica destes microrganismos é a resistência intrínseca a muitos dos antimicrobianos utilizados habitualmente no tratamento de infecções por cocos Gram positivos. Por outro lado, os Enterococos têm adquirido diferentes determinantes genéticos que conferem resistência a vários antimicrobianos. Este trabalho tem como objetivo determinar a freqüência da resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (gentamicina), tetraciclina, bem como avaliar a diversidade genética das amostras, pesquisando os genes envolvidos na resistência, além de detectar o fator de virulência gelatinase em isolados clínicos e alimentares de *Enterococcus* spp. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana dos 52 isolados de alimentos revelaram que 7,7% (n=4) apresentaram resistência somente à tetraciclina, 5,8% (n=3) foram resistentes somente a gentamicina e 28,9% (n=15) apresentaram resistência a ambos antimicrobianos. Nos 40 isolados clínicos, 42,5% (n=17) foram resistentes a tetraciclina, 20% (n=8) resistentes a gentamicina e 17,5% (n=7) foram resistentes a ambos antimicrobianos. A pesquisa de genes de resistência em isolados alimentares revelou que 90% (n=17) dos microrganismos resistentes a tetraciclina apresentaram o gen *tet(M)*, e 100% das amostras resistentes a gentamicina apresentaram o gene *aac(6')-le-aph(2'')-Ia*. Entretanto, 30% dos microrganismos sensíveis apresentaram algum dos genes de resistência. Nos isolados clínicos 95,8% (n=23) das amostras resistentes a tetraciclina apresentaram o gene *tet(M)* e 100% dos Enterococos resistentes a gentamicina apresentaram o gen *aac(6')-le-aph(2'')-Ia*. No entanto, dos isolados que se mostraram sensíveis, 37,5% apresentaram algum dos genes de resistência analisados. Ainda, foi verificado que 78% (n=49) dos microrganismos isolados de alimentos hidrolisaram a gelatina, e somente 50% (n=20) dos isolados clínicos apresentaram a mesma atividade.

## ABSTRACT

Bacteria of the *Enterococcus* spp. genus are widely distributed in the natural environment, Enterococci are opportunistic pathogens, and often are the causal agents of infections in immunosuppressed patients. One of the remarkable characteristics of these microorganisms is the intrinsic resistance they offer against several of the antimicrobial agents routinely prescribed in the treatment of Gram-positive cocci. On the other hand, enterococci have been proved to acquire different genetic markers that lend resistance to a variety of other antimicrobial ,searching the involved genes in the resistance, besides detecting the virulence factor gelatinase in isolated of *Enterococcus spp.* from foods and humans samples.

This study aimed to determine the frequency of antimicrobial resistance against high concentrations of aminoglycosides (gentamicin), tetracycline, as well as assess the genetic diversity of microbial strains isolated from foods and humans. Antibiotic susceptibility tests of *Enterococcus* spp. isolated from food showed that of the 52 isolates, 7,7% (n=4) were tetracycline resistant, 5,8% (n=3) were resistant only the gentamicin and 28,9% (n=15) was resistant to both antibiotics. Already in 40 clinical samples 42,5% (n=17) of the samples were tetracycline resistant, 20% (n=8) were gentamicin resistant and 17,5% (n=7) were resistant to both antimicrobials. The research of genes of resistance in isolates from food disclosed that in 90% (n=17) of tetracycline resistant *Enterococcus* had the *tet(M)* gen, and 100% gentamicin resistant samples had *aac(6')-le-aph(2'')-Ia* gene and 30% of the sensible microorganism had presented some of the resistance genes. Already in clinical isolates 95,8% (n=23) tetracycline resistant samples contained the *tet(M)* gene and 100% of the gentamicin resistant enterococcus had presented gen *aac(6')-le-aph(2'')-Ia*; however 37,5% enterococcus sensible had presented some of the genes of resistance in research. In this work, also it was verified that 78% (n=49) of the foods isolates produced gelatinase, and 50% (n=20) of the clinical isolates demonstrated the capacity of degradation of the gelatin substrate.

## 1 - INTRODUÇÃO

A importância dos Enterococos foi reconhecida na década de 70, quando se identificou um grande número de infecções nosocomiais causadas por estes microrganismos, desencadeando um aumento do número de casos de endocardites, bacteremias, infecções do trato urinário e infecções neonatais. Simultâneo a este evento começou a surgir um grande número de linhagens multi-resistentes, principalmente, devido a sua capacidade de efetuar troca de determinantes de resistência com outros microrganismos (SCHABERG *et al.*, 1991; TAILOR *et al.*, 1993; DUTKA-MALEN *et al.*, 1994; VANCANNNEYT *et al.*, 2002; MCBRIDE *et al.*, 2007).

Bactérias do gênero *Enterococcus* foram consideradas por longo período, como pertencentes ao gênero *Streptococcus* possuidores do antígeno D, sendo inicialmente descritas como “estreptococos de origem fecal”. Após vários estudos sorológicos e técnicas moleculares modernas (estudos de hibridização DNA-DNA e seqüenciamento da subunidade 16S rRNA) evidenciou-se a grande distância genética existente entre estes dois grupos, sugerindo um novo gênero microbiano denominado *Enterococcus* spp.. A classificação foi proposta por Schleifer e incluía inicialmente as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (SCHLEIFER & KLIPPER-BÄLZ, 1984; DEVRIESE *et al.*, 1995; FORTINA *et al.*, 2004).

Os Enterococos são microrganismos comensais que atuam como patógenos oportunistas principalmente em pacientes idosos, com doença de base grave, imunocomprometidos, hospitalizados por longos períodos ou que fazem uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro. Nos Estados Unidos, os Enterococos tornaram-se o segundo microrganismo mais comumente isolado do trato urinário e de feridas e, a terceira causa mais comum de bacteremia hospitalar (HÖRNER *et al.*, 2005). O principal reservatório humano deste gênero é o trato gastrointestinal, porém ele pode ser encontrado, embora com menos frequência, em cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina (KONEMAN & CURY, 2001). Os mesmos ainda podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, pássaros e insetos (TEIXEIRA & FACKLAM, 2003). A maior parte das infecções por Enterococos origina-se da microbiota normal do paciente, embora os microrganismos possam ser transferidos de paciente para paciente ou adquiridos através do consumo de água

ou alimentos contaminados (MURRAY & TOROS, 2004). Em infecções humanas, as espécies mais freqüentemente isoladas são *E. faecalis* (aproximadamente 90%) e *E. faecium* (5-10%), isoladas em culturas puras ou mistas. No entanto, tem sido relatado o isolamento de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus raffinosus* como causa de infecções importantes em seres humanos. (RUOFF *et al.*, 1990; GORDON *et al.*, 1992; HSUEH *et al.*, 2000; TYRRELL *et al.*, 2002; MONDINO *et al.*, 2003). Através da análise comparativa da seqüência do rRNA 16S foi possível identificar 28 espécies: *Enterococcus asini*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus canis*, *E. casseliflavus*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus flavescens*, *E. gallinarum*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus emoraviensis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus phoeniculicola*, *Enterococcus pseudoavium*, *E. raffinosus*, *Enterococcus ratti*, *Enterococcus saccharolyticus*; *Enterococcus saccharominimus*, *Enterococcus solitarius*, *Enterococcus sulfureus* e *Enterococcus villorum* (HARDIE & WHILEY, 1997; MANERO & BLANCH, 1999; HSUEH *et al.*, 2000; TYRRELL *et al.*, 2002).

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1- Importância dos *Enterococcus* spp. em alimentos**

#### **2.1.1 - Culturas Iniciadoras (*starters*)**

Bactérias viáveis adicionadas a alimentos com a finalidade de melhorar a conservação, segurança e as características sensoriais são denominadas culturas "starter" ou iniciadoras (GONZALES-FERNANDEZ *et al.*, 1997; SMITH & PALUMBO, 1983). Os Enterococos

caracterizam-se como linhagens homofermentativas com o ácido láctico como produto final de fermentação da glicose, sem produção de gás o que diminui o pH e pode inibir microrganismos indesejáveis como *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Campylobacter jejuni*, além de conferir sabor ácido característico de produtos fermentados. A fermentação láctica é produzida não somente pelos *Lactobacillus*, mas também por outras bactérias pertencentes aos gêneros *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Enterococcus* spp.. Adicionalmente, as bactérias ácidas lácticas podem produzir substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, conferindo aos produtos maturados e queijos do tipo frescal melhor qualidade sanitária (BALDUINO *et al.*, 1999).

Estudos da microbiota de queijos tradicionais de países europeus situados na região do Mediterrâneo, que são produzidos a partir de leite proveniente de diversas espécies de animais, como bovinos, ovelhas e cabras têm demonstrado que Enterococos executam papel importante na maturação desses queijos, provavelmente resultante de sua atividade proteolítica, lipolítica e degradação do citrato, que contribuem para obtenção de aroma e sabor característico a esses queijos (BOUTON *et al.*, 1998; SUZZI *et al.*, 2000; GELSOMINO *et al.*, 2001; FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006). Sendo assim, essas características demonstram a capacidade destes microrganismos de atuarem de forma positiva em vista a sua atuação sob a modulação de propriedades e contribuindo para o desenvolvimento de aroma e sabor característico nos produtos, levando a uma qualidade diferenciada não só de queijos, mas também de outros produtos fermentados (FRANZ *et al.*, 2003).

### **2.1.2 - *Enterococcus* spp. como probiótico**

Probióticos podem ser definidos como monoculturas ou culturas mistas de microrganismos vivos que quando ingeridos pelo homem ou animal podem afetar de forma positiva, melhorando as propriedades da flora endógena do hospedeiro. Frequentemente são constituídos de espécies que fazem parte do habitat intestinal (HAVENAAR *et al.*, 1992; FRANZ *et al.*; 1999). A partir disso um probiótico pode ser definido como uma preparação de, ou produto

que contém microrganismos viáveis e em número suficiente para que possam através da colonização, alterar a microbiota em local que ofereça efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Eles são empregados em iogurtes, leites fermentados, fórmulas infantis e preparações farmacêuticas. Seus efeitos benéficos são atribuídos aos seguintes mecanismos: ação antagônica em relação a outros microrganismos através da produção de substâncias que inibam ou eliminem os patógenos, competição com patógenos por fontes de nutrientes ou locais de adesão, modulação da resposta imune do hospedeiro (PERDIGON *et al.*, 1988; BERNET *et al.*, 1994).

Foram realizados estudos do uso de linhagens de Enterococos como probióticos para utilização em humanos ou animais, sendo a linhagem de *E. faecium* SF68 uma das mais estudadas em termos de atividade probiótica. Esses estudos relataram a importância do uso de cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* como probiótico, pois os mesmos podem implicar em ganho de respostas imune, equilíbrio da microbiota intestinal, tratamento de diarreia associada a antibióticos, controle de colites induzidas por Rotavírus e prevenção de úlceras causadas por *Helicobacter pilory*, 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 não relatadas (FRANZ *et al.*, 1999).

### **3 - CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS* spp.**

Os microrganismos do gênero *Enterococcus* spp. caracterizam-se por serem cocos Gram positivos que podem apresentar-se sozinhos, aos pares ou ainda na forma de pequenas cadeias. Os Enterococos são anaeróbios facultativos com temperatura de crescimento ótima a 35°C, entretanto crescem em ampla variedade de temperaturas entre 10 e 45°C e podem sobreviver durante 30 minutos a 60°C, bem como suportar amplas variações de pH. Crescem em meios contendo elevadas concentrações de NaCl e 40% de sais biliares, a maioria das espécies hidrolisa o substrato pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (**PYR**). Todas as linhagens produzem enzima leucina-aminopeptidase (**LAP**) (SCHLEIFER & KLIPPER-BÄLZ, 1984; FRANZ *et al.* 1999; CORRÊA *et al.*, 2005).

Os Enterococos não possuem enzimas do citocromo, fornecendo resultados negativos quando submetidos ao teste da catalase; porém ocasionalmente produzem uma pseudo-catalase, podendo apresentar um fenótipo catalase positivo. Quase todas as linhagens são homofermentativas, produzindo ácido láctico como produto final, resultante da fermentação da glicose, sem produção de gás. O conteúdo de pirimidinas (G+C) no DNA varia de 37 a 45%. A maioria das cepas produz o antígeno ácido teicóico glicerol, associado à parede celular, grupo estreptocócico antígeno D, e sua detecção muitas vezes é difícil (FACKLAM & ELLIOTT, 1995).

### 3.1 - Resistência Bacteriana

Enterococos são intrinsecamente resistentes a uma ampla variedade de antibióticos e isso limita a escolha de agentes antimicrobianos contra estes organismos (KAK & CHOW, 2002).

Segundo KRETSINGER *et al.* (2003), nos Estados Unidos é comum o uso de gentamicina em certas espécies de animais, entre eles, frangos e porcos. Tendo em vista este uso dos aminoglicosídeos, os autores realizaram um trabalho com o objetivo de isolar estes microrganismos de carne de bovinos, suínos e aves, bem como avaliar a resistência a gentamicina. Foi constatado que a resistência a elevados níveis de gentamicina em Enterococos foi mais comum em isolados de frango (72%), menos freqüente em isolados de porcos (24%) e raro em Enterococos isolados de carne bovina (4%).

Segundo um estudo sobre a prevalência de *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) na Europa, a mesma ainda é baixa, mas considerando a alta prevalência de resistência a altos níveis de gentamicina naquele continente, Enterococos podem representar um sério risco ao tratamento de pacientes com processos infecciosos severos (SCHOUTEN *et al.*, 2000).

Em outro trabalho realizado em Portugal, com o objetivo de analisar a presença e diversidade de Enterococos resistentes a antimicrobianos em isolados de galinhas domésticas; os resultados obtidos foram bastante preocupantes, já que 48% dos isolados foram resistentes a

vancomicina, 34% apresentaram elevados níveis de resistência a gentamicina, 32% a estreptomicina. A presença de resistência simultânea a vários antimicrobianos (tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina) foi observada em quase todos isolados (NOVAIS *et al.*, 2005).

