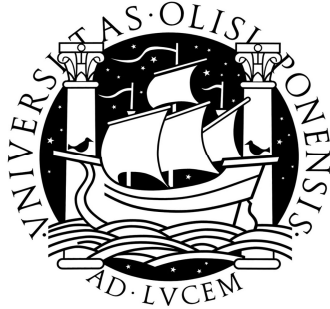


Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa



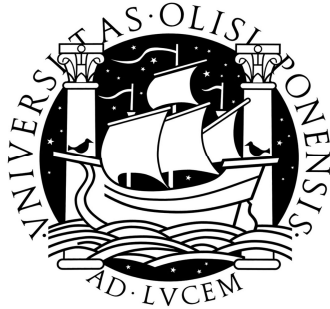
**Estudo da disseminação de *Enterococcus faecalis vanA*⁺ em
diferentes ambientes**

Marta Isabel da Silva Ruivo
Mestrado em Microbiologia Clínica

2008

Esta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa de 14 de Outubro de 2008.

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa



**Estudo da disseminação de *Enterococcus faecalis vanA*⁺
em diferentes ambientes**

Marta Isabel da Silva Ruivo

Mestrado em Microbiologia Clínica

Dissertação orientada pela Doutora Maria de Fátima Silva Lopes

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

Agradecimentos

Queria agradecer:

Ao Conselho científico do Mestrado em Microbiologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Ao ITQB e IBET, instituições que me acolheram durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Mário Ramirez, por aceitar co-orientar esta dissertação.

À Doutora Aida Duarte da Faculdade de Farmácia de Lisboa, à Doutora Constança Pomba da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e ao Doutor Nuno Mendonça, pela cedência dos isolados utilizados neste estudo.

Ao Doutor Rob Willems da Universidade de Utrecht (Holanda), pela colaboração neste estudo.

E agora MUITO OBRIGADO:

À Fátima pela orientação, por todas as oportunidades que me tem dado, pelo apoio e pela amizade.

À Tânia e à Marta por me terem incentivado e motivado, por todo o apoio e pelas ajudas precisosas.

Ao Paulo pela orientação, pela motivação e pelo apoio.

Aos restantes colegas de laboratório pelas ajudas.

Ao restante pessoal da Microbiologia, em especial à Paula e à Catarina por estarem presentes e por aguentarem os meus desabafos de vez em quando.

Aos meninos do RNA pelo apoio, motivação e por todas as ajudas.

Aos meus miguinhos do coração (vocês sabem quem são): por me conhecerem tão bem que nos momentos exactos estavam lá com os vossos ombros amigos- Por me apoiarem, incentivarem e por me ajudarem a manter a cabeça levantada sem nunca me deixarem desistir.

Aos meus pais: por todo o amor, por sempre me apoiarem e incentivarem, por terem estado sempre a meu lado em todas as minhas decisões e por todos os sacrifícios que fizeram para eu chegar onde estou hoje.

Ao meu mano e cunhada: pelo carinho, por estarem sempre presentes, por me incentivarem e por todo o vosso apoio.

E um beijinho muito grande à Catarina, a minha sobrinha linda, que mesmo nos tempos mais difíceis conseguiu fazer-me rir e mostrou-me o que realmente é importante.

Obrigado a todos.....

Resumo

Os enterococos constituem uma grande parte da microflora do tracto gastrointestinal dos mamíferos. Durante muito tempo os enterococos foram considerados inofensivos para o Homem, no entanto tem-se observado um aumento de infecções por eles causadas, em paralelo com o aumento da sua resistência a antibióticos, incluindo resistência à vancomicina. Num estudo efectuado anteriormente, verificou-se a existência de isolados *E. faecalis*, tanto clínicos como alimentares, que apresentavam susceptibilidade ou uma resistência intermédia à vancomicina, mas que no entanto apresentavam o operão *vanA* incompleto, sendo denominados de VACISEf.

No presente estudo tiparam-se 17 isolados VACISEf (de alimentos, de humanos e de animais) por MLST e MLVA, de modo a determinar a disseminação destes isolados e a determinar a sua relação com *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) presentes na base de dados (<http://efaecalis.mlst.net>). Pelo método de MLST, verificou-se que estes isolados não se encontram relacionados entre si, não estando também relacionados com nenhuma estirpe resistente. A disseminação do transposão e consequentemente do gene *vanA* parece assim não ser clonal. O método MLVA descrito mostrou-se pouco eficiente no estudo de tipagem envolvendo isolados de diferentes ambientes.

A tipagem molecular revelou a existência de isolados alimentares relacionados com isolados hospitalares que causaram infecção. Recorrendo à Suppression Subtractive Hybridization (SSH), procuraram-se as diferenças entre os genomas de um isolado hospitalar e de um isolado alimentar. Dos clones analisados (10%) apenas duas diferenças foram encontradas. Das restantes sequências analisadas é de salientar a detecção em ambos os isolados de um gene do plasmídeo pCF10, uma sequência homóloga a uma região do genoma da estirpe OG1-RF e também a existência de uma

sequência homóloga com uma região do genoma de *S. aureus*, o que evidencia a grande plasticidade do genoma de *E. faecalis*.

Palavras chave: *E. faecalis*; MLST; MLVA; SSH

Abstract

Enterococci constitute part of the microflora of the gastro intestinal tract of humans and other mammals. For many years enterococci were considered harmless for humans. However an increase of infections caused by these bacteria, and also an increase in antibiotic resistance has been reported in the last decades, including resistance to vancomycin. In a previous study the existence of *E. faecalis* strains, both of clinical and dairy origin, presenting susceptibility, or an intermediate resistance, to vancomycin, carrying an incomplete *vanA* operon were detected and designated as VACISEf. In the present study 17 VACISEf isolates (from food, humans and animals) were typed by MLST and MLVA in order to evaluate dissemination of these isolates and to determine their relation with VRE from the database (<http://efaecalis.mlst.net/>). MLST revealed that those isolates are not related with each other, nor related with any VRE strain. Thus, *vanA* spread appears not to be clonal. MLVA revealed to be inefficient to study isolates from different environments.

Molecular typing revealed the existence of dairy isolates related to hospital isolates. Using Suppression Subtractive Hybridization (SSH), differences between the genomes of an hospital isolate and a dairy isolate, were searched. Of the analysed clones (10%) only two differences were found. From the remaining analyzed sequences, it is important to highlight the detection of a gene of the pCF10 plasmid, an homologue sequence to the genome of the OG1-RF strain and an homologue sequence to a region of the *S. aureus* genome, which demonstrates the great plasticity of the *E. faecalis* genome.

Key-words: *E. faecalis*; MLST; MLVA; SSH

Lista de Siglas e Abreviaturas

ACB - Argentina-Connecticut-Bla⁺

BHI - Brain Heart Infusion

BVE - Bla⁺-Van^R-Endocarditis

CC - Complexo Clonal

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DLV - Doble Locus Variants

DNA - Deoxyribonucleic Acid

DOP - Denominação de Origem Protegida

GRAS - Generally Reconized As Safe

IBET - Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica

ITQB – Instituto de Tecnologia Quimica e Biológica

LB - Luria-Bertani

MLEE - Multilocus Enzyme Electrophoresis

MLST - MultiLocus Sequence Typing

MLVA - Multi-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis

MRSA - Metecilin Resistant Staphylococcus aureus

MOS - Mirror Orientation Selection

MST - Minimal Spanning Tree)

MT - MLVA Type

ORF - Open Reading Frame

PAI - Ilha de Patogenicidade

PCR - Polymerase Chain Reaction

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

RNA - Ribonucleic Acid

rRNA - ribossomal Ribonucleic Acid

SLV - Single Locus Variants

SSH - Suppression Subtractive Hybridization

ST - Sequence Type

VACISE - vanA-carrying intermediate and susceptible Enterococcus

VACISEf - vanA-carrying intermediate and susceptible Enterococcus *faecalis*

VNTR - Variable Number of Tandem Repeats

VRE - Vancomycin-Resistant Enterococci

VSE - Vancomycin-Susceptible Enterococci

Índice de Quadros

	Pág
Quadro 1: Resistências, intrínseca e adquirida, a antimicrobianos em <i>Enterococcus</i> .	6
Quadro 2: Fenótipos de resistência à vancomicina	11
Quadro 3: Origens e características dos isolados em estudo.	20
Quadro 4: Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> usados para amplificar os genes do esquema de MLST: <i>ghd</i> , <i>gyd</i> , <i>pstS</i> , <i>gki</i> , <i>aroE</i> , <i>xpt</i> , <i>yiqL</i>	33
Quadro 5: Programa de PCR Utilizado na amplificação dos genes do esquema de MLST	33
Quadro 6: Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> usados para amplificar as regiões do esquema de MLVA.	34
Quadro 7: Programa de PCR utilizado para a amplificação dos genes correspondentes ao esquema de MLVA	35
Quadro 8: Perfil alélico e correspondente ST obtido para cada isolado em estudo; Origem e situação geográfica dos isolados encontrados na base de dados para as ST's deste estudo.	36
Quadro 9: Representação do perfil alélico de MLVA para cada isolado em estudo.	42
Quadro 10: Número de reacções negativas e percentagem correspondente, obtidas na amplificação das regiões estudadas, do presente estudo em comparação com o estudo de Titze-de-Almeida.	44
Quadro 11: Programa de PCR utilizado na amplificação dos fragmentos clonados	57

Quadro 12: Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> desenhados a partir das sequências obtidas para os clones analisados	58
Quadro 13: Programa de PCR utilizado para a amplificação dos das sequências encontradas	59
Quadro 14: Resultado das contagens de colónias brancas após a clonagem, e número de colónias repicadas de cada placa.	64
Quadro 15: Características dos fragmentos obtidos e correspondentes homologias	68

Índice Figuras

	Pág.
Figura 1: Estrutura química da Vancomicina	8
Figura 2: Os operões que conferem resistência à vancomicina, já descritos em enterococos	12
Figura 3: Posição dos genes do esquema de MLST para <i>E. faecalis</i> , no genoma da estirpe V583.	27
Figura 4: Diagrama MST obtido através do software Bionumerics, que representa o processo evolutivo das ST's obtidas para o esquema de MLST para <i>E. faecalis</i> .	39
Figura 5: Dendograma representativo dos perfis de MLVA	43
Figura 6: Esquema do método de SSH	49
Figura 7: Gel de agarose resultante da aplicação dos produtos da digestão dos DNA Driver e Tester	61
Figura 8: Gel de agarose resultante da aplicação dos produtos de reação do controlo de ligação dos adaptadores.	61
Figura 9: Gel de agarose resultante da aplicação do produto subtraído obtido pelo método de SSH	62
Figura 10: Gel de agarose resultante da aplicação dos produtos da amplificação do gene <i>pstS</i> , para o produto subtraído e não subtraído.	63
Figura 11: Resultados obtidos pelo processo de hibridação diferencial	65
Figura 12: Géis de agarose resultantes da aplicação dos produtos da amplificação dos fragmentos inseridos em 36 clones.	67
Figura 13: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 3.	69

Figura 14: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 11.	69
Figura 15: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 19.	70
Figura 16: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 35, representativo do EF0490 encontrado no genoma da estirpe V583.	71
Figura 17: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 43	71
Figura 18: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 51	72
Figura 19: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 81	72
Figura 20: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 89	73
Figura 21: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 105	73
Figura 22: Esquema representativo da região abrangida pelos fragmentos inseridos no clone 114 e 122	74
Figura 23: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 105	74
Figura 24: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 160	75
Figura 25: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 176	75

Figura 26: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 191	76
Figura 27: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 192	77
Figura 28: Esquema representativo da região abrangida pelos fragmentos inseridos no clone 73 e 152	77
Figura 29: Géis de agarose resultantes da aplicação dos produtos da amplificação das regiões específicas encontradas para cada clone, nos isolados em estudo	79
Figura A.1: Diagrama resultante do programa eBURST que apresenta a estrutura clonal de <i>E. faecalis</i>	105
Figura B.1: Alinhamento do fragmento obtido do clone 3 com o EF3310.	107
Figura B.2: Alinhamento do fragmento obtido do clone 3 com a região intergénica entre o EF3310 e o EF3311.	107
Figura B.3: Alinhamento do fragmento obtido do clone 3 com o EF3311.	108
Figura B.4: Alinhamento do fragmento obtido do clone 11 com o EF0715.	109
Figura B.5: Alinhamento do fragmento obtido do clone 19 com o EF2229.	110
Figura B.6: Alinhamento do fragmento obtido do clone 35 com o EF0490 do genoma da estirpe V583.	111
Figura B.7: Alinhamento do fragmento obtido do clone 35 com o EF_A0042 do plasmídeo pTEF1 da estirpe V583	111
Figura B.8: Alinhamento do fragmento obtido do clone 43 com o EF2459.	112
Figura B.9: Alinhamento do fragmento obtido do clone 43 com a região intergénica entre o EF2458 e o EF2459.	112
Figura B.10: Alinhamento do fragmento obtido do clone 51 com o EF0641.	113

Figura B.11: Alinhamento do fragmento obtido do clone 81 com o EF1206	113
Figura B.12: Alinhamento do fragmento obtido do clone 89 com o EF2781.	114
Figura B.13: Alinhamento do fragmento obtido do clone 105 com o EF0539.	115
Figura B.14: Alinhamento das sequências obtidas para os clones 114 e 122.	115
Figura B.15: Alinhamento dos fragmentos obtidos para os clone 114 e 122 com o EF0720.	116
Figura B.16: Alinhamento do fragmento obtido do clone136 com o EF3146	117
Figura B.17: Alinhamento do fragmento obtido do clone 136 com a região intergênica entre o EF3145 e o EF3146.	117
Figura B.18: Alinhamento do fragmento obtido do clone 144 com o EF0549.	118
Figura B.19: Alinhamento do fragmento obtido do clone 160 com o EF0587, EF0588 e EF0589.	118
Figura B.20: Alinhamento do fragmento obtido do clone 160 com a região intergênica entre o EF0587 e EF0588.	119
Figura B.21: Alinhamento do fragmento obtido do clone 160 com a região intergênica entre o EF0588 e EF0589.	119
Figura B.22: Alinhamento do fragmento obtido do clone 160 com a região intergênica entre o EF0589 e EF0590.	119
Figura B.23: Alinhamento do fragmento obtido do clone 176 com o EF0546.	119
Figura B.24: Alinhamento do fragmento obtido do clone 176 com o EF0547.	120
Figura B.25: Alinhamento do fragmento obtido do clone 176 e a região intergênica entre o EF0545 e o EF0546.	120
Figura B.26: Alinhamento do fragmento obtido do clone 176 com a região intergênica entre o EF0546 e o EF0547.	120
Figura B.27: Alinhamento do fragmento obtido do clone 169 com o EF0546.	121

Figura B.28: Alinhamento do fragmento obtido do clone 191 com o EF1392.	121
Figura B.29: Alinhamento do fragmento obtido do clone 191 com a região intergênica entre o EF1391 e o EF1392.	122
Figura B.30: Alinhamento do fragmento obtido do clone 192 com o EF1966.	122
Figura B.31: Alinhamento do fragmento obtido do clone 192 com a região intergênica entre o EF1965 e o EF1966.	123
Figura B.32: Alinhamento das sequências obtidas para os clones 73 e 152	123
Figura B.33: Alinhamento dos fragmentos obtidos dos clones 73 e 152 com o SAS0025	124
Figura B.34: Alinhamento do fragmento obtido do clone 27 como gene <i>pcfW</i>	125
Figura B.35: Alinhamento do fragmento obtido do clone 184 uma sequência do genoma da estirpe <i>E. faecalis</i> OG1-RF	125

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Lista de Siglas e Abreviaturas	X
Índice de Quadros	XII
Índice de Figuras	XIV
Índice Geral	XIX

Índice Geral

	Pág.
Introdução Geral e Objectivos	1
<i>Género Enterococcus</i>	2
Importância da resistência a antibióticos em enterococos	5
Resistência à vancomicina	7
Enterococos resistentes à Vancomicina (VRE – Vancomycin-resistant enterococci)	9
Fenótipos e Genótipos de resistência à vancomicina	10
Disseminação Global	13
Objectivos	16
Capítulo 1: Descrição dos isolados	17
1.1 Introdução ao presente estudo	18
1.2 Origem	22
1.3 Crescimento	22

Capítulo 2: Tipagem Molecular	23
2.1 Introdução	24
2.2 Metodologia	30
2.2.1 Extracção de DNA total	30
2.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)	31
2.3 Resultados e discussão	35
Capítulo 3: <u>S</u>uppression <u>S</u>ubtractive <u>H</u>ybridization (SSH)	46
3.1 Introdução	47
3.2 Metodologia	53
3.2.1 Isolados em estudo	53
3.2.2 Extracção de DNA total	53
3.2.3 SSH	53
3.2.4 Clonagem	54
3.2.4.1 Preparação de células competentes	54
3.2.4.2 Ligaçã	55
3.2.4.3 Transformação das células	55
3.2.5 Confirmação dos clones	56
3.2.5.1 Preparação das membranas	56
3.2.5.2 Marcação das sondas	56
3.2.5.3 Hibridação	57
3.2.6 Sequenciação dos clones	57
3.2.6 Confirmação dos clones por PCR	58
3.3 Resultados e Discussão	60
Considerações finais	82

Referências Bibliográficas	85
APÊNDICE A: Diagrama eBURST	104
APÊNDICE B: Alinhamentos de sequências	106
APÊNDICE C: Comunicação oral	126
APÊNDICE B: Poster	134

Introdução Geral e Objectivos

Género *Enterococcus*

Importância da resistência a antibióticos em enterococos

Resistência à vancomicina

Enterococos resistentes à Vancomicina (VRE – Vancomycin-resistant enterococci)

Fenótipos e Genótipos de resistência à vancomicina

Disseminação Global

Objectivos

Introdução

Género *Enterococcus*

O nome “entérocoque” foi pela primeira vez introduzido em 1899 por Thiercelin, de modo a enfatizar a origem intestinal de diplococos Gram-positivos por ele descobertos^{58, 77}. No entanto, no início do século XX, o termo *Streptococcus* era mais utilizado para designar estas bactérias. Em 1937, Sherman desenvolveu um novo esquema de classificação do género *Streptococcus*, dividindo-os em quatro classes: piogénicos, viridans, lácteos e enterococos, sendo este último maioritariamente de origem fecal^{31, 34, 58, 77}. Só o aparecimento de técnicas de hibridação de DNA-DNA e DNA-rRNA e sequenciação do RNA 16s, foi possível distinguir os enterococos dos streptococos, o que culminou na aceitação do Género *Enterococcus* em 1984^{34, 58, 74, 77, 86}. Até à data são conhecidas as seguintes espécies de enterococos: *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camelliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*/*E. flavescens*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*/ *E. saccharominimus*, *E. heemanniensis*, *E. hirae*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. silesiacus*, *E. sulfureus*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. villorum*/ *E. porcinus* (<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html> acedido a 20 de Agosto de 2008).

O género *Enterococcus* consiste em bactérias Gram-positivas, anaeróbios facultativos, que apresentam uma forma ovóide, podendo aparecer como pequenas cadeias, aos pares ou como células únicas^{27, 31, 77}. Fazem parte da microflora intestinal humana, mas também foram descritos como fazendo parte da mucosa oral e do extracto vaginal¹²⁴. Também se encontram na microflora de outros animais, alimentos

(principalmente em produtos lácteos e carnes), plantas, podendo também ser encontrados no solo e água, provavelmente como resultado de contaminação por fontes fecais e devido à sua tolerância natural a condições adversas^{36, 40, 73, 77, 124}. *E. faecium* e *E. faecalis* são as espécies mais comuns em humanos. *E. durans* é frequentemente encontrado em leite e queijos, dos quais também são isolados *E. hirae* e *E. casseliflavus/E. flavescens*^{77, 86}.

Os enterococos são capazes de crescer entre 10°C e 45 °C, até 6.5% de NaCl (sendo este um dos melhores parâmetros para a sua identificação) e a pH 9.6. São também capazes de resistir a 60°C durante 30 minutos^{19, 34, 77, 86}.

Algumas espécies são pigmentadas, como é o caso do *E. mundtii* e do *E. casseliflavus*; outras apresentam mobilidade, como o *E. casseliflavus* e o *E. gallinarum*^{34, 77}. Estes organismos não possuem citocromos e são catalase negativos, porém existem algumas espécies que produzem uma pseudocatalase^{34, 77}. Outra das características que os distingue é a capacidade de hidrolisarem compostos como a esculina na presença de 40% de sais biliares, L-pirrolidonil-β-naftilamida (PYR) e leucina-β-naftilamida (LAP), com exceção de algumas espécies^{34, 77}.

O seu antigénio, ácido teicoico, está descrito como pertencente ao grupo D dos streptococos, no modelo de classificação de Lancefield.

O seu conteúdo em G+C varia entre 37 a 45 mol%^{31, 34, 77}.

Os enterococos são organismos fermentativos restritos devido á inexistência de ciclo de Krebs⁵⁰. Quase todas as estirpes são homofermentativas, sem que haja produção de gás. A fermentação da glucose resulta na produção de ácido L-lático²⁷.

Os enterococos são quimioorganotróficos, e o seu complexo nutricional requer um meio contendo peptona ou produtos semelhantes²⁷.

A sua capacidade de crescimento em condições adversas permite a sua distinção de outras bactérias, e consequente isolamento, estando descritos como resistentes a vários antibióticos²⁷.

Ao contrário de outras bactérias lácteas, os enterococos não são considerados GRAS (Generally Reconized As Safe), dado que a sua detecção em águas é considerada um indicador de contaminação fecal^{77, 86}. No entanto, algumas estirpes têm uma acção benéfica, sendo até considerados indispensáveis na indústria queijeira, como culturas de arranque^{34, 73}.

A distribuição dos organismos envolvidos em infecções nosocomiais tem vindo a alterar-se, tendo-se observado uma alteração das bactérias Gram-negativas para as Gram-positivas, das quais se destacam os *Enterococcus* que emergiram como um dos principais agentes patogénicos⁸⁶. Os enterococos são responsáveis por infecções nosocomiais graves, sendo a terceira causa nos EUA e a quarta na Europa, sendo considerados patogénicos emergentes. Mais especificamente, os enterococos são a segunda causa de infecções urinárias tanto nos EUA como na Europa, e são responsáveis de entre 5 a 20% das endocardites⁸⁶. A taxa de mortalidade de infecções por enterococos ronda os 20 a 30%⁸⁶.

Resumem-se a duas as fontes de infecção nosocomial por enterococos: a causada por enterococos presentes no tracto gastrointestinal do próprio paciente; e a adquirida por transmissão no ambiente hospitalar. No entanto, na maioria dos casos torna-se difícil perceber em qual dos casos se enquadra cada situação^{18, 50, 77}.

A maioria das infecções é causada por *E. faecalis* e *E. faecium*, representando, aproximadamente 80 e 20% das infecções respectivamente. No entanto, já foram descritos casos pontuais de infecções causadas por *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. raffinosus*⁸⁶. Embora a maioria das infecções seja causada por *E.*

faecalis tem-se observado um crescente aumento de infecções causadas por *E. faecium*, espécie à qual está associado um maior número de resistência a antibióticos⁶.

Até ao momento apenas o genoma de dois *E. faecalis* foram sequenciados, o genoma da estirpe V583⁸⁹, e mais recentemente o genoma da estirpe OG1-RF¹⁴. No momento estão a ser sequenciados os genomas de outros isolados *E. faecalis* e também está a ser sequenciado o primeiro genoma de um isolado *E. faecium* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial/microbial-index.xsp> acessado a 20 de Agosto de 2008). O interesse pela espécie *E. faecalis* surgiu pelo facto de esta possuir vários plasmídeos, podendo alguns desses ser transferidos por conjugação a outras bactérias. Foi em *E. faecalis* que se descobriram dois novos sistemas genéticos em *Enterococcus*, os transposões conjugativos e plasmídeos que respondem a feromonas sexuais^{29, 35}. A existência de plasmídeos conjugativos não só em *E. faecalis* mas também em *E. faecium*, levou a que estas espécies fossem consideradas como reservatórios de plasmídeos para outros géneros de bactérias^{27, 97, 106}.

Importância da resistência a antibióticos em enterococos

Nos últimos anos uma grande atenção tem sido dada aos enterococos, não só pelo aumento de doenças nosocomiais por eles causadas, mas também pelo aumento do número de antibióticos aos quais são resistentes. Estes dois factores reforçam-se mutuamente, visto que a resistência permite que os enterococos sobrevivam num ambiente em que os antibióticos são fortemente utilizados. Por outro lado, o ambiente hospitalar contém antibióticos que eliminam bactérias susceptíveis, contribuindo assim para uma vantagem selectiva dos organismos resistentes, providenciando também a disseminação destes agentes pelo meio hospitalar^{37, 74}.

A resistência a antibióticos pode ser dividida em duas classes: a intrínseca e a adquirida^{37, 41, 74}. Algumas bactérias são intrinsecamente resistentes a antibióticos, ou porque não possuem o local alvo para o antibiótico ou porque este não é capaz de atravessar a parede celular, de modo a chegar ao local alvo. A resistência adquirida é normalmente dependente de transposões ou plasmídeos, podendo também ser resultado de mutações pontuais^{37, 74}. Os enterococos apresentam resistências pertencentes a ambas as classes, como referido no Quadro 1.

Quadro 1: Resistências, intrínseca e adquirida, a antimicrobianos em *Enterococcus*. (Adaptado de Top et al, 2008¹²)

Resistência Intrínseca	Resistência Adquirida
β -lactâmicos	Ampicilina (altos níveis)
Penicilinas (baixo nível)	Aminoglicosídeos (altos níveis)
Carbapenems (níveis intermédios)	Macrolitos
Cefalosporinas (altos níveis)	Cloramfenicol
Aminoglicosídeos (níveis baixos ou intermédios)	Tetraciclina
Lincosamidas	Quinolonas
Streptogramina A	Oxazolidinonas
Glicopéptidos (baixos níveis)	Glicopéptidos (altos níveis)

O facto de os enterococos possuírem resistência intrínseca a muitos dos agentes antimicrobianos mais comuns, pode constituir uma vantagem cumulativa de adquirirem genes de alta resistência aos mesmos⁷⁶.

Também de grande relevância é o habitat destes organismos, ou seja, o tracto gastrointestinal, uma vez que estes estão em contacto, não só com bactérias Gram-

positivas, mas também Gram-negativas, podendo haver troca de material genético, que codifica para genes que conferem resistência a antimicrobianos⁷⁴.

Resistência à vancomicina

Os glicopéptidos, como por exemplo a vancomicina (Figura 1) e a teicoplanina, são usados no tratamento de doenças causadas por bactérias Gram-positivas, em casos de resistência ou alergia a β -lactâmicos^{54, 60}.

Em 1954 a vancomicina foi isolada da bactéria *Amycolaptosis orientalis*, enquanto que a teicoplanina foi introduzida em 1984^{19, 63}.

Os glicopéptidos são moléculas grandes, rígidas e hidrofóbicas, que são constituídos por uma estrutura de sete péptidos, aos quais se ligam cinco a sete anéis aromáticos e diferentes glícidos^{11, 54}.

Devido ao seu tamanho, os glicopéptidos não conseguem penetrar na parede celular das bactérias Gram-positivas. Esta é composta principalmente por peptidoglicano que é constituído por cadeias polipeptídicas de resíduos alternados de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) que se encontram ligadas entre si por um pentapeptido de L-alanina-D-glutamato-L-lisina-D-alanina-D-alanina. São estas ligações cruzadas que vão conferir rigidez e estabilidade à célula^{69, 73, 94}.

Durante a síntese da parede bacteriana ocorre a transglicosilação, ou seja a ligação GlcNAc-MurNAc originando as cadeias polissacarídeas; e ocorre a ligação do pentapéptido, pela acção de transpeptidases, promovendo a formação das ligações cruzadas entre as cadeias de polissacáridos. Os glicopéptidos interagem com o C-terminal do resíduo de precursores de peptidoglicano D-alanil-D-alanina (D-ala-D-ala) da subunidade N-acetil-muramil-pentapéptido da parede celular, e a formação destes

complexos bloqueia a transpeptidação, impedindo assim a incorporação dos precursores na parede celular, resultando numa formação anormal da parede, levando à morte da célula^{54, 73, 94}.

Os organismos Gram-negativos são intrinsecamente resistentes a estes antibióticos, devido a impermeabilidade da parede celular exterior⁵⁴.

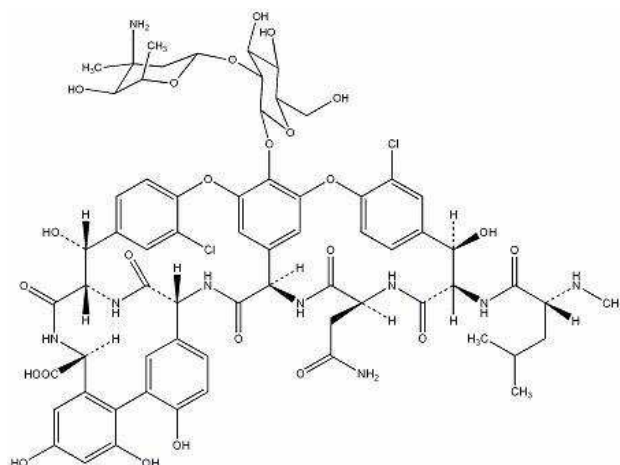


Figura 1: Estrutura química da Vancomicina (<http://www.molcan.com/vancomycin.htm> acedido a 19 de Fevereiro de 2008).

A teicoplanina é um substituto menos tóxico da vancomicina, sendo maioritariamente utilizada no tratamento de infeções, moderadas ou severas, causadas por organismos Gram-positivos. O número de organismos resistentes a este antibiótico é baixo, sendo alguns exemplos os *Pediococcus* e alguns *Lactobacillus*¹¹⁴.

Enterococos resistentes à Vancomicina (VRE – Vancomycin-resistant enterococci)

Durante 20 anos, a vancomicina não foi usada em medicina clínica, dada a sua nefro-toxicidade e também pela introdução dos β -lactâmicos⁶⁰. Contudo, a detecção de MRSA (Metecilin Resistant Staphylococcus aureus) em 1961 levou a um aumento do uso de vancomicina¹⁹. Em meados dos anos 80, a utilização da vancomicina aumentou grandemente devido à introdução de uma forma purificada e menos tóxica deste antibiótico na Europa e EUA, resultando num aumento brusco do uso deste antibiótico¹¹⁸. Em 1986, em França, surgiu o primeiro caso de resistência à vancomicina, não em *Staphylococcus*, mas sim em *Enterococcus*¹⁹.

A origem dos genes de resistência à vancomicina é ainda desconhecida, supondo-se que sejam originários da espécie produtora do antibiótico. Em relação ao aparecimento de enterococos ambientais resistentes, pensa-se ser resultado da utilização de vancomicina e de outros glicopéptidos, tanto a nível clínico, como agrícola (ex. avoparcina – promotor de crescimento). Nas primeiras incidências, os surtos de VRE eram monoclonais e apenas ocorriam em alas hospitalares de cuidado intensivo ou de oncologia. Contudo, no presente têm sido detectados surtos policlonais de VRE, não só em áreas de cuidados intensivos mas também em outras áreas hospitalares. Se os VRE se tornarem endémicos no Futuro, os programas de controlo de infecções tradicionais, como por exemplo barreiras de precaução e de restrição do uso de vancomicina, deixam de ser eficazes⁵⁷.

O aumento de enterococos resistentes à vancomicina está-se a tornar um caso preocupante para os médicos, dada a ameaça de este antibiótico deixar de ser eficaz no tratamento de infecções causadas por estas bactérias⁷³. Na verdade, as grandes preocupações em torno da resistência à vancomicina em enterococos prendem-se com: a

falta de sinergia, quando a vancomicina é combinada com aminoglicósidos; a resistência dos enterococos a muitos dos outros antibióticos; o risco de se espalhar por bactérias virulentas⁷³, já tendo sido comprovada a transferência da resistência à vancomicina para *Staphylococcus aureus*¹⁰⁸.

Fenótipos e Genótipos de resistência à vancomicina

O mecanismo de resistência a glicopéptidos em enterococos, ocorre por alteração do alvo de ligação do antibiótico. Esta alteração ocorre pela substituição dos precursores de peptidoglicano D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser. Esta resistência à vancomicina em enterococos pode ser associada a sete fenótipos distintos, onde o tipo VanL foi o último a ser descrito¹⁵. Os fenótipos apresentam-se descritos no Quadro 2.