Segundo MENEZES *et al.* (2005) a frequência de *E. faecalis* isolados em urinoculturas no Hospital Geral de Fortaleza foi de 10%. Os isolados de *E. faecalis* foram mais susceptíveis a vancomicina (100%) e a nitrofurantóina (100%) enquanto que apresentaram maior resistência a rifampicina (52%) e a tetraciclina (48%).

Estudo da incidência de Enterococos isolados de pacientes em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em cinco países foi realizado recentemente empregando dados de estudo de vigilância norte americano e europeu do período entre 2000 e 2004. Entre as amostras dos EUA, *Enterococcus* spp. aparece em sexto lugar, representando 5,4% dos patógenos isolados. Entre os *E. faecalis* dos EUA, 1,2% foram resistentes a ampicilina, 4,5% a vancomicina e 34,8% foram resistentes a altos níveis de gentamicina. Entre os *E. faecium*, 90,3% foram resistentes a penicilina, 76,3% resistentes a vancomicina e 42,5% resistentes a altos níveis de gentamicina. Nas linhagens do Canadá, *Enterococcus* spp. aparece em quinto lugar representando 7,6% dos microrganismos isolados. Na Alemanha e Itália resultados similares foram obtidos, com Enterococos representando cerca de 3,4% dos microrganismos isolados. (JONES *et al.*, 2004).

No Brasil foi realizado um estudo sobre a incidência de microrganismos do gênero *Enterococcus* spp. num hospital universitário situado no estado de São Paulo, no qual foi relatado um aumento progressivo da resistência a vancomicina nas culturas clínicas positivas para *Enterococcus* spp. durante três anos de estudo. Em 2000, 9,5% das amostras eram resistentes a vancomicina, com aumento para 14,7% em 2001 e 15,8% em 2002. As unidades com maior número de isolados foram respectivamente pronto-socorro (19,5%) e UTI geral (15%). O maior número de isolados originaram-se de amostras de urina (36%) e sangue (20%). Estes dados sugerem que existe a necessidade da implantação de medidas de controle mais efetivas para deter a disseminação do VRE (FURTADO *et al.*, 2005).

POETA *et al.* (2004) investigaram a presença de estirpes de Enterococos resistentes a vancomicina em amostras fecais de frango, nos quais nunca se utilizou avoparcina como promotora de crescimento e em aves em que a avoparcina tinha sido empregada. As amostras

de *E. gallinarum* isoladas de fezes de galinha foram resistentes a vancomicina, independente do uso de avoparcina como promotora de crescimento.

A presença de elevados níveis de resistência a gentamicina e quinupristina/dalfopristina foi relatada recentemente em carnes de porcos obtidas de armazéns nos Estados Unidos. Foram isolados num total de 569 microrganismos do gênero em estudo, dos quais 78% eram *E. faecalis*, 15% *E. faecium*, 4% *E. gallinarum*. Nos testes de sensibilidade 4% dos isolados apresentaram resistência a elevados níveis de gentamicina e 78% dos *E. faecium* foram resistentes a quinupristina/dalfopristina (MCCLELLAN *et al.*, 2001).

Esses microrganismos têm desenvolvido resistência a antimicrobianos comumente empregadas na terapêutica; seja pela aquisição de genes de resistência em plasmídeos ou transposons de outros microrganismos, ou ainda por mutações cromossômicas espontâneas (SALYERS & AMÁBILE-CUEVAS, 1997; FURTADO *et al.*, 2005). A mutação espontânea corresponde a uma característica da espécie bacteriana, e a mutação adquirida a característica de uma ou mais linhagens das espécies. No primeiro caso, todas as amostras da espécie, independentemente do local do isolamento, são sempre resistentes. Na resistência adquirida, somente parte das amostras é resistente, a proporção destas, variando de acordo com o local de isolamento, dependendo basicamente da intensidade de uso do antimicrobiano.

A resistência cromossômica é considerada resistência de baixo nível ou de sensibilidade diminuída, um exemplo é a resistência intrínseca dos Enterococos a baixos níveis de aminoglicosídeos. A presença do antimicrobiano atua como mecanismo seletivo suprimindo os mecanismos suscetíveis e permitindo o crescimento dos mutantes resistentes aos fármacos (BARRETO *et al.*, 2004).

As bactérias em sua grande maioria contêm elementos genéticos extracromossômicos. Os fatores R são elementos genéticos intracelulares que compreendem uma classe de plasmídeos que transportam genes que codificam resistência a um ou a vários agentes antimicrobianos e metais pesados. Genes plasmidiais para a resistência antimicrobiana normalmente controlam a formação de enzimas que inativam os agentes antimicrobianos, por alterarem sua estrutura. Desta forma, os plasmídeos determinam a resistência as penicilinas e as cefalosporinas, transportando genes para a formação de  $\beta$ -lactamases. Os plasmídeos podem codificar enzimas que destroem o cloranfenicol (acetiltransferase), enzimas que

acetilam, adenilam ou fosforilam vários aminoglicosídeos, proteínas que determinam a expulsão do antimicrobiano de dentro da célula bacteriana, como mecanismo de resistência em tetraciclinas (KATZUNG, 2005).

### **3.2 - Resistência em microrganismos do gênero *Enterococcus* spp.**

Uma importante característica deste gênero é a resistência intrínseca a muitos antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento de infecções por cocos Gram positivos, tais como cefalosporinas, lincosaminas, co-trimoxazol e baixos níveis de penicilinas e aminoglicosídeos.

#### **3.2.1 - Resistência a $\beta$ -lactâmicos**

Os Enterococos possuem resistência natural intrínseca a antimicrobianos  $\beta$  lactâmicos devida à baixa afinidade de suas proteínas de ligação a penicilina para estes agentes. A resistência intrínseca difere entre os antibióticos desse grupo, com as penicilinas exercendo maior atividade frente a estes microrganismos, seguidas por carbapenens e cefalosporinas, com a menor atividade. Entre as penicilinas a ampicilina é a mais efetiva. A resistência intrínseca as cefalosporinas é tão elevada que o mesmo não pode ser empregado no tratamento de pacientes infectados com Enterococos. A concentração inibitória mínima (MIC) para Enterococos varia de 1 a 16  $\mu\text{g/mL}$ , entretanto para isolados clínicos de *E. faecium* normalmente a concentração inibitória mínima é superior, podendo chegar a 256  $\mu\text{g/mL}$ . Na maioria dos hospitais, mais de 90% dos isolados de *E. faecium* são resistentes a ampicilina (MIC $\geq$ 32 $\mu\text{g/mL}$ ) (TORRES *et al.*, 1993; VALDES *et al.*, 1998; KAK & CHOW, 2002).

O elevado nível de resistência a penicilinas é ocasionado principalmente pela superprodução de proteínas de ligação a penicilina (PBP) de baixa afinidade, ou ainda por

mutações nas **PBP** o que as torna menos suscetível a inibição pelas penicilinas. Já foram descritas linhagens de *E. faecalis* produtoras de  $\beta$ -lactamase codificadas pelo gene *blaZ* (FONTANA *et al.*, 1996).

### 3.2.2 - Resistência a aminoglicosídeos

O grupo dos aminoglicosídeos inclui a gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, canamicina, estreptomicina, dibenkacina e a neomicina. Esses fármacos são empregados principalmente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas, entretanto exercem efeito sinérgico com inibidores da síntese de parede celular em bactérias Gram positivas, sendo bactericida. Embora sejam fármacos importantes e amplamente utilizados os mesmos são extremamente tóxicos limitando sua utilização. Os aminoglicosídeos exercem seu efeito bactericida por interferirem na síntese de proteínas pela ligação a porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S (HERNÁNDEZ, 1998). Estes microrganismos caracterizam-se por apresentar resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos, resultando em dificuldades no transporte do antimicrobiano através da membrana celular. Aminoglicosídeos não são efetivos como monoterapia contra Enterococos. Entretanto quando associados com agentes como penicilinas ou glicopeptídeos, ocorre um aumento da concentração intracelular deste agente, causando a morte do microrganismo, resultante de uma ação sinérgica. A principal forma de resistência a este agente se deve à aquisição de genes de resistência que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que podem ser fosfotransferases (fosforilam a molécula de aminoglicosídeo a partir de **ATP**), acetiltransferases (acetilam a molécula a partir de acetil-CoA) ou nucleotidiltransferases (adiciona molécula de adenina, também proveniente de **ATP**) (KROGSTAD *et al.*, 1978; HERNÁNDEZ, 1998; MINGEOT-LECLERCQ *et al.*, 1999; CHOW *et al.*, 2000). A MIC da gentamicina para Enterococos varia de 6 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ; quando estas enzimas estão presentes, a MIC de aminoglicosídeos pode frequentemente aumentar para  $\geq 2000 \mu\text{g/mL}$ . Frequentemente, isolados clínicos de Enterococos que apresentam elevados níveis de

resistência a aminoglicosídeos possuem três ou mais genes promotores de resistência a esses antimicrobianos.

O *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* codifica uma enzima bifuncional que possui ambas atividades de acetilação e fosforilação da molécula do antibiótico. Esse gene é resultante da fusão de dois genes ancestrais e desencadeia resistência a um amplo espectro de aminoglicosídeos incluindo gentamicina, tobramicina, amikacina, kanamicina. (MIRANDA *et al.*, 2001; DONABEDIAN *et al.*, 2003). Este gene tem sido identificado em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e vários *Streptococcus* spp, bem com em *Enterococcus* spp. e pode ser localizado em transposon e plasmídeos (KAUFHOLDI, & POTGIETER, 1993). Mais de 90 % dos isolados clínicos que possuem resistência a este grupo, possuem este gene e menos de 10% possuem *aph(2'')-Ic*; *aph(2'')-Id*; *aph(2'')-Ib*; *ant(4')-Ia*; *aph(3'')-IIIa* e *aac(6')-Ii*. O gene *aph(2'')-Ic* codifica uma fosfotransferase que media resistência clínica a gentamicina, tobramicina, canamicina e dibekacina. O mesmo está relacionado com a eliminação do sinergismo ampicilina /gentamicina. Este gene foi descrito pela primeira vez no ano de 1997 em plasmídeos conjugativos de *E.gallinarum*, desde então tem sido identificado em *E. faecalis* *E. faecium* (MAROTHI *et al.*, 2005; CHOW *et al.*, 1997).

Os genes *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id* codificam uma fosfotransferase responsável pelo elevado nível de resistência a gentamicina, tobramicina, canamicina, netilmicina e dibekacina. O segundo tem sido detectado somente em isolados clínicos de *E. faecium* resistente a vancomicina (TSAI *et al.*, 1998; DONABEDIAN *et al.*, 2003).

O gene *aph(3'')-IIIa* codifica uma fosfotransferase que confere elevado nível de resistência a kanamicina em Enterococos. O *ant(4')-Ia* codifica uma nucleotidotransferase que confere resistência a tobramicina, amikacina, canamicina e dibekacina sendo encontrada em Enterococos bem como bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. O *aac(6')-Ii* codifica uma acetiltransferase, que elimina o sinergismo entre  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos( KAK & CHOW, 2002).

Como a estreptomicina é o antibiótico desse grupo que apresenta estrutura molecular mais distinta logo os genes citados anteriormente não codificam enzimas que possam atuar nesse antimicrobiano. Seus mecanismos de resistência se devem aos genes (*ant(6)-Ia* e *ant(3'')-Ia*) que codificam nucleotidiltransferases que modificam a estrutura deste

antimicrobiano, ou ainda através de mudanças na subunidade ribossomal 30S que diminui a capacidade de ligação do antimicrobiano.

### 3.2.3 - Resistência a glicopeptídeos

Pertencem a este grupo vancomicina e teicoplanina. Esses antimicrobianos exercem seus efeitos por inibirem a síntese da parede celular de bactérias sensíveis através de sua ligação de alta afinidade a extremidade terminal D-alanil-D-alanina de unidades precursoras da parede celular. São empregados no tratamento de infecções severas causadas por microrganismos Gram positivos (PIÑERA *et al.*, 1998a ; REMONATTO *et al.*, 2005). As cepas são consideradas sensíveis com  $MIC \leq 4\mu\text{g/mL}$  em *S. aureus* e *S. epidermidis*, incluindo cepas resistentes a meticilina, que são habitualmente inibidos por concentração de 1 a 4  $\mu\text{g/mL}$ . *Streptococcus piogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus viridans* são altamente sensíveis a esse antimicrobiano. As linhagens de Enterococos resistentes a vancomicina, principalmente *E. faecium* surgiram como importantes patógenos nosocomiais em hospitais nos Estados Unidos, tipicamente estas cepas são resistentes a múltiplos antibióticos incluindo estreptomicina, gentamicina, ampicilina. A resistência a estreptomicina e gentamicina causam preocupação especial, visto que a combinação de um aminoglicosídeo com inibidor de síntese de parede celular constitui o único esquema bactericida confiável para o tratamento de endocardite enterococcica. A resistência nesse gênero a vancomicina resulta de uma alteração do alvo D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, que se ligam precariamente a vancomicina, devido à ausência de um local crítico para a ponte de hidrogênio. (FINES *et al.*, 1999; POOTOOLAL *et al.*, 2002; LAZO *et al.*, 2006).

Teicoplanina se mostra ativa apenas contra bactérias Gram positivas. Trata-se de um bactericida confiável contra cepas sensíveis, exceto contra Enterococos. Possui atividade contra estafilococos, tanto sensível como resistente a meticilina, que tipicamente apresenta  $MIC \leq 4\mu\text{g/mL}$ . Enterococos são inibidos por concentrações que variam de 0.01 a 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Mecanismos de resistência a teicoplanina não foram elucidados, entretanto a presença do gene *VanA* codifica resistência a ambos, teicoplanina e vancomicina (PIÑERA *et al.*, 1998b; LAZO *et al.*, 2006).

Foram descritos seis fenótipos de resistência, cinco deles são conhecidos por serem adquiridos (*VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanE* e *VanG*) enquanto que um (*VanC*) é uma propriedade intrínseca de *Enterococos* móveis (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. flavescens*) (KAK & CHOW, 2002; TEIXEIRA & FACKLAM, 2003; KHAN *et al.*, 2005). São mecanismos que compreendem uma maquinaria complexa de enzimas responsáveis pelos seguintes eventos: perceber a presença de glicopeptídeos no local, modificar a produção do peptidoglicano para o fenótipo de resistência e eliminar precursores de peptidoglicano normais, de modo que a célula sintetize quase que exclusivamente precursores de peptidoglicano do fenótipo resistente.

O gene *vanA* expressa resistência de alto nível a vancomicina (MIC $\geq$ 64  $\mu$ g/mL) e teicoplanina (MIC $\geq$ 16  $\mu$ g/mL), e é normalmente adquirido através do transposon Tn1546 ou membros da família relacionados como Tn3 (ARTHUR *et al.*, 1993). O gene *vanB* induz níveis variados de resistência a vancomicina (MIC 4-1000  $\mu$ g/mL), entretanto não induz resistência a teicoplanina, estando normalmente localizado no cromossomo bacteriano, mas podendo ser carregado por plasmídeos (POOTOOLAL *et al.*, 2002; FRANZ *et al.*, 2003; REMONATTO *et al.*, 2005). O gene *vanD* induz um nível moderado de resistência a vancomicina (MIC 64-128  $\mu$ g/mL) e teicoplanina (MIC 4-64  $\mu$ g/mL) e apresenta-se localizado no cromossomo e não parece ser transferível (CASADEWALL & COURVALIN, 1999). Os determinantes *vanE* e *vanG* codificam um baixo nível de resistência a vancomicina (MIC $<$ 16  $\mu$ g/mL) e acredita-se que sejam adquiridos e induzíveis (FINES *et al.*, 1999; MCKESSAR *et al.*, 2000).

### **3.2.4 - Resistência a tetraciclina**

A resistência a tetraciclina é um dos fenótipos de resistência adquirida mais presentes em *Enterococos* isolados de alimentos. Esse grupo de antibióticos é muito empregado na

agricultura e piscicultura, principalmente como promotor de crescimentos em países europeus (HUYS *et al.*, 2003). Possui amplo emprego em infecções do trato urogenital, doenças periodontais e tratamento da acne. Tetraciclinas têm sido particularmente úteis para a terapia de pacientes ambulatoriais por ser um fármaco relativamente barato e que pode ser administrada oralmente (SPEER *et al.*, 1992).

Dentre os isolados clínicos de Enterococos cerca de 65% apresentam-se resistentes a este grupo (ROBERTS *et al.*, 2003). As tetraciclinas são bacteriostáticas e atuam por inibição da síntese de proteínas, bloqueando a união de tRNA (RNA de transferência) ao complexo ribossômico de mRNA (RNA mensageiro). A união reversível se produz na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis (SPEER *et al.*, 1992). Possuem atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, riquetsias, micoplasmas, clamídias, espiroquetas, borrelíias, actinomicetos, legionelas e algumas micobactérias (LAZO *et al.*, 2006). Dos diversos tipos de tetraciclinas, estão atualmente disponíveis no Brasil, para uso oral, o cloridrato e o fosfato de tetraciclina, a oxitetraciclina, a doxiciclina e a minociclina. A eficácia dos diversos análogos da tetraciclina é, em geral, similar, desde que utilizados em doses adequadas (SILVA, 1998).

O mecanismo de resistência a este antibiótico é resultante de três estratégias empregadas pelas bactérias; limitação do acesso do antimicrobiano ao seu alvo pelo efluxo deste através da membrana celular; alteração ribossomal que dificulta uma ligação efetiva do antimicrobiano ao seu respectivo alvo; produção de enzimas de inativação da tetraciclina.

Até então foram identificadas oito classes de genes envolvidos na resistência codificada por proteínas transmembrana responsáveis pelo efluxo do antimicrobiano através da membrana celular. Classes de A até E são encontradas entre membros da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Haemophilus*, *Vibrio*, *Aeromonas* e *Moraxella* estando presente em plasmídeos. Classe K e L têm sido encontradas em bactérias Gram positivas como microrganismos pertencentes aos gêneros *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., estando localizados principalmente em plasmídeos (BISMUTH *et al.*, 1990).

Existem três classes de genes que codificam resistência pela ligação de proteínas ao ribossomo e alteração de sua conformação, prevenindo a ligação da tetraciclina no ribossomo, o

mais comum entre Enterococos, gene *tet(M)*, tipicamente cromossômico e usualmente carregado pelo transposon Tn916 ou transposons conjugativos relacionados, mas também pode ser encontrado em plasmídeos conjugativos, *tet(O)* e *tet(S)* (ZHANEL *et al.*, 2004). Estas três classes de genes foram encontradas inicialmente em bactérias Gram positivas, mas atualmente encontram-se amplamente distribuídas em diversas espécies e gêneros bacterianos.

O terceiro tipo de resistência à tetraciclina é dado pela produção de enzimas inativadoras de tetraciclina. Esse gene foi identificado em *E. coli* e *Bacteriodes* spp. sendo designado por *tet(X)*, estando presente principalmente em plasmídeos, entretanto seu significado clínico ainda não está claro (SPEER *et al.*, 1992).

### **3.2.5 - Resistência ao cloranfenicol**

O antibiótico cloranfenicol possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, atua inibindo a síntese de proteínas nas bactérias, e em menor grau nas células eucarióticas. Atua primariamente através de sua ligação reversível à subunidade ribossômica 50S. Com o elevado nível de resistência de linhagens enterocócicas alguns hospitais têm empregado o cloranfenicol no tratamento desses processos infecciosos, entretanto cerca de 50% das linhagens pertencentes a este gênero são resistentes e ainda o mesmo pode atuar também nas células mitocondriais de mamíferos, o que dificulta sua utilização pela elevada toxicidade, representada pelo alto índice de discrasias sanguíneas. Na maioria dos Enterococos a resistência é mediada pela presença do gene *cat*, que pode ser encontrado no cromossomo ou em plasmídeos, que codifica uma acetiltransferase, a qual tem função de alterar a estrutura do antimicrobiano, fazendo com que esta perca a capacidade de ligação à porção ribossomal (TRIEU-CUOT *et al.* 1993; LAZO *et al.*, 2006).

### 3.2.6 - Resistência a macrolídeos

Dentro deste grupo merecem especial atenção eritromicina, claritomicina, clindamicina, roxitromicina e azitromicina. São antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese de proteínas através de sua ligação reversível às subunidades ribossômicas 50S de microrganismos sensíveis. O principal mecanismo de resistência aos macrolídeos entre os *Enterococos* é a alteração do sítio de ligação conferida por enzima que metila um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, o que resulta em dificuldades na ligação do antimicrobiano ao ribossomo. Esse mecanismo é usualmente mediado pelo gene *erm(B)*, e raramente pelo gene *erm(A)*. O gene *mef(A)* codifica uma proteína de efluxo que expulsa os macrolídeos da célula. Esse gene parece estar localizado num elemento conjugativo e regula os níveis de resistência a eritromicina mais baixos do que aqueles mediados pelo gene *erm(B)* (PIÑERA *et al.*, 1998b; ROBERTS *et al.*, 1999, LAZO *et al.*, 2006.).

### 3.2.7 - Resistência a quinolonas

A primeira quinolona descrita foi o ácido nalidíxico, tendo sido este empregado amplamente no tratamento de infecções urinárias. Depois foram introduzidos a este grupo mais quatro quinolonas fluoradas, como ciprofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino e gatifloxacino. Até o momento já existem mais de 20 quinolonas descritas. Esses antimicrobianos que possuem como alvo a DNA-girase e a topoisomerase IV bacterianas. Para muitas bactérias Gram positivas, a topoisomerase IV é a principal atividade inibida pelas quinolonas. Em contraste, para bactérias Gram negativas o principal alvo das quinolonas é a DNA girase. A atividade da ciprofloxacina contra *Enterococos* é moderada, e a resistência nestes microrganismos a este antimicrobiano é bastante comum. Algumas fluorquinolonas (moxifloxacino e gatifloxacino) se mostram bastante efetivas *in vitro* contra bactérias do

gênero *Enterococos*, entretanto isolados resistentes a ciprofloxacino são normalmente resistentes a moxifloxacino e gatifloxacino (LAZO *et al.*, 2006).

A resistência a quinolonas em *Enterococos* não está bem esclarecida, quando comparado com os mecanismos de resistência em estafilococos e pneumococos. O mecanismo de resistência ocorre basicamente por mutações nas regiões *parC* e *gyrA* do DNA bacteriano (KOLAR *et al.*, 2006).

### 3.2.8 - Resistência a estreptograminas

As estreptograminas pertencem ao grupo macrolídeos-lincosaminas-estreptograminas. A família estreptograminas compreende micamicinas, pristinamicinas, oestreomicinas, virginamicinas. As Pristinamicinas tópicas e orais vêm sendo empregadas na França há um longo período no tratamento de infecções por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp (BARRIERE *et al.*, 1992). Essas antimicrobianas atuam inibindo a síntese de proteínas por interferir com a subunidade 50S do ribossomo bacteriano. As pristinamicinas deram origem a derivados semi-sintéticos, dalfopristina e quinupristina.

Devido à presença de elevados níveis de resistência a antibióticos, tem-se buscado o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, como quinupristina-dalfopristina. Essa associação atua de modo sinérgico e é normalmente bactericida, ao contrário de quando os mesmos são usados isoladamente, ou comparado com os antibióticos similares pertencentes ao grupo macrolídeo. Os principais alvos desse grupo são os microrganismos resistentes e que possuem opções terapêuticas limitadas. Entretanto, pequeno período após aprovação destes dois medicamentos, microrganismos resistentes começaram a serem encontrados (HERSHBERGER *et al.*, 2003; LAZO *et al.*, 2006). Em geral, tem sido relatado que quinupristina/ dalfopristina apresenta atividade inibitória contra *E. faecium*, incluindo os VRE que são resistentes a outros agentes clinicamente disponíveis. No entanto, dois genes já foram descobertos em *E. faecium*, como responsáveis pela resistência a quinopristina-dalfopristina: *vatD* e *vatE*, os quais codificam acetiltransferases estreptograminas A. *E. faecalis* é resistente

à associação destes antimicrobianos devido à expressão do gene *lsa*, que é responsável pela resistência intrínseca a clindamicina e quinopristina- dalfopristina, ou por possuírem o gene *vat E* (HERSHBERGER *et al.*, 2003).

#### **4 - FATORES DE VIRULÊNCIA**

As características que tornam certas bactérias patogênicas são conhecidas como fatores de virulência. Este termo se refere às substâncias produzidas pelos microrganismos, que podem causar danos ao hospedeiro. Toxinas bacterianas, por exemplo, são referidas como fatores de virulência. O termo passou a significar, qualquer componente do microrganismo que seja exigido para provocar doença ou potencialize sua capacidade para isso. Características que determinam virulência em linhagens de Enterococos são, entre outros: a aderência ao tecido do hospedeiro, invasão e formação de abscesso, modulação da resposta inflamatória e secreção de produtos tóxicos. Dependendo do tipo e combinação desses fatores, estes se tornam determinantes para a patogenicidade da cepa (JETT *et al.*, 1994; JOHNSON *et al.*, 1994; EATON & GASSON, 2001).

Entre os fatores de virulência mais conhecidos em Enterococos está a resistência intrínseca a antibióticos comumente empregados no tratamento de doenças e, mais importante ainda, é a habilidade em adquirir genes que conferem alta resistência a determinados grupos de antimicrobianos (HANDWERGER & SKOBLE, 1995; MUNDY *et al.*, 2000). Existem outros fatores de virulência que também podem ser adquiridos por trocas genéticas dentre eles: substância de agregação (*Agg*), gelatinase (*GeLE*), proteína de superfície de Enterococos (*Esp*), citolisina e adesinas (LEAVIS *et al.*, 2004; FURUMURA *et al.*, 2006).

#### 4.1 - Hemolisina/Citolisina

A citolisina é uma toxina hemolítica descrita em Enterococos que aparece em até 60% de *E. faecalis* isolados de surtos, sendo exclusiva desta espécie (MUNDY *et al.*, 2000). A citolisina produzida por *E. faecalis* possui atividade antimicrobiana, contra um amplo grupo de bactérias Gram positivas (estafilococos e estreptococos) e apresenta atividade hemolítica contra hemácias de cavalo, coelho e humano, porém não tem ação em hemácia de carneiro nem contra bactérias Gram negativas (SEMEDO *et al.*, 2003). Esse fator de virulência é codificado por um operon formado por oito genes: *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylI*. Este operon pode ser encontrado em plasmídeos autotransmissíveis e induzíveis por feromônio ou ainda integrados ao cromossomo (JETT *et al.*, 1994; MUNDY *et al.*, 2000). As linhagens produtoras de hemolisinas de *E. faecalis* têm demonstrado papel importante em modelos animais na primeira etapa dos processos infecciosos humanos, quando o processo ainda é assintomático, contribuindo na penetração nos tecidos intestinais humanos (VERGIS *et al.*, 2002; VELASCO *et al.*, 2000).

A citolisina desempenha funções patogênicas importantes, atuando como uma toxina que causa ruptura da membrana dos glóbulos vermelhos e diversas outras células humanas (VELASCO *et al.*, 2000).

Em 1993, foi realizado um estudo no qual utilizou-se coelhos que apresentavam quadro de endocardite com dano valvular, induzida pela inserção de cateteres. Foram examinadas cepas de *E. faecalis* que possuíam defeito na síntese de substância de agregação ou ainda na secreção de citolisina. Esses experimentos revelaram que apenas 7% dos coelhos com endocardite e infectados por linhagens que expressavam somente **Agg**, foram a óbito, já animais contaminados por linhagens que expressavam citolisina e **Agg** a mortalidade foi superior, chegando a 55% (CHOW *et al.*, 1993).