Quadro 2: Fenótipos de resistência à vancomicina (adaptado de Top et al, 2008¹²)

	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG	VanL
Tipo de Resistência	Adquirida	Adquirida	Intrínseca	Adquirida	Adquirida	Adquirida	Adquirida
CIM							
Vancomicina (mg/L)	64-1000	4-1000	2-32	64-128	16	8-16	8
CIM							
Teicoplanina (mg/L)	16-512	0.5-1	0.5-1	4-64	0.5	0.5	0.5
Regulação	Induzida	Induzida	Induzida/ Constitutiva	Induzida/ Constitutiva	Induzida	Induzida	Não determinado
Conjugação	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva	Não determinado
Resíduos Terminais	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser
Localização	Plasmídeo/ cromossoma	Plasmídeo/ cromossoma	cromossoma	cromossoma	Cromossoma	cromossoma	cromossoma

Cada fenótipo é codificado por um operão específico, estando seis dos operões descritos na Figura 2.

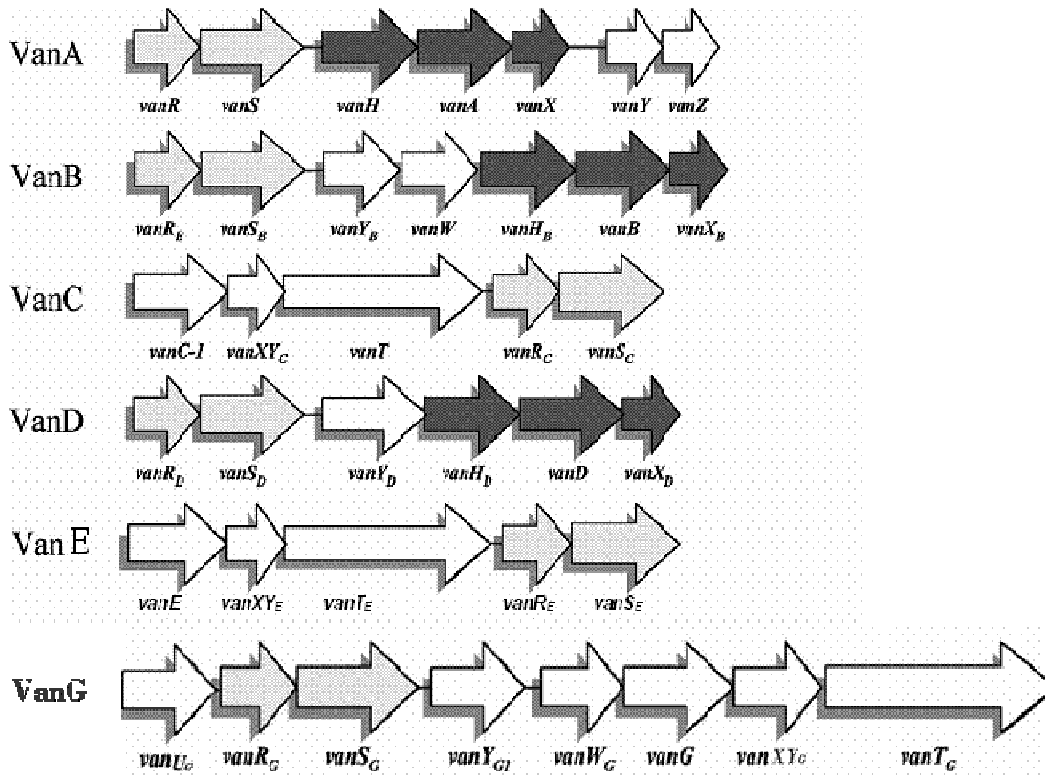


Figura 2: Os operões que conferem resistência à vancomicina, já descritos em enterococos. Cada operão mostra os genes associados com cada tipo de resistência, cujos mecanismos se encontram descritos no texto; As tonalidades de cinzento claro e escuro, correspondem a genes com funções semelhantes. (adaptado de Pootoolal et al, 2002⁹⁴)

O fenótipo VanA é caracterizado pela resistência induzida a níveis altos tanto de Vancomicina como de Teicoplanina^{18, 94}. A resistência é codificada por nove genes, que se encontram num elemento genético móvel, cujo modelo é o transposão Tn1546. Este possui a habilidade de se auto-transferir, podendo também ser transferível por conjugação^{8, 9}. O Tn1546 tem aproximadamente 11Kb, pode ser encontrado no cromossoma ou em plasmídeos. Os 9 genes codificam para nove polipeptidos, que interagem de modo a conferirem a resistência a glicopeptidos⁹. Os dois primeiros,

ORF1 e ORF2 (não representados na Figura) que se encontram a montante dos restantes elementos, têm a função de transposição; o VanR e VanS, regulam a expressão dos restantes genes. O VanH, o VanA e o VanX, conferem resistência, levando à formação de precursores de peptidoglicano D-Ala-D-Lac (D-alanil-D-Lactato), em vez dos precursores normais D-Ala-D-Ala. Os últimos dois (VanY e VanZ) são proteínas acessórias que inibem a via normal da síntese de peptidoglicano^{9, 54}. A via de resistência é desencadeada pela proteína sensora VanS e pela proteína reguladora VanR, na presença de glicopéptidos no meio. O VanH, uma desidrogenase, reduz o piruvato a D-lactato. A ligase VanA sintetiza o precursor D-Ala-D-Lac. A VanX, DD-dipeptidase hidroliza o dipeptido D-Ala-D-Ala, produzido a partir do cromossoma endógeno. Os resíduos D-Ala produzidos são hidrolisados pela DD-carboxipeptidase VanY. A VanZ confere resistência a altos níveis de teicoplanina através de mecanismos ainda desconhecidos²⁵.

Disseminação Global

Enquanto nos EUA a prevalência de VRE acontece em hospitais, na Europa a realidade é bem diferente. Pensa-se que a situação dos EUA tenha resultado da administração de uma grande quantidade de glicopéptidos a nível hospitalar, no entanto esta é uma tendência que começa a alterar-se⁸⁶. Na Europa têm sido isolados VRE não só em ambientes hospitalares, como também em indivíduos não hospitalizados, em animais e também em produtos alimentares. Na Europa, onde foi isolado o primeiro VRE, a prevalência a nível hospitalar, quando relacionada com os EUA, mantém-se num nível mais baixo,

O facto de na Europa se observar um elevado numero de isolados VRE não associados a ambientes hospitalares e em diferentes ambientes levanta várias

preocupações, sendo uma das maiores o isolamento de VRE em animais de quintas. Em países onde se utilizaram antibióticos, como a avoporcina, análogos à vancomicina, como promotores de crescimento^{90, 120}, têm sido apresentadas evidências da possível transmissão de VRE de animais para humanos^{51, 107, 101, 117, 122}. O facto de se considerar a hipótese de transmissão entre animais e humanos, levanta a questão da necessidade de monitorizar os animais de companhia, podendo estes ser uma via de transmissão de resistência aos humanos^{43, 47}. Outro problema relacionado com animais de quintas, é se os produtos obtidos desses animais, como leite, queijo ou até mesmo carne, se serão uma possível via de transmissão a humanos^{36, 41}. Bates *et al* (1994)¹² detectaram pela primeira vez isolados VRE em alimentos, tendo no seu estudo sugerido que os VRE podiam contaminar humanos através da cadeia alimentar. Bertrand *et al* (2000)¹²⁵ demonstraram, recorrendo à técnica de PFGE, que isolados alimentares apresentavam perfis comuns aos isolados de humanos, levando mais uma vez a suspeitar que os isolados alimentares podem servir de reservatórios ou via de transmissão da resistência à vancomicina. Mais recentemente Biavasco *et al* (2007) estudaram a relação entre isolados *E. faecium vanA* de diferentes ambientes, e os resultados encontrados sugerem que os isolados alimentares, nomeadamente de carne, poderão ter um papel na transmissão desta resistência¹³.

Outra via de disseminação de *Enterococcus* que levanta grandes preocupações, é através da água³. Vários estudos têm demonstrado que um elevado número de VRE está presente em águas de esgotos hospitalares e de matadouros que posteriormente são misturados com esgotos municipais em estações de tratamento^{70, 71, 81}. Os tratamentos a que os esgotos são submetidos reduzem a carga bacteriana, mas não a eliminam totalmente, o que pode resultar numa disseminação de isolados multiresistentes não só através de águas para consumo, mas também através de rios^{3, 70, 71, 81} e oceanos⁷⁵.

Em Portugal alguns estudos têm sido efectuados que permitem relatar a disseminação de enterococos, bem como os genótipos de resistência e virulência, em hospitais^{23, 83, 85, 96}, na comunidade^{82, 83, 92, 93}, em animais^{23, 83, 84, 91-93, 96}, águas^{70, 71, 81, 83} e alimentos^{23, 96}. A incidência de VRE em ambiente hospitalar aumentou cerca de 41% desde 2001, especialmente em *E. faecium* (<http://www.rivm.nl/earss/> acessado em 20 de Agosto de 2008). Embora a maior prevalência ocorra em hospitais, têm surgido publicações que referem o isolamento de VRE em animais^{84, 93} e águas^{70, 71, 81}. Uma das situações descritas por Ribeiro *et al* (2007), é a existência de estirpes, que embora apresentem o gene *vanA* que confere resistência são susceptíveis à vancomicina, tendo sido isoladas de indivíduos hospitalizados, animais e alimentos. Estes isolados apesar de só conterem parte do operão *vanA*, possuíam uma resistência intermédia à vancomicina, os quais foram denominados de VACISE (*vanA*-carrying intermediate and susceptible *Enterococcus*)⁹⁶. Este estudo demonstrou a importância de se efectuar a pesquisa dos genes que conferem resistência, não só em VRE, mas também em estirpes susceptíveis, assim como a importância de estudos que permitam monitorizar a disseminação dos isolados, e deste modo estabelecer uma relação entre isolados VRE, VSE e VACISE.

Objectivos

Este trabalho teve como objectivos principais:

- I. Estudo da disseminação de isolados VACISEf de diferentes ambientes através de métodos de tipagem molecular como MLVA e MLST, e com este ultimo relacioná-los com estirpes VRE inseridas na base de dados <http://efaecalis.mlst.net/>.
- II. Por comparação genómica com recurso ao método SSH, determinar diferenças entre um isolado alimentar e um isolado hospitalar, relacionados por métodos de tipagem molecular.

Capítulo 1: Descrição dos isolados

1.1 Introdução ao presente estudo

1.2 Origem

1.3 Crescimento

Capítulo 1: Descrição dos isolados

1.1 Introdução ao presente estudo

Ribeiro *et al* (2007)⁹⁶ efectuou um estudo com enterococos de diferentes ambientes (clínico humano, clínico veterinário e alimentar), no qual se englobavam os 17 isolados utilizados no presente estudo) tendo como objectivo principal a avaliação do risco real que os enterococos alimentares constituem como potenciais reservatórios e veículos da transmissão de resistência à vancomicina⁹⁶. Nesse estudo os vários isolados foram tipados por PFGE, o método considerado como “gold-standard” na tipagem de enterococos, que consiste na macro restrição do DNA total, seguido de separação electroforetica dos fragmentos. De acordo com as semelhanças nos perfis de bandas obtidos são reconhecidos como geneticamente relacionados ou não. No estudo de Ribeiro *et al* os isolados foram agrupados, recorrendo ao software Bionumerics, com base nos respectivos perfis de PFGE. Aplicando os critérios de Tenover (isolados com 6 ou menos bandas de diferença são relacionados e com mais de sete bandas de diferença não são relacionados)¹⁰⁹ considerou-se que um índice de semelhança igual ou superior a 94% era indicativo da relação genética entre os isolados. Para todos os isolados foram pesquisadas as resistências a 30 antibióticos de todas as classes e mecanismos de acção, e foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de E-test para os antibióticos teicoplanina e vancomicina. Também foi efectuada uma pesquisa genotípica de resistência à vancomicina, em que se pesquisou a presença dos genes *vanA* e *vanB*. No caso dos isolados em que se detectou estes genes, também foram pesquisados os restantes genes do operão *vanA*. Foram também pesquisados genes que conferem resistência à gentamicina (*acc(6')-aph(2'')*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*) e à eritromicina (*ermB*).

Neste estudo verificou-se que um grande número de isolados, mesmo apresentando susceptibilidade à vancomicina, apresentava o gene *vanA*, sendo que a maioria pertencia à espécie *E. faecalis*, passando a ser denominados de VACISEf (*vanA*-carrying intermediate and susceptible *Enterococcus faecalis*)⁹⁶.

Perante estes resultados, uma das questões que se coloca é: qual a relação genética, se é que ela existe, entre os isolados VACISEf e os isolados VRE e VSE, a uma escala global?

No sentido de responder a esta questão, escolheram-se 17 isolados VACISEf, cujas características estão descritas no Quadro 3, e tiparam-se com recurso às técnicas de MLVA (Multi-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) e de MLST (MultiLocus Sequence Typing), comparando os resultados com os já obtidos por PFGE, uma vez que os do método MLST permitem uma comparação global dos isolados (Mundial). Tendo-se encontrado isolados alimentares e clínicos relacionados, para determinar diferenças a nível de genoma entre estes dois isolados relacionados e de ambientes distintos, recorreu-se à técnica de SSH (Suppression Subtractive Hybridization).

Quadro 3: Origens e características dos isolados em estudo.

Isolado	Origem	Fenótipo de Resistência	Genes de resistência a antibióticos	MIC (µg/ml)		Operão <i>vanA</i> ^b	PFGE
				TC	Va		
QA46	Queijo	CN, K, DA, MY, E, SP, CT, PB, RD, MET, CRO, B	<i>ermB</i>	6	0,25	<i>vanA, vanY</i>	A
LCB80	Leite	CN, K, NET, TE, Oxt, DA, MY, E, SP, CT, PB, CIP, Nor, SxT, RD, MET, CRO, B	<i>aph(2'')-Ic, ermB</i>	3	0,25	<i>vanH, vanA</i>	B
QCB1	Queijo	CN, K, NET, TE, Oxt, CI, DA, MY, SP, CT, PB, CIP, Ofi, Enr, SxT, RD, AML, AMP, P, MET, PRL, IMP, CFP, CRO, B	-	4	1	<i>vanA</i>	C
QCB4	Queijo	CN, K, NET, TE, DA, MY, SP, CT, PB, MET, CFP, CRO, B	<i>ermB</i>	3	0,25	<i>vanH, vanA</i>	C
QCB15	Queijo	CN, K, NET, TE, Oxt, CI, DA, MY, E, SP, CT, PB, RD, MET, B	<i>ermB</i>	3	0,38	<i>vanH, vanA</i>	D
HSM3143a	Humano	CN, K, DA, MY, CT, PB, RD, MET, CFP, CRO, B	-	2	0,38	<i>vanR, vanH, vanA</i>	F
HSM3720	Humano	CN, K, TE, Oxt, CI, DA, MY, E, SP, CT, PB, CIP, RD, P, MET, CRO, B	<i>ermB, aph(2'')-Ic</i>	6	0,5	<i>vanR, vanH, vanA</i>	D
HSM3840	Humano	CN, K, TE, Oxt, CI, DA, MY, E, SP, CT, PB, SxT, B	<i>ermB</i>	4	0,25	<i>vanA</i>	^d
HSM4182	Humano	CN, K, TE, Oxt, CI, DA, MY, E, SP, CT, PB, RD, MET, CFP, CRO, B	<i>ermB</i>	6	0,5	<i>vanR, vanS, vanH, vanA, vanY</i>	D

11270	Humano	CN, K, DA, MY, CT, PB, Ofi, MET, CFP, CRO, B	-	4	0,38	<i>vanA, vanH</i>	J
U1740	Humano, Infecção Urinária	CN, K, TE, Oxt, Cl, DA, MY,E, SP, CT, PB, MET, CRO, B	<i>ermB</i>	4	2,5	<i>vanR, vanS, vanH, vanA, vanY</i>	I
U610	Humano, Infecção Urinária	CN, TE, Oxt, DA, MY, CT, PB, RD, MET, B	-	4	0,25	<i>vanA</i>	K
U153	Humano, Infecção Urinária	CN, K, DA, MY, CT, PB, MET, CFP, CRO, B	-	4	0,38	<i>vanA</i>	G
V82	Animal, Infecção Urinária	CN, K, NET, TE, Oxt, DA, MY, E, SP, CT, PB, RD, AML, AMP, P, MET, PRL, IMP, CFP, CRO, Nf, B	<i>aac(6')aph(2'')</i>	3	1,5	<i>vanA</i>	H
85R	Animal, Otite Externa	CN, K, NET, TE, Oxt, DA, MY,E, SP, CT, PB, CIP, Nor, Ofi, Enr, SxT, RD, AML, AMP, P, MET, PRL, IMP, CFP, CRO, Nf, B	<i>aac(6')aph(2'')</i>	2	1,5	<i>vanA</i>	M
344	Animal, Infecção Urinária	CN, K, NET, TE, Oxt, DA, MY,E, SP, CT, PB, CIP, Nor, Ofi, Enr, RD, AML, AMP, P, MET, PRL, IMP, CFP, CRO, Nf, B	<i>ermB, aac(6')aph(2'')</i>	2	3	<i>vanH, vanA</i>	E
MM172	Humano, Infecção vaginal	CN, K, NET, TE, OT, DA, CT, PB, RD, MET, CFP, CRO, MY, B, VA	<i>ermB</i>	12	0,75	-	D

^aFA-Ácido Fusídico; AML- Amoxicilina; AMP-Ampicilina; B-Bacitracina; CFP-Cefoperazona; CRO-Ceftriaxona; CIP-Ciprofloxacina; DA-Clindamicina; Cl-Cloranfenicol; CT-Colistina; ENO-Enrofloxacina; E-Eritromicina; SP-Espiramicina; CN-Gentamicina; IPM-Imipeneme; K-Kanamicina; MY-Lincomicina; MET-Meticilina; NET-Neticilina; F-Nitrofurantoina; NOR-Norfloxacina; OFX-Ofloxacina; Oxt-Oxitetraciclina; P-Penicilina G; PRL-Piperacilina; PB-Polimixina B; RD-Rifampicina; SxT-Sulfametaxanol/Trimetoprim; TE-Tetraciclina; VA-Vancomicina; TC- Teicoplanina

^bGenes que compõem o operão *vanA*, que confere resistência à Vancomicina

^cO gene *ermB* codifica para uma adenina dimetilase de RNA ribossomal que confere resistência à eritromicina; o gene *aph(2'')-Ic* codifica para uma fosforilase que confere um nível médio de resistência à gentamicina; o gene *aac(6')aph(2'')* codifica para uma enzima bifuncional que confere um nível de resistência alto à gentamicina⁶⁵.

^dNão se conseguiu obter o perfil de PFGE para este isolado.

(-) Não se obteve amplificação

1.2 Origem

Para a realização deste trabalho foram utilizados 17 isolados identificados como *Enterococcus faecalis*, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do IBET (Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica), que cujas características relevantes se encontram descritas no Quadro 3. Desses, cinco foram isolados de queijo e leite provenientes de regiões portuguesas de Denominação de Origem Protégida (D.O.P.) (decreto-lei nº146/84^{II}), nomeadamente Azeitão e Castelo Branco, identificados por Alves *et al* (2004)⁷. Sete dos isolados são de origem hospitalar e três de origem animal, nomeadamente de infecções caninas, tendo sido identificados pelo método VITEK. Um último isolado é de origem comunitária identificado pelo método descrito por Depardieu *et al* (2004)²⁴.

1.3 Crescimento

Os inóculos em meio líquido foram obtidos transferindo uma ansa da cultura a - 20°C, correspondente a um volume de 10 µl, para tubos contendo 5 ml de meio BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid, Inglaterra), que foram incubados a 37°C durante 24 horas.

Capítulo 2: Tipagem Molecular

2.1 Introdução

2.2 Metodologia

2.2.1 Extracção de DNA total

2.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

2.3 Resultados e discussão

Parte deste trabalho foi apresentado, na forma de comunicação oral, no “20th International ICFMH symposium - FoodMicro 2006 – Food safety and food biotechnology: diversity and global impact” em Bolonha, Itália

Capítulo 2: Tipagem Molecular

2.1 Introdução

A epidemiologia molecular é cada vez mais uma ferramenta importante em microbiologia. É uma disciplina que estuda a disseminação de agentes patogénicos, permitindo a diferenciação de estirpes, sendo de grande importância em caso de surtos⁸⁷. A nível global, permite acompanhar a evolução filogenética dos agentes patogénicos, e deste modo a criação de mecanismos de combate a estes organismos¹⁰³.

A tipagem molecular é essencial em epidemiologia molecular, pelo que são cada vez criados métodos com uma eficácia, cada vez maior, na comparação de estirpes^{42, 103}.

O PFGE é considerado como padrão entre os métodos de tipagem molecular, dado que não só permite a comparação de estirpes, como também a identificação de clones entre as mesmas. Baseia-se na macrorestrição do genoma, obtendo-se uma série de fragmentos de diferentes tamanhos, que são depois sujeitos a separação electroforetica¹⁰³. O perfil de bandas obtido é comparado, e através do número de bandas de diferença, pode estabelecer-se se as estirpes são a mesma (clone), se são relacionadas ou não relacionadas¹⁰⁹. No entanto, este método tem desvantagens, nomeadamente o facto de ser moroso e a compatibilidade dos resultados entre laboratórios nem sempre ser satisfatória².

Um dos alvos para a criação de novos métodos de tipagem molecular são os denominados genes “housekeeping”, uma vez que nestes genes a acumulação de variações (mutações) é lenta. A primeira vez que estes genes foram utilizados de modo a determinar a variação das espécies, foi no método Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE). Este método baseia-se na mobilidade electroforetica de proteínas essenciais para o crescimento e viabilidade da célula^{20, 30, 115}. Com esta técnica obtinham-se

resultados fidedignos em caso de surtos, no entanto não eram suficientemente discriminativos a nível de estudos populacionais e apresentavam pouca informação⁶⁷. Baseando-se nos mesmos princípios que o MLEE, surgiu um novo método, MultiLocus Sequencia Typing (MLST), onde a diferença entre espécies é estabelecida com base na sequenciação de fragmentos internos de genes “housekeeping”, e não por separação electroforetica^{33, 115}.

O MLST foi proposto em 1998 como método do qual resultam dados exactos e comparáveis, que seria apropriado para a investigação epidemiológica e que daria uma boa ideia da distribuição populacional dos organismos e da sua evolução⁶⁷. Baseia-se na sequência de fragmentos internos (450-500pb) de genes “housekeeping”, normalmente um conjunto de sete genes^{30, 103}. Uma das especificações na escolha destes genes, prende-se com o facto de estes se encontrem dispersos no genoma, equidistantes entre si, de modo a que as alterações obtidas sejam representativas de todo o genoma^{48, 98}. O tamanho dos fragmentos é escolhido de modo a obter-se uma boa sequenciação em ambas as cadeias de DNA, utilizando apenas um par de *primers*. Na maioria das bactérias este tamanho de fragmentos é suficiente para se observarem variações que levem à identificação de alelos diferentes dentro de uma população³⁰. Em cada gene, para cada sequência diferente é atribuído um alelo, e o conjunto dos setes alelos é denominado de perfil alélico, que define a Sequence Type (ST) específica de cada isolado^{30, 103, 115}. Este método não discrimina as diferenças que ocorrem por mutações pontuais ou por processos de recombinação³⁰. Em epidemiologia molecular este método é muito atractivo visto identificar grupos de isolados que apresentem pelo menos seis dos setes alelos em comum, e que são denominados de complexos clonais (CC)^{33, 105, 115}. Este método também dá uma previsão de qual a ST fundadora de cada complexo clonal, sendo esta a que diferir de um maior número de outras ST's em apenas um alelo^{17, 33}. A

acumulação de alterações nucleotídicas nos genes “housekeeping” é relativamente lenta, levando a que o perfil alélico de uma estirpe seja suficientemente estável durante o tempo para que este método seja ideal na epidemiologia molecular³⁰.

Em 2002, Homan *et al*⁴⁸, desenvolveram o esquema de MLST para *E. faecium*. Desde então, estudos efectuados mostraram que os isolados de certos ambientes se encontram inseridos em complexos clonais específicos, como é o caso dos isolados associados a infecções nosocomiais, que fazem parte do CC17, que tem como fundadora a ST17^{2, 21, 26, 48, 59, 113}. Este complexo clonal é caracterizado por isolados com resistência à ampicilina e ciprofloxacina, presença de factores de virulência, como a proteína de superfície (Esp) e hialuronidase (Hyl). A maioria dos isolados também possui uma ilha de patogenicidade (PAI)^{2, 21, 26, 59, 113}. Os vários estudos efectuados mostram uma larga disseminação deste complexo nos últimos anos, e que reflecte um aumento de infecções nosocomiais causadas por *E. faecium*, comparativamente às causadas por *E. faecalis*¹¹³. No presente, a base de dados para *E. faecium* conta com 1357 isolados inseridos e 439 ST's encontradas (<http://efaecium.mlst.net/> acedido a 20 de Agosto de 2008).

Em 2005, Nallapareddy *et al*⁸⁰ desenvolveram um primeiro esquema de MLST para *E. faecalis* que, apesar de ser muito discriminatório, englobava nove genes. Em 2006 foi aceite outro esquema para *E. faecalis*, proposto por Ruiz-Garbajosa *et al*⁹⁸. Este esquema engloba apenas sete genes, que se encontram separados por uma distância mínima de 137kb (Figura 3): *gdh*, que codifica para *glucose-6-phosphate dehydrogenase*; *gyd*, que codifica para *glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase*; *pstS*, que codifica para *phosphate ATP binding cassette transporter*; *gki*, que codifica para *glucokinase*; *aroE*, que codifica para *shikimate 5-dehydrogenase*; *xpt*, que codifica

para *xanthine phosphoribosyltransferase*; *yiqL*, que codifica para *acetyl-CoA acetyltransferase*.

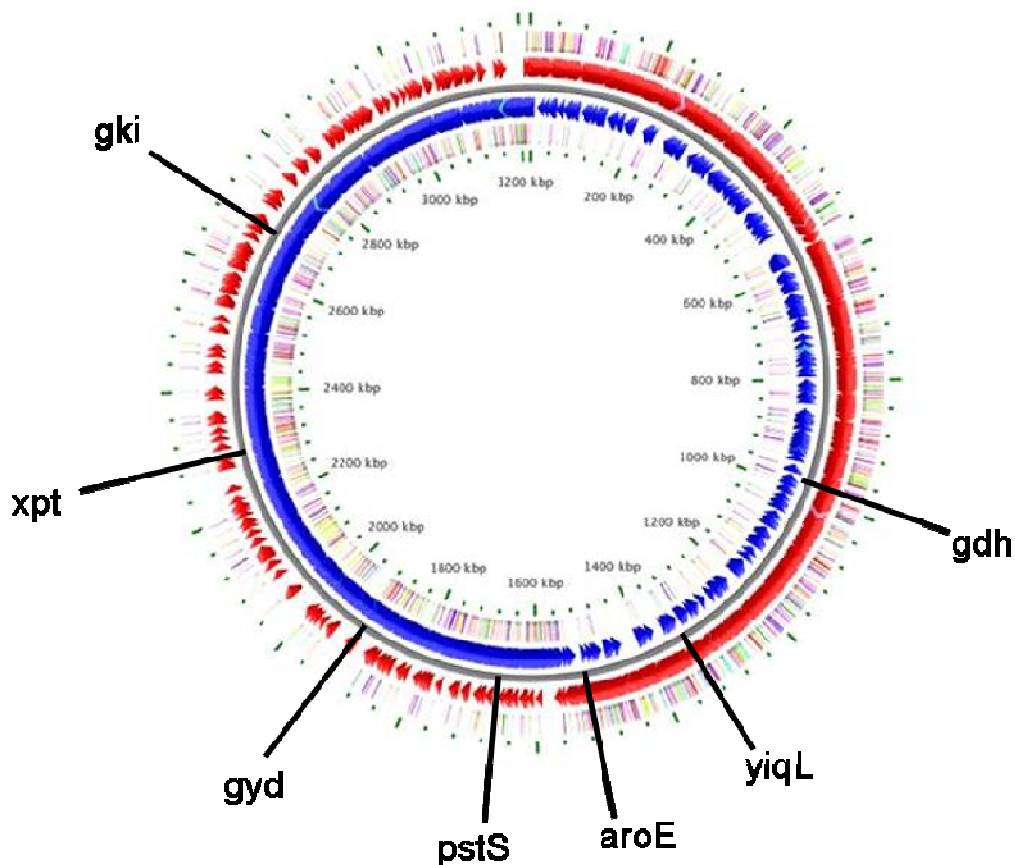


Figura 3: Posição dos genes do esquema de MLST para *E. faecalis*, no genoma da estirpe V583.

No estudo de Ruiz-Garbajosa *et al* foram englobados 110 isolados, tendo sido obtidas 55 ST's. Foram encontrados quatro complexos clonais: CC10 composto por isolados de diferentes ambientes; CC21 composto maioritariamente por isolados de origem animal; CC2 composto por isolados resistentes à vancomicina, β -lactamase positivos e responsáveis por endocardites, pertencentes ao complexo BVE (*Bla*⁺-*Van*^R-*Endocarditis*); e o CC9 composto por isolados Hospitalares pertencentes ao complexo ACB (*Argentina-Connecticut-Bla*⁺)^{56, 80, 98}.

No final de 2006, McBride *et al*⁷² aplicaram este esquema a 106 isolados obtidos ao longo de um período de 100 anos. Obtiveram 51 ST's diferentes, maioritariamente

pertencentes a cinco complexos clonais: CC40 que englobava isolados de diferentes ambientes; CC21 que neste estudo englobava isolados de origem animal mas também hospitalares que apresentavam um baixo número de resistências e factores de virulência; CC2, CC8 e CC9 que englobavam isolados hospitalares com maior numero de resistências e factores de virulência.

Em 2007, Kawalec *et al*⁵⁶, efectuaram um estudo da disseminação de *E. faecalis* em hospitais Polacos, e em 291 isolados obtiveram 53 ST's diferentes. Alguns dos isolados pertenciam aos complexos clonais CC2 e CC9, mas um grande numero de isolados pertenciam ao CC21, a um novo complexo CC87, e á ST40, o que sugeriu que fossem endémicos aos Hospitais Polacos.

Estes estudos sugerem que os isolados dos CC2 e CC9, no decorrer dos anos, possam ter adquirido mecanismos que lhes permitem uma melhor adaptação e consequente disseminação no ambiente hospitalar, podendo resultar numa situação endémica, semelhante ao caso do CC17 de *E. faecium*^{56, 59}. Por outro lado, mostram também que isolados de diferentes ambientes pertencem a ST's relacionadas e são agrupados no mesmo complexo clonal, o que mostra uma disseminação global (no que respeita a ambientes e localização geográfica) da espécie *E. faecalis*⁵⁹. Neste momento a base de dados para *E. faecalis* engloba 350 isolados, tendo sido já encontradas 241 ST's. Também já se encontram descritos vários alelos para cada um dos genes do MLST: *gdh* tem 47 alelos; *gyd* tem 15 alelos; *pstS* tem 52 alelos; *gki* tem 56 alelos; *aroE* tem 51 alelos; *xpt* tem 43 alelos; *yiqL* tem 52 alelos (<http://efaecalis.mlst.net/> acedido a 20 de Agosto de 2008).

O facto de o PFGE ser um método muito moroso e de o MLST ser dispendioso, levou ao desenvolvimento de um outro método que englobasse todos os pontos positivos destas duas técnicas de referência. Um dos principais objectivos na criação de

um novo método, tem sido criar um método de tipagem que seja rápido e seguro em casos de surtos e que, ao mesmo tempo, reduza o tempo de manipulação de agentes altamente patogénicos^{16, 42, 64}.

Durante a análise de genomas já sequenciados, observou-se que existiam zonas compostas por repetições de pequenas sequências⁴². Estas repetições variam em tamanho, localização e complexidade, podendo aparecer juntas numa zona específica do genoma, ou dispersas⁴². Existe uma classe de repetições, minisatélites, que podem ser uma fonte de polimorfismos, geralmente referidos como VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)^{42, 64, 116, 121}. Os VNTR's consistem na presença consecutiva de uma sequência de DNA, podendo ser encontrados em todos os organismos. A sua função biológica e mecanismo evolutivo ainda não é totalmente conhecido, no entanto tem uma variedade de aplicações incluindo identificação de estirpes e epidemiologia bacteriana⁴².

Foi a partir destas repetições que surgiu um novo método de tipagem, Multi-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). Este novo método de tipagem é rápido, reprodutível e permite a comparação entre laboratórios, e sem recurso à sequenciação^{64, 116}.

O método de tipagem MLVA consiste na amplificação de fragmentos de DNA, que diferem de tamanho dependendo do número de segmentos repetidos inseridos no fragmento amplificado. O tamanho deste fragmento está directamente relacionado com o número de repetições. O tamanho dos alelos é então convertido num número, sendo o código obtido pelo número dos sete alelos diferentes o que irá gerar o perfil alélico, que resultará num MLVA Type (MT)^{16, 42, 110}. São considerados do mesmo MT os isolados que partilham pelo menos seis dos sete alelos¹⁶.