## 4.2 - Adesinas

Para o estabelecimento da infecção, a aderência da bactéria é o primeiro passo desse processo. No caso dos Enterococos que são microrganismo comensais do trato gastrointestinal, os mesmos precisam se ligar aos receptores das células eucarióticas na superfície da mucosa, e para isso secretam adesinas facilitando esta fixação, caso contrário, os mesmos provavelmente seriam eliminados através do fluxo intestinal (JETT *et al.*, 1994).

### 4.2.1 - Substância de agregação

Vários fatores de adesão executam papel importante na ligação do microrganismo à mucosa e a outras superfícies epiteliais, facilitando a colonização e a formação de vegetações (KOCH *et al.*, 2004). Dessa forma, a substância de agregação (**AS**) é um fator de virulência que parece mediar a ligação específica ao epitélio intestinal, células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos (SUSSMUTH *et al.*, 2000).

A substância de agregação é uma proteína de superfície codificada por um plasmídeo de *E. faecalis* (em raros casos por *E. faecium*) e expressa em resposta a indução por feromônios, o soro humano também induz a produção da substância de agregação, sugerindo que células que possuem a capacidade de expressar esta substância podem formar agregações maiores do que células que não a expressam (MUNDY *et al.*, 2000).

Em *E. faecalis* quatro plasmídeos que codificam **Agg** já foram descritos: pAD1, pCF10, pD1, pAM373 e os genes que codificam a **Agg** são: *asa1*, *asc10*, *asa 373* e *ash 701*. A **Agg** parece estar envolvida nos processos de conjugação entre espécies de Enterococos, pois este determinante é capaz de mediar a ligação da célula doadora com a célula potencialmente receptora, promovendo a agregação celular e facilitando a transferência de plasmídeos (DUNNY *et al.*, 1995; SUSSMUTH *et al.*, 2000).

Essa substância aumenta a internalização dos *Enterococos*, a sobrevivência intracelular, e parece ser mais comum em amostras de origem clínica em relação às aquelas da microbiota (CHOW *et al.*, 1993).

#### **4.2.2 - Adesina de colágeno (*Ace*)**

Foi recentemente identificada uma proteína envolvida na aderência da bactéria às células do hospedeiro, pela ligação ao colágeno, a mesma é codificada pelo gene *ace*, sendo designada como adesina de colágeno de *E. faecalis* (*Ace*). Essa adesina intercede na ligação ao colágeno, fibronectina e laminina da matriz extracelular do hospedeiro e parece executar papel importante na patogênese da endocardite (KOCH *et al.*, 2004; RICH *et al.*, 1999; NALLAPAREDY *et al.*, 2000).

Estudos *in vitro* demonstraram que 5,6% das células de *E. faecalis* isoladas de processos de endocardites conseguiram se ligar a fibronectina em condições de ensaio pré-determinadas, sendo essa superior a ligação de bactérias Gram negativa como *E. coli* (0,9%), entretanto foi consideravelmente inferior a cepas de *S. aureus*, já que 56% dos isolados também de processos de endocardite conseguiram ligar-se a fibronectina (SCHELD *et al.*, 1985).

#### **4.2.3 - Proteína de superfície de *Enterococcus* (*Esp*)**

ESP é uma proteína de alto peso molecular sendo constituída por 1873 aminoácidos, apresentando um domínio *N*-terminal sem significativa similaridade com outras proteínas nos bancos de dados. Acredita-se que a região *N*-terminal possa contribuir na interação com o tecido do hospedeiro, entretanto sua função ainda é desconhecida, mas a mesma tem sido

relatada em diversos Enterococos isolados de processos infecciosos. Já existem trabalhos científicos que comprovam o papel positivo desse fator na formação de biofilmes.

Em 2002, foi realizado um trabalho, no qual observou-se que a proteína de superfície de *E. faecalis* é um possível fator de virulência porque a presença da mesma foi relacionada com o aumento do número de bactérias aderidas a materiais de drenagem biliar (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001; WAAR *et al.*, 2002).

A proteína de superfície de Enterococos foi descoberta em uma linhagem de *E. faecalis* envolvida em vários processos infecciosos em um hospital nos Estados Unidos (SHANKAR *et al.* 1999), neste trabalho observou-se que a maioria das cepas apresentaram o gene *esp*.

Segundo SHANKAR *et al.* (2001), a presença de *esp* não desencadeia alterações histopatológicas significativas associadas a processos infecciosos do trato urinário, entretanto a mesma favorece a colonização e persistência de *E. faecalis* no local da infecção.

#### 4.3 - Gelatinase

A gelatinase é uma protease classificada como uma metaloendopeptidase extracelular, codificada pelo gen *GelE*. É rica em resíduos de histidina, os quais servem de sítios de ligação para íon zinco. Extremamente hidrofóbica, seu pH ótimo de atuação varia entre 6 e 8. É uma enzima, capaz de hidrolisar a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos (VERGIS *et al.*, 2002; KAYAOGLU & ORSTAVIK, 2004).

Essa protease foi descrita pela primeira vez há cerca de 40 anos como uma metaloendopeptidases de 28-32 kDa em *E. faecalis*. Em 1975, ocorreu o primeiro relato da importância da gelatinase como fator de virulência, em um estudo no qual se analisou a contribuição da gelatinase no desenvolvimento de cáries em camundongos, observando-se um aumento significativo de cáries na presença dessa protease (GOLD *et al.*, 1975).

O gene *GelE* presente em *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* foi seqüenciado em 1991 e encontrou-se homologia significativa deste com os genes que codificam as proteinases de espécies de *Bacillus* e elastase de *Pseudomonas aeruginosa* (SU *et al.*, 1991). Em outro estudo foi relatado que *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* foi o mais freqüentemente encontrado, 63,7% dentro de um grupo constituído de 917 amostras (KUHNNEN *et al.*, 1988).

Conforme ensaios realizados por IZUMI *et al.* (2002) constatou-se a influência de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) na produção de gelatinase verificando-se um aumento no tamanho do halo em presença dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , ao contrário do que ocorreu na presença de  $\text{Zn}^{2+}$  que possibilitou inibição da atividade gelatinolítica.

Foi realizada a análise de fatores de virulência em Enterococos provenientes de processos infecciosos, de alimentos, de cultura “starter” e probióticos. O gene *gelE* foi encontrado em amostras que não apresentavam a atividade de gelatinase, ou seja, os genes estavam presentes, mas os mesmos não foram expressos. Acredita-se que os mesmos se tornam ativos por alguns fatores ambientais, como por exemplo, o ambiente encontrado no trato-gastrointestinal, o equilíbrio do microrganismo na microbiota intestinal e efeitos de sinergismo bacteriano, assim como, a presença e persistência de um grande número de Enterococos viáveis (EATON & GASSON, 2001).

Estudos sobre a gelatinase demonstraram que esta contribui para a virulência de *E. faecalis* em modelos animais; entretanto pouco se sabe sobre a patogênese em infecções humanas.

#### **4.4 – Bacteriocinas**

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas produzidas por bactérias que podem eliminar ou inibir o crescimento de outras bactérias, normalmente contra espécies que possuam características comuns à cepa produtora, como a estrutura da parede celular. A capacidade de produzir bacteriocinas oferece uma vantagem ecológica para esses microrganismos. Nas bactérias pertencentes ao gênero Enterococos a produção de

bacteriocinas está relacionada com o mesmo determinante genético responsável pela síntese da atividade  $\beta$ -hemolítica e sua produção é um marcador de patogenicidade (CAMPO *et al.*, 2001; BROMBERG *et al.*; 2006). A sua ação inibitória é resultante da interferência na permeabilidade da membrana, bem como no funcionamento de funções celulares essenciais, como replicação do DNA e translocação (CLEVELAND *et al.*, 2001). Muitas bactérias ácido-láticas possuem importante papel na produção de alimentos fermentados, e muitas dessas conseguem inibir uma grande variedade de microrganismos causadores de deterioração de alimentos. Um exemplo clássico é a nisina produzida por bactérias do gênero *Lactococcus* spp. (JACK *et al.*, 1995).

Segundo LOSTEINKIT *et al.* (2001) as bacteriocinas podem executar papel importante na preservação de alimentos, contudo somente a nisina é permitida para utilização em alimentos, também se discute o emprego da lacticina 3147 e nisina na prevenção de mastite em vacas. Já a enterocina CRL35 de *E. faecium* CRL35, é ativa na inibição da multiplicação “*in vitro*” de células do vírus causador de herpes (WACHSMAN *et al.*, 1999).

Um estudo sobre a produção de bacteriocinas em 218 isolados de Enterococos (*E. faecium* e *E. faecalis*) sensíveis e resistentes a vancomicina de diferentes fontes (fezes de humanos e de galinhas; amostras de esgoto), revelou que 47% dos isolados produziram bacteriocinas. O percentual de produção de bacteriocinas foi relativamente superior em amostras clínicas humanas. Somente um dos quinze isolados de VRE produziu bacteriocina, enquanto que 44% das amostras sensíveis demonstraram atividade antimicrobiana frente a pelo menos um dos trinta e três microrganismos indicadores. Dentro do grupo das bactérias indicadoras, a mais sensível foi *Listeria monocytogenes*. (CAMPO *et al.*, 2001).

## **5 - DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS* spp.**

Infecções do trato urinário, são os processos mais comuns causados por este microrganismo, entre eles destacam-se cistites, prostatites, epididimites, que acometem

homens idosos. Entretanto Enterococos não é freqüente em Infecção do trato urinário (ITU) menos severas em mulheres jovens. As ITU's são mais comuns em pacientes hospitalizados por longo período ou que fazem uso de terapia antimicrobiana durante muito tempo, e desta forma são normalmente resistentes a um grande número de antibióticos. Este microrganismo é responsável por 15 % de ITU's nosocomiais (TERPENNING *et al.*, 1988; RICHARDS *et al.*, 2000; MENEZES *et al.*, 2005; MCBRIDE *et al.*, 2007).

Infecção de tecidos superficiais, intra-abdominais e pélvicos normalmente é encontrada como componente de flora microbiana mista, e raramente são causadores monomicrobiais de infecções nestes sítios. É menos freqüente, mas já tem sido relatado processo de peritonite secundário a processos de cirrose. São a segunda fonte de bacteremias. (EVANS & CHINN, 1946; FRANZ *et al.*, 1999; GILMORE *et al.*, 2002). São responsáveis por 15 % das infecções de feridas em sítios cirúrgicos em pacientes de UTI.

As endocardites causadas por Enterococos, são responsáveis por 5% a 18% de todos os processos de endocardites (TEIXEIRA, 1999). Menos comum, todavia já se isolou linhagem de Enterococos de processos de meningite, pneumonia, osteomielite hematogênica, artrite.

## **6 - RESERVATÓRIOS NATURAIS**

O principal reservatório humano dos Enterococos é o trato gastrointestinal. Contudo, pode ser encontrado, com menos freqüência, na cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina. Também podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, pássaros e insetos. A sua importância se deve ao aumento da resistência a agentes antimicrobianos.

No passado a principal fonte era endógena, originada da própria microbiota normal do paciente. Atualmente a fonte de contaminação esta relacionada à transmissão entre pacientes em Unidades de tratamento intensivo, principalmente através de mãos contaminadas dos profissionais que trabalham nas UTIs (BOYCE *et al.*, 1994; FACKLAM *et al.*, 2002).

## 6.1 - Colonização e infecção por *Enterococcus* resistentes a antibióticos

Terapia antimicrobiana prévia com vancomicina, cefalosporinas de 3º geração e agentes com atividade contra anaeróbios têm sido implicados como fator de risco para colonização por **VRE**. Um outro fator de risco para a colonização por VRE, seria internações em **UTIs** por longo período e a exposição a outros pacientes contaminados por **VRE**. Certas populações de pacientes como, pacientes com hemodiálise crônica, doenças hematológicas malignas e transplantados de fígado, parecem estar mais sujeitos a aquisição de **VRE** (BOYCE *et al.*, 1994)

A colonização por Enterococos resistente a elevados níveis de gentamicina parece ser resultante do uso de cateteres intravenosos, procedimentos cirúrgicos e terapias antimicrobianas anteriores.

A maioria dos pacientes colonizados por **VRE** não irá desenvolver infecções sintomáticas, o risco de infecções severas é claramente aumentado em certos grupos de pacientes (imunocomprometidos seja pela presença de doença de base ou ainda por uso de antimicrobianos imunossupressores).

## 7 - TRATAMENTO

O tratamento varia de acordo com alguns fatores, entre eles: susceptibilidade do agente etiológico a antimicrobianos como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos, bem como as associações de antimicrobianos destas classes; infecção monomicrobiana (como é o caso da maioria dos processos infecciosos do trato urinário) ou polimicrobiana (como em abscessos e feridas cirúrgicas); localização dos processos infecciosos como válvulas cardíacas (LANDMAN & QUALE, 1997; SHEPARD & GILMORE, 2002).

Infecções causadas por Enterococos suscetíveis, são tratadas com ampicilina e penicilina

que são os antimicrobianos de escolha; infecções monomicrobianas tal como infecções do TGU podem ser tratadas com apenas uma destes antimicrobianos, sem a necessidade de associações de antibióticos. Infecções pélvicas, intra-abdominal da pele, subcutânea são normalmente polimicrobianas, neste caso, recomenda-se a associação de  $\beta$ -lactâmicos mais antimicrobiano efetivo contra microrganismos Gram negativos e estafilococos. Pacientes que apresentam hipersensibilidade a penicilinas podem ser tratados com antimicrobianos glicopeptídeos (vancomicina ou teicoplanina). Nitrofurantoína tem se mostrada efetiva em processos infecciosos do TGU (GILMORE *et al.*, 2002).

As endocardites causadas por Enterococos sensíveis têm como tratamento padrão à associação de antimicrobianos que atuam na parede celular associada a aminoglicosídeos (ampicilina-penicilina/gentamicina), na presença de resistência a gentamicina pode a mesma ser substituída pela estreptomicina.

Para linhagens que apresentam elevados níveis de resistência a gentamicina, o tratamento pode ser realizado com  $\beta$ -lactâmicos quando o agente etiológico for suscetível. Em endocardites o tratamento é bastante difícil, mesmo quando a linhagem se mostra relativamente sensível. Antimicrobianos que atuam sinergicamente são requeridos para o tratamento, mas quando se trata de VRE ou linhagens resistentes a elevados níveis de gentamicina, normalmente o tratamento é ineficaz e resta apenas a remoção da válvula infectada. Esse processo é mais freqüente em pacientes do sexo masculino e idoso. A fonte inicial de bacteremia que leva a válvula, normalmente é do trato geniturinário (TEIXERA, 1999).

Em bacteremias, não se recomenda o uso de gentamicina, visto que a mesma gera elevados níveis de toxicidade. No caso de infecções do trato geniturinário, pele e tecidos superficiais, o tratamento pode ser realizado com doxiciclina ou fluorquinolonas. Na infecção do trato urinário baixo o tratamento pode ser realizado com o emprego de nitrofurantoína ou cloranfenicol.

## **8 - OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi determinar a freqüência de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (gentamicina), tetraciclina, bem como avaliar a diversidade

genética das amostras, pesquisando os genes envolvidos na resistência a estes antimicrobianos pela utilização da Reação em Cadeia da Polimerase, em isolados de processos infecciosos e de alimentos.

### **8.1 - Objetivos específicos**

- Isolar o microrganismo *Enterococcus* spp. a partir de diversas fontes alimentícias;
- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente linhagens de *Enterococcus* spp. isoladas de diferentes fontes alimentares, provenientes de mercados situados na região norte de Porto Alegre ;
- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de diferentes processos infecciosos, provenientes de unidades hospitalares do Complexo Hospitalar Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (CHISCOMPA);
- Determinar a frequência da resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (gentamicina) e tetraciclina, tanto em isolados clínicos como alimentares;
- Detectar, através de testes fenotípicos e testes de Reação em Cadeia da Polimerase, o determinante potencial do fator de virulência gelatinase nos isolados clínicos e alimentares.

## 9 - MÉTODOS E RESULTADOS

A seção de materiais e métodos e a seção de resultados serão apresentadas a seguir na forma de um manuscrito. O manuscrito será submetido à publicação no periódico *Journal of Basic Microbiology* e intitulado “**Molecular analysis of resistance genes and virulence factors of *Enterococcus* spp.**”, apresenta os procedimentos de isolamento, identificação fenotípica da espécie, identificação genotípica do gênero, perfil de resistência aos antimicrobianos tetraciclina e gentamicina, pesquisa dos genes de resistência, ensaio da atividade gelatinolítica bem como a pesquisa do gene responsável pela enzima gelatinase em isolados clínicos e alimentares de *Enterococcus* spp. .

## 9.1 - Manuscrito

### Molecular analysis of resistance genes and virulence factors of *Enterococcus* spp.

Bianca Almeida Gama<sup>1</sup>, Christine Garcia Bierhals<sup>1</sup>, Ana Paula Guedes Frazzon<sup>2</sup>, Pedro Alves d'Azevedo<sup>3</sup>, Jeverson Frazzon<sup>1,4\*</sup>

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

<sup>2</sup> Departamento de Microbiologia, UFRGS;

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia, FFFCMPA;

<sup>4</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS.

**Keywords:** *Enterococcus* spp, tetracycline resistant enterococci, gentamicin resistant enterococci.

\* Correspondence and reprints:

Dr. Jeverson Frazzon

jeverson.frazzon@ufrgs.br

Centro de Biotecnologia/Campus do Vale - UFRGS

Bento Gonçalves Av., 9500 – LBM (Lab. 209)

PO Box: 15005 – Porto Alegre/RS – Brazil

Phone: +5551 – 33086072

Fax: +5551 - 33087309

## Abstract

*Enterococcus* spp. are widely distributed in the natural environment, been opportunistic pathogens and often are the causal agents of infections in immunosuppressed patients. One of the remarkable characteristics of these microorganisms is the intrinsic resistance against several of the antimicrobial agents routinely prescribed in the treatment of Gram-positive cocci. In addition enterococci have enormous facility to acquire different genetic markers by conjugation lending resistance to a variety of other antimicrobial. This study aimed to determine the frequency of antimicrobial resistance against high concentrations of aminoglycosides (gentamicin), tetracycline, as well as assess the genetic diversity of microbial strains isolated from foods and humans. Antibiotic susceptibility tests of *Enterococcus* spp. isolated from food showed that of 52 isolates, 7.7% (n=4) were tetracycline resistant, 5.8% (n=3) had been resistant only the gentamicin and 28.9% (n=15) were resistant to both antibiotics. Already in clinical sample of the 40 isolates 42.5% (n=17) of the samples was tetracycline resistant, 20% (n=8) was gentamicin resistant, 17.5% (n=7) had been resistant to both antimicrobials. The research of genes of resistance in isolates from food disclosed that in 90% (n=17) of tetracycline resistant *Enterococcus* showed tet(M) gene, and 100% of the gentamicin resistant samples had presented the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Already in clinical isolates 95,8% (n=23) tetracycline resistant samples contained the tet(M) gene and 100% of the gentamicin resistant *Enterococcus* had presented gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*.

## 1. Introduction

Bacteria of the *Enterococcus* genus are widely distributed in the natural environment,

and are detected in water, food and soils. Also, enterococci are members of the normal microbiota of the human gastrointestinal tract, oral cavity, and genitourinary tract [1, 2, 3]. Enterococci are opportunistic pathogens, and often are the causal agents of infections in immunosuppressed patients [4]. One of the remarkable characteristics of these microorganisms is their intrinsic resistance against several of the antimicrobial agents routinely prescribed in the treatment of Gram-positive cocci, like cephalosporins, lincosamines, cotrimoxazole, and low levels of penicillins and aminoglycosides [5]. On the other hand, *Enterococcus* have evolved increased resistance a variety of other antimicrobial by the acquisition of antibiotic resistance genes on plasmids or transposon from other organisms that lead resistance to agents like as chloramphenicol, tetracyclines, macrolides, streptogramins, high levels of aminoglycosides and  $\beta$ -lactamic drugs, glycopeptides and more recently quinilones [5, 6, 7]. The resistance to aminoglycosides may be codified by the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene, which codifies a bifunctional enzyme. The enzyme performs both acetylation and phosphorylation functions of the antibiotic molecule. Over 90% of clinical isolates that are resistant to this class of drugs carry the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene, while under 10% carry *aph(2'')-Ic; aph(2'')-Id; aph(2'')-Ib; ant(4')-Ia; aph(3'')-IIIa e aac(6')-Ii* [8, 9, 10, 11, 12]. The resistance to tetracycline comprises one of the acquired resistance phenotypes most commonly present in enterococci isolated from foods. There are several genes responsible for this resistance in enterococci, being the *tet(M)* gene more common. Different virulence factors have been reported in *Enterococcus*; however, the molecular mechanism has not been fully understood in the genus. Virulence factors have been detected more often in *Enterococcus faecalis*, while the species *Enterococcus faecium* is unaffected by

these markers. To the present knowledge, few are the studies on virulence factors in enterococci isolated from foods [2, 13, 14].

This study aimed to determine the frequency of antimicrobial resistance against high concentrations of aminoglycosides (gentamicin), tetracycline, as well as assess the genetic diversity of microbial strains. The genes involved in the resistance against these drugs were investigated. Also, the potential genetic marker, the gelatinase virulence factor was evaluated in clinical and food isolates using the Polymerase Chain Reaction (PCR).

## **2. Materials and methods**

This work was developed using strains of enterococci that had been isolated from foods and infectious processes.

Isolation of enterococci from food: Bacteria of the *Enterococcus* genus were isolated from *in natura* cassava, potato, beetroot, pork, carrot, chicken steak, chicken (carcass), colonial type cheese, mozzarella type cheese, soft cheese, ricotta, thick sausage of chicken, thick sausage of pig and temper green. Food samples were purchased from several popular markets from Porto Alegre, Brazil. Between November of 2006 and March 2007, 52 strains were obtained.

The first isolation step consisted of inoculation of 9g of food in sterile buffered peptone water (90 ml) and incubation at 37° C for 18 hours. From this, 25 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, hemolytic profile) were used for strains isolation and colony picking of presumable streptococcal/enterococcal strains. Foods were purchased always in different weeks, alternating the provider market. Overall,

twenty-eight food samples were analyzed. Afterwards, colonies with typical enterococci morphology were identified at genus level by the following methods: Gram staining, esculin hydrolysis tests in combination with resistance to bile salts, and growth at 10°C and 45°C. The selected strains were stored in BHI containing 50% glycerol at -20°C.

**Bacterial isolates from humans:** Forty clinical samples had been gotten from collection of *Enterococcus* of the Laboratory of Gram-Positive Cocci of the Department of Microbiology and Parasitology of the College of Medical Sciences of Porto Alegre (FFFCMPA). The strains were kept in solution containing skimmed milk (Molico, Nestle') 10% (v/v) and glicerol 10% (v/v), stored in freezing pipes -20°C. For recovery of the samples, an aliquot of each suspension was inoculated in BHI agar plates followed by 36°C incubation for 18-24 hours.

**Genus-specific determination by PCR method:** Strains phenotypically determined as *Enterococcus* genus were submitted to PCR reaction using genus specific primers, which 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) [19]. Genomic DNA was extracted by boiling method, as described by Hagen et al., (2002) [18]. All PCR amplification were performed in final volume of 25  $\mu$ L containing: 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTPs, 0.2  $\mu$ 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  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), observed in UV transillumination and photographed using Kodak Digital Science<sup>TM</sup> DC120. Negative controls include all reagents except DNA and an *E.*

*faecalis* reference strain obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), catalog number 51299, was used as positive control.

**Species identification.** *Enterococcus* strains were subjected to biochemical characterization according to the protocol proposed by Facklam et al., (2002) [15]. The trials assays included testing for the presence of arginine and pyruvate dehydrolases; acid production from 1% L-arabinose, raffinose, mannitol,  $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside (MGP), sorbitol and L-sorbose; motility [14, 15, 16]. For all the tests had been used standardized strains as positive control.

**Antibiotic susceptibility testing:** All isolates identified as enterococci were tested by standard disk diffusion method recommended by the NCCLS [17]. Two antibiotics commonly used in the treatment of clinical infections were tested (concentrations are expressed in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ): tetracycline-30 (TET), gentamycin-120 (GEN). Inhibition zone diameters were measured and strains were classified according to the criteria from NCCLS (for TET, GEN). For all the tests had been used standardized strain as positive control (*E. faecalis* I8A) and susceptible strains (*E. faecium* H1) to antibiotics in research.

**Assay of gelatinolytic activity:** The gelatinolytic activity of *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from food and humans was assayed by inoculated in BHI supplemented with 4% of gelatin as substrate. Incubates tubes at 37°C for at least 48 hours. Stand tubes upright in ice for at least 30 minutes to bring the temperature considerably below 28°C (melting point of gelatin). If negative, reincubate for up to 7 days. The positive reaction was indicated by medium liquid after 30 minutes on ice and the negative result by solid gel when left for 30 minutes on ice [31].

**Antibiotic resistance genes:** They were studied by PCR in all isolates. The following genes were tested: *tet(M)* and *aac (6')-le-aph (2'')-la*. The reactions used primers that target and amplify the 576 bp fragment and 220 pb, respectively [2]. Genomic DNA was extracted by boiling method and all PCR amplification were performed as previously described in the genus-specific determination. For the research of the gene *tet(M)*, the cycling parameters used were: 3 min at 95°C and then 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 57°C, and 1 min at 72°C, and a 5 min final extension at 72°C. For the research of the gene *aac(6')-le-aph(2'')-la*, the cycling parameters used were: 3 min at 95°C and then 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 53°C, and 1 min at 72°C, and a 5 min final extension at 72°C.

**Detection of virulence factor gelatinase:** The following gene was searched by PCR in all enterococcal isolates: gene *gelE* encoding the virulence factor gelatinase. The reaction used primers that target and amplify the 419 bp fragment [2]. Genomic DNA was extracted by boiling method and all PCR amplification were performed as previously described in the genus-specific determination, but using a different cycling parameters: 3 min at 95°C and then 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 51°C, and 1 min at 72°C, and a 5 min final extension at 72°C.

### 3. Results

A total of 52 strains characterized as *Enterococcus* spp. were isolated from foods during November 2006 to March 2007 (Figure 1). Species identification showed that 11.6% of the strains were *E. faecium* and 88.4% were *E. faecalis*. Among *Enterococcus* isolated from humans 7.5% were identified as *E. faecium* and 92.3% were identified as *E. faecalis*.

**Antibiotic susceptibility tests:** *In vitro* susceptibility data from over 90 isolates was had been analyzed. Among the isolates from food 7.7% (n=4) was tetracycline resistant and, 5.8% (n=3) had been resistant only the gentamicin and 28.9% (n=15) was resistant to both antibiotics. On the other hand, the isolates from infections process were more resistant than the food isolates, 42.5% (n=17) of the samples was tetracycline resistant, 20% (n=8) was gentamicin resistant, 17.5% (n=7) had been resistant to both antimicrobials (Figure 1).

**Assay of gelatinolytic activity:** Among the *Enterococcus* isolated from food the production of gelatinase enzyme was presented in 78% (n=41) and in enterococci from humans 50% (n=20) had presented the hydrolysis activity of the gelatin substrate (Figure 2).

**Antibiotic resistance genes:** The *tet(M)* gene was found in 90% (n=17) of the tetracycline-resistant isolates of foods and in 95.8% (n=23) of tetracycline – resistant humans isolates. All gentamicin-resistant isolates harbor the gen *aac(6')-le-aph(2'')-la*. Among the enterococci isolated from foods and humans that had not presented resistance, 30% e 37.5% showed some of these resistance genes, respectively (Figure 3).