Em 2004 surgiram métodos de MLVA para enterococos. Top *et al*¹¹¹ desenvolveram esta técnica para *E. faecium*, comparando os resultados com a técnica de

MLST para 392 estirpes. Titze-de-Almeida *et al*¹¹⁰ desenvolveram esta técnica para *E. faecalis* comparando-a com a técnica de PFGE. No caso específico de *E. faecalis* basearam-se em sete regiões: *espC*, que apresenta parte da região codificante para a proteína Esp; *espA* região a montante da região codificante da proteína Esp¹⁰²; *aceB* região codificante para uma adesina membrana⁷⁹; *efa2* região codificante para uma proteína membrana; *efa5* região codificante para uma lipase (http://minisatellites.u-psud.fr/ASPSamp/base_ms/Interrogation.php acessado a 8 de Fevereiro de 2008); *efa3* e *efa6* que são regiões codificantes para proteínas membranares (R. Willems, comunicação pessoal). A aplicação deste método permitiu aos autores diferenciar 37 MT's, contra 31 tipos por PFGE, em 83 estirpes *E. faecalis*¹¹⁰. Em ambos os casos, quer em *E. faecium*, quer em *E. faecalis*, o MLVA mostrou ser semelhante e concordante com o respectivo método de referência, sugerindo assim que o MLVA é altamente discriminatório como método de tipagem e tem a possibilidade de estabelecer uma relação filogenética segura^{110, 111}.

Neste estudo, recorrendo às técnicas descritas, MLST e MLVA, e comparando com os resultados já obtidos por PFGE, pretendeu-se estabelecer uma relação entre os isolados de diferentes ambientes, esperando determinar qual o papel dos isolados alimentares na disseminação da resistência à vancomicina do tipo VanA.

2.2 Metodologia

2.2.1 Extração de DNA total

O DNA total foi extraído pelo método descrito por Serror et al (2002)¹⁰⁰. 6 ml de cultura com 24h em BHI (Oxoid, Reino Unido) foram centrifugadas a 10000rpm (Microcentrifuga Sigma 112, rotor nr.12002), durante 10 minutos a 4°C; descartou-se o

sobrenadante e as células foram lavadas em 1 ml de TES (TE 100x¹, Sacarose 250g/l); centrifugou-se a suspensão a 10000rpm, durante 10 minutos a 4°C; descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 300 µl de TES com 5mg/ml de lisozima; incubou-se a suspensão a 37°C durante 30 minutos; adicionaram-se 300 µl de Solução salina (150 mM NaCl, 10 mM EDTA pH8) e 20µl de SDS 40% (p/v); misturou-se por inversão até se notar transparência e adicionou-se 1 volume de Biofenol (Biosolve, Holanda) (o Biofenol é composto por uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1); vortexou-se até se formar uma emulsão e centrifugou-se de seguida a 14000rpm (Minicentrífuga Eppendorf 5415D, rotor nr.F45-24-11) durante 10 minutos à temperatura ambiente; passou-se a fase superior para um novo tubo e repetiu-se o procedimento anterior duas vezes, com adição de Biofenol (Biosolve, Holanda); passou-se a fase superior para um novo tubo e adicionou-se 1 volume de clorofórmio; vortexou-se até se formar uma emulsão e centrifugou-se 14000rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente; transferiu-se a fase superior para um novo tubo à qual se adicionou 1 volume de isopropanol; misturou-se por inversão e centrifugou-se a 14000rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente; descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet em 800 µl de Etanol a 70%, 14000rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente, removeu-se o sobrenadante e deixou-se o pellet secar à temperatura ambiente que de seguida se ressuspendeu em 100µl de água MilliQ e conservou-se a -20°C.

2.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

As reacções de PCR foram efectuadas num Termociclador T3000 Thermocycler (Biometra, Alemanha). Cada mistura de reacção de 50 µl continha 250 ng de DNA, 0.5

¹ 37.2 g/l de Tritriplex III, 121.1 g/l Tris base

μM de cada *primer*, 10 mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.5 mM de MgCl_2 , 1x Immunobuffer e 0.04 U de Immolase. Todos os reagentes foram adquiridos à Bioline (Alemanha), excepto os primers que foram adquiridos à MWG-Biotech) (Alemanha).

Dos produtos obtidos foram aplicados 5 μl em gel de agarose com brometo de etídio incorporado (1 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma Aldrich, Espanha), juntamente com 2 μl de azul de bromofenol, e a electroforese foi efectuada em tampão TBE 1 X (0.89M Tris Base, 0.89M Ácido bórico, 0.02M EDTA), a 80 V, durante aproximadamente 2 horas. O marcador utilizado foi o 1Kb plus DNA ladder (100-12000 pb) da Invitrogen (Espanha). Os géis foram fotografados com radiação UV com recurso ao sistema Kodak Digital ScienceTM (USA).

Para os 17 isolados em estudo, foram amplificados os sete genes correspondentes ao esquema de MLST para *E. faecalis*, *gdh*, *gyd*, *pstS*, *aroE*, *gki*, *xpt* e *yiqL*, cujos primers se encontram descritos no Quadro 4, e o programa de PCR utilizado encontra-se no Quadro 5.

Quadro 4: Sequência nucleotídica dos *primers* usados para amplificar os genes do esquema de MLST: *ghd*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yiqL*⁹⁸.

Gene	Nome Primer ^a	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>ghd</i>	<i>ghd-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
	<i>ghd-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd</i>	<i>gyd-1</i>	CAAACCTGCTTAGCTCCAATGGC	395
	<i>gyd-2</i>	CATTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>pstS</i>	<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC	583
	<i>pstS-2</i>	ATTTACATCACGTTCTACTTGC	
<i>gki</i>	<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
	<i>gki-2</i>	ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	
<i>aroE</i>	<i>aroE-1</i>	TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC	459
	<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	
<i>xpt</i>	<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456
	<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<i>yiqL</i>	<i>yiqL-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
	<i>yiqL-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	

^a 1- forward; 2- reverse

Quadro 5: Programa de PCR Utilizado na amplificação dos genes do esquema de MLST

T (°C)	Tempo	Nº ciclos
94	5 min.	1
94	30 seg.	
52	30 seg.	30
72	1 min.	
72	7 min.	1

Os produtos obtidos foram aplicados num gel de 1% de agarose e purificados com o kit QIAquick PCR purification kit (Quiagen, Alemanha), sendo depois enviados para sequenciação pela Baseclear (Leiden, Holanda). As sequências foram analisadas

utilizando o programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). Os alelos e as ST foram identificadas a partir da Base de dados MLST (<http://efaecalis.mlst.net/>).

Para os 17 isolados em estudo, foram também amplificados as sete regiões, correspondentes ao esquema de MLVA: *efa2*, *efa3*, *efa5*, *efa6*, *aceA*, *aceB*, *aceC*. Os *primers* específicos para cada gene encontram-se descritos no Quadro 6 e o programa de PCR utilizado encontra-se apresentado no Quadro 7.

Quadro 6: Sequência nucleotídica dos *primers* usados para amplificar as regiões do esquema de MLVA.

região	Sequencia (5'-3')	Tamanho de uma repetição (bp)
<i>aceB</i>	f- AAAATGTGGAAATGCCAACAGAA GAAAGTC r- ATTTAATTTTTGAATTGGTTC ACT AAGCAG	141
<i>espA</i>	f- CAGATGGATCATCTGATGAAGT r- GTAACGTTACTGTTACATCTGC	252
<i>espC</i>	f- TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC r- CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG	246
<i>efa2</i>	f- TTCGCTGGTTCTTCAGG r- CGTTGAGGCAGTAGATATTTTAAC	393
<i>efa3</i>	f- TGTCACGCCATCTAAATTG r- CACCAGTGGGGTATGTATTAG	282
<i>efa5</i>	f- TTGTTTCGTACCAGTTTGATC r- GTTAAATGGCAGCTCGC	213
<i>efa6</i>	f- AGTACCAAGGACCGTGC r- ATTTAGATGCTCGTTTTGTAGG	270

Quadro 7: Programa de PCR utilizado para a amplificação dos genes correspondentes ao esquema de MLVA

T (°C)	Tempo	Nº ciclos
94	4 min.	1
94	30 seg.	
70 ^a	1 min.	15 ^a
72	1 min.	
94	30 seg.	
55	1 min.	15
72	1 min.	

^a Por cada ciclo a temperatura de annealing decresce um grau, sendo T_{inicial}=70°C e a T_{final}=55°C

Os produtos obtidos foram aplicados num gel de 1,5% de agarose, sendo depois analisados os resultados com recurso ao programa Kodak 1D software (v.3.6.1) (USA), de modo a determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

2.3 Resultados e discussão

Com este estudo pretendia-se estabelecer uma relação entre isolados VACISEf de diferentes ambientes através de métodos de tipagem molecular, querendo também ver qual a relação destes isolados com estirpes VSE e VRE existentes em base de dados.

Os 17 isolados em estudo foram tipados por MLST, sendo os perfis alélicos inseridos na base de dados, de modo a determinar as ST's correspondentes. Os resultados obtidos estão descritos no Quadro 8.

Quadro 8: Perfil alélico, e correspondente ST, obtido para cada isolado em estudo; Origem e situação geográfica dos isolados encontrados na base de dados para as respectivas ST's deste estudo.

Isolado	PFGE	MLST		Base Dados	
		Perfil Alélico (<i>gdh</i> , <i>gyd</i> , <i>pstS</i> , <i>gki</i> , <i>aroE</i> , <i>xpt</i> , <i>yiqL</i>)	ST	Países	Origem
QCB1	C	1-7-9-1-1-1-1	ST 21	Polónia	Hospitalar
QCB4		1-7-9-1-1-1-1	ST 21	Espanha Holanda	Animal e Hospitalar Alimentar
11270	J	1-7-10-1-1-10-1	ST 22	Espanha Holanda	Hospitalar
U153	G	7-1-11-1-10-2-1	ST 30	Espanha Polónia	Hospitalar
85R	M	18-1-24-24-20-17-15	ST 53	Espanha	Hospitalar
QCB15	D	3-7-23-1-9-16-7	ST 55	Espanha Polónia	Hospitalar
HSM3720		3-7-23-1-9-16-7	ST 55		
HSM4182		3-7-23-1-9-16-7	ST 55		
MM172		3-7-23-1-9-16-7	ST 55		
LCB80	B	4-7-11-1-23*-16-2	ST 74	Polónia	Hospitalar
QA46	A	4-7-11-1-23*-12-2	ST 73		
HSM3143a	F	25*-2-15-9-23*-18*-6	ST 75		
HSM3840	-	22*-6-7-26*-22*-4-4	ST 76		
U1740	I	14-7-11-1-9-9-18*	ST 77		
U610	K	13-1-5-14-10-9-5	ST 78		
V82	H	23*-6-7-25*-24*-2-17*	ST 79		
344	E	24*-11*-24-24-20-17-15	ST 80		

*Novos alelos submetidos para a base de dados

Com este estudo foram submetidos para a base de dados novos alelos: para o gene *gdh* quatro novos alelos; para o gene *gyd* um novo alelo; para o gene *gki* dois novos alelos; para o gene *aroE* três novos alelos; para o gene *xpt* um novo alelo; para o gene *yiqL* dois novos alelos.

Em 17 isolados obtiveram-se 13 ST's distintas, sendo que 10 correspondem a isolados únicos. Os resultados são concordantes com os já obtidos por PFGE. A ST21 (PFGE tipo C) engloba dois isolados lácteos, que por PFGE se verificou serem clones, provenientes da mesma queijaria, e tendo sido isolados no mesmo ano. Como se observa no Quadro 2 (Capítulo 1), estes isolados apresentam fenótipos de resistência diferentes, sendo para o isolado QCB1 que se observa resistência a um maior número de antibióticos, nomeadamente alguns β -lactâmicos e quinolonas. No isolado QCB4 foi detectada a presença do gene *ermB*, que está envolvido na resistência à eritromicina. Nenhum destes isolados apresenta o operão *vanA* completo, apenas tendo sido detectada a presença do gene *vanA*, e no caso do isolado QCB4 também o gene *vanH*. Tem sido demonstrado que clones específicos podem adquirir resistência a diferentes antibióticos e factores de virulência²¹. Foi provavelmente o que aconteceu neste caso, o que vem demonstrar a importância de realizar estudos epidemiológicos de modo a monitorizar a disseminação de clones multiresistentes. A ST55 engloba 4 isolados, pertencentes ao PFGE tipo D: dois isolados são de origem hospitalar; um alimentar; e um de origem comunitária. Estes isolados apresentam fenótipos de resistência semelhantes e todos apresentam o gene *ermB*, tendo sido também detectado o gene *aph(2'')-Ic* para o isolado HSM3720. Os quatro isolados apresentam uma constituição do operão *vanA* diferente, que está ausente no isolado MM172, e o isolado HSM4182 apresenta quase todo o operão, excepto o gene *vanX*. Por PFGE verificou-se que os isolados HSM4182 e MM172 são clones, isolados na mesma área geográfica, embora o primeiro tendo sido isolado em 1999, e o segundo seis anos mais tarde.

De modo a determinar a variedade de origens dos isolados pertencentes às ST's encontradas neste estudo, recorreu-se à base de dados: A ST21 apresentava 17 isolados de origem humana, um isolado de porco e um isolado de leite; A ST22 apresentava dois

isolados de origem humana; A ST30 apresentava 8 isolados de origem humana; A ST53 apresentava um isolado de origem humana; A ST55 apresentava 4 isolados de origem humana; a ST74 apresentava um isolado de origem humana; para as restantes ST's ainda não se encontravam inseridos isolados.

De modo a determinar a relação entre as ST's obtidas, recorreu-se ao programa eBURST (<http://efaecalis.mlst.net/eburst/>), um algoritmo que permite identificar grupos de ST's relacionadas, que partilham o mesmo fundador (CC), mostrando também como estes surgiram e como se diferenciaram, por representação num diagrama. Aplicando ao contexto do MLST, inicialmente os membros de um complexo clonal são iguais (mesma ST), mas com o decorrer do tempo ocorrem alterações num dos sete genes (Single Locus Variants – SLV), outros fenómenos levam a que ocorram alterações em dois genes (Doble Locus Variants – DLV), resultando numa população bacteriana que consiste em complexos clonais que quando relativamente recentes, podem ser identificados por métodos como o MLST^{32, 105}. Neste estudo, e tendo em conta a análise do diagrama eBURST, foram considerados como complexos clonais, apenas aqueles cuja ST fundadora é SLV de pelo menos 3 ST's distintas. A relação entre as ST's também foi obtida através do coeficiente Categorical do software Bionumerics (versão 5.0 MLST plug-in versão 1.9) resultando numa MST (Minimal Spanning Tree). A MST representa um possível processo evolutivo onde se pressupõe que alelos idênticos em genótipos diferentes descendem de um mesmo ancestral⁹⁸. Este diagrama está representado na Figura 4.

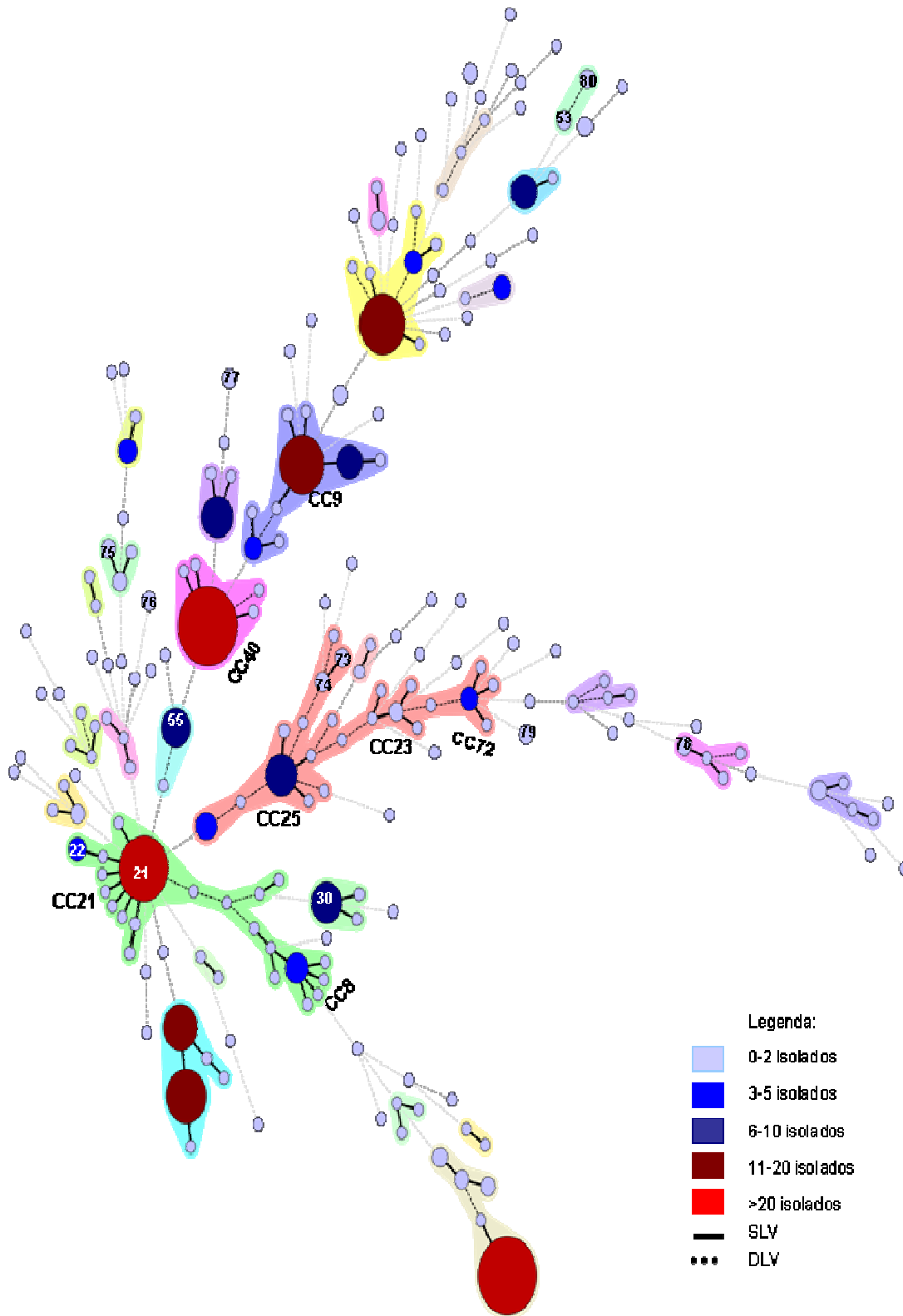


Figura 4: Diagrama MST obtido através do software Bionumerics, que representa o processo evolutivo das ST's obtidas para o esquema de MLST para *E. faecalis*. Neste diagrama encontram-se apenas assinaladas, pelo número correspondente, as ST's encontradas neste estudo.

Por este diagrama, observou-se que a ST21 é DLV da ST22, esta que engloba um isolado clínico, apresentando diferenças nos genes *pstS* e *xpt*. A ST53 que representa o isolado 85R e a ST80 representante do isolado 344, sendo ambos de origem veterinária, são DLV com diferenças nos genes *gdh* e *gyd*. A ST73 e ST74, ambas englobam isolados de origem alimentar (QA46 e LCB80 respectivamente) são SLV apenas com diferença no gene *xpt*. Os restantes isolados pertencem a ST's que se encontram isoladas.

O diagrama também mostra a existência de 7 complexos clonais: CC8, CC9, CC21, CC23, CC25, CC40, CC72. Por análise do diagrama MST (Figura 4) e do diagrama eBURST (Figura A.1) pode-se observar que a ST21 é a fundadora do CC21, que é SLV de sete ST's distintas e DLV de três. A ST22 também pertence a este complexo, sendo SLV da ST202 e DLV de quatro ST's distintas. Neste complexo a maioria dos isolados são de origem humana, no entanto da ST46 existem cinco isolados de origem animal (foca e porco) assim como o isolado pertencente à ST5 é de origem alimentar (produto de galinha). As ST74 e ST75 pertencem ao CC25 e são ambas DLV da ST85. Este complexo clonal é composto por isolados de origem humana, onde apenas os isolados deste estudo são de origem alimentar. A ST30 é SLV das ST212 e ST56, onde ambas englobam isolados de origem humana. Observa-se também que a ST55 é DLV da ST149 que engloba um isolado humano. A ST75 é SLV da ST93 que engloba dois isolados de origem humana, e é também DLV da ST98 que engloba um isolado de origem animal. Por último, a ST78 é SLV da ST44 e DLV da ST189, ambas representando isolados de origem humana.

Os complexos clonais indicados anteriormente representam, na sua maioria, isolados de origem humana. No entanto também se encontram isolados de outras origens: A ST21 (CC21) engloba um isolado de origem animal (Porco) e um isolado

alimentar (Leite); A ST46 (CC21) engloba quatro estirpes isoladas de porco e uma isolada de foca; A ST23 (CC23) engloba um isolado animal (bezerro); A ST97 (CC25) engloba um isolado animal (Porco).

Como foi referido, um dos objectivos deste trabalho era comparar os isolados VACISEf com os isolados VRE-VanA inseridos na base de dados. Verificou-se a existência de 29 VRE-VanA na base de dados, representando apenas 8.3% do total de isolados. Destes isolados, a maioria era de origem humana, pertencentes às ST2, ST6, ST9, ST16, ST19, ST28, ST31, ST49, ST87 e ST158. Nenhuma se encontra relacionada com as encontradas neste estudo. Foram também encontrados isolados de outras origens, como um isolado de esgoto pertencente à ST6, um isolado de origem animal pertencente à ST23 e um isolado também de origem animal (Galinha) pertencente à ST32, sendo que também nenhuma destas ST's se encontra relacionada com as encontradas neste estudo. No entanto, foi encontrado um isolado VRE-VanA de origem alimentar pertencente à ST5 (já referido anteriormente) sendo esta a única ST que está relacionada com as ST21 e ST22, ambas encontradas neste estudo, sendo SLV da primeira e DLV da segunda.

A maioria dos complexos clonais obtidos da análise do diagrama eBURST, encontram-se associados ao ambiente hospitalar. Em várias publicações, o CC9 e o denominado CC2, englobam o grupo de estirpes mais patogénicos^{72, 98, 99}. Como se observa nenhum dos isolados presente neste estudo apresenta qualquer relação com as ST's destes complexos clonais.

Tendo em conta os resultados obtidos por MLST, método que nos permite a comparação com os isolados da base de dados, não se encontra uma relação directa entre os isolados em estudo e os VRE da base de dados. Verifica-se também que os nossos isolados se encontram distribuídos não apresentando nenhuma relação entre si.

Visto que a base de dados de MLST para *E. faecalis* é recente, será necessário monitorizar o aparecimento de novas ST's, assim como o aparecimento de novos VRE, de modo a determinar a sua relação com os isolados presentes neste estudo.

Os 17 isolados em estudo também foram tipados por MLVA, estando os perfis alélicos representados no Quadro 9:

Quadro 9: Representação do perfil alélico de MLVA para cada isolado em estudo. Os valores apresentados correspondem ao número de repetições de cada sequência.

	Perfil alélico						
	espA	aceB	espC	efa2	efa3	efa5	efa6
QA46	0	0	0	0	0	0	0
LCB80	15	0	2	0	0	4	0
QCB1	0	3	2	0	0	5	0
QCB4	0	3	2	0	0	5	0
QCB15	11	1.5	2	2.5	0	5	0
H3143	0	0	2	5	0	5	0
H3720	0	0	3	0	0	0	0
H3840	0	3	3	6	0	0	0
H4182	15	0	2	5	0	0	0
11270	16	0	2	7	0	0	0
U1740	0	4	0	0	0	0	0
U610	0	3	3	3.5	0	0	4
U153	0	3	3	0	0	5	0
V82	0	3	0	4.5	0	3	0
85R	0	4	3	0	0	0	0
344	0	4	0	0	0	0	0
MM72	0	4	2	4	0	0	0

De modo a determinar a relação entre os isolados, recorreu-se ao Software Bionumerics (versão 4.0, Applied Maths, Belgica). O dendograma resultante, encontra-se representado na Figura 5, e foi obtido usando o coeficiente “Categorical”, e tendo em

conta que são considerados do mesmo MLVA Type os isolados que partilhem pelo menos 6 dos 7 alelos, determinou-se que os perfis com mais de 85% de semelhança pertenciam ao mesmo MT. Observou-se então a existência de 13 MT's, sendo que 11 correspondem a estirpes únicas. O MT1 engloba 3 isolados (dois lácteos e um clínico humano) e o MT3 engloba também 3 isolados (dois veterinários e um clínico humano).

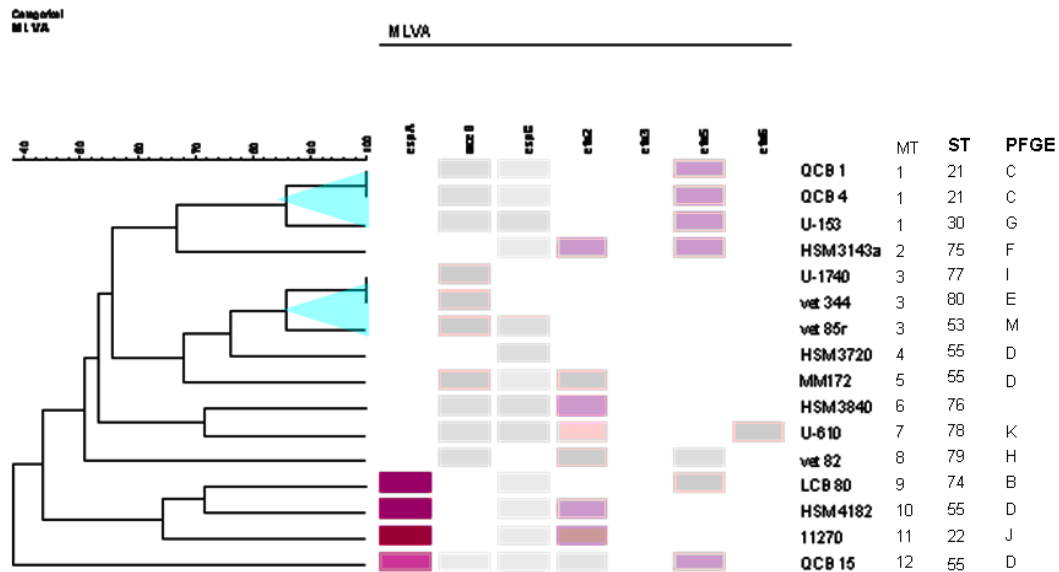


Figura 5: Dendrograma representativo dos perfis de MLVA, que permite determinar o valor a partir do qual os isolados se consideram relacionadas; o gradiente de cores corresponde ao número de repetições encontrados.

No estudo efectuado por Titze de Almeida *et al* (2004), foram encontrados 37 MT's em 83 isolados, enquanto no estudo efectuado por Lepage *et al*, foram encontrados 19 MT's em 30 isolados.

Como se pode observar no Quadro 9, para algumas das regiões estudadas não se obteve amplificação em alguns isolados. No caso da região *efa3*, não se obteve amplificação em nenhum dos isolados. Para o isolado QA46, não houve amplificação em nenhuma das regiões. Este facto já tinha sido observado no trabalho de Titze-de-Almeida *et al*. A percentagem de amplificações negativas, para ambos os estudos, encontra-se no Quadro 10.

Quadro 10: Número de reacções negativas, e percentagem correspondente, obtidas na amplificação das regiões estudadas, no presente e no estudo de Titze-de-Almeida *et al*¹¹⁰.

	Titze-de-Almeida <i>et al</i> (2004)		Presente estudo	
	Nº de reacções	% de reacções	Nº de reacções	% de reacções
	negativas	negativas	negativas	negativas
<i>aceB</i>	0/83	0	6/17	35.3
<i>espC</i>	27/83	32.5	4/17	23.5
<i>espA</i>	26/83	31.3	13/17	76.5
<i>efa2</i>	2/83	2.4	9/17	52.9
<i>efa3</i>	39/83	47.0	17/17	100
<i>efa5</i>	7/83	8.4	10/17	58.8
<i>efa6</i>	33/83	39.8	16/17	94.1

Tal como se pode observar no presente estudo, no estudo efectuado por Titze-de-Almeida *et al*, a maior percentagem de reacções negativas foi obtida para as regiões *efa3* e *efa6*. A justificação dada por estes autores, assenta na hipótese de o fragmento que se está a amplificar conter um elevado número de repetições¹¹⁰. Para comprovar esta hipótese será necessário recorrer a um método de hibridação de modo a confirmar a existência desta região, e no caso de ela estar presente, tem que se determinar se o local de hibridação dos *primers* utilizados não contém nenhuma mutação que impeça a ligação dos mesmos.

Também se observa que, em alguns genes os tamanhos dos fragmentos sugerem que as repetições estão incompletas, podendo ser resultado de processos de recombinação dentro de cada repetição isoladamente¹²¹.

Os processos de recombinação são muito frequentes nos VNTR's e dependem da pressão selectiva que cada estirpe sofre. Isto leva a que estirpes que aparecem relacionadas com outros métodos, pelo método MLVA, podem aparecer separadas, principalmente se pertencerem a ambientes diferentes ou se foram isolados de

indivíduos diferentes, dado que foram expostas a respostas imunitárias diferentes^{16, 38, 64}. Pode ser esta a razão para as diferenças encontradas neste estudo entre este método, MLVA, e os outros dois métodos, PFGE e MLST. No caso dos isolados QCB1 e QCB4, ambos isolados do mesmo tipo de queijo e na mesma altura, aparecem relacionados nos 3 métodos. No caso dos isolados pertencentes à ST55, como são pertencentes a ambientes diferentes, ou no caso dos isolados HSM3720 e HSM4182 isolados no mesmo hospital, mas de indivíduos diferentes, pelo método de MLVA não se encontram relacionados.

Outro caso observado, é nos MT1 e MT3, onde estirpes de ST's diferentes encontram-se relacionadas pelo método de MLVA, facto ainda não descrito em publicações. Existem duas hipóteses para esta ocorrência: poderá ser apenas uma coincidência, ou visto que os enterococos são geneticamente flexíveis, a evolução do genoma está a ocorrer a uma taxa mais rápida do que as alterações a nível dos VNTR's. No entanto, no caso da segunda hipótese, seria necessário aplicar este método a um maior número de isolados, de modo a verificar a existência de situações semelhantes.

Com os resultados obtidos neste estudo, mostra-se que este método poderá não ser adequado para estudos que englobem isolados de vários ambientes, tendo em conta os VNTR's seleccionados.

Capítulo 3: Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

3.1 Introdução

3.2 Metodologia

3.2.1 Isolados em estudo

3.2.2 Extração de DNA total

3.2.3 SSH

3.2.4 Clonagem

3.2.4.1 Preparação de células competentes

3.2.4.2 Ligação

3.2.4.3 Transformação das células

3.2.5 Confirmação dos clones por hibridação

3.2.5.1 Preparação das membranas

3.2.5.2 Marcação das sondas

3.2.5.3 Hibridação

3.2.6 Sequenciação dos clones

3.2.7 Confirmação dos clones por PCR

3.3 Resultados e Discussão

Este trabalho foi apresentado, na forma de Poster, no “XII International congress of Bacteriology and Applied Microbiology – IUMS2008 – Microbes: Then, Now and hereafter” em Istambul, Turquia

Capítulo 3: Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

3.1 Introdução

Os métodos de tipagem molecular podem fornecer dados sobre a relação genética entre estirpes de diferentes ambientes. Muitas vezes encontram-se estirpes não virulentas que são relacionadas com estirpes virulentas^{4, 126}, pelo que se torna cada vez mais necessário perceber quais as diferenças a nível do genoma que levam algumas estirpes a apresentarem um elevado grau de virulência, principalmente quando os mesmos genes de virulência são também encontrados e expressos em estirpes não virulentas⁴. Dada a impossibilidade de sequenciar os genomas completos de várias estirpes, torna-se necessário encontrar outros métodos que permitam identificar as diferenças entre as várias estirpes.