**Detection of virulence factor gelatinase:** The *gelE* gene was detected in all the strains that had presented gelatinolytic activity. Among the strains from food that had not presented the hydrolysis capacity of the gelatin subtrate 36.85% harbor the gene *gelE* (Figure 3).

## Discussion

The enterococci are part of the natural intestinal flora of most mammals and birds and it has emerged as important nosocomial and community acquired pathogens in the entire world [20, 21, 22]. Most enterococci infections are probably of endogenous origin, and being difficult to treat, because the resistances to several antibiotics are intrinsically present. In the

last decade, isolation frequency associated with antimicrobial resistance on these microorganisms has been increase. In the present study, we showed that the species distribution was similar to that observed for *E. faecalis* in other studies and the prevailing species was *E. faecalis*, occurring in 80 to 90% of all clinical and food isolates, while *E. faecium* accounted for 5% to 15% of all isolates analyzed [4].

In this work, the strains isolated from several foods were investigated for the frequency of antimicrobial resistance against high concentrations of aminoglycosides (gentamicin), tetracycline, as well as the genes involved in the resistance against these drugs. Also, a potential genetic marker, the gelatinase virulence factor was evaluated. Among these samples, some foods had originated lineages with similar characteristics suggesting that the strains had the same clonal origin. A total of 52 enterococci were recovered from foods; among these food samples, 12 strains isolated from 4 different foods showed common characteristics. With a view to ruling out the hypothesis that these strains have one same origin, additional antimicrobial susceptibility tests were carried out, against 7 antimicrobial agents commonly used in therapy, among which: ampicillin-10 (AMP), chloramphenicol- 30 (CLO), erythromycin-15 (ERI), penicilin-10, quinupristin-dalfopristin-15 (QD), streptomycin-300 (ET), vancomycin-30 (VAN). After data analysis, of the 12 samples analyzed, 7 presented phenotypic diversity, with distinct antimicrobial susceptibility profiles. This suggests that the strains are not of a same clonal origin. Otherwise, the strains that showed same characteristics would have be better characterized to really confirm that they possess the same origin. At moment, these data are not enough to classify them as being of the same origin.

In our study, the resistance found in clinical isolates against aminoglycosides (37.5%) was similar to the value found by Gordon et al., (1992) [24], in a study that investigated

clinical *Enterococcus* isolates from an intensive care unit. This study also revealed high resistance against aminoglycosides, which reached 38%. Resistance against tetracycline (60%) was similar to the value found in the study conducted by Menezes et al, (2005) [25], which revealed that 48% of enterococci isolated from urinary infections were resistant against that drug. Yet, according to Roberts et al., (2003) [26] 65% of clinical enterococci isolates presented resistance against this group. So far, several studies on antimicrobial resistance in *Enterococcus* isolated from humans and animals have been published; nevertheless, such studies addressing resistance from enterococci isolates from foods are scarce. The occurrence of resistance in food isolates may be explained by some hypotheses as: (I) the use of contaminated irrigation water; (II) the use of growth promoters like avoparcine, which has been linked to resistance against vancomycin. (III) 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.

Another factor analyzed in the present study was the resistance genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* and *tet(M)* against gentamicin e tetracycline, respectively. The resistance gene analysis was conducted both in sensitive and resistant isolates.

Several genes can be involved in the tetracycline resistance, between these the most important are *tet(K)*, *tet(L)* codifies an efflux pump and *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(M)* are implicated in ribosomal protection [23, 32]. Among the food samples resistant to tetracycline, 90% presented the resistance gene *tet(M)* against the antibiotic being tested, which suggests that the resistance detected in the other isolates results from the presence of these other genes. In clinical isolates, similar results were found, with around 95% of isolates presenting the gene *tet(M)*. As for gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, it was detected in 100% of the samples resistant to

gentamycin, both in clinical and food isolates. In the study carried out by Aarestrup et al., (2000) [27], the author reported that 100% of the samples resistant to gentamicin presented this gene. Already, in a study carried out by Harthug et al., (2002) [28] 93% of all enterococci resistant to gentamicin obtained from nosocomial infections presented the gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Another important data is that a high number of sensitive strains presented one or another resistance gene being investigated. This observation raises concerns due to the fact that these genes may become active depending on the external factors, which these strains may be exposed.

The first report of the importance of gelatinase as virulence factor was made in 1975, in a study that analyzed the contribution of gelatinase to the development of caries in mice. The results showed that an increased number of caries was observed whenever the protease was detected [29]. Other studies on gelatinase have demonstrated its contribution to the virulence acquired by *E.faecalis* in animal models; nevertheless, little is yet known about the pathogenesis in human infections. The present study investigated the gelatinolytic activity and the presence of the respective gene. Considerably different results were obtained for clinical and food isolates, a high proportion of the isolates showed this virulence determinant (50% of the clinical isolates and 78% of the food isolates). Relevant information is that for the clinical samples that did not show this activity, at least 50% have presented the gene. Otherwise, in food isolates, only 7% of the samples that did not show activity presented the gene.

In a study study carried out by Eaton, Gasson, (2001) [14] investigated virulence factors in enterococci isolated from infections, from foods, from starter cultures and from probiotics, verified that the gene *gelE* was found in samples that did not present gelatinase activity. One likely explanation for this observation is that this gene may become active when

exposed to certain environmental factors, such as the conditions in the gastrointestinal tract, the intestinal microbiota equilibrium, and the effects of bacterial synergy, as well as the presence and persistence of a large number of viable enterococci (quorum sensing). However in study carried through by Quin et al. (2000) [30], regulating genes assigned *fsr* (*fsrA*, *fsrB* and *fsrC*) had been found in *E. faecalis* that they are similar to the genes of the system *agr* (regulating of accessory gene) that exist in *Staphylococcus aureus*. These genes that positively regulate the expression of the genes *gelE* and *sprE* (a serine protease gene), seem to be self-regulated and located before regulatory genes designed as *fsr* (*fsrA*, *fsrB* e *fsrC*). The absence of these genes or the presence of a mutation in one or more of these three genes can compromise the expression of gelatinase.

Our results had evidenced high resistance levels, against both tetracycline and to gentamicin. These data are extremely important due to the fact that gentamicin, in association with beta-lactamic agents, may be one of the last choices in the treatment of several infections caused by enterococci.

### **Acknowledgements**

J.F. (CNPq, 306397/2006-4) is research awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil.

## 5. References

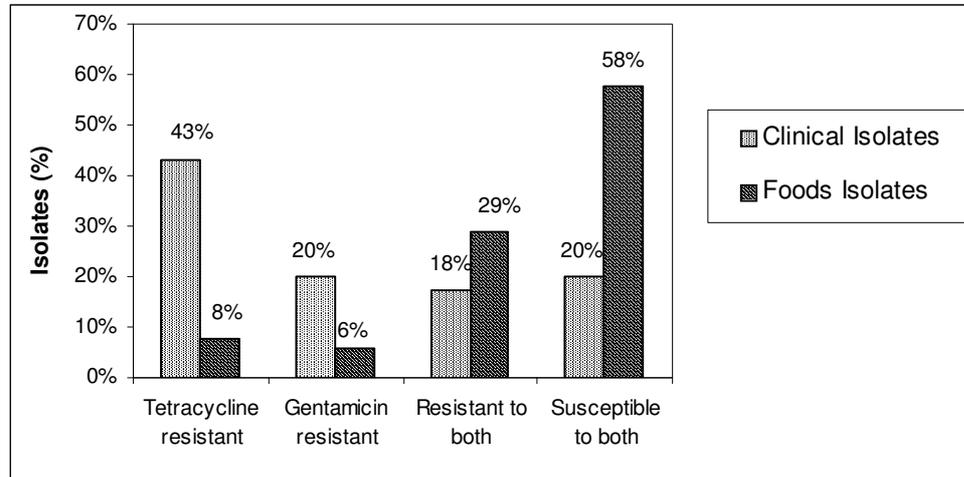
- [1] Poeta, P., Antunes, T., Rodrigues, J., 2005. *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, 58, 412-414.
- [2] Poeta, P., Costa, D., Saenz, N., Klibi, N., et al., 2005. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. J. Vet. Med., 52, 396-402.
- [3] Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., et al., 2001. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. Appl. Environ. Microbiol., 68, 1381-1389.
- [4] Hörner, R., Liscano, M.G.H., Maraschin, M.M., Salla, A., et al., [2005]. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. J Bras Patol Med Lab., 41, 391-395.
- [5] Kak, V., Chow, J.W., 2002. Acquired antibiotic resistances in enterococci, p 355-363. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E., Rice, L.B. (Eds.), The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM Press, Washington.
- [6] Salyers, A.A., Ámabile-Cuevas, C.F., 1997. Why are antibiotic resistance genes so resistance to elimination?. Antimicrob. Agents Chemother., 41, 2321-2325.

- [7] Furtado, G.H.C., Martins, S.T., Coutinho, A.P., Soares, G.M.M., et al., 2005. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. *Rev. Saúde Pública*, 39, 1-5.
- [8] Krogstad, D.J., Korfhagen, T.R., Moellering, R.C., Wennersten, Jr.C., et al., 1978. Aminoglycoside-inactivating enzymes in clinical isolates of *Streptococcus faecalis* an explanation for resistance to antibiotic synergism. *J.Clini. Invest.*, 62, 480-486.
- [9] Hernández E.B., 1998. Aminoglucósidos. *Acta Medica*, 8, 48-53.
- [10] Mingeot-Leclercq, M.P; Glupczynski & Tulkens P.M. (1994). Aminoglycosides phosphotransferases type III from *Enterococcus*: overexpression, purification, and substrate specificity. *Biochemistr.* 33: 6936-6944.
- [11] Chow, J.W., 2000. Aminoglycoside resistance in *Enterococcus*. *Clinic. Infection.*, 31, 586-589.
- [12] Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M., Swings, J., 2003. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1555-1562.
- [13] Zhanel, G.G., Homenuik, K., Nichol, K., Noreddin, A., et al., 2004. The glycylicyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs*, 64, 63-88.
- [14] Eaton, T.J., Gasson, M., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1628-1635.
- [15] Facklam, 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.

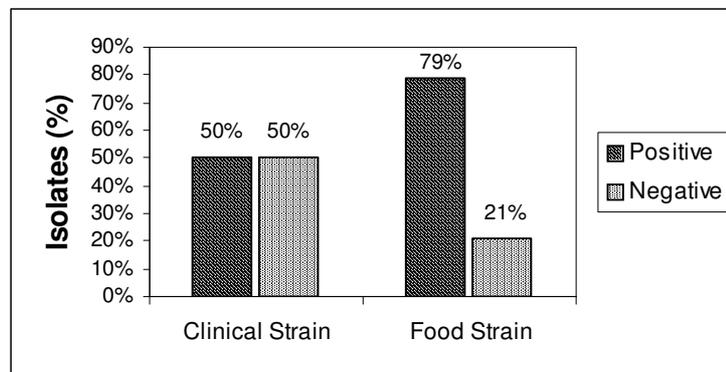
- [16] Facklam, R.R., Carvalho, M.G.S., Teixeira, L.M., 2002. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. p 1-54. In: Gilmore, M.S.; Clewell, D.B.; Courvalin, P.; Dunny, G.M.; Murray, B.E., Rice, L.B. (eds.), *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington.
- [17] National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Eighth Informational Supplement M2-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- [18] Hagen, R.M., Gauthier, Y.P., Sprague, L.D., Vidal, D.R., et al., 2002. Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. *Mol. Pathol.*, 55, 398-400.
- [19] Ke, D., Picard, F.J., Martineau, F., Ménard, C., et al., 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3497-3503.
- [20] Schaberg, D.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P., 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Depart. of Int. Med.*, 9, 72-75.
- [21] Teixeira, L.M., Facklam, R.R., 2003. *Enterococcus*, p. 422-433. In: Murray, P.R. (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8.ed. ASM Press, Washington.
- [22] Murray, B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3, 46-65.
- [23] Bismuth, R., Zilhao, R., Sakamoto, H., Guesdon, J. L., et al. 1990. Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34, 1611-1614.
- [24] Gordon, S., Swenson, J.M., Hill, B.C., Pigott, N.E., et al., 1992. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2373-2378.

- [25] Menezes, E.A., Lima, K.C., Cunha, F.A., Ângelom, R.F., et al., 2005. Infecções Hospitalares urinárias causadas por *Enterococcus faecalis* na cidade de Fortaleza. Rev. Bras. Anal. Clin., 37, 65-67.
- [26] Roberts, M.C., Moncla, B.J., Hillier, S.H., 2003. Characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 35, 1555-1557.
- [27] Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., et al., 2000. 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, 127-37.
- [28] Harthug, S., Juren, R., Mohn, S.C., Digranes, A., et al., 2002. The prevalence of faecal carriage of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci among inpatients at 10 major Norwegian hospitals. J. Hosp. Infect., 50:145-154.
- [29] Gold, O., Jordan, H.V., Houte, V.J., 1975. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. Arch. Oral Biol., 20, 473-477.
- [30] Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. Infect. Immun., 68, 2579-2586.
- [31] Claus, G.W., 1989. Understand microbes: a laboratory text book for microbiology, p. 250-252, W.H Freeman, New York.
- [32] Zhanel, G.G., Homenuik, K., Nichol, K., Noreddin, A., et al., 2004. The glycylicyclines: a comparative review with the tetracyclines. Drugs, 64, 63-88.