Lepage *et al* (2006) compararam 30 isolados alimentares e hospitalares por macro arrays e PCR utilizando 202 sondas específicas para *E. faecalis* seleccionadas a partir do genoma da estirpe *E. faecalis* V583 e parte da ilha de patogenicidade (PAI) da estirpe MMH594. 79 dos genes estudados foram divididos em três grupos: genes que se apresentavam igualmente distribuídos entre isolados alimentares e hospitalares; genes que apenas estavam presentes nas estirpes V583 e MMH594; e um grupo de 6 genes que não se encontravam presentes em nenhum dos isolados alimentares⁶². Em outro estudo efectuado por McBride *et al* (2007), 106 isolados foram comparados recorrendo a microarrays com 3582 sondas, que englobavam 3182 ORF's (Open Reading Frame) do cromossoma do *E. faecalis* V583, genes da PAI, de plasmídeos de *E. faecalis* e genes de resistência, entre outros. Neste estudo apenas foram utilizados 4 isolados lácteos, sendo os outros de origem hospitalar e animal⁷². Neste estudo não foi obtida nenhuma

associação clara entre estirpes de uma determinada origem, de acordo com a presença ou ausência de genes, como no estudo de Lepage *et al.*

Em 2007, Aakra *et al.*, efectuaram um estudo de comparação genómica através de microarrays. Foram comparados 9 isolados de várias origens, recorrendo a 3160 sondas representativas do genoma do V583. Neste estudo foi introduzido o conceito de genes divergentes. São considerados genes divergentes, aqueles que estão ausentes da estirpe controlo (V583) ou cuja sequência tenha evoluído e seja suficientemente diferente para não ser detectada por hibridação. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos obtidos por Lepage *et al.*, no qual também se observou a existência de um grupo de genes que aparenta ser parte do conjunto de genes que caracterizam a espécie *E. faecalis*. Neste estudo verificaram que o genoma de *E. faecalis* apresenta uma grande diversidade e plasticidade, tendo sido encontradas várias regiões de material genético exógeno adquirido nos isolados estudados, o que sugere que cada isolado responde de maneira diferente à pressão selectiva externa¹.

Este tipo de estudos é de extrema importância dada a enorme quantidade de informação obtida, no entanto apenas se detectam diferenças respeitantes às sondas testadas, e não as diferenças totais no genoma das estirpes.

Um método novo e eficaz, designado por Suppression Subtractive Hybridization (SSH) foi desenvolvido de modo a comparar dois genomas, tendo sido originalmente desenvolvido para estudar a expressão génica do cosmídeo do cromossoma Y Humano²⁸, e foi aplicado pela primeira vez em bactérias por Akopyants *et al* (1998) em *Helicobacter pylori*⁵. É usado para selectivamente amplificar fragmentos alvo, e simultaneamente suprimir a amplificação de sequências não desejadas²⁸. Baseia-se na técnica de PCR. Pequenos fragmentos são ligados à extremidade 5', permitindo a

amplificação das sequências desejadas e simultaneamente suprimindo as não desejadas.

Na Figura 6 apresenta-se um esquema elucidativo deste método.

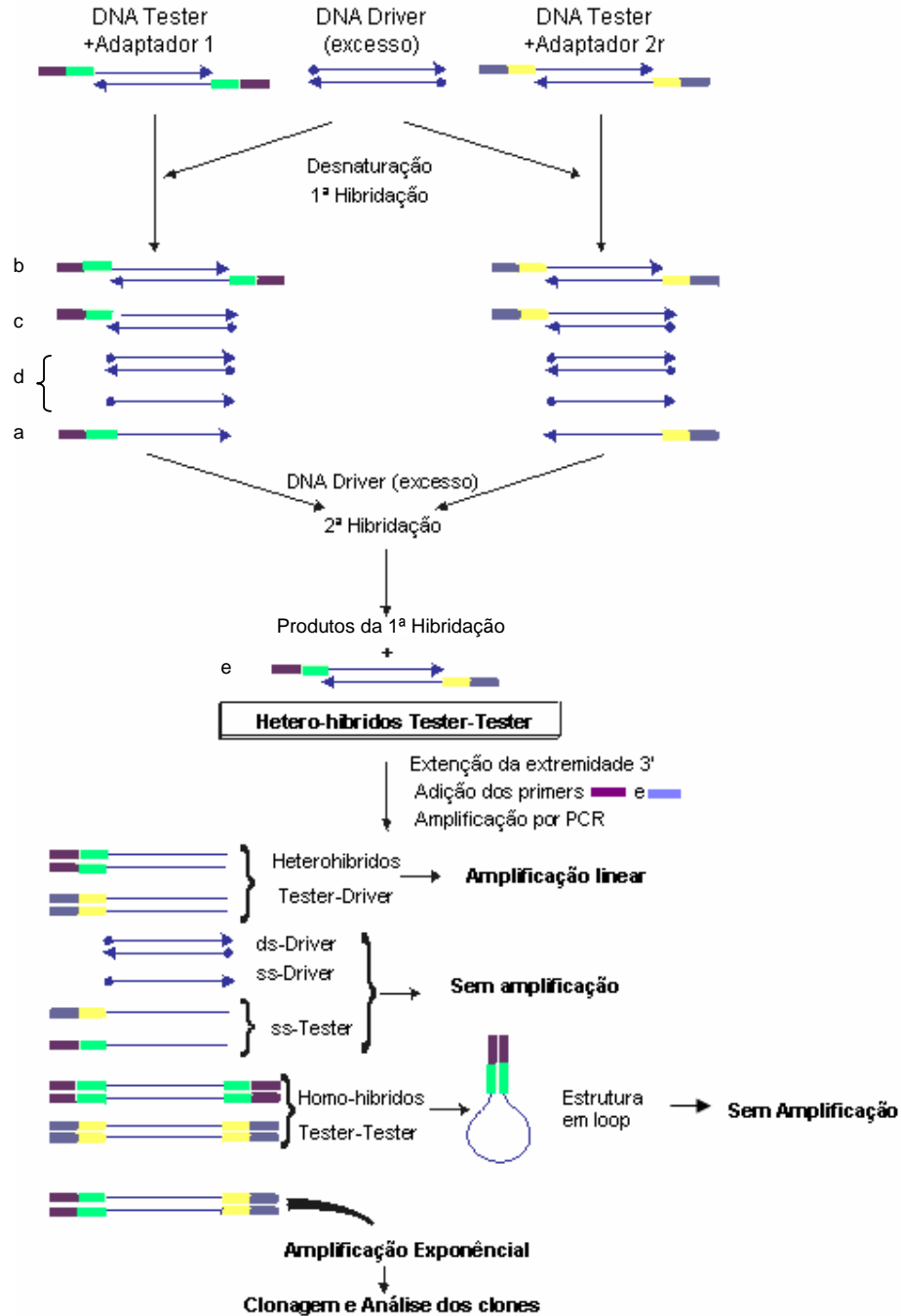


Figura 6: Esquema do método de SSH; adaptado de www.evrogen.com/img/SSH_SH1.gif (accedido a 29 de Fevereiro de 2008); ver descrição do método no texto.

Este método permite a comparação de dois genomas, sendo o DNA da estirpe que se pretende estudar denominado de Tester, e o DNA da estirpe de referência denominado de Driver. O Tester e o Driver são primeiramente digeridos com uma enzima de restrição com um palindroma de 4 bases, que deixa extremidades rombas. O Tester digerido é dividido em duas amostras (1 e 2), que serão ligadas a dois adaptadores diferentes, 1 e 2r, respectivamente, resultando no Tester 1 e Tester 2r. Esta ligação ocorre na extremidade 5', uma vez que os adaptadores foram desenhados sem o grupo fosfato, permitindo assim uma ligação covalente^{5, 28, 123}.

Seguem-se, então, duas hibridações: em primeiro lugar um excesso de Driver é adicionado às duas amostras de Tester. As amostras são desnaturadas por calor, seguindo-se um abaixamento da temperatura de modo a que os fragmentos hibridem. A fracção de Tester em cadeia simples (a) é normalizada, ou seja, a concentração de fragmentos mais abundantes e menos abundantes torna-se aproximadamente igual. A normalização ocorre porque o processo de hibridação que gera homo-híbridos (b) é mais rápido para as moléculas mais abundantes. Os DNA's em cadeia simples do Tester (a) são enriquecidos em genes mais abundantes, assim como acontece com os DNA's "comuns" que hibridam com o driver (c)^{5, 28, 123}. Na segunda hibridação, as duas amostras da primeira hibridação são misturadas. Apenas o Tester normalizado e subtraído é capaz de se reassociar e formar híbridos (b), (c) e (e). Uma nova adição de Driver desnaturado enriquece ainda mais a fracção (e). Os novos híbridos (e) formados têm uma característica que os distingue dos híbridos (b) e (c), que consiste na presença de diferentes adaptadores nas suas extremidades 5': um da amostra 1 e outro da amostra 2. O fragmento (e) é preferencialmente amplificado por PCR com recurso a dois *primers* Pn1 e Pn2, que são homólogos às sequências externas dos adaptadores. Para

possibilitar a hibridação dos *primers*, o PCR é precedido por um passo de extensão das extremidades 3'^{5, 28, 123}.

Em todos os ciclos de PCR, a amplificação exponencial apenas ocorre nas moléculas do tipo (e). As moléculas do tipo (b) contêm repetições invertidas dos adaptadores que, após o passo de hibridação, formam “loops” impedindo assim a ligação dos *primers* e da polimerase de modo a efectuar a extensão. As moléculas do tipo (d) e (a) como não possuem local de ligação dos *primers* não vão sofrer ligação, enquanto as moléculas do tipo (c) apenas são amplificadas linearmente^{5, 28, 123}. As sequências desejadas são fragmentos específicos do Tester, que estão ausentes do Driver^{28, 46}.

Este método permite que DNA específico de uma estirpe seja seleccionado, eliminando a necessidade de sequenciação e mapeamento de um genoma inteiro⁵. Vários estudos têm sido efectuados em bactérias com objectivos diversos. Como foi referido a primeira vez que este método foi aplicado em bactérias, foi em *H. pylori*, tendo sido comparadas duas estirpes não relacionadas. A estirpe utilizada como Driver tinha o genoma sequenciado e a estirpe Tester era utilizada em testes em macacos Rhesus. Neste estudo, 18 fragmentos específicos da Tester foram obtidos, onde 11 dos clones apresentavam fragmentos onde uma parte da sua sequência era homóloga com a Driver, sendo considerados de grande importância a nível evolutivo. Para alguns dos fragmentos, a nível de proteína não foram encontradas funções conhecidas, tendo sido especulada a possível existência de novas classes de proteínas⁵. Noutro estudo efectuado em 2002, de modo a demonstrar a eficácia deste método, foram comparadas duas estirpes de *H. pylori* cujo genoma estava sequenciado, tendo-se conseguido identificar 95% das sequências únicas de cada estirpe⁴.

Em 2000, Zhang *et al* utilizaram este método de modo a identificar diferenças entre os genomas de duas estirpes relacionadas de *Aeromonas hydrophila*, uma virulenta (Tester) e uma avirulenta (Driver). Neste estudo foram obtidos 69 fragmentos específicos da Tester, 23 fragmentos dos quais mostraram elevada homologia com proteínas de outras bactérias, e os restantes fragmentos foram identificados como sendo novas proteínas de *A. hydrophila*. Entre estes, 22 encontravam-se em outras oito estirpes virulentas estudadas, mas não em sete estirpes avirulentas, sugerindo que poderão ser genes de virulência universais entre *A. hydrophila*¹²⁶.

Outro estudo efectuado em *Synechococcus*, no qual foram comparadas estirpes isoladas de diferentes regiões, levou à identificação de genes específicos para cada região⁵³.

Outros estudos têm sido efectuados em *E. coli*⁵⁵, *Campylobacter jejuni*⁴⁶, *Streptococcus mutans*⁴⁴ e *Yersinia pestis*²², de modo a comparar estirpes de origens diferentes, e a identificar genes específicos de cada nicho. Em 2005, Bae *et al* efectuaram um estudo de modo a determinar genes específicos de espécies diferentes de *Salmonella*, de modo a aplicar como sondas de microarrays, para posteriormente serem utilizados em estudos de identificação de isolados¹⁰. Noutro estudo efectuado por Wang *et al* (2006), utilizando o método de SSH em combinação com microarrays, onde compararam *Y. Pestis* com *Y. Pseudotuberculosis*, demonstraram um processo evolutivo destas duas espécies, pondo a hipótese de qual a espécie ancestral na China e demonstrando a proximidade entre estas duas espécies¹¹⁹.

Já em 2008, Maigre *et al*, efectuaram um estudo em *Mycoplasma* numa tentativa de desenvolverem um esquema que através da técnica de PCR possibilitasse a diferenciação entre o *Mycoplasma capricolum* e o *Mycoplasma mycoides*, resultando na

proposta de um esquema em PCR multiplex tendo como alvo dois genes específicos de cada espécie⁶⁸.

Como se pode demonstrar por estes estudos, este método apresenta uma variedade de aplicações em estudos comparativos de genomas, podendo-se obter um leque enorme de resultados.

No presente estudo pretendeu-se estudar as diferenças entre dois isolados relacionados de ambientes diferentes, um isolado de um produto alimentar e um isolado de origem hospitalar que causou infecção, numa tentativa de identificar genes específicos de isolados lácteos.

3.2 Metodologia

3.2.1 Isolados em estudo

Para este estudo seleccionaram-se dois isolados, ambos pertencentes à ST55: um isolado lácteo, QCB15, como Tester e um isolado Hospitalar, HSM3720, como Driver. As características destes isolados estão na Quadro 2, Capítulo 1.

3.2.2 Extracção de DNA total

O DNA foi extraído utilizando o Kit Ultraclean™ Microbial DNA isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.3 SSH

O método de SSH foi efectuado de acordo com o protocolo do Kit PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction (Clontech, USA). Digeriu-se 20 µg de ambos os DNA's com a enzima de restrição RsaI a 37°C o.n. e efectuou-se um controlo da digestão. De seguida dividiu-se o Tester em duas porções às quais se adicionaram os adaptadores:

adaptador1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3') e adaptador2 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'), tendo-se efectuado o controlo de ligação por PCR utilizando o *primer* 1 (P1: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' e os *primers* correspondentes ao 23S de enterococos (f: 5'-GCGTGCCTTTTGTAGAATGA-3'; r: 5'-TTCGCCCTATTCAGACTCG-3'). A cada uma destas porções adicionou-se Driver em excesso e efectuou-se um passo de desnaturação por aquecimento a 98°C seguido de uma primeira hibridação a 60°C durante 1,5 horas. De seguida juntaram-se as duas porções resultantes da primeira hibridação, e adicionou-se um excesso de Driver a esta mistura final, submetendo-a a um passo de hibridação de 60°C durante 20 horas. A partir deste produto efectuou-se uma primeira reacção de PCR utilizando um *primer* homólogo à sequência interna de ambos os adaptadores (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') e, utilizando o produto desta reacção, efectuou-se um segundo PCR onde se utilizaram dois *primers*, cada um homólogo à sequência externa de um dos adaptadores Pn1 (5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3') e Pn2 (5'-AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'). O produto final foi purificado com o Kit QIAquick PCR purification kit (Quiagen, Alemanha), e clonado de seguida.

3.2.4 Clonagem

3.2.4.1 Preparação de células competentes

Em LB preparou-se uma cultura de *E. coli* JM101TR. Adicionou-se 2ml deste pré-inóculo a 100 ml de meio LB. Incubou-se a 37°C com agitação a 200 rpm, até ser atingida uma DO_{600nm} de 0,7. Centrifugou-se a 6000 rpm (centrifuga Sigma 4K15, rotor nr.12166), durante 17 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* num volume igual de glicerol 10% frio. Centrifugou-se a 6000 rpm, durante 17 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em metade do

volume de glicerol 10% frio. Centrifugou-se a 6000 rpm, durante 20 minutos a 4°C. Eliminou-se o sobrenadante o mais possível, e ressuspendeu-se o *pellet* em 500ul de glicerol 10% frio. Prepararam-se alíquotas de 40 µl, que foram conservadas a -80°C.

3.2.4.2 Ligação

A ligação foi efectuada de acordo com o Kit pGEM-T[®] vector systems (Promega, USA). Ao produto resultante do método SSH, adicionou-se o vector pGEM-T, a T4 DNA ligase e um tampão específico para esta enzima e incubou-se a 4°C o.n. Também se efectuaram dois controlos: controlo positivo, ao qual se adicionou um DNA controlo em vez do produto do SSH; controlo negativo, no qual não se adicionou DNA. No final da ligação precipitou-se o produto de ligação adicionando 100 µl de Etanol 100%, 10 µl de Acetato de sódio 3M pH7 e 1 µl glicerol. Centrifugou-se 20 minutos a 13000 rpm (Microcentrifuga Sigma 112, rotor nr.12002). Ressuspendeu-se o *pellet* em 10 µl de H₂O milliQ, e utilizou-se este produto na transformação das células competentes.

3.2.4.3 Transformação das células

Adicionou-se 5 µl de produto de ligação a uma alíquota de células competentes e electroporou-se no Electroporador (BioRad) a 25uF, 200 ohms e 2.5Kv. Adicionou-se 1 ml de SOC (Bactotripton 20g/ml; extracto de levedura 5g/l; NaCl 0.25M; KCl 0.06M; MgCl₂ 0.25M; MgSO₄ 0.25M), e transferiu-se a suspensão de células para um tubo, incubando-se de seguida a 37°C durante 1.5 horas com a gitação a 200 rpm. Plaqueou-se por espalhamento 100 µl de cada uma das diluições 10⁰ e 10⁻¹, centrifugando-se a restante suspensão. O pellet foi ressuspensado em 100 µl de SOC e plaqueado em placas de LB contendo ampicilina (100ug/ml), IPTG (100mM) e X-Gal (50mg/ml). Incubou-se

o.n a 37°C. Repicaram-se as colónias brancas em novas placas de LB com ampicilina (100µg/ml), IPTG (100mM) e X-Gal (50mg/ml) para confirmação. Conservaram-se os clones em glicerol 80% a -80°C.

3.2.5 Confirmação dos clones

A confirmação dos clones foi efectuada por hibridação, segundo o protocolo do kit PCR-Select Differential Screening Kit (Clontech, USA), utilizando como sondas os DNA Tester e Driver digeridos com RsaI.

3.2.5.1 Preparação das membranas

Prepararam-se as membranas, aplicando 1 µl de uma cultura de cada clone com 2 horas, colocando-se as membranas em placas de LB com ampicilina (100µg/ml), incubando-se a 37°C o.n. As membranas foram então colocadas sobre papel contendo uma solução de desnaturação (NaOH 0,5M; NaCl 1,5M) e de seguida colocadas numa solução de neutralização (Tris-Cl 0,5 M pH7,4; NaCl 1,5M). As membranas foram depois fixadas com uma solução de NaOH 50mM preparada de fresco.

3.2.5.2 Marcação das sondas

Para a marcação das sondas utilizou-se 100ng de cada DNA digerido e desnaturado a 95°C durante 8 minutos. A este DNA adicionou-se dCTP marcado com ³²P, adicionando-se também um tampão específico, *random primers* (nonameros de oligonucleótidos de sequências aleatórias) e a enzima Klenow. Esta reacção foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Foi posteriormente adicionada à solução de hibridação.

3.2.5.3 Hibridação

Efectuou-se uma pré-hibridação das membranas a 68°C durante 2 horas. De seguida adicionou-se a sonda marcada anteriormente e hibridou-se a 68°C o.n. De seguida efectuaram-se 4 lavagens de 15 minutos cada, com uma solução de baixa estringência (2x SSC; 0,5% SDS) a 68°C. Efectuaram-se duas lavagens finais com uma solução de alta estringência (0,2x SSC; 0,5% SDS). As membranas foram de seguida expostas durante uma semana para posterior visualização no aparelho laser scanner STORM 860 (GE Healthcare, Inglaterra).

3.2.6 Sequenciação dos clones

Os fragmentos clonados foram sequenciados. Para tal, amplificaram-se por PCR com os *primers* Pn1 e Pn2. Inicialmente cresceram-se os clones em 100µl de LB com 100µg/ml de ampicilina, durante 2 horas. Para cada reacção 1µl de cultura foi adicionado à seguinte mistura de reacção: Tampão 10X, 10 µM de cada *primer* Pn1 e Pn2; 10mM dNTP, Polimerase 50X, para um volume final de 20 µl. Todos os reagentes foram adquiridos à empresa Clontech (EUA). O programa de PCR utilizado encontra-se descrito na Quadro 11. O produto de reacção foi purificado utilizando o Kit QIAquick PCR purification kit (Quiagen, Alemanha), sendo depois enviado para sequenciação para a Baseclear (Leiden, Holanda).

Quadro 11: Programa de PCR utilizado na amplificação dos fragmentos clonados

T (°C)	Tempo	Nº ciclos
95	2 min.	1
95	30 seg.	
68	30 seg.	30
72	3 min.	
72	5 min.	1

As sequências foram analisadas utilizando o programa Vector NTI Advance™ (versão 10, Invitrogen, EUA) e de modo a determinar as homologias dos fragmentos obtidos recorreu-se ao Blastn através da página <http://tigrblast.tigr.org/cmrbblast/>.

3.2.7 Confirmação dos clones por PCR

Recorrendo ao programa Primer 3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), foram desenhados primers específicos para as sequências encontradas. Os primers desenhados encontram-se descritos no Quadro 12.

Quadro 12: Sequência nucleotídica dos *primers* desenhados a partir das sequências obtidas para os clones analisados

clone	Sequencia (5'-3')	Tamanho do fragmento (bp)
Clone 3	f:TCCGGCGTTATTTACTAGGC r:ATCCAACCAGAAACGATTGC	543
Clone 11	f:CTTCGTCGTGAACCATTACG r:CGCGAACAAGAATCTCAAGC	511
Clone 19	f:AGTTCTGCGGGGTATAATCG r:TTGTATTTCCAGCACCATTCC	136
Clone 27	f:GCATATGCCCAAAGTGACG r:TTTTGGGGGATATAGATTTGG	633
Clone 35	f:CGTGCCTAGTGTAACAACACC r:CCTTCATTTTACCGTCCTTACC	173
Clone 51	f:TGCCCAGGTTTTTTGATTAGC r:TGACAAAGCCAAATCTGAAGG	153
Clone 81	f:TGAGCAGCCAGTTATTTTTGC r:TTTCTTTGACAGCGTTACGG	329
Clone 89	f:AAGTGACAGGCAGCCTAACC r:GCTTCTTTGGCAGCTACACC	514
Clone 105	f:TTTTTGAGGGTAGGAATACAAGC r:TTGCTGTTTGTAATAAATCTGC	235

Clone 114	f:GAAACAAAGTTAGCGGAAATGG r:AAAAATTGGCGAACAAGTCG	498
Clone 144	f:TCGGAGGTTGTGTTTTGACC r:CGCAGTAAAGTGGGACAACC	471
Clone 152	f:GGTTGCTTTTTCTGGTTTGG r:GCTCATTCTGTTGCTTTTGG	479
Clone 160	f:CAACAGGCAATTGAAAATGG r:TGGGATAGGGTGAGAATTGC	524
Clone 169	f:CTTGAGAAGGGGAACCAAGG r:CGAAATTTTTCCCTTTTTCTGC	532
Clone 184	f:AAAGTGAAAAATATAGTGACGATTGC r:AGGATGGTTTCTTTGCTTGG	161
Clone 191	f:CAAAGGAATCCATTCAAACG r:CGAAGCACGTAATTTTTGTTCG	388
Clone 192	f:TTCGTTTGCGAGAAACAATAGC r:GTCACCAAGAACCCAGATCG	450

Para cada reacção 1µl de DNA foi adicionado à seguinte mistura de reacção: 10 µl de MasterMix (5 Prime, Espanha); 10µM de cada *primer* para um volume final de 25 µl. O programa de PCR utilizado encontra-se descrito na Quadro 13.

Quadro 13: Programa de PCR utilizado na amplificação das sequências encontradas

T (°C)	Tempo	Nº ciclos
95	2 min.	1
95	30 seg.	
50	30 seg.	30
72	1 min.	
72	5 min.	1

Os produtos obtidos foram aplicados num gel de 1% de agarose, sendo depois analisados os resultados com recurso ao programa Kodak 1D software (v.3.6.1) (USA), de modo a determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

3.3 Resultados e Discussão

Através do método de SSH pretendia-se determinar as diferenças a nível do genoma, entre dois isolados *E. faecalis* relacionados de ambientes diferentes, um lácteo e um de uma infecção hospitalar.

Como primeiro passo deste método, efectuou-se a digestão de ambos os DNA. O SSH é um método baseado na técnica de PCR, pelo que grandes fragmentos de DNA não são eficazmente amplificados, não sendo representados no produto final. Por outro lado, os fragmentos muito pequenos, inferiores a 200pb, que seriam mais facilmente amplificáveis, são raramente amplificáveis devido à complementariedade dos adaptadores, que leva à formação de loops, que impedem a amplificação dos fragmentos. Assim é importante que os fragmentos resultantes da digestão tenham tamanhos compreendidos entre 0.2-1.2kb⁴. Para se verificar a eficácia do enzima RsaI neste estudo, pesquisou-se no genoma da estirpe *E. faecalis* V583, o número e tamanho dos fragmentos que se obteria, tendo-se confirmado que este enzima seria indicado, com a ressalva de não serem conhecidos os genomas dos isolados em estudo. Como representado na Figura 7, a maioria dos fragmentos obtidos encontra-se dentro desta gama de tamanhos.

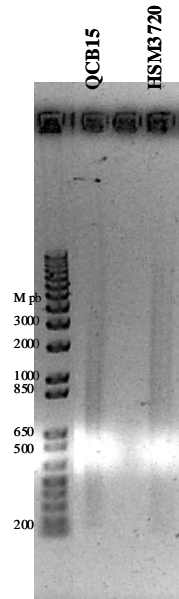


Figura 7: Gel de agarose resultante da aplicação dos produtos da digestão dos DNA Driver e Tester

Após a digestão procedeu-se à ligação dos adaptadores a duas fracções do Tester. Efectuou um controlo da ligação, representado na Figura 8.

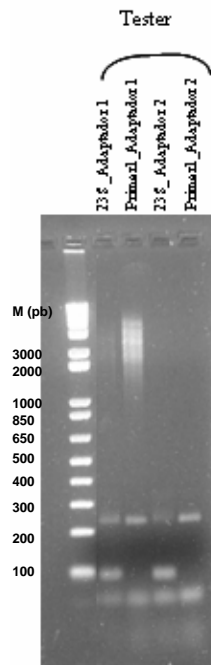


Figura 8: Gel de agarose resultante da aplicação dos produtos de reacção do controlo de ligação dos adaptadores.

Como se pode observar, obteve-se o perfil esperado. Na amplificação com os primers do 23S obteve-se a banda esperada de 100 pb e na amplificação com os primers P1 e 23Sr obteve-se uma banda de tamanho superior.

Após o processo de subtracção, recorreu-se ao PCR para amplificar os fragmentos desejados. O resultado encontra-se representado na Figura 9.

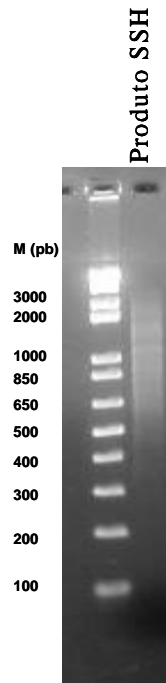


Figura 9: Gel de agarose resultante da aplicação do produto subtraído obtido pelo método de SSH.

Obteve-se o resultado esperado, visto que os fragmentos esperados se encontram entre os 2000 e 200pb. De modo a ter um resultado preliminar da eficácia da subtracção, procedeu-se à amplificação de um gene comum entre ambos os isolados, tendo sido escolhido o gene *pstS* (esquema de MLST) por não ter nenhum local de restrição para o enzima *RsaI*. Efectuou-se o PCR para o produto do SSH e para um produto não subtraído, ou seja, neste controlo efectuaram-se todos os passos do método, excepto as hibridações. O resultado deste teste de eficácia está representado na Figura 10.

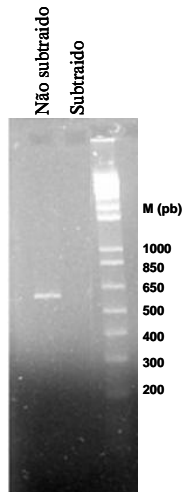


Figura 10: Gel de agarose resultante da aplicação dos produtos da amplificação do gene *pstS*, para o produto subtraído e não subtraído.

Como se pode verificar, houve amplificação apenas no produto não subtraído, o que indica que este gene comum entre os isolados foi “eliminado” durante o processo de SSH, demonstrando eficácia no método.

O produto obtido foi clonado no vector pGEM-T. Este vector possui o gene de resistência à ampicilina, por isso a incorporação do antibiótico no meio, de modo a poder seleccionar as bactérias que tenham incorporado este vector, conferindo-lhes assim resistência. O vector também possui um gene *lacZ*, que codifica para uma β -galactosidase. Esta proteína, quando funcional, produz colónias azuis na presença de X-Gal. Os fragmentos foram inseridos no interior do *lacZ* inactivando este gene, logo as colónias em que foram inseridos fragmentos apresentam uma cor branca (<http://www.scienceteacherprogram.org/biology/Geen98.html> acessado a 20 de Março de 2008). O número de colónias brancas obtidas em cada diluição está descrito no Quadro 14.

Quadro 14: Resultado das contagens de colónias brancas após a clonagem, e número de colónias repicadas de cada placa.

Diluição	Número de colónias brancas	Número de clones repicados
10⁰	123	123
10⁻¹	68	68
<i>pellet</i>	Incontável	1

No total foram repicados 192 clones, tendo sido denominados de 1 a 192. Estes clones foram de seguida aplicados em membranas para, através de um processo de hibridação diferencial, serem confirmados. Durante o crescimento dos clones nas membranas, o Clone 34, não cresceu. Pode não ter havido contacto entre a membrana e o meio, ou então por algum processo, este clone perdeu o plasmídeo inserido.

No processo de hibridação diferencial, para garantir que as sondas não hibridavam com o vector, utilizaram-se dois controlos negativos, dois clones que foram obtidos do controlo negativo do processo de clonagem. Os resultados da hibridação diferencial encontram-se representados na Figura 11.

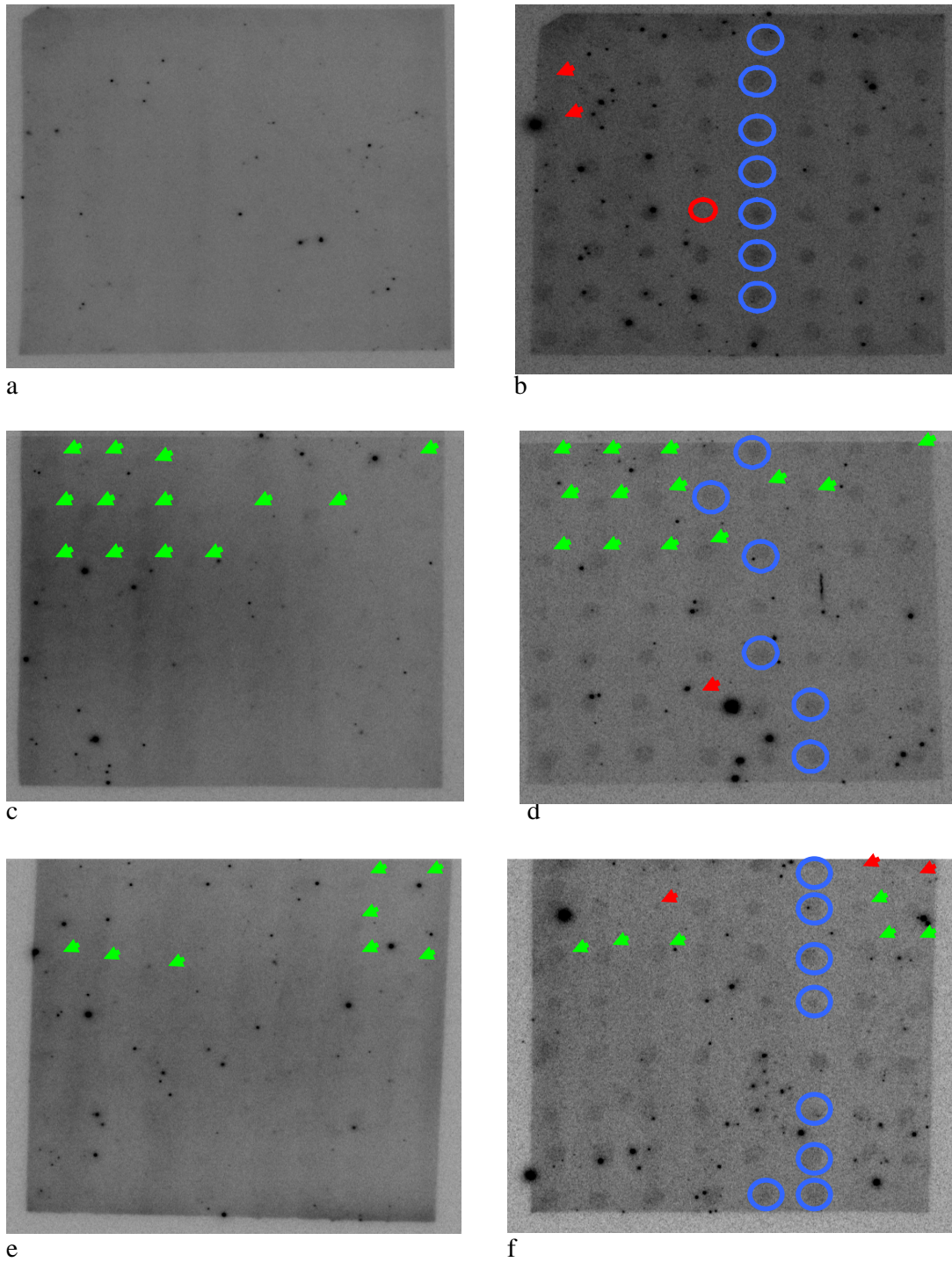


Figura 11: Membranas resultantes do processo de hibridação diferencial: imagens a, c, e representam as membranas hibridadas com o Driver; imagens b, d, f representam as membranas hibridadas com o Tester; o círculo vermelho representa o clone 34; as setas vermelhas representam os clones que não hibridaram com o Tester; as setas verdes representam os clones que hibridaram com ambas as sondas ou só com o Driver; os círculos azuis representam os clones já sequenciados.

Como se pode observar, obteve-se um sinal mais forte nas membranas hibridadas com a sonda Tester, pondo-se a hipótese de a marcação da sonda Driver ter tido uma baixa eficácia. Não se obteve sinal para os controlos negativos, o que indica que as sondas não hibridam com os vectores, sendo os sinais obtidos apenas da hibridação das sondas com os fragmentos inseridos.

Por este método, detectaram-se 25 falsos positivos em 191 clones (13%): 2 hibridaram apenas com a driver; 4 não hibridaram com nenhuma das sondas; 19 hibridaram com ambas as sondas. Uma limitação no método SSH é a inevitabilidade da ocorrência de falsos positivos. Os falsos positivos resultam de sequências, que mesmo na presença de excesso de Driver, permanecem em cadeia simples e eventualmente hibridam com sequências parcialmente complementares do Tester^{4, 49}. Estes podem ser detectados através do método de hibridação diferencial, no entanto existe uma tentativa de diminuir o número destes falsos positivos. Um dos métodos desenvolvidos engloba a remoção de um dos adaptadores por acção de endonucleases, seguido de desnaturação e reassociação dos fragmentos de SSH, efectuando de seguida uma reacção de PCR utilizando apenas os primers do adaptador que permanece, sendo este método denominado por Mirror Orientation Selection (MOS)^{49, 95}.

De seguida procedeu-se à amplificação dos fragmentos de 36 clones, estando os resultados representados nas Figuras 12.

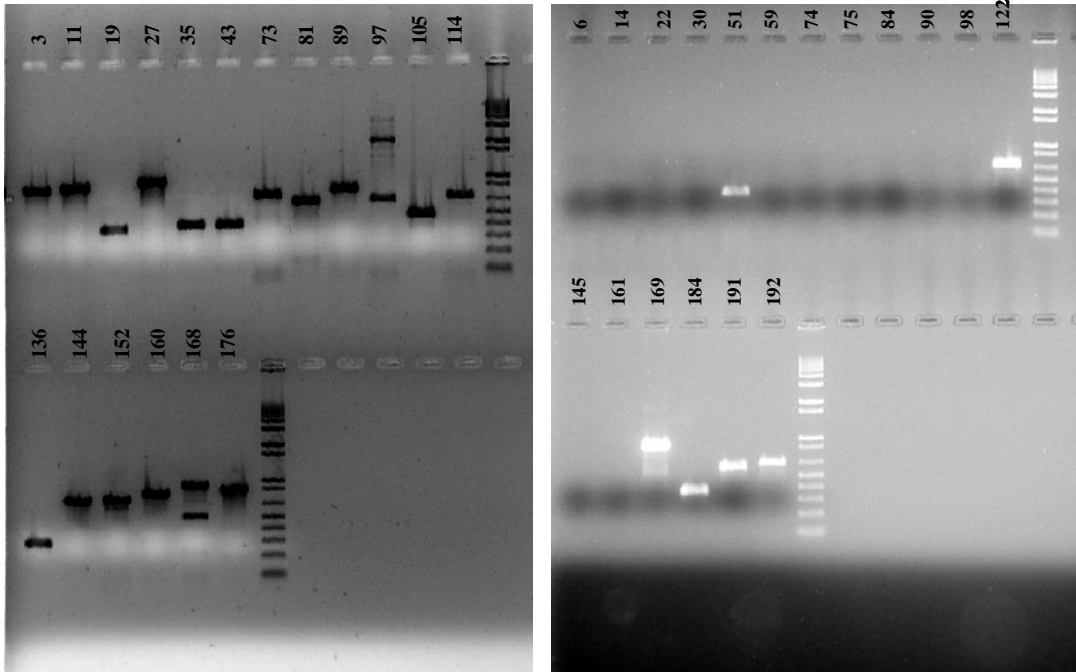


Figura 12: Géis de agarose resultantes da aplicação dos produtos da amplificação dos fragmentos inseridos em 36 clones.

Para 12 clones não se obteve amplificação, em 2 obteve-se amplificação de dois fragmentos, podendo ser resultado da inserção de dois fragmentos, ou então o fragmento inserido ter um local de hibridação de um dos *primers*. Os restantes 22 clones para os quais se obteve amplificação de uma só banda foram sequenciados, tendo-se analisado as sequências e procurado homologias com sequências conhecidas por Blastn, estando os resultados apresentados no Quadro 15.

Quadro 15: Características dos fragmentos obtidos e correspondentes homologias.

Nome	Tamanho Fragmento (pb)	%GC	Homologia com proteínas conhecidas	Valor E ^a
3	743	39	EF3310 – sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase (V583 genome)	7.2e-72
			EF3311 – Glucose inhibited division protein A (V583 genome)	1.8e-40
11	753	38	EF0715 – Trigger Factor (V583 genome)	1.4e-162
19	218	35	EF2229 – hypothetical protein (V583 genome)	2.1e-42
27	824	29	pcfW gene - pCF10 plasmid (<i>E. faecalis</i> plasmid)	0.0
35	262	39	EF0490 – cell wall surface anchor family protein (V583 genome)	1.0e-52
			EF_A0042 - cell wall surface anchor family protein (pTEF1 - V583 plasmid)	1.2e-51
43	279	24	EF2459 – ATP-dependent DNA helicase RecQ (V583 genome)	1.6e-12
51	237	41	EF0641 – L-lactate dehydrogenase (Ldh-2) (V583 genome)	1.3e-47
73	528	34	SAS0025 – putative type I restriction enzyme protein (Genoma <i>Staphylococcus aureus</i> subsp.	1.2e-58
152	571	35	<i>Aureus</i>)	2e-58
81	454	40	EF1206 – malate dehydrogenase, decarboxylating (V583 genome)	5.1e-68
89	639	41	EF2781 – DNA polymerase III gamma and tau subunits (V583 genome)	3.6e-136
105	313	30	EF0539 – Phosphosugar-binding Transcriptional regulator RpiR family (V583 genome)	1.2e-64
114	548	42	EF0720 – Voltage gated chloride channel family protein (V583 genome)	2.2e-116
122	477			3.7e-101
136	101	26	EF3146 – hypothetical protein (V583 genome)	2e-28
144	571	36	EF0549 – Transposase; IS3 family (V583 genome)	2.9e-82
160	661	34	EF0587 – hypothetical protein (V583 genome)	2.2e-47
			EF0588 – Ribosomal protein L33 (V583 genome)	4.5e-25
			EF0589 – hypothetical protein (V583 genome)	4.3e-28
169	666	31	EF0546 - hypothetical protein (V583 genome)	1.2e-21
176	749	26	EF0546 – hypothetical protein (V583 genome)	2.1e-72
			EF0547 – Amonium transporter (V583 genome)	1.5e-19
184	229	32	<i>E. faecalis</i> OG1-RF genome	1e-114
191	436	38	EF1392 – molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC (V583 genome)	2.5e-47
192	501	37	EF1966 – YitT family protein (Genoma V583)	1.2e-56

^a Apenas são consideradas as homologias cujo valor de score fosse igual inferior a 1e-5

Na pesquisa de homologias por Blast, apenas foram consideradas homologias cujo valor de *score* fosse igual ou inferior a $1e-5$. Este valor representa a probabilidade de os fragmentos corresponderem a um certo gene ou sequência.

O clone 3, contendo um fragmento de 743 pb, apresenta homologia com dois genes de V583 (esquema na Figura 13).

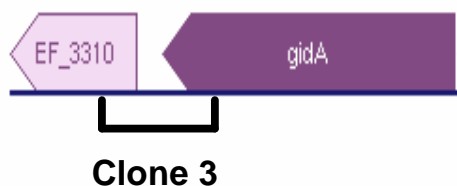


Figura 13: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 3.

Este fragmento apresenta homologias com o EF3310 que faz parte de uma unidade transcricional de 7 genes envolvidos no metabolismo do sorbitol. Também tem homologia com o EF3311, que se encontra inserido numa unidade transcricional de 3 genes, envolvidos no processamento de tRNA's. No estudo de Aakra *et al* (2007) o EF3311 foi utilizado como sonda, tendo sido encontrado em todos os isolados estudados¹. Este fragmento também engloba a região intergênica entre estes dois genes. Os respectivos alinhamentos encontram-se no Apêndice I.

O fragmento obtido do clone 11, representa uma zona interna do EF0715, como está esquematizado na Figura 14.

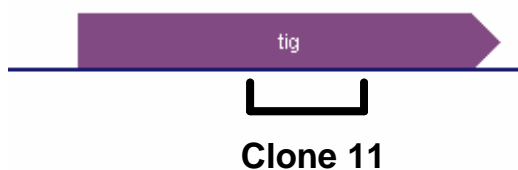


Figura 14: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 11.

Este gene é transcrito isoladamente e codifica para um *Trigger factor* que, em enterococos, se pensa estar relacionado com o processo de tradução e maturação da proteína Gelatinase, envolvida em processos de virulência⁴⁵. Em *Streptococcus pyogenes* estes factores estão descritos como peptidil-prolil cis-trans isomerases envolvidas na maturação de proteases⁶⁶, apresentando uma grande semelhança com o mecanismo encontrado em enterococos. O alinhamento da sequência obtida com o EF0715 encontra-se no Apêndice I.

O fragmento obtido do clone 19 é homólogo a uma zona interna do EF2229, esquematizado na Figura 15.



Figura 15: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 19.

Este gene codifica para uma proteína hipotética, que possui um domínio encontrado em proteínas de superfície. Este é co-transcrito com outra proteína hipotética. O alinhamento da sequência obtida com o EF2229 encontra-se representado na Apêndice I.

O fragmento obtido do clone 35 apresenta homologia com uma zona interna de um gene que codifica para uma proteína de superfície, encontrando-se presente no genoma da estirpe V583 (EF0490) mas também no plasmídeo pTEF1 da estirpe V583. O esquema representativo encontra-se na Figura 16.



Clone 35

Figura 16: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 35, representativo do EF0490 encontrado no genoma da estirpe V583.

Este gene, no genoma de V583, faz parte de uma unidade transcripcional composta por 7 genes - 5 codificam para proteínas hipotéticas, e um para uma muramidase (EF0491) envolvida na mobilidade e sinalização intracelular. Este gene encontra-se inserido na PAI do genoma de V583 (a PAI engloba a região EF0479-EF0620⁸⁰). No estudo de Lepage *et al*, este gene faz parte do grupo de genes que foi detectado tanto em isolados clínicos como em isolados alimentares⁶². No estudo de Aakra *et al*, este foi considerado um gene divergente¹. De acordo com Paulsen *et al*, este gene encontra-se inserido numa região de plasmídeos integrados⁸⁹. O alinhamento deste fragmento com o gene correspondente encontra-se no Apêndice I.

Para o clone 43 obteve-se um fragmento de 279 pb, que se encontra esquematizado na Figura 17.



Clone 43

Figura 17: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 43.

Este fragmento engloba o final do EF2459 e parte da região intergénica entre este gene e o EF2458. Este gene é transcrito isoladamente e codifica para uma DNA helicase dependente de ATP, pertencente à superfamília Helicase II. Esta proteína está

envolvida em vários processos de replicação, recombinação e reparação de DNA. Os alinhamentos do fragmento obtido, tanto com o gene correspondente como com a região intergênica, encontram-se descritos no Apêndice I.

O fragmento obtido para o clone 51 apresenta homologia com uma parte interna do EF0641, estando o esquema representado na Figura 18.



Figura 18: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 51.

Este gene é transcrito isoladamente, codificando para uma L-lactato desidrogenase (ldh) pertencendo à família de hidroxicarboxilato desidrogenases dependentes de NAD, que são enzimas envolvidas no último passo da glicólise que converte o piruvato em L-lactato. O alinhamento das sequências encontra-se descrito no Apêndice I.

Para o clone 81, obteve-se um fragmento de 454pb, que apresenta homologia com uma zona interna do EF1206. O esquema representativo encontra-se na Figura 19.

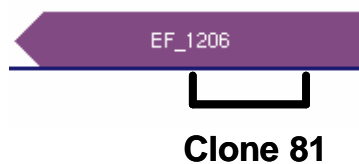


Figura 19: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 81.

Este gene codifica para uma malato desidrogenase, e é co-transcrito com um transportador de citrato (EF1207). O alinhamento correspondente encontra-se descrito no Apêndice I.

Para o clone 89 obteve-se um fragmento com homologia numa zona interna do EF2781. O esquema encontra-se representado na Figura 20.

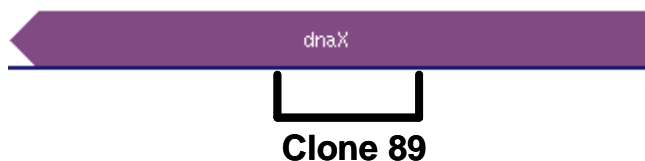


Figura 20: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 89.

Este gene codifica para as sub-unidades γ e τ da DNA polimerase III, enzima envolvida na transcrição de DNA. É co-transcrito com uma proteína hipotética conservada (EF2780). Este gene foi utilizado no estudo de Aakra *et al*, estando presente em todos os isolados estudados¹. O alinhamento encontra-se representado no Apêndice I.

O fragmento obtido do clone 105, apresenta homologia com uma zona interna do EF0539, estando o esquema representado na Figura 21.



Figura 21: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 105.

Este gene é transcrito isoladamente e codifica para um regulador transcricional de ligação a fosfato-açúcares que apresenta dois domínios, um de *Helix-turn-helix* de ligação ao DNA, e outro de isomerase de fosfato-açúcares, encontrando-se envolvida na síntese de açúcares fosfatados. De acordo com Aakra *et al*, este tipo de reguladores encontra-se conservado em bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo em GC¹. O alinhamento desta sequência encontra-se representado no Apêndice I.

Para o clone 114 obteve-se um fragmento de 548pb que se verificou ser o mesmo obtido para o clone 122, este com 477 pb. Estes fragmentos apresentavam homologia com uma sequência interna do EF0720, cujo esquema está representado na Figura 22.

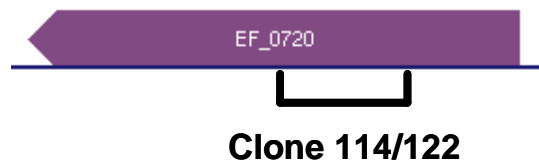


Figura 22: Esquema representativo da região abrangida pelos fragmentos inseridos no clone 114 e 122.

Este gene é transcrito isoladamente, e codifica para uma proteína “*Voltage-gated chloride channel*”. Possui um domínio EriC, que está envolvido no transporte de Cl⁻, fazendo parte do mecanismo de resposta a situações de extrema acidez do meio. Este mecanismo poderá estar relacionado com a resposta a stress ácido.

Para o clone 136, obteve-se um fragmento que apresentava homologia com o EF3146 e com a região intergênica entre este gene e o EF3145. O esquema encontra-se representado na Figura 23.

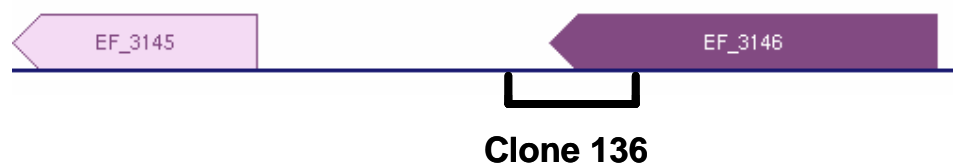


Figura 23: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 105.

Este gene é transcrito isoladamente e codifica para uma proteína hipotética.

Para o clone 144, obteve-se um fragmento com homologia com uma zona interna do EF0549, que codifica para uma transposase, que se encontra relacionada com mecanismos de conjugação de material genético. Não está descrito se este gene se

encontra integrado em alguma unidade transcripcional, no entanto está integrado na PAI de V583.

Para o clone 160, obteve-se um fragmento com 661pb, que apresenta homologia com 3 genes, EF0587, EF0588 e EF0589. O esquema representativo encontra-se na Figura 24.

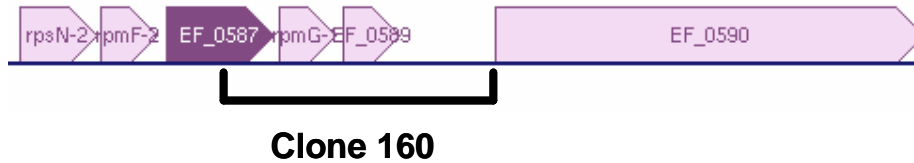


Figura 24: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 160.

Estes genes fazem parte de uma unidade transcripcional composta por 5 genes. O EF0587 codifica para uma proteína hipotética. O EF0588 codifica para a proteína ribossomal 50S. O EF0589 codifica para uma proteína hipotética. Este operão encontra-se inserido na PAI de V583. Este fragmento também englobava as regiões intergênicas entre estes genes e a região intergênica completa entre o EF0589 e o EF0590. O facto de apenas ter sido sequenciado parte deste operão, pode indicar a existência de um local de restrição do enzima RsaI, logo o restante fragmento do operão poderá estar inserido num clone ainda não sequenciado.

Para o clone 176, obteve-se um fragmento com 749pb, que apresenta homologia com o EF0546 e o EF0547. O esquema representativo encontra-se na Figura 25.



Figura 25: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 176.

Cada um destes genes é transcrito isoladamente. O EF0546 codifica para uma proteína hipotética e o EF0547 para um transportador de amónio. Ambos os genes encontram-se inseridos na PAI de V583. Neste fragmento também se encontravam representadas a região intergénica entre os dois genes descritos e parte da região intergénica entre o EF0546 e o EF0545.

O fragmento obtido para o clone 169, tem aparentemente alguma homologia com uma zona interna do EF0546 descrito anteriormente. Como demonstrado pelos alinhamentos (Apêndice I), o fragmento 176 tem um bom alinhamento, mas no caso do fragmento 169, o alinhamento não é ótimo, embora se tenha obtido um score de $12e-21$. Em publicações em que as homologias obtidas apresentam scores dentro do limite, mas em que o alinhamento das sequências é fraco, consideram que estas diferenças entre as sequências possam ser resultado de processos evolutivos⁵.

Para o clone 191, obteve-se um fragmento que apresenta homologia com parte do EF1392, estando o esquema representado na Figura 26.

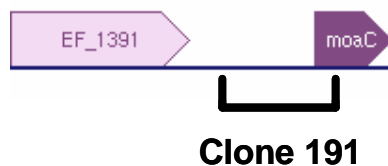


Figura 26: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 191.

Este gene encontra-se integrado numa unidade transcripcional de 8 genes, relacionada com a síntese de compostos de molibdénio. O EF1392 codifica para um cofactor da biosíntese de compostos de molibdénio. Este fragmento também engloba parte da região intergénica entre este gene e o EF1391.

O fragmento obtido para o clone 192, apresenta homologia com o EF1966 e parte da região intergénica entre este gene e o EF1966, estando o esquema representado na Figura 27.

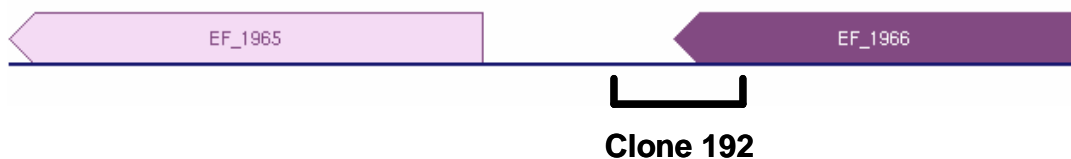


Figura 27: Esquema representativo da região abrangida pelo fragmento inserido no clone 192.

Este gene é transcrito isoladamente, e codifica para uma proteína YitT, cuja função é desconhecida. Pensa-se que poderá ter função de transportador ou permease.

Para o clone 73 obteve-se um fragmento de 528pb, que se verificou ser o mesmo que para o clone 152, que tinha 571pb. Verificou-se que este gene não tinha homologia com o genoma da estirpe de V583, mas com um gene que codifica para uma enzima de restrição tipo I de *Staphylococcus aureus*. O esquema encontra-se representado na Figura 28.

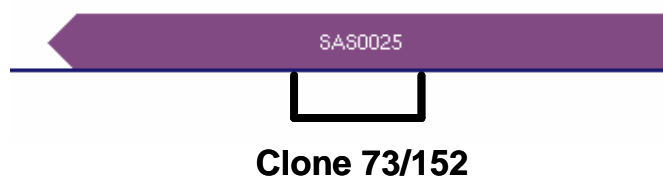


Figura 28: Esquema representativo da região abrangida pelos fragmentos inseridos no clone 73 e 152.

Este gene é co-transcrito com outros dois genes, sendo que o SAS0026 também codifica para uma enzima de restrição do tipo I e o SAS0027 codifica para uma metilase. Estes enzimas formam um complexo com funções a nível de processos de recombinação de DNA e de alteração de locais alvo no DNA para protecção da célula, já tendo sido comprovada a sua função como barreira contra infecção por fagos⁷⁸.

Para o clone 27, obteve-se um fragmento com 824 pb, que apresenta homologia com o gene *pcfW* codificado no plasmídeo de enterococos pCF10, cuja função é ainda desconhecida. Este plasmídeo tem sido estudado por estar relacionado com mecanismos

de conjugação por resposta a feromonas¹⁰⁶. Ainda não foi efectuado nenhum estudo que vise a detecção deste plasmídeo em isolados de vários ambientes.

Para o clone 184 obteve-se um fragmento com 229pb, não tendo sido encontrada nenhuma homologia significativa com nenhum genoma bacteriano na base de dados. No entanto, um Blast contra os genomas de enterococos que se encontram em anotações, permitiu encontrar homologia com o genoma da estirpe *E. faecalis* OG1-RF. A sequência deste genoma encontra-se em processo final de publicação, não sendo ainda possível determinar se este fragmento é homólogo com alguma região codificante.

Os fragmentos descritos correspondem aos clones sequenciados que por hibridação diferencial pareciam representar diferenças entre os isolados em estudo.

Com recurso às sequências obtidas, foram desenhados *primers* específicos, que posteriormente foram utilizados de modo a efectuar a confirmação dos clones, mas recorrendo à técnica de PCR. Para os clones 43, 136 e 176, não foram encontrados *primers*, nos quais se pudesse ter um bom grau de segurança para os resultados que se obteriam. Para os clones 114 e 122, assim como para os clones 73 e 152, que apresentam sequências repetidas, foram escolhidas para desenhar os *primers*, as sequências mais longas. O resultado encontra-se representado na Figura 29.

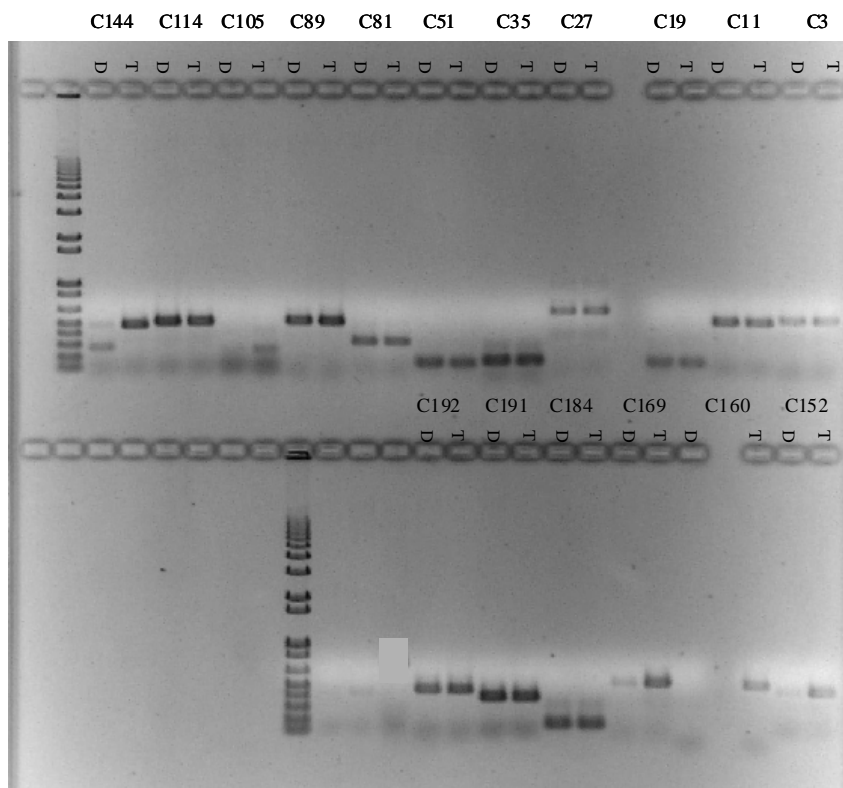


Figura 29: Géis de agarose resultantes da aplicação dos produtos da amplificação das regiões específicas encontradas para cada clone, nos isolados em estudo; T-DNA Tester, D- DNA Driver, C- Clone seguido do número correspondente.

Como se pode observar, por PCR, apenas os fragmentos dos clones 105 e 160 constituem diferenças entre o isolado lácteo e o isolado clínico.

Na confirmação dos clones por hibridação diferencial, obteve-se um fraco sinal nas membranas, o que poderá justificar as diferenças dos resultados obtidos por este método e pelos obtidos por PCR. No entanto, é de salientar que os clones analisados, apenas representam 10% dos clones recolhidos, podendo-se encontrar um maior número de sequências diferentes, nos restantes 90% dos clones. No estudo de Akopyants *et al* dos 64 clones recolhidos, apenas 18 (28%) representavam diferenças entre os isolados estudados⁵, assim como no estudo de de Kariyawasam *et al* se obteve a mesma percentagem de diferença (136 diferenças/482 clones totais)⁵⁵. Já no estudo de Migre *et al*, em que foram realizados dois ensaios de SSH, foram obtidas 34% e 50% de

diferenças entre os isolados estudados⁶⁸. Extrapolando a partir dos resultados já obtidos, espera-se no total obter 20 sequências específicas do isolado lácteo.

Como foi referido o fragmento obtido para o clone 105, representa parte de um gene que codifica para um regulador transcricional, que se encontra envolvido na via metabólica das pentoses fosfato. Em *E. coli*, a utilização de D-ribose como fonte de carbono em parte é catalizada por uma ribose fosfato isomerase, existindo no seu genoma dois genes que codificam para esta enzima, *rpiA* e *rpiB*. O gene *rpiB* é regulado negativamente por um regulador desta família¹⁰⁴. Em enterococos a função destes reguladores ainda não foi estudada. Efectuando uma pesquisa no genoma da estirpe V583, verificou-se que existem no total, onze reguladores desta família, um deles localizado na PAI, logo a possível ausência deste regulador do isolado clínico, pode não efectuar este metabolismo.

Como também foi referido, o fragmento obtido para o clone 160, representa parte de um operão no qual se encontra enzima ribossomal. Estas enzimas são essenciais para a célula, estando conservadas. No genoma de V583, encontra-se um parólogo deste gene (EF3203), pelo que a ausência do fragmento 160, no isolado clínico, não é de estranhar e pode estar relacionada com a sua localização na PAI. Por outro lado, como foi descrito por Akopyants *et al*⁵, podem existir situações em que apenas parte de um fragmento obtido, representa diferença entre os isolados. Neste caso, o tamanho da sequência do gene que codifica para a proteína ribossomal, pode não ser suficientemente grande para que se dê a hibridação, quando comparado com a restante sequência obtida, resultando num sinal negativo na hibridação com a sonda Driver.

Embora este estudo tivesse como objectivo encontrar diferenças entre os dois isolados, de entre as sequências comuns aos dois genomas, Driver e Tester, há três clones que interessa destacar, nomeadamente a existência de uma sequência homóloga

com parte de um gene de *S. aureus*. Este gene codifica para uma enzima de restrição, sendo importante determinar se os isolados possuem homologia com toda a sequência deste gene. Também é de grande interesse determinar se estes isolados possuem o plasmídeo pCF10, ou se parte deste se encontra integrado no seu genoma, tendo em conta a importância deste plasmídeo em processos de conjugação. Com a finalização da publicação do genoma OG1-RF será importante determinar se a sequência encontrada corresponde a uma região codificante.

Considerações finais

Considerações finais

Neste trabalho pretendeu-se estudar a disseminação de isolados VACISEf, e tentar estabelecer uma relação entre estes isolados e os VRE existentes na base de dados de MLST de *E. faecalis*. Verificou-se que os isolados VACISEf não apresentam relação entre si e também não apresentam nenhuma relação aparente com os isolados VRE. De notar que a base de dados não é representativa da população *E. faecalis*, visto apenas serem adicionados dados consoante a necessidade nos estudos que são efectuados. No entanto, a informação presente é suficiente para as conclusões retiradas neste estudo. Será necessário continuar a monitorizar estes isolados de modo a determinar o seu papel na transmissão da resistência à vancomicina. De modo a verificar como aparecem estes isolados, será necessário efectuar estudos que permitam monitorizar várias gerações de um isolado VRE sem estar submetido à pressão selectiva da vancomicina⁵². Estes estudos podem explicar se estes isolados surgem pela perda gradual de elementos do operão *vanA* ou se surgem por apenas ocorrer a transferência de parte do operão.

A análise das ST's dos isolados VACISEf revelou a existência de um isolado lácteo e outro clínico com a mesma ST. Assim, o trabalho foi orientado também no sentido de encontrar diferenças no genoma, por SSH. Dos fragmentos analisados (10%), comprovou-se que apenas dois representavam diferenças entre os dois isolados em estudo. Um dos fragmentos apresenta homologia com um regulador transcricional descrito como conservado em bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo em GC. O fragmento, correspondente ao clone 160, apresenta homologia com um grupo de genes que fazem parte de um operão. Este operão encontra-se inserido na PAI da estirpe de V583. O facto de o isolado clínico apresentar ausência de genes da PAI, não significa que seja menos virulento. Como foi sugerido por Lee *et al* (2006), num estudo em

Pseudomonas aeruginosa, a virulência num organismo é multifactorial e combinatória, sendo que vários factores combinam-se de modo a conferirem um fenótipo de virulência⁶¹. Será indispensável determinar a virulência dos dois isolados deste estudo através de modelos animais, como *Caenorhabditis elegans*³⁹ ou *Galleria mellonella*⁸⁸. De modo a determinar se os genes encontrados são específicos de isolados alimentares ou se apenas são específicos deste isolado lácteo, ir-se-á sondar um grupo de isolados de vários ambientes por Southern-Blot utilizando os fragmentos obtidos como sondas. Este método poderá ser posteriormente utilizado para determinar regiões específicas de isolados de outros ambientes.

Devido à detecção de genes do plasmídeo pCF10 em ambos os isolados, e pelo facto de a presença deste plasmídeo ainda não ter sido estudada em isolados de diferentes ambientes, torna-se relevante: 1) determinar se o plasmídeo se encontra presente nos isolados, ou se parte do plasmídeo se encontra integrado no seu genoma; 2) determinar a presença deste plasmídeo em isolados de diferentes ambientes. Com presença de um fragmento em ambos os isolados, que apresenta homologia com uma sequência de *S. aureus* que codifica para uma enzima de restrição, torna-se importante determinar se estes isolados apresentam esta enzima, assim como se possuem todo o complexo enzimático do qual esta enzima faz parte. Estes resultados vêm demonstrar a importância de estudos de comparação de genomas de isolados de diferentes origens.