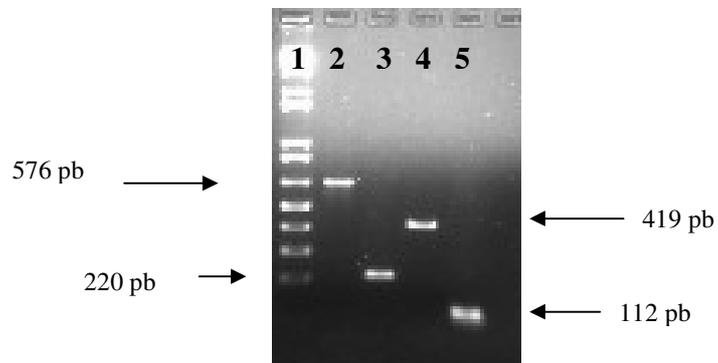
## 9.2 - Figures and legends



**Fig. 1:** Antibiotic resistant profile of the isolated *Enterococcus* spp. from food and humans. The figure shows the percentage of resistance to the tetracycline and gentamicin.



**Fig. 2:** Assay of gelatinolytic activity in tube contents BHI supplemented with 4% gelatin. The figure shows the percentage of gelatinolytic activity in clinical and food strains.



**Fig. 3:** *Enterococcus* spp: PCR reaction using *tet* (M) primer, generating an 576 pb product (2); PCR reaction using *aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia* primer, generating an 220 pb product (3); Virulence factor gelatinase, PCR reaction using *gelE* primer generating an 419 pb product (4); PCR reaction using *tuf* primer pair, generating an 112 pb product (5); Marker (kDa) (1).

## 10 - CONCLUSÕES

- a. A distribuição das espécies de *Enterococcus* foi similar à observada em outros estudos. A espécie prevalente foi *E. faecalis*, ocorrendo em 80 a 90% de todos isolados clínicos e alimentares enquanto que *E. faecium* representou cerca de 5 a 15%.
- b. Um elevado nível de resistência foi observado aos antimicrobianos tetraciclina e gentamicina tanto em *Enterococos* isolados de alimentos e humanos, sendo superior em isolados clínicos.
- c. A resistência simultânea foi observada na maioria das linhagens resistentes.
- d. O gene de resistência a tetraciclina estava presente em cerca de 90% dos isolados resistentes a tetraciclina o que sugere que as amostras resistentes não possuidoras do gene fossem resistentes pela presença de outros genes, já que a mesma pode ser codificada por outros não tão comuns.
- e. Todas as amostras resistentes a gentamicina apresentaram o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*.
- f. A atividade gelatinase foi superior em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos quando comparado com amostras clínicas.
- g. O gene *gelE* estava presente em 50% dos isolados clínicos cuja expressão gênica não foi suficiente para demonstrar a funcionalidade do gene.

## 11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F. & COURVALIN, P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursor in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology*, 175(1): 117-127, 1993.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S. & HAULY, M. C. O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19(3): 356-362, 1999.

BARRETO, N. A.; SANT'ANNA, R. R. P.; SILVA, L. B. G.; UEHARA, A. A.; GUIMARÃES, R. C.; DUARTE, I. M. & ASENSI, M. D. Caracterização fenotípica e molecular de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro, 2002 –2003. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, 16(3): 32-42, 2004.

BARRIERE, J. C.; BOUANCHAUD, D. H.; PARIS, J. M.; ROLIN, O.; HARRIS, N. V. & SMITH, C. Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* of semisynthetic injectable streptogramins: RP59500 and related compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30(Suppl A): 1–8, 1992.

BERNET, M. F.; BRASSART, D.; NEESER, J. R. & SERVIN, A. L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35(4): 483-489, 1994.

BISMUTH, R.; ZILHAO, R.; SAKAMOTO, H.; GUESDON, J. L. & COURVALIN, P. Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(8): 1611-1614, 1990.

BOUTON, Y.; GUYOT, P. & GRAPPIN, P. Preliminary characterization of microflora of Comté cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1): 123-131, 1998.

BOYCE, J. M.; OPAL, S. M.; CHOW, J. W.; ZERVOS, M. J.; BYNOE, G. P.; SHERMAN, C. B.; ROMULO, R. L. C.; FORTNAS. & MEDEIROS, A. A. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class Vancomycin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5): 1148-1153, 1994.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R. I. & CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(1): 135-144, 2006.

CAMPO, R. D.; TENORIO C.; JIMÉNEZ-DÍAZ R.; RUBIO, C.; MEZ-LUS, R.; BAQUERO, F. & TORRES, C. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3): 905-912, 2001.

CASADEWALL, B. & COURVALIN, P. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *Journal of Bacteriology*, 181(12): 3644-3648, 1999.

CHOW, J. W.; THAL, L. A.; PERRI, M. B.; VASQUEZ, J. A.; DONABEDIAN, S. M.; CLEWEL, D. B. & ZERVOS, M. J. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental *Enterococcal Endocarditis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(11): 2474-2477, 1993.

CHOW, J. W. Aminoglycoside resistance in *Enterococci*. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 586-589, 2000.

CHOW, J. W.; ZERVOS, M. J.; LERNER, S. A.; THAL, L. A.; DONABEDIAN, S. M.; JAWORSKI, D. D.; TSAI, S.; SHAW, K. J. & CLEWELL D. B. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(3): 511-514, 1997.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F. & CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1): 1-20, 2001.

CORRÊA, A. A.; FUENTEFRÍA, D. B. & CORÇÃO, G. Resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* isolados de amostras de fezes de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(2): 155-159, 2005.

DEVRIESE, L. A. B.; POT, B.; VAN DAMME, P.; KERSTERS, K. & HAESBROUCK, F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *International*

*Journal of Food Microbiology*, 26(2): 187-197, 1995.

DONABEDIAN, S. M.; THAL, L. A.; HERSHBERGER, E.; PERRI, M. B.; CHOW, J. W.; BARTLETT, P.; JONES, R. & JOYCE, K. R. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3): 1109-1113, 2003.

DUTKA-MALEN, S.; BLAIMONT, B.; WAUTERS, G. & COURVALIN, P. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(7): 1675-1677, 1994.

DUNNY, G. M.; LEONARD, B. A. & HEDBERG, P. J. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *Journal of Bacteriology*, 177(4): 871-876, 1995.

EATON, T. J. & GASSON, M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1628-1635, 2001.

EVANS, A. C. & CHINN, A. L. The Enterococci: with special reference to their association with human disease. *Journal of Bacteriology*, 54(4): 495-512, 1946.

FACKLAM, R. & ELLIOTT, J. A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the Streptococci and Enterococci. *Clin Microbiol Rev.* October; 8(4): 479-495. 1995.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S. & TEIXEIRA, L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore, M. S.; Clewell, D. B.; Courvalin, P.; Dunny, G.M.; Murray, B. E. & Rice, L. B. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, ASM Press, p. 1-9, 2002.

FINES, M.; PERICHON, B.; REYNOLDS, P.; SAHM, D. F. & COURVALIN, P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9): 2161-2164, 1999.

FONTANA, R.; LIGOZZI, M.; PITTALUGA, F. & SATTA, G. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microbial Drug Resistance*, 2(2): 209-213, 1996.

FORTINA, M. G.; RICCI, G.; MORA, D. & MANACHINI, P.L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1717-1721, 2004.

FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E. & DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1): 1-24, 2006.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. & STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47(1): 1-24, 1999.

FRANZ, C. M.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H. & HOLZAPFEL, W. H.. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2/3): 105-122, 2003.

FURTADO, G. H. C.; MARTINS, S. T.; COUTINHO, A. P.; SOARES, G. M. M.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 39(1): 1-5, 2005.

FURUMURA, M. T.; CARBONELL, G. V.; LEMES-MARQUES, E. G.; DARINI, A. L. C. & YANO, T. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus Faecalis* strains isolated from clinical sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3): 230-236, 2006.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, J. & COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3): 177-188, 2001.

GILMORE, M. S.; CLEWELL, D. B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G. M.; MURRAY, B. E. & RICE, L. B. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, ASM Press, 2002.

GONZALES-FERNANDEZ, C.; SANTOS, E. M.; JAIME, I. & ROVIRA, J. Use of starter cultures in dry-fermented sausage (*chorizo*) and their influence on the sensory properties. *Food Science and Technology International*, 3: 31-42, 1997.

GOLD, O.; JORDAN, H.V. & HOUTE, V. J. The prevalence of Enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Archives of Oral Biology*, 20(7): 473-477, 1975.

GORDON, S.; SWENSON, J. M.; HILL, B. C.; PIGOTT, N. E.; FACKLAM, R. R.; COOKSEY, R. C.; THORNSBERRY, C.; JARVIS, W. R. & TENOVER, F. C. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9): 2373-2378, 1992.

HANDWERGER, S. & SKOBLE, J. Identification of chromosomal mobile element conferring highlevel vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11): 2446-2453, 1995.

HARDIE, J.M. & WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal Applied Microbiology Symposium Supplement*, 83: 1S– 11S, 1997.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B. & HUIS, I.N. Probiotics, The scientific basis. In: FULLER, R. (Ed.). *Probiotics*. London: Chapman & Hall, p. 209–224, 1992.

HERNÁNDEZ, E. B. Aminoglucósidos. *Acta Medica*; 8(1): 48-53, 1998.

HERSHBERGER, E.; DONABEDIAN, S.; KONSTANTINOU, K. & ZERVOS, M. J. Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. *Clinical Infectious Disease*, 38(1): 92-98, 2003.

HÖRNER R.; LISCANO, M. G. H.; MARASCHIN, M. M.; SALLA ,A.; MENEGHETTI, B.; FORNO, N. L. F. D. & RIGHI, R. A. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 41(6): 391-395, 2005.

HSUEH, P. R.; TENG, L. J.; CHEN, Y. C.; YANG, P. C.; HO, S. W. & LUH, K.T. Recurrent bacteremic peritonitis caused by *Enterococcus cecorum* in a patient with liver cirrhosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6): 2450-2452, 2000.

HUYS, G.; D'HAENE, K.; COLLARD, J. M. & SWINGS, J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3): 1555-1562.

IZUMI, E.; PIRES, P. D. & SUZART, S. Detecção de atividade gelatinolítica em amostras de *Enterococcus Faecalis* isoladas em Londrina, Paraná. In: XI Encontro Anual de Iniciação Científica, Maringá. Anais do XI Encontro Anual de Iniciação Científica, p. 30, 2002

JACK, R. W.; TAGG J. R. & RAY B. B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59(2) :171-200,1995.

JETT, B. D.; HUYCK, M. M. & GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4): 462-478, 1994.

JOHNSON, A. P. The pathogenicity of enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(6): 1083–1089, 1994.

JONES, M. E.; DRAGHI, D. C.; THORNSBERRY, C.; KARLOWSKY, J. A.; SAHM, D. F. & WENZEL, R. P. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North America surveillance study (2000-2002). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3:14, 2004.

KAK, V. & CHOW, J. W. Acquired antibiotic resistances in *Enterococci*. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B. E. & Rice, L.B. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, ASM Press, p. 355-363, 2002.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 550-720, 2005.

KAUFHOLDI, A. & POTGIETER, E. Chromosomally mediated high-level gentamicin resistance in *Streptococcus mitis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(12): 2740-2742, 1993.

KAYAOGU, G. & ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus Faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 15 (5): 308-320, 2004.

KHAN, S.A.; NAWAZ, M. S.; KHAN A. A.; HOPPER, S. L.; JONES, R. A. & CERNIGLIA, C. E. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 27-34, 2005.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C. & HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22(7): 822-830, 2004.

KOLAR, M.; URBANEK, K.; VAGNEROVA, I. & KOUKALOVA, D. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics*, 31(1): 67-72, 2006.

KONEMAN, E. W. & CURY, A. E. *Diagnóstico microbiológico*. Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 589-659.

KRETSINGER, K.; DRAKE, A.; GAY, K.; JOYCE, K.; LEWIS, K.; ANGULO, F. High-level gentamicin resistance among *Enterococci* isolated from meat purchased from grocery stores and from outpatient human stools – United States, 1998-2001. In: 52nd. Annual Epidemic Intelligence Service (EIS) Conference, Atlanta. [Annals], P14, 2003.

KROGSTAD, D. J.; JKORFHAGEN, T. R.; MOELLERING, R. C ; WENNERSTEN JR., C. & SWARTS, M. N. Aminoglycoside-inactivating enzymes in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*: an explanation for resistance to antibiotic synergism. *Journal of Clinical Investigation*, 62(2): 480-486, 1978.

KUHNEN, E. F.; RICHTER, K. & ANDRIES, L. Establishment of a typing system for group D streptococci. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abt. Originale. Reihe A*, 267:322-330, 1988.

LAZO, J. S.; BRUNTON, L. L. & PARKER, K. L. *Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p. 999-1055, 2006.

LANDMAN, D. & QUALE, J. M. Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(2): 161-70, 1997.

LEAVIS, H.; TOP, J.; SHANKAR, N.; BORGAN, K.; BONTEN, M.; EMBDEN, J. & WILLEMS, R.J. L. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *Journal of Bacteriology*, 186(3): 672-682, 2004.

LOSTEINKIT, C.; UCHIYAMA, K.; OCHI, S.; TAKAOKA, T.; NAGAHISA, K. & SHIOYA, S. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of related genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(4): 390-395, 2001.

MAROTHI, Y. A.; AGNIHOTRI, H. & DUBEY, D. Enterococcal resistance - an overview. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23(4): 214-219, 2005.

MCBRIDE, S. M.; FISCHETTI, V. A.; LEBLANC, D. J.; MOELLERING, R. C. & GILMORE M. S. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PloS ONE*, 2(7): e582, 1-22, 2007.

MCCLELLAN, J.; JOYCE, K.; ROSSITER, S.; BARRETT, T. & ANGULO, F.J. High-level gentamicin resistant *Enterococci* and quinupristin/dalfopristin resistant *E. faecium* from ground pork purchased from grocery stores. In: 41st Interscience Conference Antimicrobial Agents Chemotherapy, Chicago. Program and Abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p.16-19, 2001.

MCKESSAR, S. J.; BERRY, A. M.; BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D. & PATON, J. C. Genetic characterization of *vanG*, a novel resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(11): 3224-3228, 2000.