Pela primeira vez, neste estudo, esta técnica foi aplicada na comparação genómica de enterococos, onde até hoje era efectuada por recurso à sequenciação, a Macroarrays e Microarrays. Mesmo tendo que ser ainda sujeita a um processo de optimização para comparação genómica de enterococos, esta técnica mostra-se promissora e embora muito trabalhosa, é uma alternativa para técnicas mais dispendiosas.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. **Aakra, A., O. L. Nyquist, L. Snipen, T. S. Reiersen, and I. F. Nes.** 2007. Survey of genomic diversity among *Enterococcus faecalis* strains by microarray-based comparative genomic hybridization. *Appl Environ Microbiol* **73**:2207-17.
2. **Abele-Horn, M., U. Vogel, I. Klare, C. Konstabel, R. Trabold, R. Kurihara, W. Witte, W. Kreth, P. G. Schlegel, and H. Claus.** 2006. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* **44**:4009-13.
3. **Abriouel, H., N. B. Omar, A. C. Molinos, R. L. Lopez, M. A. Grande, P. Martinez-Viedma, E. Ortega, M. M. Canamero, and A. Galvez.** 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int J Food Microbiol* **123**:38-49.
4. **Agron, P. G., M. Macht, L. Radnedge, E. W. Skowronski, W. Miller, and G. L. Andersen.** 2002. Use of subtractive hybridization for comprehensive surveys of prokaryotic genome differences. *FEMS Microbiol Lett* **211**:175-82.
5. **Akopyants, N. S., A. Fradkov, L. Diatchenko, J. E. Hill, P. D. Siebert, S. A. Lukyanov, E. D. Sverdlov, and D. E. Berg.** 1998. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13108-13.
6. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 2006. Commensals upon us. *Biochem Pharmacol* **71**:893-900.

7. **Alves, P. I., M. P. Martins, T. Semedo, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. Barreto Crespo.** 2004. Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**:237-52.
8. **Arthur, M., F. Depardieu, P. Reynolds, and P. Courvalin.** 1996. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol Microbiol* **21**:33-44.
9. **Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin.** 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* **175**:117-27.
10. **Bae, J. W., S. K. Rhee, Y. D. Nam, and Y. H. Park.** 2005. Generation of subspecies level-specific microbial diagnostic microarrays using genes amplified from subtractive suppression hybridization as microarray probes. *Nucleic Acids Res* **33**:e113.
11. **Barna, J. C., and D. H. Williams.** 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu Rev Microbiol* **38**:339-57.
12. **Bates, J., J. Z. Jordens, and D. T. Griffiths.** 1994. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother* **34**:507-14.
13. **Biavasco, F., G. Foglia, C. Paoletti, G. Zandri, G. Magi, E. Guaglianone, A. Sundsfjord, C. Pruzzo, G. Donelli, and B. Facinelli.** 2007. VANA-TYPE ENTEROCOCCI FROM HUMANS, ANIMALS AND FOOD: species

distribution, population structure, Tn1546-typing and location, and virulence determinants. *Appl Environ Microbiol*.

14. **Bourgogne, A., D. A. Garsin, X. Qin, K. V. Singh, J. Sillanpaa, S. Yerrapragada, Y. Ding, S. Dugan-Rocha, C. Buhay, H. Shen, G. Chen, G. Williams, D. Muzny, A. Maadani, K. A. Fox, J. Gioia, L. Chen, Y. Shang, C. A. Arias, S. R. Nallapareddy, M. Zhao, V. P. Prakash, S. Chowdhury, H. Jiang, R. A. Gibbs, B. E. Murray, S. K. Highlander, and G. M. Weinstock.** 2008. Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biol* **9**:R110.
15. **Boyd, D. A., B. M. Willey, D. Fawcett, N. Gillani, and M. R. Mulvey.** 2008. Molecular characterization of low level vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* N06-0364 harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother*.
16. **Budowle, B., M. D. Johnson, C. M. Fraser, T. J. Leighton, R. S. Murch, and R. Chakraborty.** 2005. Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. *Crit Rev Microbiol* **31**:233-54.
17. **Camargo, I. L., M. S. Gilmore, and A. L. Darini.** 2006. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin Microbiol Infect* **12**:1123-30.
18. **Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall.** 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* **13**:686-707.
19. **Chavers, L. S., S. A. Moser, W. H. Benjamin, S. E. Banks, J. R. Steinhauer, A. M. Smith, C. N. Johnson, E. Funkhouser, L. P. Chavers, A. M. Stamm,**

- and **K. B. Waites**. 2003. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* **53**:159-71.
20. **Clarke, S. C.** 2002. Nucleotide sequence-based typing of bacteria and the impact of automation. *Bioessays* **24**:858-62.
21. **Coque, T. M., R. J. Willems, J. Fortun, J. Top, S. Diz, E. Loza, R. Canton, and F. Baquero.** 2005. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2693-700.
22. **Dai, E., Z. Tong, X. Wang, M. Li, B. Cui, R. Dai, D. Zhou, D. Pei, Y. Song, J. Zhang, B. Li, J. Yang, Z. Chen, Z. Guo, J. Wang, J. Zhai, and R. Yang.** 2005. Identification of different regions among strains of *Yersinia pestis* by suppression subtractive hybridization. *Res Microbiol* **156**:785-9.
23. **de Fatima Silva Lopes, M., T. Ribeiro, M. Abrantes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. Crespo.** 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int J Food Microbiol* **103**:191-8.
24. **Depardieu, F., B. Perichon, and P. Courvalin.** 2004. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **42**:5857-60.
25. **Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* **20**:79-114.
26. **Deplano, A., O. Denis, C. Nonhoff, F. Rost, B. Byl, F. Jacobs, V. Vankerckhoven, H. Goossens, and M. J. Struelens.** 2007. Outbreak of hospital-adapted clonal complex-17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*

- strain in a haematology unit: role of rapid typing for early control. *J Antimicrob Chemother* **60**:849-54.
27. **Devriese, L. A., Collins, M. D., Wirth, R.** 1991. *The Genus Enterococcus*. , New York, USA.
 28. **Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert.** 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6025-30.
 29. **Dunny, G. M., B. L. Brown, and D. B. Clewell.** 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:3479-83.
 30. **Enright, M. C., and B. G. Spratt.** 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**:482-7.
 31. **Facklam, R. R., Carvalho, M. G. S., Teixeira, L. M.** 2002. History, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing Of Enterococci. ASM Press, Washington DC.
 32. **Feil, E. J.** 2004. Small change: keeping pace with microevolution. *Nat Rev Microbiol* **2**:483-95.
 33. **Feil, E. J., and M. C. Enright.** 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* **7**:308-13.
 34. **Foulquie Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, and L. De Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* **106**:1-24.

35. **Franke, A. E., and D. B. Clewell.** 1981. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**:494-502.
36. **Franz, C. M., W. H. Holzapfel, and M. E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol* **47**:1-24.
37. **Franz, C. M., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, and W. H. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* **67**:4385-9.
38. **Garaizar, J., A. Rementeria, and S. Porwollik.** 2006. DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:178-89.
39. **Garsin, D. A., C. D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K. V. Singh, B. E. Murray, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel.** 2001. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10892-7.
40. **Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* **26**:163-71.
41. **Giraffa, G., and F. Sisto.** 1997. Susceptibility to vancomycin of enterococci isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol* **25**:335-8.
42. **Grissa, I., P. Bouchon, C. Pourcel, and G. Vergnaud.** 2007. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*.

43. **Guardabassi, L., and A. Dalsgaard.** 2004. Occurrence, structure, and mobility of Tn1546-like elements in environmental isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Appl Environ Microbiol* **70**:984-90.
44. **Guo, L. H., J. N. Shi, Y. Zhang, X. D. Liu, J. Duan, and S. Wei.** 2006. Identification of genetic differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by suppression subtractive hybridization. *Oral Microbiol Immunol* **21**:372-80.
45. **Hancock, L. E., and M. Perego.** 2004. The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol* **186**:5629-39.
46. **Hepworth, P. J., H. Leatherbarrow, C. A. Hart, and C. Winstanley.** 2007. Use of suppression subtractive hybridisation to extend our knowledge of genome diversity in *Campylobacter jejuni*. *BMC Genomics* **8**:110.
47. **Herrero, I. A., J. F. Fernandez-Garayzabal, M. A. Moreno, and L. Dominguez.** 2004. Dogs should be included in surveillance programs for vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* **42**:1384-5.
48. **Homan, W. L., D. Tribe, S. Poznanski, M. Li, G. Hogg, E. Spalburg, J. D. Van Embden, and R. J. Willems.** 2002. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* **40**:1963-71.
49. **Huang, X., Y. Li, Q. Niu, and K. Zhang.** 2007. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:753-60.
50. **Huycke, M. M., D. F. Sahn, and M. S. Gilmore.** 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* **4**:239-49.

51. **Jensen, L. B.** 1998. Differences in the occurrence of two base pair variants of Tn1546 from vancomycin-resistant enterococci from humans, pigs, and poultry. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2463-4.
52. **Johnsen, P. J., G. S. Simonsen, O. Olsvik, T. Midtvedt, and A. Sundsfjord.** 2002. Stability, persistence, and evolution of plasmid-encoded VanA glycopeptide resistance in enterococci in the absence of antibiotic selection in vitro and in gnotobiotic mice. *Microb Drug Resist* **8**:161-70.
53. **Jones, H., M. Ostrowski, and D. J. Scanlan.** 2006. A suppression subtractive hybridization approach reveals niche-specific genes that may be involved in predator avoidance in marine *Synechococcus* isolates. *Appl Environ Microbiol* **72**:2730-7.
54. **Kak, V., Chow, J. W.** 2002. *Acquired Antibiotic Resistances in Enterococci.* ASM Press, Washington DC.
55. **Kariyawasam, S., J. A. Scaccianoce, and L. K. Nolan.** 2007. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiol* **7**:81.
56. **Kawalec, M., Z. Pietras, E. Danilowicz, A. Jakubczak, M. Gniadkowski, W. Hryniewicz, and R. J. Willems.** 2007. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *J Clin Microbiol* **45**:147-53.
57. **Kim, W. J., R. A. Weinstein, and M. K. Hayden.** 1999. The changing molecular epidemiology and establishment of endemicity of vancomycin resistance in enterococci at one hospital over a 6-year period. *J Infect Dis* **179**:163-71.

58. **Kohler, W.** 2007. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int J Med Microbiol*.
59. **Leavis, H. L., R. J. Willems, W. J. van Wamel, F. H. Schuren, M. P. Caspers, and M. J. Bonten.** 2007. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog* **3**:e7.
60. **Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* **319**:157-61.
61. **Lee, D. G., J. M. Urbach, G. Wu, N. T. Liberati, R. L. Feinbaum, S. Miyata, L. T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Deziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel.** 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* **7**:R90.
62. **Lepage, E., S. Brinster, C. Caron, C. Ducroix-Crepy, L. Rigottier-Gois, G. Dunny, C. Hennequet-Antier, and P. Serror.** 2006. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *J Bacteriol* **188**:6858-68.
63. **Levine, D. P.** 2006. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis* **42 Suppl 1**:S5-12.
64. **Lindstedt, B. A.** 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* **26**:2567-82.
65. **Lopes Mde, F., T. Ribeiro, M. P. Martins, R. Tenreiro, and M. T. Crespo.** 2003. Gentamicin resistance in dairy and clinical enterococcal isolates and in reference strains. *J Antimicrob Chemother* **52**:214-9.

66. **Lyon, W. R., C. M. Gibson, and M. G. Caparon.** 1998. A role for trigger factor and an rgg-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. *Embo J* **17**:6263-75.
67. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3140-5.
68. **Maigre, L., C. Citti, M. Marena, F. Poumarat, and F. Tardy.** 2008. Suppression-Subtractive Hybridization as a strategy to identify taxon-specific sequences within the "*M. mycoides*" cluster: Design and validation of a *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum* specific PCR assay. *J Clin Microbiol.*
69. **Marshall, C. G., G. Broadhead, B. K. Leskiw, and G. D. Wright.** 1997. D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6480-3.
70. **Martins da Costa, P., P. Vaz-Pires, and F. Bernardo.** 2006. Antimicrobial resistance in *Enterococcus spp.* isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Res* **40**:1735-40.
71. **Martins da Costa, P. M., P. M. Vaz-Pires, and F. M. Bernardo.** 2006. Antibiotic resistance of *Enterococcus spp.* isolated from wastewater and sludge of poultry slaughterhouses. *J Environ Sci Health B* **41**:1393-403.

72. **McBride, S. M., V. A. Fischetti, D. J. Leblanc, R. C. Moellering, Jr., and M. S. Gilmore.** 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. PLoS ONE **2**:e582.
73. **Mendez-Alvarez, S., X. Perez-Hernandez, and F. Claverie-Martin.** 2000. Glycopeptide resistance in enterococci. Int Microbiol **3**:71-80.
74. **Moellering, R. C., Jr.** 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis **14**:1173-6.
75. **Moore, D. F., J. A. Guzman, and C. McGee.** 2008. Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. J Appl Microbiol.
76. **Mundy, L. M., D. F. Sahn, and M. Gilmore.** 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev **13**:513-22.
77. **Murray, B. E.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev **3**:46-65.
78. **Murray, N. E.** 2000. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). Microbiol Mol Biol Rev **64**:412-34.
79. **Nallapareddy, S. R., K. V. Singh, R. W. Duh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 2000. Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of ace during human infections. Infect Immun **68**:5210-7.
80. **Nallapareddy, S. R., H. Wenxiang, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 2005. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic

- resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *J Bacteriol* **187**:5709-18.
81. **Novais, C., T. M. Coque, H. Ferreira, J. C. Sousa, and L. Peixe.** 2005. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. *Appl Environ Microbiol* **71**:3364-8.
 82. **Novais, C., T. M. Coque, J. C. Sousa, and L. V. Peixe.** 2006. Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. *Clin Microbiol Infect* **12**:1131-4.
 83. **Novais, C., A. R. Freitas, J. C. Sousa, F. Baquero, T. M. Coque, and L. V. Peixe.** 2008. Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycin-resistant enterococci in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1001-8.
 84. **Novais, C., J. C. Sousa, T. M. Coque, and L. V. Peixe.** 2003. First report of the activity of linezolid against Portuguese enterococci from human, animal and environmental sources. *J Antimicrob Chemother* **51**:1314-5.
 85. **Novais, C., C. Vital, G. Ribeiro, T. M. Coque, and L. V. Peixe.** 2002. First characterization of vancomycin-resistant enterococci from a Portuguese hospital. *J Antimicrob Chemother* **49**:215-7.
 86. **Ogier, J. C., and P. Serror.** 2007. The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol*.
 87. **Olive, D. M., and P. Bean.** 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* **37**:1661-9.
 88. **Park, S. Y., K. M. Kim, J. H. Lee, S. J. Seo, and I. H. Lee.** 2007. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun* **75**:1861-9.

89. **Paulsen, I. T., L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, and C. M. Fraser.** 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**:2071-4.
90. **Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, and J. Waddell.** 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* **53**:28-52.
91. **Poeta, P., D. Costa, G. Igrejas, J. Rodrigues, and C. Torres.** 2007. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol* **125**:368-74.
92. **Poeta, P., D. Costa, J. Rodrigues, and C. Torres.** 2006. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int J Antimicrob Agents* **27**:131-7.
93. **Poeta, P., D. Costa, J. Rodrigues, and C. Torres.** 2005. Study of faecal colonization by *vanA*-containing *Enterococcus* strains in healthy humans, pets, poultry and wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother* **55**:278-80.
94. **Pootoolal, J., J. Neu, and G. D. Wright.** 2002. Glycopeptide antibiotic resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**:381-408.
95. **Rebrikov, D. V., O. V. Britanova, N. G. Gurskaya, K. A. Lukyanov, V. S. Tarabykin, and S. A. Lukyanov.** 2000. Mirror orientation selection (MOS): a

- method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res* **28**:E90.
96. **Ribeiro, T., M. Abrantes, F. Lopes Mde, and M. T. Crespo.** 2007. Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry *vanA* and *vanB* genes. *Int J Food Microbiol* **113**:289-95.
97. **Rice, L. B., L. L. Carias, R. Hutton-Thomas, and S. Rudin.** 2007. Interaction of related Tn916-like transposons: analysis of excision events promoted by Tn916 and Tn5386 integrases. *J Bacteriol* **189**:3909-17.
98. **Ruiz-Garbajosa, P., M. J. Bonten, D. A. Robinson, J. Top, S. R. Nallapareddy, C. Torres, T. M. Coque, R. Canton, F. Baquero, B. E. Murray, R. del Campo, and R. J. Willems.** 2006. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol* **44**:2220-8.
99. **Ruiz-Garbajosa, P., T. M. Coque, R. Canton, R. J. Willems, F. Baquero, and R. Del Campo.** 2007. [High-risk clonal complexes CC2 and CC9 are widely distributed among *Enterococcus faecalis* hospital isolates recovered in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**:513-8.
100. **Serror, P., T. Sasaki, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2002. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *L. delbrueckii subsp. lactis* with various plasmids. *Appl Environ Microbiol* **68**:46-52.
101. **Shankar, N., A. S. Baghdayan, R. Willems, A. M. Hammerum, and L. B. Jensen.** 2006. Presence of pathogenicity island genes in *Enterococcus faecalis* isolates from pigs in Denmark. *J Clin Microbiol* **44**:4200-3.

102. **Shankar, V., A. S. Baghdayan, M. M. Huycke, G. Lindahl, and M. S. Gilmore.** 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* **67**:193-200.
103. **Singh, A., R. V. Goering, S. Simjee, S. L. Foley, and M. J. Zervos.** 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* **19**:512-30.
104. **Sorensen, K. I., and B. Hove-Jensen.** 1996. Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the *rpiB* gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the *rpiR* gene, which is involved in regulation of *rpiB* expression. *J Bacteriol* **178**:1003-11.
105. **Spratt, B. G., W. P. Hanage, B. Li, D. M. Aanensen, and E. J. Feil.** 2004. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett* **241**:129-34.
106. **Staddon, J. H., E. M. Bryan, D. A. Manias, Y. Chen, and G. M. Dunny.** 2006. Genetic characterization of the conjugative DNA processing system of enterococcal plasmid pCF10. *Plasmid* **56**:102-11.
107. **Stobberingh, E., A. van den Bogaard, N. London, C. Driessen, J. Top, and R. Willems.** 1999. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrob Agents Chemother* **43**:2215-21.
108. **Sung, J. M., and J. A. Lindsay.** 2007. *Staphylococcus aureus* that are hyper-susceptible to resistance gene transfer from enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*.

109. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**:2233-9.
110. **Titze-de-Almeida, R., R. J. Willems, J. Top, I. P. Rodrigues, R. F. Ferreira, 2nd, H. Boelens, M. C. Brandileone, R. C. Zanella, M. S. Felipe, and A. van Belkum.** 2004. Multilocus variable-number tandem-repeat polymorphism among Brazilian *Enterococcus faecalis* strains. *J Clin Microbiol* **42**:4879-81.
111. **Top, J., L. M. Schouls, M. J. Bonten, and R. J. Willems.** 2004. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol* **42**:4503-11.
112. **Top, J., R. Willems, and M. Bonten.** 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**:297-308.
113. **Top, J., R. Willems, S. van der Velden, M. Asbroek, and M. Bonten.** 2008. Emergence of Clonal Complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J Clin Microbiol* **46**:214-9.
114. **Trautmann, M., H. Wiedeck, M. Ruhnke, M. Oethinger, and R. Marre.** 1994. Teicoplanin: 10 years of clinical experience. *Infection* **22**:430-6.
115. **Urwin, R., and M. C. Maiden.** 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**:479-87.
116. **van Belkum, A.** 2007. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol* **49**:22-7.

117. **van den Bogaard, A. E., R. Willems, N. London, J. Top, and E. E. Stobberingh.** 2002. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* **49**:497-505.
118. **Van den Braak, N.** 2001. Glycopeptide-Resistant Enterococci in The Netherlands - Surveillance and Genome Analysis.
119. **Wang, X., D. Zhou, L. Qin, E. Dai, J. Zhang, Y. Han, Z. Guo, Y. Song, Z. Du, J. Wang, J. Wang, and R. Yang.** 2006. Genomic comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* by combination of suppression subtractive hybridization and DNA microarray. *Arch Microbiol* **186**:151-9.
120. **Wegener, H. C., F. M. Aarestrup, L. B. Jensen, A. M. Hammerum, and F. Bager.** 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis* **5**:329-35.
121. **Werner, G., I. Klare, and W. Witte.** 2007. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol* **7**:28.
122. **Willems, R. J., J. Top, N. van den Braak, A. van Belkum, D. J. Mevius, G. Hendriks, M. van Santen-Verheuevel, and J. D. van Embden.** 1999. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:483-91.
123. **Winstanley, C.** 2002. Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J Med Microbiol* **51**:459-67.
124. **Witte, W., R. Wirth, and I. Klare.** 1999. Enterococci. *Chemotherapy* **45**:135-45.

125. **X. Bertrand, B. M., J. F. Viel, M. Thouverez, D. Talon.** 2000. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. Food Microbiology **17**:543-551.
126. **Zhang, Y. L., C. T. Ong, and K. Y. Leung.** 2000. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. Microbiology **146 (Pt 4)**:999-1009.

APÊNDICE A: Diagrama eBURST

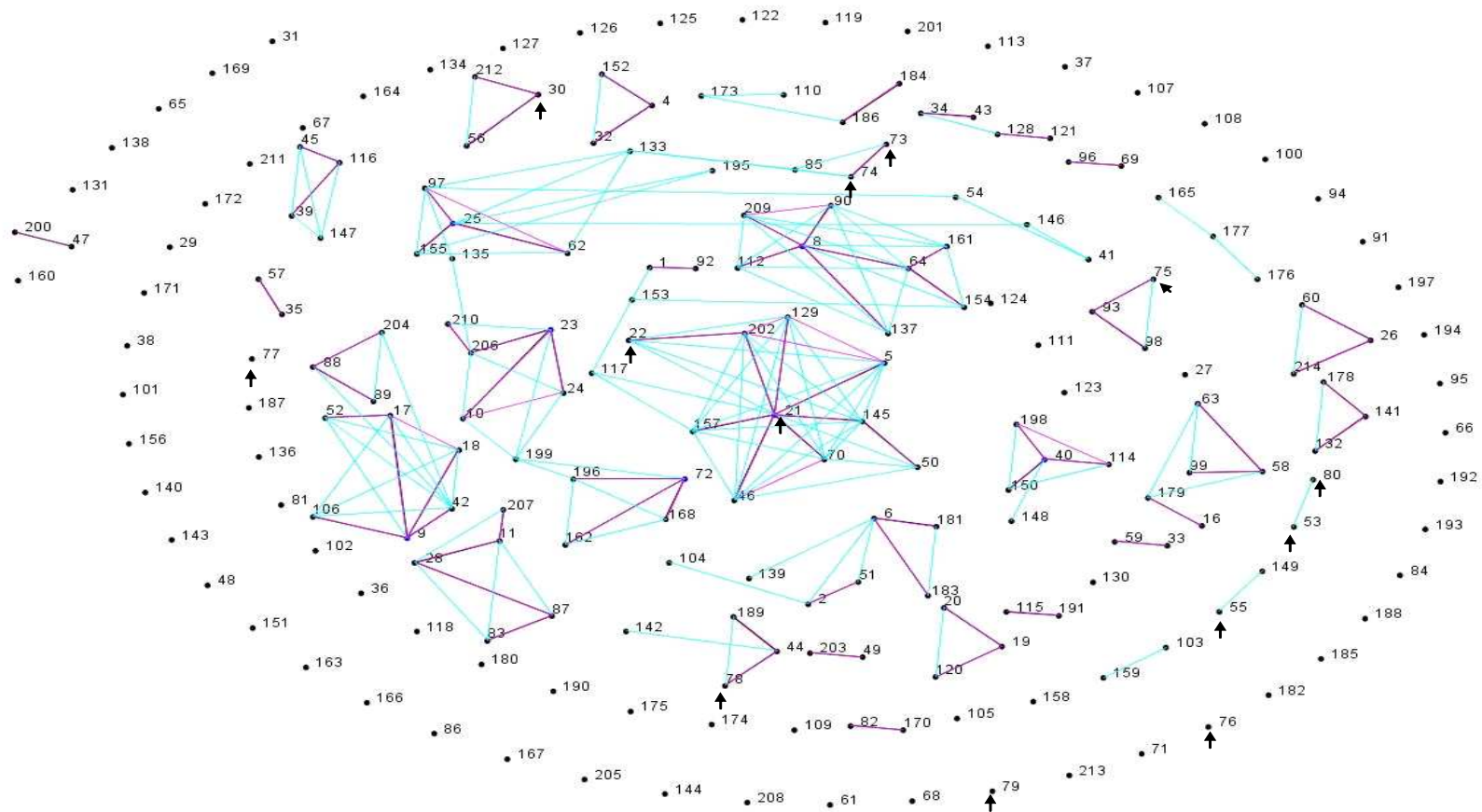


Figura A.1: Diagrama resultante do programa eBURST que apresenta a estrutura clonal de *E. faecalis*; As linhas azuis representam os SLV e as linhas rosa representam os DLV. As setas indicam as ST's encontradas neste estudo. Neste diagrama não foi considerado o numero de isolados pertencentes a cada ST.

APÊNDICE B: Alinhamentos de seqüências

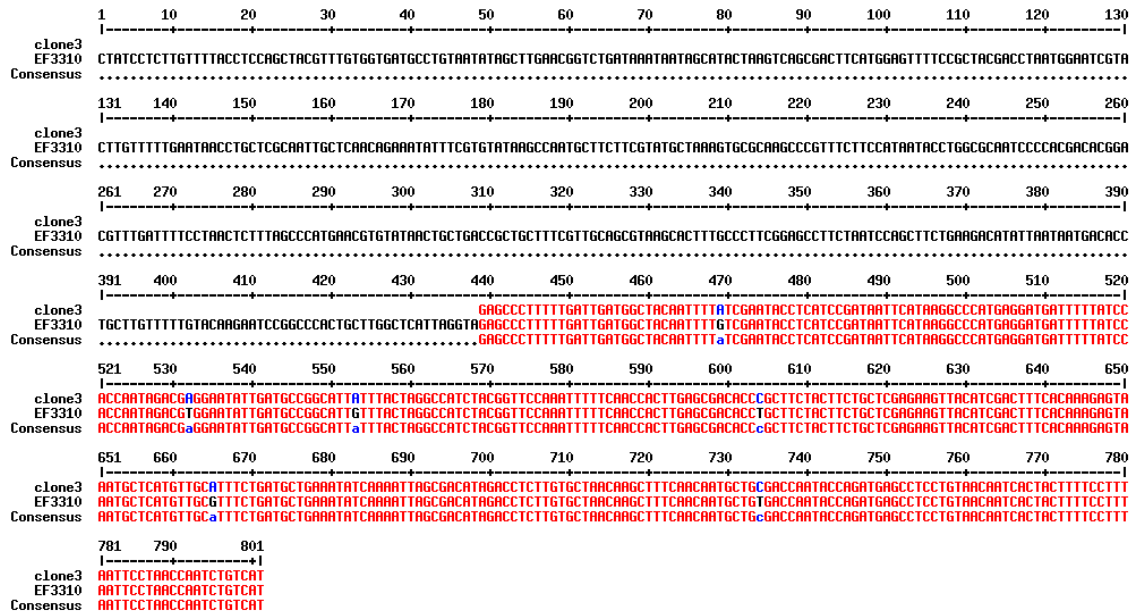


Figura B.1: Alinhamento do fragmento obtido do clone 3 com o EF3310.

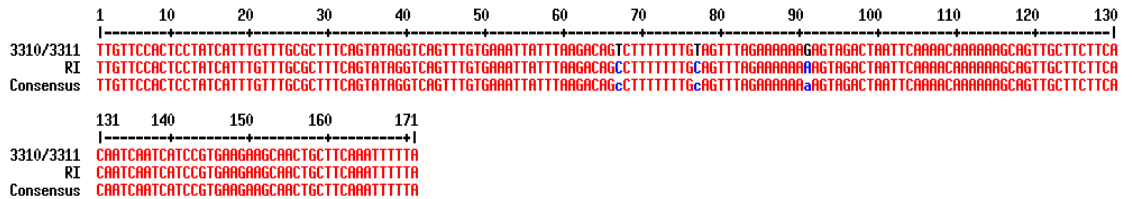


Figura B.2: Alinhamento do fragmento obtido do clone 3 com a região intergênica entre o EF3310 e o EF3311.

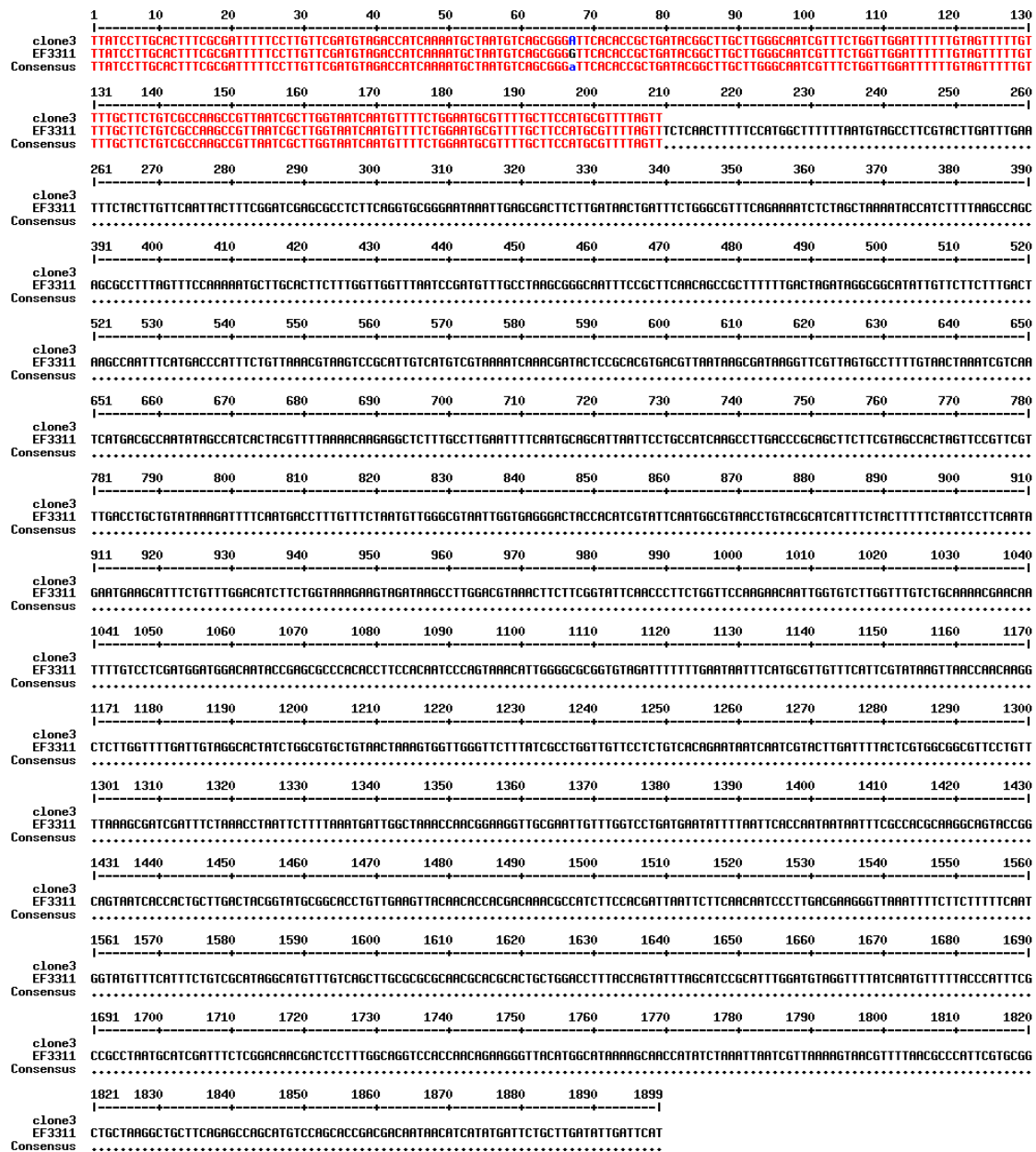


Figura B.3: Alinhamento do fragmento obtido do clone 3 com o EF3311.