MENEZES, E. A.; LIMA, K. C.; CUNHA, F. A.; ÂNGELOM, R. F.; SALVIANO, N. C. & OLIVEIRA, I. R. N. Infecções hospitalares urinárias causadas por *Enterococcus faecalis* na cidade de Fortaleza. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 37(2): 65-67, 2005.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y. & TULKENS, P. M. Aminoglicosides phosphotransferases type III from *Enterococcus*: over expression, purification, and substrate specificity. *Biochemistry*, 33: 6936-6944, 1999.

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. *Archives of Medical Research*, 32(2): 159-163, 2001.

MONDINO, S. S. B.; CASTRO, A. C. D.; MONDINO, P. J.; CARVALHO, M. G.; SILVA, K. M. & TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two brazilian hospitals. *Microbial Drug Resistance*, 9(2): 167-74, 2003.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F. & GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4): 513-522, 2000.

MURRAY, P. R.; TOROS, E. F. *Microbiologia médica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 220-223, 2004.

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. *Infection and Immunity*, 68(9): 5218-5224, 2000.

NOVAIS, C.; COQUE, T. M.; COSTA, M. J.; SOUSA, J. C.; BAQUERO, F. & PEIXE, L. V. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6): 1139-1143, 2005.

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*. *Immunolog.*, 63(1):17-23, 1988.

PIÑERA, J. G. G.; PENIÉ, J. B.; RODRÍGUEZ, M. Á.; REYES, A. M.; MORA E. & LESCAY, M. Glicopéptidos. *Acta Medica*, 8(1): 54-57, 1998a.

PIÑERA, J. G. G.; PENIÉ J. B.; RODRÍGUEZ M. Á.; REYES, A. P. P. & ALONSO, N. L. Macrólidos. *Acta Medica*, 8(1): 71-74, 1998b.

POETA, P.; ANTUNES, T. & RODRIGUES, J. *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(3): 412-414, 2005.

POOTOOLAL, J.; NEU, J. & WRIGHT, G. D. Glycopeptide antibiotic resistance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42: 381-408, 2002.

REMONATTO, B. G. V.; ZANCHI, A. C. & D'AZEVEDO, P. A. Detecção molecular da resistência bacteriana- ênfase para *Enterococcus* e *Streptococcus*. *NewsLab*, 70: 100-112, 2005.

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*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38): 26939-26945, 1999.

RICHARDS, M. J.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H. & GAYNES, R. P. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21: 510-515, 2000.

ROBERTS, M. C.; MONCLA, B. J. & HILLIER, S. H. Characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(12): 1555-1557, 2003.

ROBERTS, M. C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; BOGO JENSEN, L.; ROOD, J. & SEPPALA, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12): 2823-2830, 1999.

RUOFF, K. L.; DE LA MAZA, L.; MURTAGH, M. J.; SPARGO, J. D. & FERRARO, M. J. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3): 435- 437, 1990.

SALYERS, A. A. & ÁMABILE-CUEVAS, C. F. Why are antibiotic resistance genes so resistance to elimination? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11): 2321-2325, 1997.

SCHABERG, D. R.; CULVER D. H. & GAYNES, R. P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *American Journal of Medicine*, 91(suppl.3B): S72-S75, 1991.

SCHLEIFER, K.H. & KLIPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev. as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 31-34, 1984.

SCHOUTEN, M. A.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; MEIS, J. F. G. & VOSS, A. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococci* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 19(11): 816-822, 2000.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; MARTINS, P.; LOPES, M. F. S.; MARQUES, J. J. F.; TENREIRO, R. & CRESPO, M. T. B. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6): 2569-2576, 2003.

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A. S.; HUYCKE, M. M.; LINDAHL, G. & GILMORE, M. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *Esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*, 67(1): 193-200, 1999.

SHANKAR, N.; LOKCATEL, C. V.; BAGHDAYAN, A. S.; DRACHEMBERG C. GILMORE, M. S. & JHONSON, D. E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *Esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 69(7): 4366-72, 2001.

SHELD, W. M.; STRUNK, R. W.; BALIAN, G. & CALDERONE, R. A. Microbial adhesion to fibronectin *in vitro* correlates with production of endocarditis in rabbits. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 180: 474-482, 1985

SHEPARD, B. D. & GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4(2): 215-224, 2002.

SILVA, P. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1314 p., 1998.

SMITH, J. L. & PALUMBO, S. A. Use of starter cultures in meats. *Journal of Food Protection*, 46(11): 997-1006, 1983.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B. & SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4): 387-399, 1992.

SU, Y. A.; SULAVIK, M. C.; HE, P.; MAKINEN, K. K.; MAKINEN, P. L.; FIEDLER, S.; WIRTH, R. & CLEWELL, D. B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. liquefaciens. *Infection and Immunity*, 59(1): 415-20, 1991.

SUSSMUTH, S. D.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; WIRTH, R.; SUSA, M.; MARRE, R. & ROZDINSKI, E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* with human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infection and Immunity*, 68(9): 4900-4906. 2000.

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). *Journal of Applied Microbiology*, 89(2): 267-274. 2000.

TAILOR, S. A. ; BAILEY, E. M. & RYBAK, S. A. *Enterococcus*, an Emerging Pathogen. *The Annals of Pharmacotherapy*, 27(10): 1231-1242, 1993.

TEIXEIRA, L.M. & FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R. *et al.* (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 422-33, 2003.

TEIXEIRA, P. F. S. Relato de caso endocardite infecciosa trivalvular por *Enterococcus faecalis*. *Revista Residência Médica*, 1(3): 1-3, 1999.

TERPENNING, M. S.; ZERVOS, M. J.; SCHABERG, D. R. & KAUFFMAN, C.A. Enterococcal infections: an increasing problem in hospitalized patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 9: 457-61, 1988.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M. J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADÉS, J. R. & LASA, I. The enterococcal surface protein, ESP, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4538-4545, 2001.

TORRES, C.; TENORIO, C.; LANTERO, M.; GASTAÑARES, M. J. & BAQUERO, F. High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 2427-2431, 1993.

TRIEU-CUOT, P.; DE CESPÉDÈS, G.; BENTORCHA, F.; DELBOS F.; GASPAR, E. & HORAUD, T. Study of heterogeneity of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) genes in streptococci and enterococci by polymerase chain reaction: characterization of a new CAT determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(12): 2593-2598, 1993.

TSAI, S. F.; ZERVOS, M. J.; CLEWELL, D. B.; DONABEDIAN, S. M.; SAHM, D. F. & CHOW, J. W. A new high-level gentamicin resistance gene, *aph(20)-Id*, in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(5): 1229-1232, 1998.

TYRRELL, G.J; TURNBULL, L.; TEIXEIRA, L.M.; LEFEBVRE, J.; CARVALHO, M. D. A. G.; FACKLAM, R. R. & LOVGREN, M. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4): 1140-1145, 2002.

VALDÉS, D. L.; MUGUERCIA, H. L.; TORRES, M. L. H.; ARIAS, E. R.; MARÍN, R. Z. & PRADERES, L. J. Penicilinas. *Acta Medica*, 8(1): 28-39, 1998.

VANCANNNEYT, M.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C.; KNIJFF, E.; TORRIANI, S.; BJORKROTH, K. J.; FRANZ, C. M. A. P.; MORENO, M.R.F.; REVETS, H.; VUYST, L. D.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; DELLAGLIO F. & HOLZAPPEL, W. H. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1381-1391, 2002.

VELASCO, R. G.; ACOSTA, K. H.; ADRIANA, G. & CHÁVEZ M. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *Lab Acta*, 14(1): 9-10, 2002.

VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M. & MUDER, R. R. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clinical Infectious Diseases*, 35(5): 570-575, 2002.

WAAR, K.; VAN DER MEI, H. C.; HARMSSEN, J. M. H; DEGENER, J. E. & BUSSCHER, H. J. *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. *Microbiology*, 148: 1863-70, 2002.

WACHSMAN, M. B.; FARIÁS, M. E.; TAKEDA, E.; SESMA, F.; HOLGADO, A. P. R.; TORRES, R. A. & COTO, C. E. Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4): 293-299, 1999.

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(1): 63-88, 2004.

## CURRICULUM VITAE RESUMIDO

**GAMA, B.A.**

### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Bianca Almeida Gama

**Local e data de nascimento:** Pelotas, RS, Brasil, 22 de novembro de 1982.

**Endereço profissional:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500; Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBM), n° 209N, Centro de Biotecnologia (CBiot) – Agronomia, CEP: 90501-970 - Porto Alegre, RS – Brasil.

**Telefone profissional:** (51) 33086072      **E-mail:** [biaatt@hotmail.com](mailto:biaatt@hotmail.com)

### 2. FORMAÇÃO: Farmácia Bioquímica (Universidade Católica de Pelotas, 2000-2004).

### 3. ESTÁGIOS:

*Sociedade Portuguesa de Beneficência*

*Setor: Farmácia Hospitalar*

*Supervisão: Dra. Lia Almeida*

Período: Dez de 2001 – Jan 2002 (Estágio voluntário)

Atuação: Dispensação de medicamentos.

*Laboratório Dr. Manoel Maia*

*Setor: Análises Clínicas (Estágio voluntário)*

*Orientação: Dr. Manoel Maia*

Período: Fev 2002 – Mar 2002

Atuação: Análises de amostras clínicas nos diferenciados setores do laboratório clínico: Laboratórios de Bioquímica, Uroanálise e Hematologia.

*Farmácia Botica Pelotense*

*Setor: Farmácia de Manipulação*

*Orientação: Farm. Ângela Santos Neves*

Período: Jan 2003- Abril 2003

Atuação: Tratamento de água, limpeza e esterilização de materiais, manipulação de cápsulas, fórmulas dermatológicas e cosméticas.

*LEAC-Laboratório Escola de Análises Clínicas*

*Setor: Análises Clínicas*

*Supervisão: Farm. José Luiz Sedrez*

Período: Ago 2004 – Dez 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.

*Centro de Biotecnologia da UFRGS*

*Setor: Bioquímica de Microrganismos*

*Orientação: Prof. Dr. Jeverson Frazzon*

Período: Maio 2005- Nov 2005

Atuação: Isolamento de microrganismos a partir de alimentos, cultura de microrganismos e preparo de meio de cultura.

#### **4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR**

- Farmacêutico Responsável Técnico (CRF/RS: I – 9293):

Local: Drogeria SESI Ltda. – Matriz, Porto Alegre, RS.

Período: Jan 2005 – Mar 2005

Local: Sanar Rede de Farmácias - Matriz, Porto Alegre, RS

Período: Maio 2005- Abr 2006

-Farmacêutico Responsável Substituto (CRF/RS: I – 9293):

Local: Farmácia Ipê - Matriz, Cidreira, RS.

Período: Ago 2006 - Ago 2007

#### **5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

**B.A. GAMA, C.G. BIERHALS, A.P. FRAZZON, P.A. D'AZEVEDO, J. FRAZZON.** Análise molecular dos genes de resistência e virulência do microrganismo *Enterococcus spp.* In: IX Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2007, Porto Alegre, Brasil.

**B.A. GAMA, F. DE NES, C.G. BIERHALS, J.F. MELLO, A.P. FRAZZON, P.A. D'AZEVEDO, J. FRAZZON.** Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana em *Enterococcus spp.* isolados de alimentos. In: 7º Simpósio latino Americano de ciência de

alimentos (SLACA), 2007, Campinas, Brasil.

F. DE NES, **B.A. GAMA**, C.G. BIERHALS, J.F. MELLO, A.P. FRAZZON, P.A. D'AZEVEDO, J. FRAZZON. Caracterização molecular de linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos no RS pelo uso da técnica de Rea. In: 7º Simpósio latino Americano de ciência de alimentos (SLACA), 2007, Campinas, Brasil.

F. DE NES, **B.A. GAMA**, C.G. BIERHALS, J.F. MELLO, A.P. FRAZZON, P.A. D'AZEVEDO, J. FRAZZON. Caracterização molecular do gene *iap* de *Listeria monocytogenes* isoladas de queijos. In: 7º Simpósio latino Americano de ciência de alimentos (SLACA), 2007, Campinas, Brasil.

**B.A. GAMA**, F. DE NES, C.G. BIERHALS, J.F. MELLO, A.P. FRAZZON, P.A. D'AZEVEDO, J. FRAZZON. Análise Molecular dos genes de resistência antimicrobiana em *Enterococcus* spp isolados de alimentos na região de Porto Alegre. In: 2º Congresso Brasileiro sobre uso racional de medicamentos, 2007, Florianópolis, Brasil.

**B.A. GAMA**, F. DE NES, C.G. BIERHALS, J.F. MELLO, A.P. FRAZZON, P.A. D'AZEVEDO, J. FRAZZON. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* spp. In: 2º Congresso Brasileiro sobre uso racional de medicamentos, 2007, Florianópolis, Brasil.

C.G. BIERHALS, **B.A. GAMA**, A.P. FRAZZON, P.A. D'AZEVEDO, J. FRAZZON. Caracterização molecular dos genes de resistência a gentamicina e tetraciclina do microrganismo *Enterococcus* spp. In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre, 2007.

**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.

**B.A. GAMA**, C.M. PEREIRA, H.M. FIRPO, M.M. MUSSI. Isoforma do citocromo P450 e interações medicamentosas In: Ciência 2003 & Consciência, Pelotas, Brasil.

C.M. PEREIRA, **B.A. GAMA**, H.M. FIRPO, M.M. MUSSI. Importância do Citocromo P450 na metabolização dos Xenobióticos In: Ciência 2003 & Consciência, Pelotas, Brasil.

A.S. CALDAS, A. BERTOILINE, **B.A. GAMA**, F.S. RESNER, H.M. FIRPO, J. TREVISAN P.P.G. NETO, R. BERTRAN A.O. BARUM, A.E. DOMINGUEZ MUSSI. Estudo do comportamento do biodiesel em grupos geradores fase I - Obtenção do biodiesel. In: Ciência 2002 & Consciência, Pelotas, Brasil.