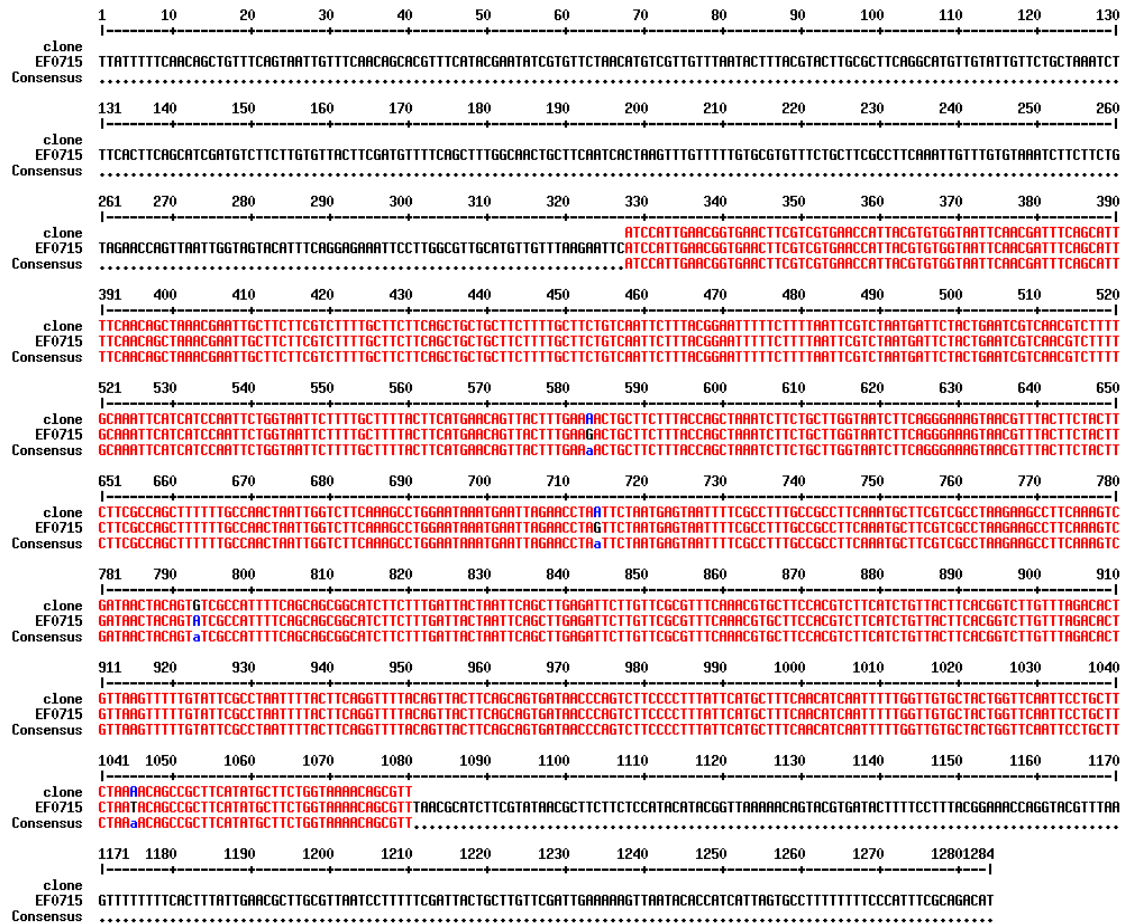


Figura B.4: Alinhamento do fragmento obtido do clone 11 com o EF0715.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
EF2229	ATGAGAAAAAAGCGTATT TAAAGTGTACACATCTCCCTTCATT TGGCTGTT TTTCCCGACTCAAT TATTAGTCTCCTGCTATGGGAAACAGCGTGGTGTATCACCCTGATCTTTTCGTT														
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----														
EF2229	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
Consensus	CAGTAGGTGTCGCTCAAGGTGGACGACCTACTATGTGGATGGGAGGAGAAATATGCCAATGATGGCAGTCGCCAGCCAGTCTGGCGTATT TGAHAAGTGAATCAGACGGAGTTCCAGC														
EF2229	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
Consensus	AGGCACCATGTTCTGCTGARTGGCAAGTACTGGATACCAATGTTGCATCCAAAGAGGAAATGGGACGGCCACAAAGATTGTCATGGATT TATGATACGATGACAAAGGAAACCACTT														
EF2229	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	
Consensus	TTGAAACACACCGCGTCCGATTATACGGTGGTGGACCTACAGCACAGGACTTCCAAAGCTGCATCTCAGGGCCGTCGAGTATGTAACCAAGATATGGGATATTCAGATTAGAGTGA														
EF2229	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	
Consensus	CAATACACCGAGCTAGTATATCTGAGGCTATAGAACACAGGAGTCTCAGAGCGGGGATATAGTACAGGATAGAACAAATCGACCTTCATATGCTCAGCATAGGAAATACATATCT														
EF2229	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	
Consensus	TCATGATGCTCAACAGATATATT TAAATCTAAGTGGAACTGCACACCAAGCAT TAAAGCCGATGGTGGAT TATGTT TTAGAGATGGT TGTAGATGCTGCAATGATACGGCAGCT														
EF2229	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	
Consensus	AATGATCATCAGACACGCTGGATT TATGATATTT TGAATGAATATGATCTCAGCAGTGGGCTTGAGGAATTCAGAACAAAGCTGATTCAGATCTCAGAGGCGCAACTTCTACAAA														
EF2229	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	
Consensus	CGTTTTCTAATATACGATCTGATACATATAGAGATATGCTGGCAGCGGATGCTCTGTCAGAGCCAAAGTGGCGGTCTGTCAGAGCAATGTTGCTCGAATGTCATGCGGATTA														
EF2229	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	
Consensus	TGGTACAAATACCGGGCTTGGCGATGCTGTAGATGACGACTTCCAAATACAGAGTATACGGATCAATATGGATT TACGATGCTGAGCTTATGATGGACATCGACTCAAC														
EF2229	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
Consensus	AATGATTTATCAATATACATCTCAATCAATACCTGGCGCTTTTATGCTATGCTGATCAAAAATTCGGTATTCGGTACATATCTCAGCTATACGGCGGGTGGTACAGAGACAG														
EF2229	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	
Consensus	GTAGACATCCAGCGGAGCTGGTGGTACATATTAAGAACAGGATTTCCATAT TGGTGAATATGATGAGCGGCAATGCCACTATCCCAATATACGATTTATGTTGGCAGCGGAT														
EF2229	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	
Consensus	TTCACATCATTTGGTGAAGAAATAGTCTGACACAGCTGGTACAGTACCAATTTTACATATATTTATACAAAGAGTCCCGCAATTAATCTTATCTAATATCCACAAATGGG														
EF2229	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	
Consensus	ACACACCAATGACCTAATATGCTCATATCCGAAATATTCAAAATATGATTTATGGCCAAAGAAATGCTACAGAAAGAGTGGTGCACCTGTGAATATAGTATAGTGAAGAAC														
EF2229	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820	
Consensus	TTTTGAHAACACAAATAGAAATCAAGATACCTGAAAGTGAAGAGTGGCAGAGAGATTTACGACTGAAACACAAAGATATGTTGGTGGATTACTCTTAAAGACGCTTACG														
EF2229	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950	
Consensus	TCAGCAGCAAAATGTCGATTAAGAAACCTCTCAGCGATTGGTAAAGCTGTCGGAAGTGAACAGTCCGCCAAGACTTCTTGAATATGCTGAATATAGTTTATGATTTGGTGGC														
EF2229	1951	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	
Consensus	CACACGATCCCAATTAHAHAATATCGTATCAATCAAGTGTAGAAATAGTTCGGCAGCGTGTGATCTTATTCAGCAGAGTGAATATACGACAGAGAGTCTGATATGAG														
EF2229	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210	
Consensus	AATGGTTGACAGGGCAAAAGATTTAATGATACATGGGAGCAATCCCTCAAGAAATATATACAGCAGCAGTGGATGAGTTCAGCAGAGTATCGCTTACCATATGATGCTGCAAT														
EF2229	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340	
Consensus	GTTCCGATCCCAATTAHAHAATATCGTATCAATCAAGTGTAGAAATAGTTCGGCAGCGTGTGATCTTATTCAGCAGAGTGAATATACGACAGAGAGTCTGATATGAG														
EF2229	2341	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	
Consensus	AAGCCAGGCTCTTTTGGGGTGCATTTGGTGAAGAAAGACCCGTTAACTAAAGACCTCAACTGCCTATGTTCAAAAGAGTGGTGGTACCGAGTACTCTGCTATACAGCGGGTACC														
EF2229	2471	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	
Consensus	GTCGCATGATTCAGAGACGCTTATATATCTTATGGATAAATATACCGGCATACCGATTAATTAHAHAATGCTAGTCTGCGGGTATATTCGGCGATTAATTCGGCGATTTAGCTGAAATGATAC														
EF2229	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730	
Consensus	AAGATTCAGAGCTAATACTACAGAGTCCCAATTAGAACAAATGATGCTTATGATGCTGCAATGGTGCAGAAATCAAAATGATGACCTTGAHAHAATAGCGGATTCAGATAGTCT														
EF2229	2731	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860	
Consensus	AAGATTCAGAGCTAATACTACAGAGTCCCAATTAGAACAAATGATGCTTATGATGCTGCAATGGTGCAGAAATCAAAATGATGACCTTGAHAHAATAGCGGATTCAGATAGTCT														
EF2229	2861	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	
Consensus	AATACATCTCTATGATATAGTACATATACAGAGCTAATCAAGTGGTGAAGAAATTCAGCCAGTAAATTTCTTATAGCAATACAGACAGCTGCTTGGCTGGTATGATCTGATATG														
EF2229	2991	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120	
Consensus	CTGGGTTGATGCTTTTCAAAAGAGGACCCCAAGAGCTTATCAGACTTTTAAAGCAAAATGACCTTCCCACTGGTCAAGCTAGCAGAGAGATTTAGCTCCAAATTTGTTATCGAA														
EF2229	3121	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250	
Consensus	TGTTTCAGAGTCAACATGATGCTGATGGGTACAGCAGAGCGGGTCAAGCCCTAATACAGCAAAACCAACTTTTATTCGGATGCTCACACAGAGAGTGCCTCAATGGTCAGAA														
EF2229	3251	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380	
Consensus	GTTCCAGCTCTCTTATCAAAAGAGGAAATATCACTGTTAGGACAGCAGCAGGTTCTCAATGCAATATGCCCAATATGCCCAATGATGCAATGATGCAATGATGCAATGATGCA														
EF2229	3381	3390	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510	
Consensus	CGCTGGATCGACTACAGCCCTCCGAGGCGAATGATTTCCCACTGAGATATGCAAAATAGATGATGGTACGAAACAAATGAGGATTTCTTGGGATGAGGATGATGATATATCT														
EF2229	3511	3520	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590	3600	3610	3620	3630	3640	
Consensus	GCCAAGTACCCCGCAGGACTTACAGTCCCTGCTGCAGTAGAGAAAGAAATAGGAAATGCGAATCTGATGACGAAATATCTCAGAGTCCGCAACTCATGGATTCCTGAGAGAAATCAATTT														
EF2229	3641	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710	3720	3730	3740	3750	3760	3770	
Consensus	GCTACAGAACCCCACTAATAATCAGGCGAAATATCAATTCATCTAAGTATGGTCAAGCCCGCACAGAGACGATGCTGGAGTCCGAGTACAGATAGATGGTGGTACACAGATG														
EF2229	3771	3780													
Consensus	CTGGCAATCAAGTATGATGAACCGGCTGATACAGCAGACAGCAGCTGCTGCAAGAAATATCAATCAAGTACAGCAGAGTTTCCGATAGTGCATGCATTTTCATTAAGT														
EF2229	CACAAATAA														
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----														

Figura B.5: Alinhamento do fragmento obtido do clone 19 com o EF2229.

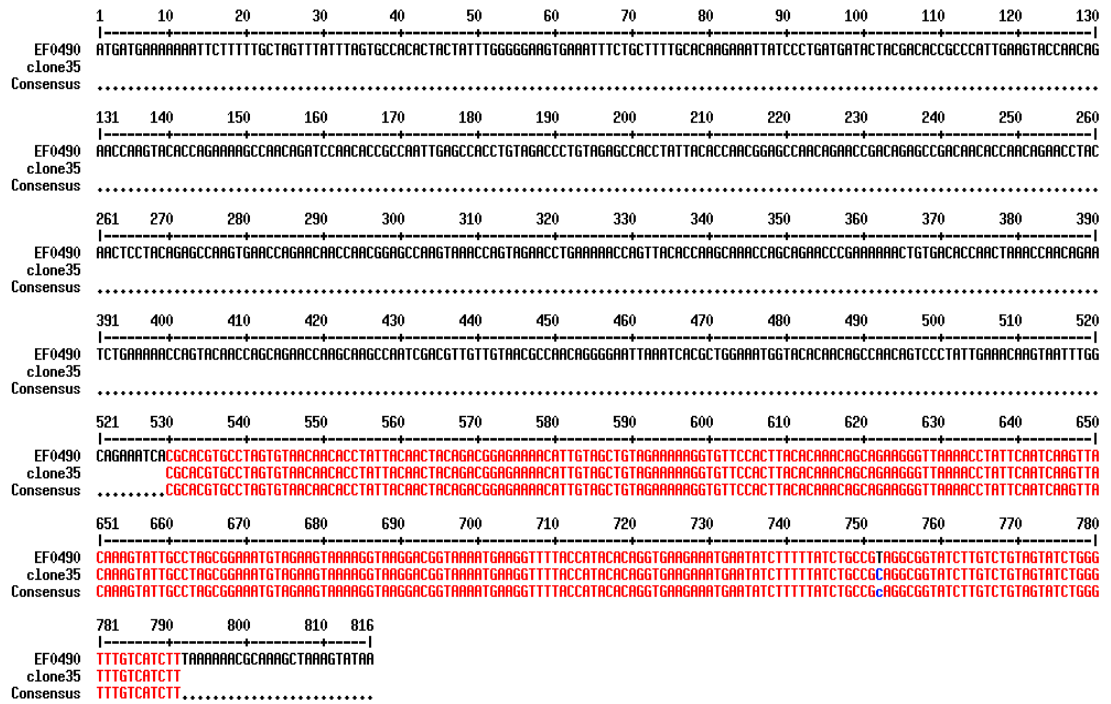


Figura B.6: Alinhamento do fragmento obtido do clone 35 com o EF0490 do genoma da estirpe V583.

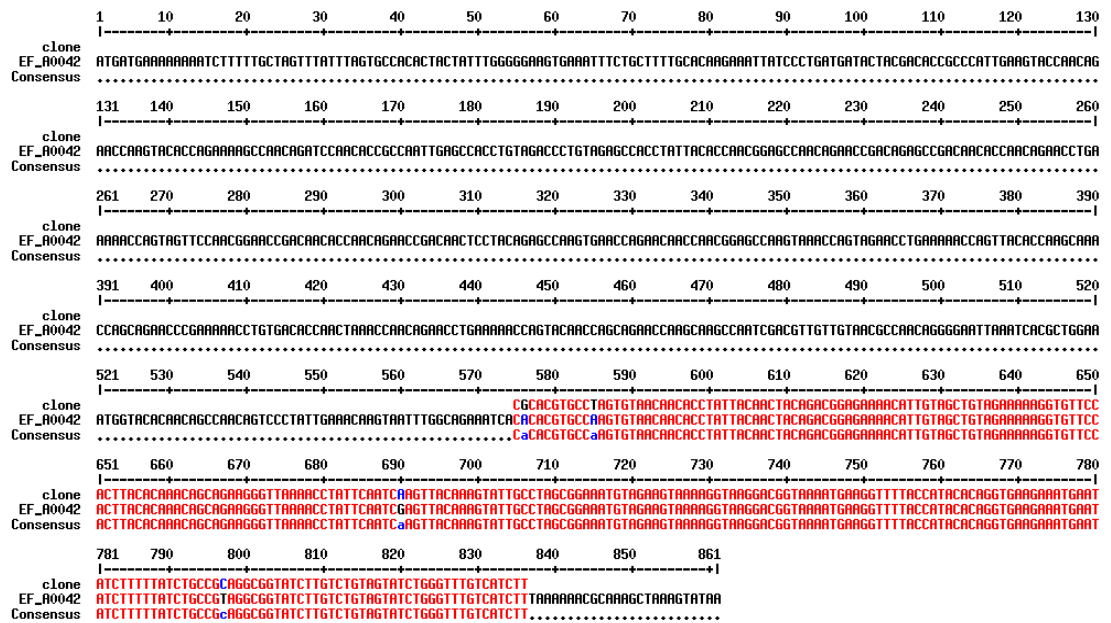


Figura B.7: Alinhamento do fragmento obtido do clone 35 com o EF_A0042 do plasmídeo pTEF1 da estirpe V583.

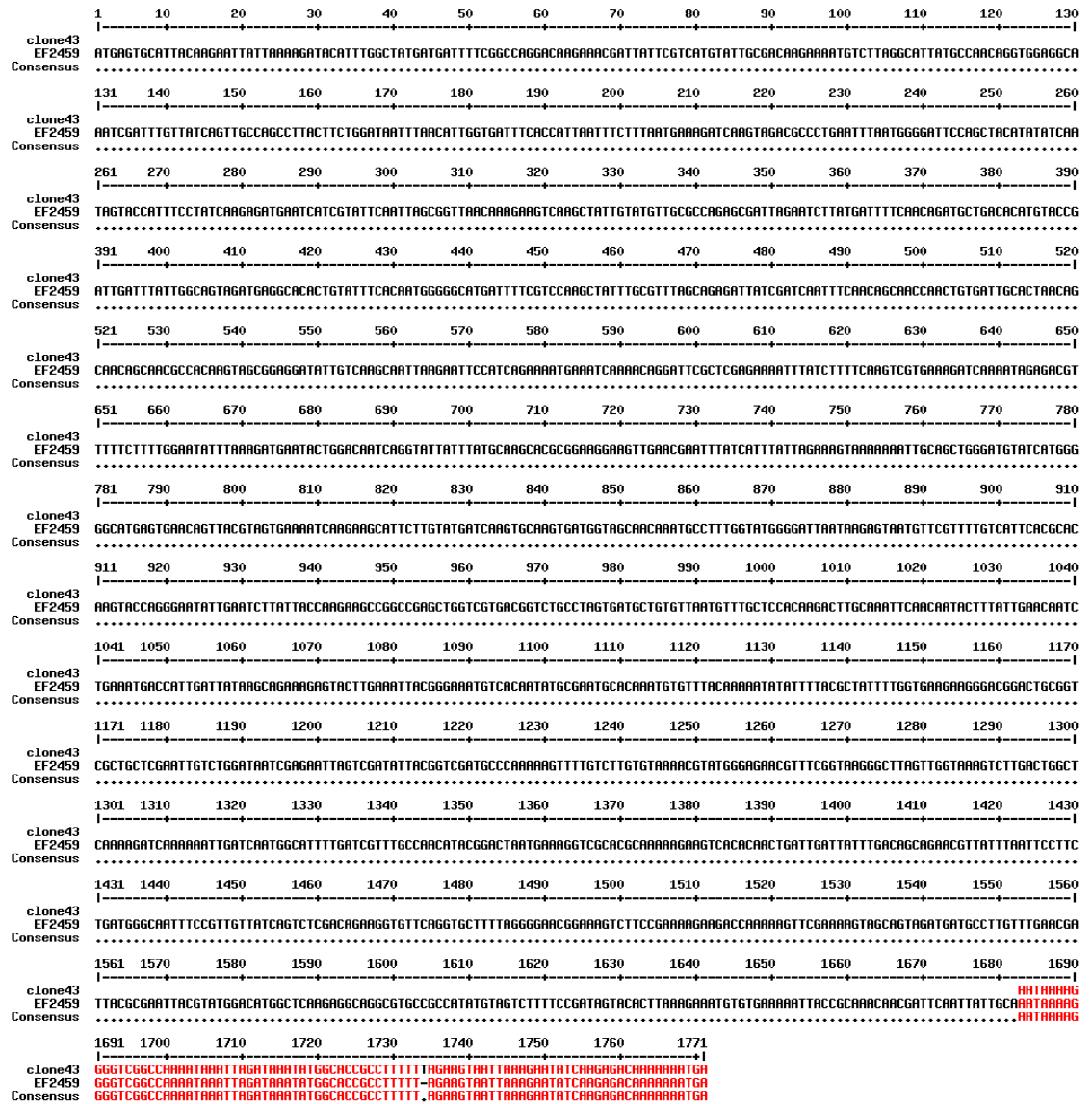


Figura B.8: Alinhamento do fragmento obtido do clone 43 com o EF2459.

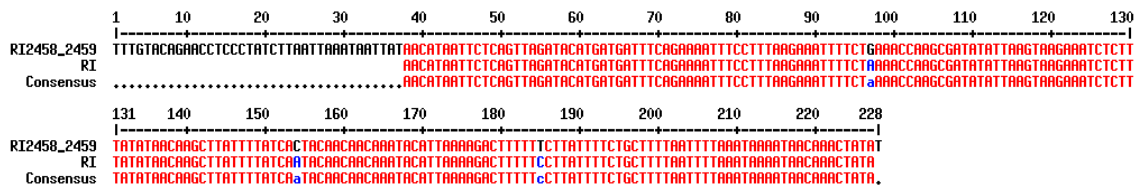


Figura B.9: Alinhamento do fragmento obtido do clone 43 com a região intergênica entre o EF2458 e o EF2459.


```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 ATGGCTTATCARGCCTTTATCGGGTCTGGCGTTCACRACGTTTCGATGACGTAGTAGGACAAARAGCAATTACTCAGACACTGAARAAATGCGATAGTGCARAAAGAAACATCTCATGCCATTTATTTA
Consensus .....
```

```

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 CTGGCCCTCGTGGTACAGGTAAACACAGTGCCTGCAAAATTTTCGCTAAGCGATTAACTGAACATATGTCAGATGGTGAACCTTGTATGTTTGTGAACCTGTGTAGCCATTACGGAGGTCGTTT
Consensus .....
```

```

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 AATGATGTCATTGAATTTGATGCGGCGAGTAAATGCGCTGGAGAAATCCGTGATATTCGTGATTAAGCAAGATGACCCGACACAGCCGAGTACAAAGTTATATATTGATGAGGTCATATG
Consensus .....
```

```

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 CTATCACAGGCGGCTCARTGCACCTTTAAARACCTTGGARAGACCCACAAATGTTATTTTATCTTAGCACGACTGACCCACACAGATTCGTTAACGATATCTCACGGACGACGCTTTG
Consensus .....
```

```

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 ATTTTAGCGAATTAGTACGACAGATATCTGCATCATATGGCCCATATCATCGAGAAATGGCTTCGATTATGAGGACAGCCCTTATGTGATTGGGCGTCTCCGGAGGTGGGATCGGAGATGC
Consensus .....
```

```

651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770    780
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 CTGAGTATCTGGATCAACGATTTCTTTAGTGTGAAARAGTAACTGGAGATGCAATGCAAGTGCAGGCGCCTAACCTATGAAATGATGATCATTATATTCAGTCTGTGTCCCGGTGAT
Consensus .....
```

```

781    790    800    810    820    830    840    850    860    870    880    890    900    910
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 GTTGARCGAGCTTAGAGGCTGGARAGTATTTAGGCGAAGGCAAGAGGCGCCGCTTCCTAGAGATTTGTTATATATTTGTCGAGATTTGCTGATGATCAGCAGCACCAGGTTATTAGCAG
Consensus .....
```

```

911    920    930    940    950    960    970    980    990    1000   1010   1020   1030   1040
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 AARACGAGACTTTGACGAGAGCATTGAGGAGACTGCTACACAAACGCTGCTGAARAAATCTACCACTAATCCAAATTTTAAAGTACACACAAATGAGATCCGCTTTACCAATGCGAAT
Consensus .....
```

```

1041   1050   1060   1070   1080   1090   1100   1110   1120   1130   1140   1150   1160   1170
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 CTATCTGGAGTAGCCACTGTCAATTAAGCTAARACGGTGCACCCATTAACACACACGCGCAGAAACAGCTAATCAGATGGTAGTGCAGAGGGAATCCAGATTAGCAGATTTACAAATCAATC
Consensus .....
```

```

1171   1180   1190   1200   1210   1220   1230   1240   1250   1260   1270   1280   1290   1300
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 GGGCACTGAGAGAGACTGGCTGATTAARAGAACACGGTGTAGCTGCCAAGAGGAGAGTGCGCCACGTCACACAGCAGCCACACAGCCCAAAAGTTTCGTTCCGTACCCAGACGCGGTAT
Consensus .....
```

```

1301   1310   1320   1330   1340   1350   1360   1370   1380   1390   1400   1410   1420   1430
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 ATCAGTCTTAACGAGGACTAGACACATTTAATGAATGTAARAAATGCTGGAGAGCTTACTGCAACATATCTGTGACTCACGAGCGATGCTCAGGCTAGTGAACCTGTCCAGCGAGTCC
Consensus .....
```

```

1431   1440   1450   1460   1470   1480   1490   1500   1510   1520   1530   1540   1550   1560
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 TAGGGCATCGTGGTGGCATTGACTATGAGATGTTTGTGCTGTCACACAGCAGTGAAGAGATGCGTTAGCTTTCATTAATATTTAGCCGTTTGTGATGATATACCCAGAGATGGTCTGCAT
Consensus .....
```

```

1561   1570   1580   1590   1600   1610   1620   1630   1640   1650   1660   1670   1680   1690
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 ACTAGGAAAGCTGGCCAAACTAGACAAAGTTTATTAACCAAAATCAGGCGAGTTTGAATCATCTGACCTGAARATGAATGGCTGCTAGCGGACGACCCGCTGTACCAATGACATTCAC
Consensus .....
```

```

1691   1700   1710   1720   1730   1740   1750   1761
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF2781 c.lone89 AAGAAATCCAGTAGATGAGCAATCGCTATGTTGGTGAAGAGCTTGTGAGTACTAGATGATTA
Consensus .....
```

Figura B.12: Alinhamento do fragmento obtido do clone 89 com o EF2781.

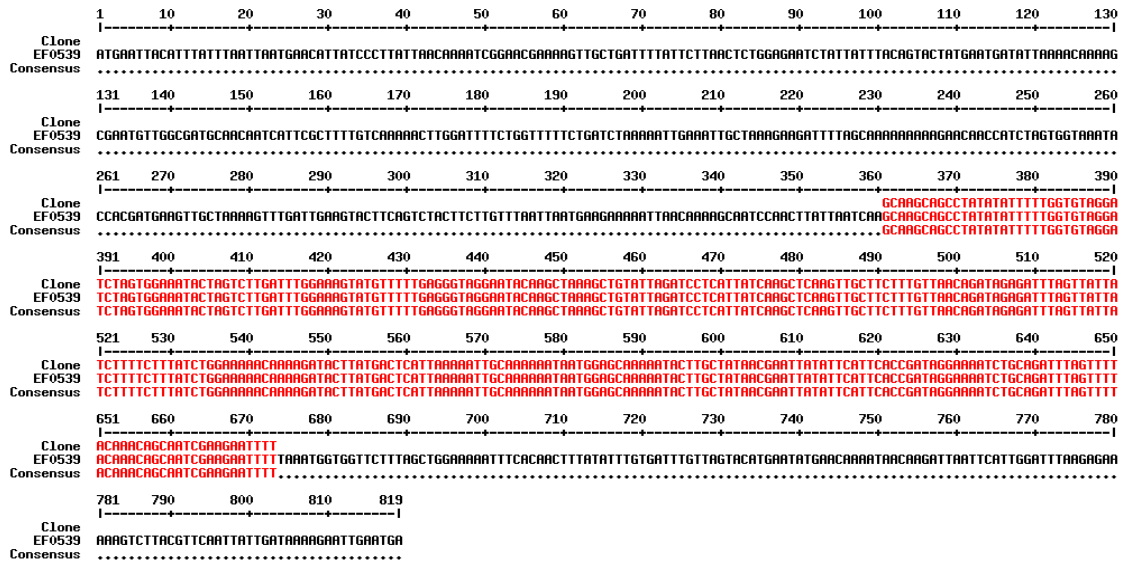


Figura B.13: Alinhamento do fragmento obtido do clone 105 com o EF0539.

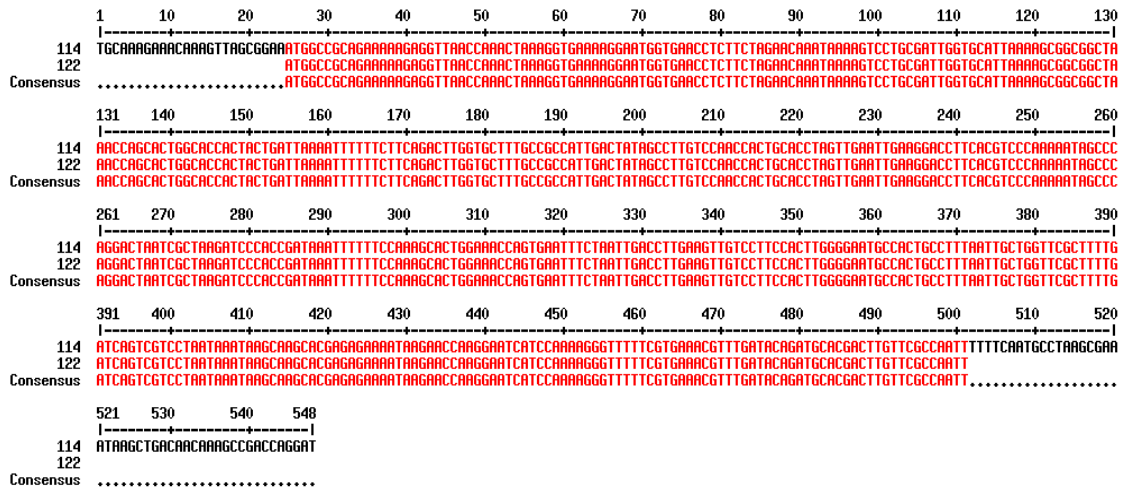


Figura B.14: Alinhamento das seqüências obtidas para os clones 114 e 122.

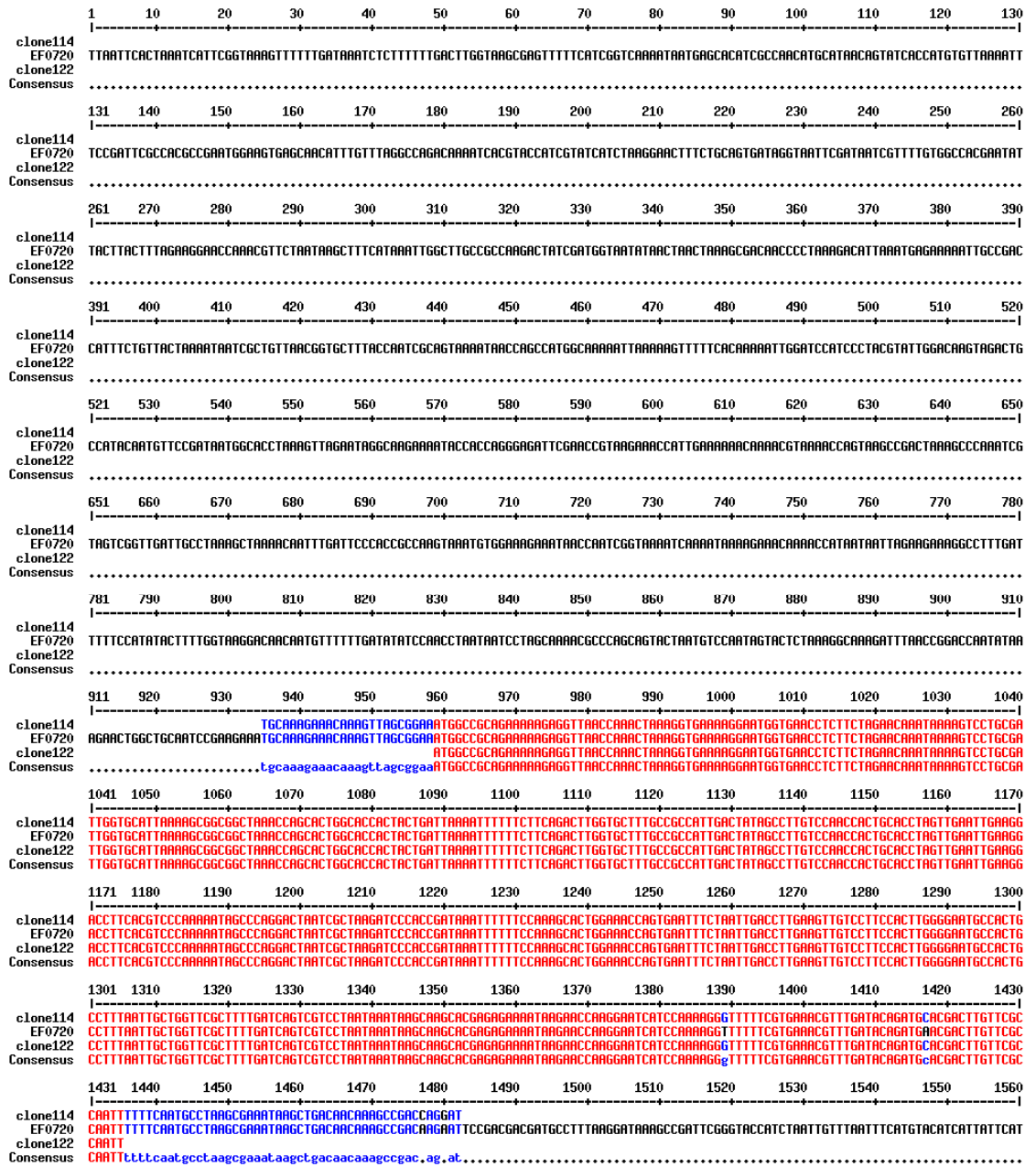


Figura B.15: Alinhamento dos fragmentos obtidos para os clone 114 e 122 com o EF0720.


```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF3146 ATGGGTGAGCTAAGTAACTAAACTTTCCGATTAACAGAAATAGTGGCAGTGTATTAGTTGTAAGATTATTTGATGAACTTATTGCCGTTTAGAAATTTAGATGTAGAGTTGTTAATAAAA
c1one136
Consensus

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF3146 AAATAGTTTATTCTATAAAGAGAACGTGAAAGTAAACAGAAATATAGAGTTTGTGTTTACTAGAGAGATTCTGCACCTAATTGGGATAAATTATATGATATTAATGAAGAGAACCTCTAA
c1one136
Consensus

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF3146 GTCAGAAATGAAAGTAGTATGCTATTGATTTTATAGAGACTTAAAGAAATAAATGAACTTTTCAAATGTTGGGTAGAAAGTACAGAAAGTAAAGATAGCTTCAGGTATTGAATACATT
c1one136
Consensus

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF3146 AAAGCATAAAGACAGATGTGGTCAGATTAGGCGCTGACGGACATTAAGAACATTCCTATGACGACCAATCAGTACGCTTAGATTGGTTAGGGATTGGCTATATCATGATCATCCAGAACTCT
c1one136
Consensus

521     530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF3146 CAATTCCCTGTTCTGTTTAAATCTTGCTCAGGATTAAGAGCGAACACACATACCTCGTTTCTGACGCGCTGTCGGTGTACAAAATTTGGATATATGAAGAACGACAGGGTACTTGGAAATAGA
c1one136
Consensus

651     660     670     680     690     700     710     717
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF3146 AGATAGGCAGGATTTTTTAAAAAATACAGGCAGAAAAAGTAGAAAAAAGAGAAAAAGTAA
c1one136      AAAAAAGTAGAAAAAAGAGAAAAAGTAA
Consensus      AAAAAAGTAGAAAAAAGAGAAAAAGTAA

```

Figura B.16: Alinhamento do fragmento obtido do clone136 com o EF3146.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
RI3145_3146 ACTTGCTTAACTATTCAGGTTTAGGTAATCACGTTCCCATTTCTCACATGATCGTCAAGAAGACAGACGTTGTTGGTGTTTAAACGTAARAGTTGAGCAACATATCCTGCTAACCATTTA
c1one136
Consensus

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
RI3145_3146 CTTGGCAGTTTATTTATAGAAAATTTGTTACTTTCAAATTTTGTATGCTTTTAAAGATGAACCAAGCTTATGTTTAAATGCTTCTATGCAAACTTAAACGAAATCCCCAAATTCGCAACT
c1one136
Consensus

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
RI3145_3146 CTTATCATTTCAGATTGTGATGTTGCTCCAAATTAAGAGTATAGTACTTCTTAAAGTATCGTTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTAA
c1one136
Consensus

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
RI3145_3146 TTATGTAAGTAAATAGTCTATACGGACTTGTAATAGAAATAAATTAATCTTTACAAAATAGTATAGAGAACCCCTTTTTTCATCTACGACATCATAGCTGACGATATAGCAATTACA
c1one136      CTTTTTCATCTACGACATCATAGCTGACGATATAGCAATTACA
Consensus      CTTTTTCATCTACGACATCATAGCTGACGATATAGCAATTACA

521     530     540     550     560     570  72
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
RI3145_3146 AACTAGTAAATGACGTAATCT
c1one136      AACTAGTAAATGACGTAATCTTACTTTTTTCTTTTTTCTTACTTTTT
Consensus      AACTAGTAAATGACGTAATCT

```

Figura B.17: Alinhamento do fragmento obtido do clone 136 com a região intergênica entre o EF3145 e o EF3146.

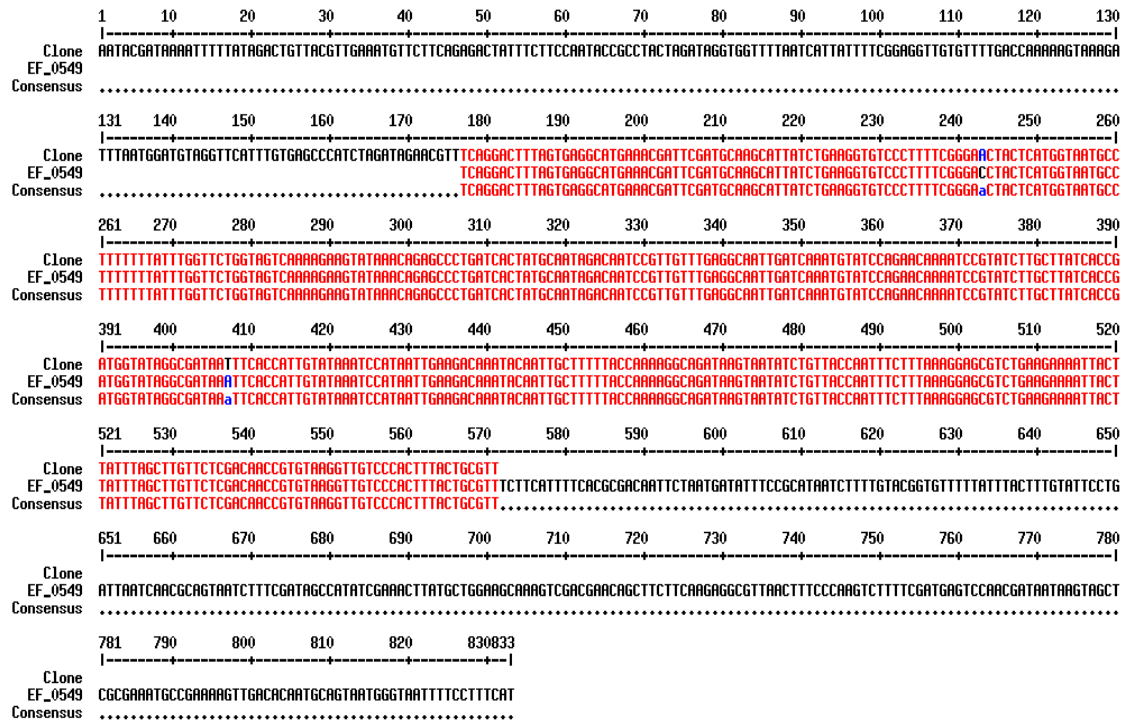


Figura B.18: Alinhamento do fragmento obtido do clone 144 com o EF0549.

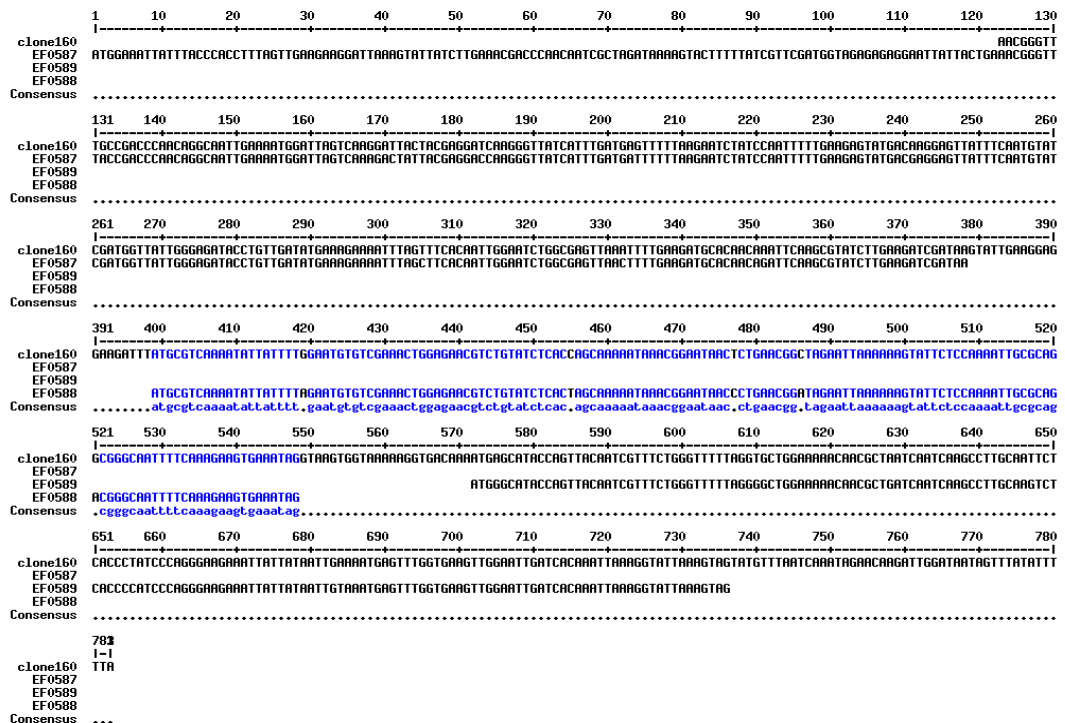


Figura B.19: Alinhamento do fragmento obtido do clone 160 com o EF0587, EF0588 e EF0589.

```

          1      10      2022
          |-----+-----+|
    RI      GTATTGAAGGAGGAAATTT
    EF0587/0588 AGTATTGAAGGAGGAAATTTA
    Consensus .GTATTGAAGGAGGAAaATTT.
  
```

Figura B.20: Alinhamento do fragmento obtido do clone 160 com a região intergênica entre o EF0587 e EF0588.

```

          1      10      20      28
          |-----+-----+-----|
    RI      GTAAGTGGTAAAAAGGTGACAAAATGA
    EF0588/0589 GGC AAGTGGTAAAAAGGAGC AAAAA
    Consensus .GcAAGTGGTAAAAAGGaGACAAAA...
  
```

Figura B.21: Alinhamento do fragmento obtido do clone 160 com a região intergênica entre o EF0588 e EF0589.

```

          1      10      20      30      40      47
          |-----+-----+-----+-----|
    0589/0590 TATA TTTAATCAATAGAACAGATTGGATAATAGTTTATATTTTAA
    RI      TATG TTTAATCAATAGAACAGATTGGATAATAGTTTATATTTTAA
    Consensus TATa TTTAATCAATAGAACAGATTGGATAATAGTTTATATTTTAA
  
```

Figura B.22: Alinhamento do fragmento obtido do clone 160 com a região intergênica entre o EF0589 e EF0590.

```

          1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120      130
          |-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
    EF0546      ATGTGTAaAAGGGTCTGATGAAAAGGAGACATATAGTTATTATCTTTTAAATAGTATCTCTTTTCCCATATTTTA
    c.lone176  AGATGTCAGATCAATGGAAAACAGTTCACTARTTCTTAATAAAATGTGTGAAGGGTCTGATGAAAAGGAGACATATAGTTATTATCTTTTAAATAGTATCTCTTTTCCCATATTTTA
    Consensus  .....ATGTGTAaAAGGGTCTGATGAAAAGGAGACATATAGTTATTATCTTTTAAATAGTATCTCTTTTCCCATATTTTA

          131      140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250      260
          |-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
    EF0546      TTTTTTTCACAAATCCATTTAACTCCAAAGTTTTGACGACCTAATATGCTGTGGTCAGATAGATGGGAAGAGATTGAGCATAAATTTAGATGATCCAAAGAAATTTACAAACATATTA
    c.lone176  TTTTTTTCACAAATAGCCATTTAACTCCAAAGTTTTGACGACCTAATATGCTGTGGTCAGATAGATGGGAAGAGATTGAGCATAAATTTAGATGATCCAAAGAAATTTACAAACATATTA
    Consensus  TTTTTTTCACAAATAgCCATTTAACTCCAAAGTTTTGACGACaCTAATATGCTGTGGTCAGATAGATGGGAAGAGATTGAGCaTATAAATTTAGATGATCCAAAGAAATTTACAAACATATTA

          261      270      280      290      300      310      320      330      340      350      360      370      380      390
          |-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
    EF0546      TCCATCAAAAGGGCAATATATACTATAGAGTTAAAATGGGCACGTTCTGTAAAAAAGATATAGTCCAGATCAATTCGGTGAARAACAGGATGGATTCAGACCAGGGCAACTAGTATCTGT
    c.lone176  TCCATCAAAAGGGCAATATATACTATAGAGTTAAAATGGGCACGTTCTGTAAAAAAGATATAGTCCAGATCAATTCGGTGAARAACAGGATGGATTCAGACCAGGGCAACTAGTATCTGT
    Consensus  TCCATCAAAAGGGCAATATATACTATAGAGTTAAAATGGGCACGTTCTGTAAAAAAGATATAGTCCAGATCAATTCGGTGAARAACAGGATGGATTCAGACCAGGGCAACTAGTATCTGT

          391      400      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500      510      520
          |-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
    EF0546      ATTCCTCACAGATTCATTTAGAAATGTTCAACATATCTAAGGATTATATATTACTAA
    c.lone176  ATTCCTCACAGATTCATTTAGAAATGTTCAACATATCTAAGGATTATATATTACTAA
    Consensus  ATTCCTCACAGATTCATTTAGAAATGTTCAACATATCTAAGGATTATATATTACTAA.....

          521      530      540      550      560      570      580      590      600      610      620      630      640      650
          |-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
    EF0546      TAGTTTAGTTTTATTTGGAGATGTAATACCAATATGAGATGGGATGTCCTTATAAATACATTCATAAATGTTATATTTTAAAGTGAAGATATGATTTACATTTAATTAATGGAGGTTTTATGA
    c.lone176  TAGTTTAGTTTTATTTGGAGATGTAATACCAATATGAGATGGGATGTCCTTATAAATACATTCATAAATGTTATATTTTAAAGTGAAGATATGATTTACATTTAATTAATGGAGGTTTTATGA
    Consensus  TAGTTTAGTTTTATTTGGAGATGTAATACCAATATGAGATGGGATGTCCTTATAAATACATTCATAAATGTTATATTTTAAAGTGAAGATATGATTTACATTTAATTAATGGAGGTTTTATGA

          651      660      670      680      690      700      710      720      730      740      749
          |-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
    EF0546      ATAACCTATTATTTTGTGCTTTGTTTTATGTGGTTAATGATTTTTGGAGTAATTTTATACATGTTGGTCTAGTTAATCACAGATATATACATC
    c.lone176  ATAACCTATTATTTTGTGCTTTGTTTTATGTGGTTAATGATTTTTGGAGTAATTTTATACATGTTGGTCTAGTTAATCACAGATATATACATC
    Consensus  .....
  
```

Figura B.23: Alinhamento do fragmento obtido do clone 176 com o EF0546.

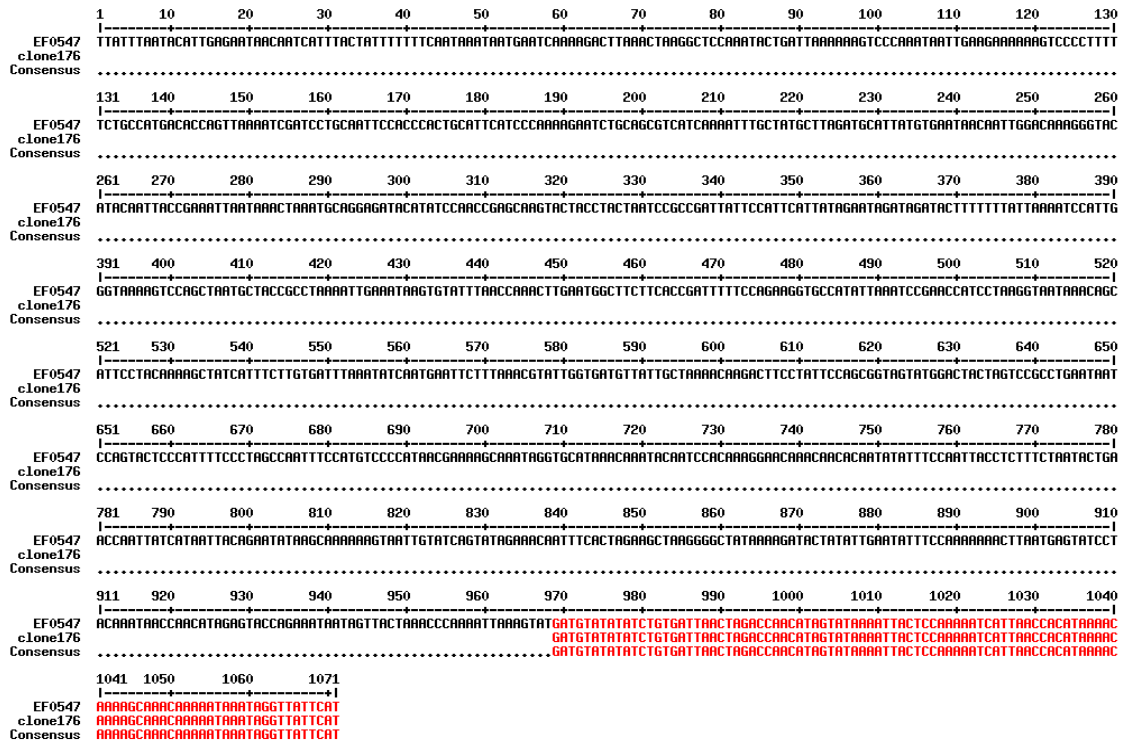


Figura B.24: Alinhamento do fragmento obtido do clone 176 com o EF0547.

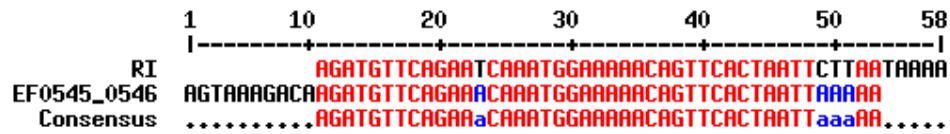


Figura B.25: Alinhamento do fragmento obtido do clone 176 e a região intergênica entre o EF0545 e o EF0546.

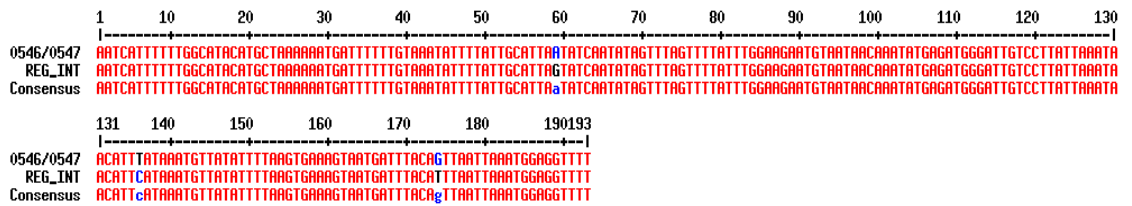


Figura B.26: Alinhamento do fragmento obtido do clone 176 com a região intergênica entre o EF0546 e o EF0547.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_0546      ATGTGTARARAGGGCTGAT--GAAARAGGGAGCATAAATAGTTATTATCTTTTARATAGCTATCTTTTTTCCATATTTATTTTTTTCACATATCCATTAR
c1one169    TTACATCTCACTGACTATCTGGTTTAGGARRAATGGATGAAATAGGGAGCGTAATATTTAGGATTTTATTAGCTCCTTTATACCTTTATTTATTTTTCTCTGGAGAG--GGG
Consensus  .....aTggTaAaaAaaacTGAT..GAAaAAGGGAGCATAATAATTATTgcaTTTTaAacTAgCTCCTTTacaCCAaTaaTTTTATTTTTTTCcacaAgAAg....gaa

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_0546      CTCCARAGTTTTGACGACCTAARATATGCTGTGGTCARAGATAGTGGARAGAGATGAGCGTATRAATTTAGATGAT-TCARARAGATTATCAARACATATATCCATCAARAGGGCARTATATAC
c1one169    AACCA--GGACTACTAARATATGCTGTGTTTCGAAATATGGCAGGAGTAGATCGCTTAAATTTAGATARAATCAGTCAARAATATGTAA--GATATATCCAGCTAAGGGCARTATATAT
aaCCAA.....GaaaacACTAARATATGCTGTGTCaaaATAATGGcAAAGAAaTAgAgCGcaTARATTTAGATaAa..TCRaaaaaAaaTATcaaaA..aTATTATCCAgCAAAAGGcARTATATAC

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_0546      TATGAGGTTAARATGGGACCTGCTGTAARARAGATATAGTCCAGATCAATTCGCGTGAARACAGGATGGATATCAGACCGGGCAGACTAGTATCTGTATTCCTCAGATTCATTTAGAA
c1one169    TATTGAGATTARAGATGAAAGATCCAGATAGARAGATATAGTCCGTATCAGATTCAGTTAGAACCTGGATGGATATCAATCCCTGGTCAGACTAGTATTTGCTACCCCAATATAGTATTAGT
TATaGhaaTTAAAaATGaaAcaTcCGaGaaAaAaAGATATATAGTCCAGATCAaATTGCaGTgAaAACaGGATGGATATCAaACCAGGcAaACTAGTATCTGcaTACCcChAaATTaaTATaaaa

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_0546      ATGTTCACCAATATCTTAGGATTATATATTTACTAA
c1one169    ATTGAGAAAAGGGAGTCCTGATTATATATTTACTAATAAATCTGACTTATTTAGAGAAGTGGTACTATTTTATGATTGTARAGATTACAGTATGTCTTCTTCTGGTAARACGGTGTAAAA
Consensus  ATTGagAAaAAGaaacTaaGATTATATATTTACTAA.....

521     530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_0546      ATCTATATTTACCAGTGTATATATTTACCAARAGGCGCAGTGAATATCTGCAAAAACCCGTTGGGGCTCTAATGAGTTTTGTCTTTACATATAGTAAAGGGCAGAAAAGGGAA
c1one169
Consensus  .....

651     660     670     679
|-----|-----|-----|
EF_0546      AAATTCGCATATTAAGACCATCTTTTT
c1one169
Consensus  .....

```

Figura B.27: Alinhamento do fragmento obtido do clone 169 com o EF0546.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_1392      TCACCTATCACTTTCCCTTGATTTAATGAAAGACGAAATGAATGACCACTACGCCACCATTTTCTCTAATAAACCAATGTTTGTATTTGTCATCTCCGATCAATTGCTTTACACATGTCATAAAT
c1one191
Consensus  .....

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_1392      GTTARAGGTGCTGCACACCTGTTAGCGCTTCATTTCAACGCCAGTTGARCCACTGTTTGTARAGCACGTACTCTAARACAGTTTATTGGCCARTCAACTGAATTTACACTTTGTCA
c1one191
Consensus  .....

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_1392      AAGCAACCAATGACACARAGGATCCATTCARACGTTCTTTGCGCGGTAATCCAGCTACTCTGCTACCTGTARTACTTCACCTTTTTTAAATCATTGGGCTGGATCGCTTCTGCTGCGCTTC
c1one191    GCARCCAAATGACACARAGGATCCATTCARACGTTCTTTGACGCGGTAATCCAGCGACTCTGCTACCTGTARTACTTCACCTTTTTTAAATCATTGGGCTGGATCGCTTCTGCTGCGCTTC
Consensus  ..GCARCCAAATGACACARAGGATCCATTCARACGTTCTTTGacGCGGTAATCCAGCGACTCTGCTACCTGTARTACTTCACCTTTTTTAAATCATTGGGCTGGATCGCTTCTGCTGCGCTTC

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
EF_1392      CAACATGTGAATTTCCATAGCAGGGGCTGTTCTTCAGTGTATTTTTTCCGAATATCAACCATGTGCCTTCTCCTGTGTATTCARAGTGCCTAATTCCTTACCTTTGAACCAT
c1one191    CAACATGTGAATTTCCATAGCAGGGGCTGTTCTTCAGTGTATTTTTTCCGAATATCAACCATATGCCTTCTCCTGTGTATTCARAGTGCCTAATTCCTTACCTTTGAACCAT
Consensus  CAACATGTGAATTTCCATAGCAGGGGCTGTTCTTCAGTGTaATTTTTTCCGAATATCAACCATaTGCACTTCTCCTGTGTATTCARAGTGCCTAATTCCTTACCTTTGAACCAT

```

Figura B.28: Alinhamento do fragmento obtido do clone 191 com o EF1392.

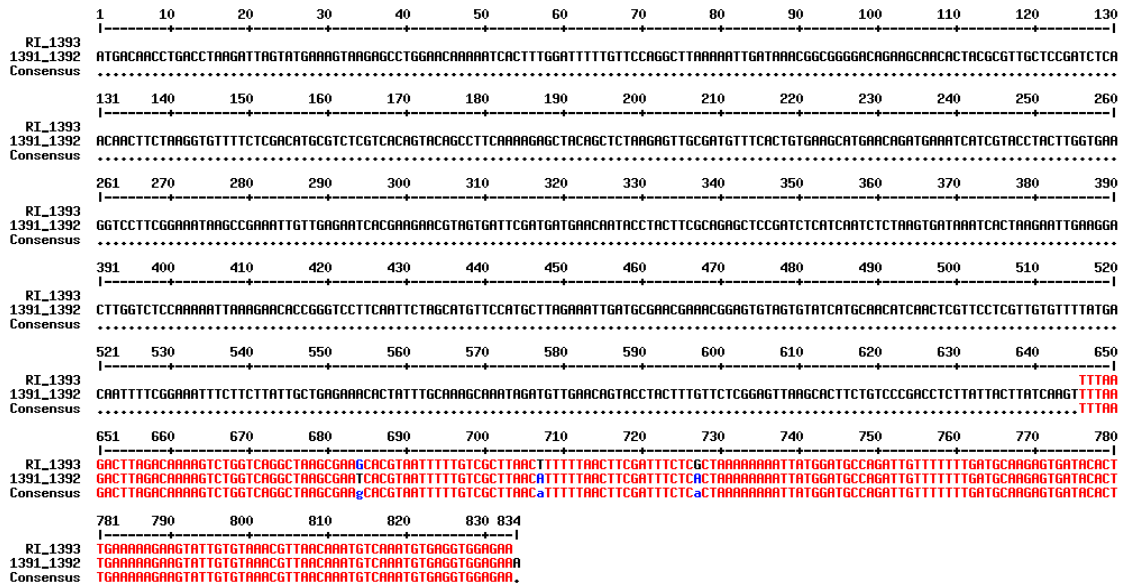


Figura B.29: Alinhamento do fragmento obtido do clone 191 com a região intergênica entre o EF1391 e o EF1392.

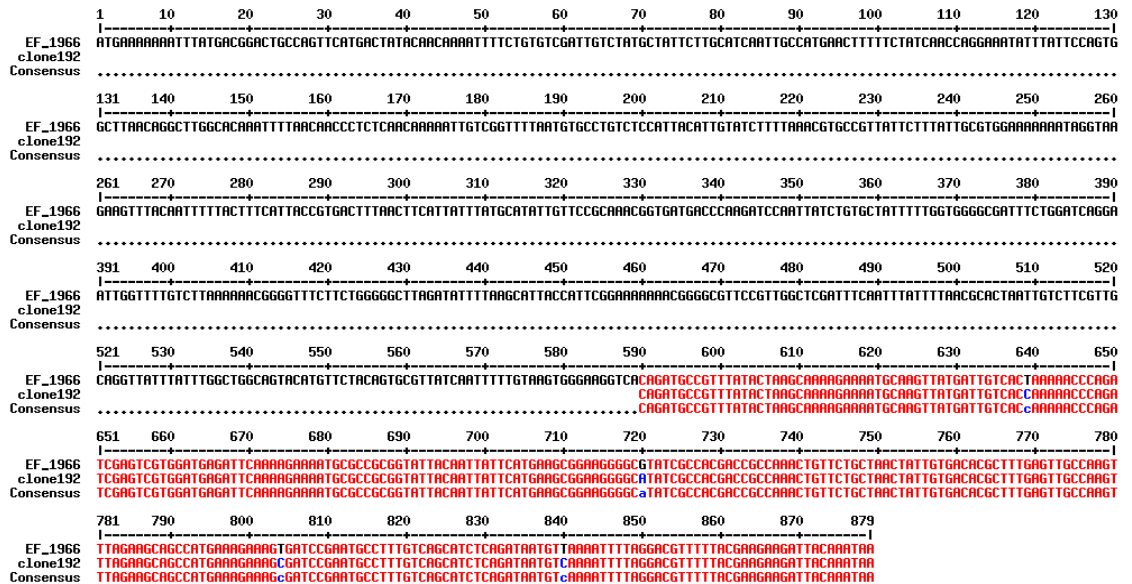


Figura B.30: Alinhamento do fragmento obtido do clone 192 com o EF1966.

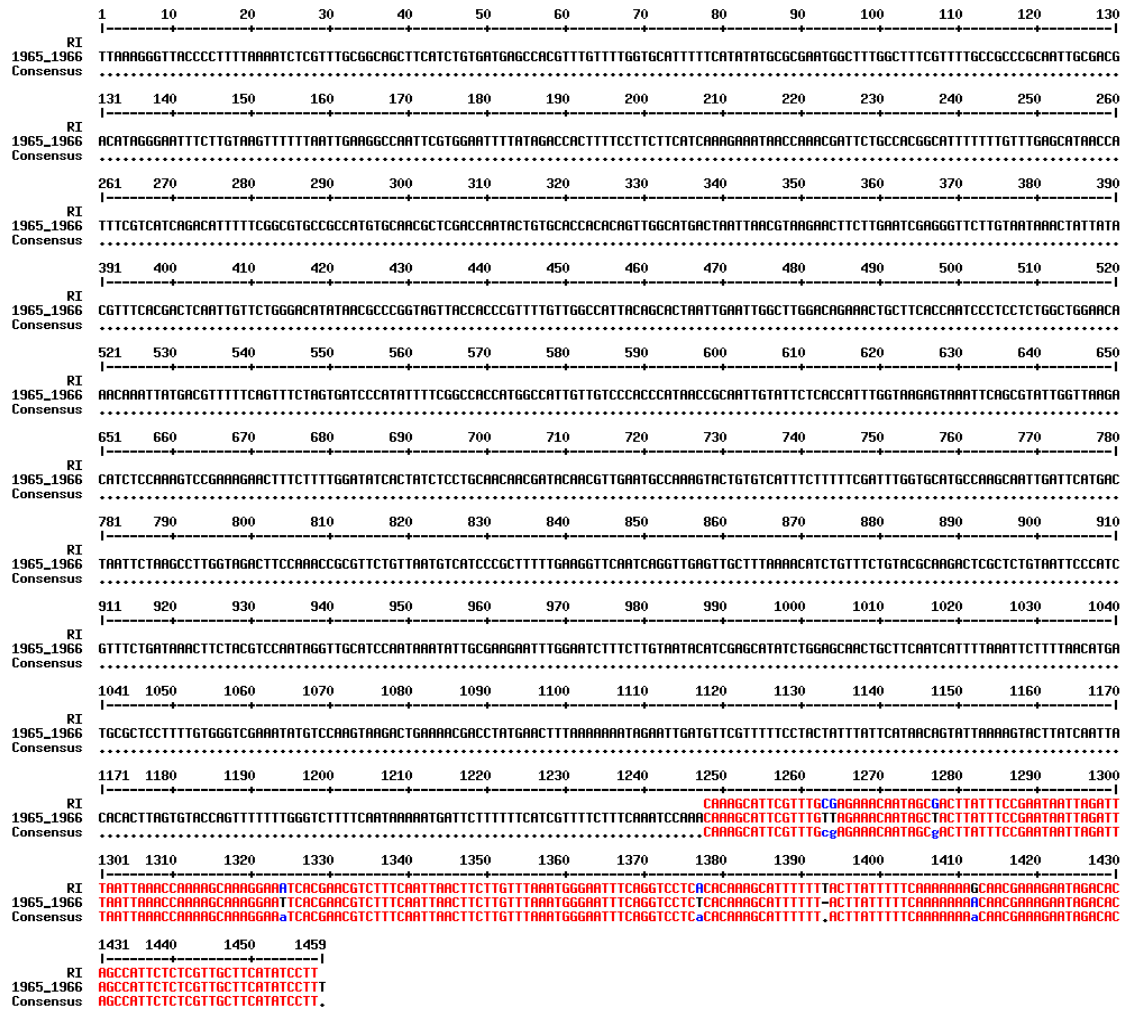


Figura B.31: Alinhamento do fragmento obtido do clone 192 com a região intergênica entre o EF1965 e o EF1966.



Figura B.32: Alinhamento das seqüências obtidas para os clones 73 e 152.

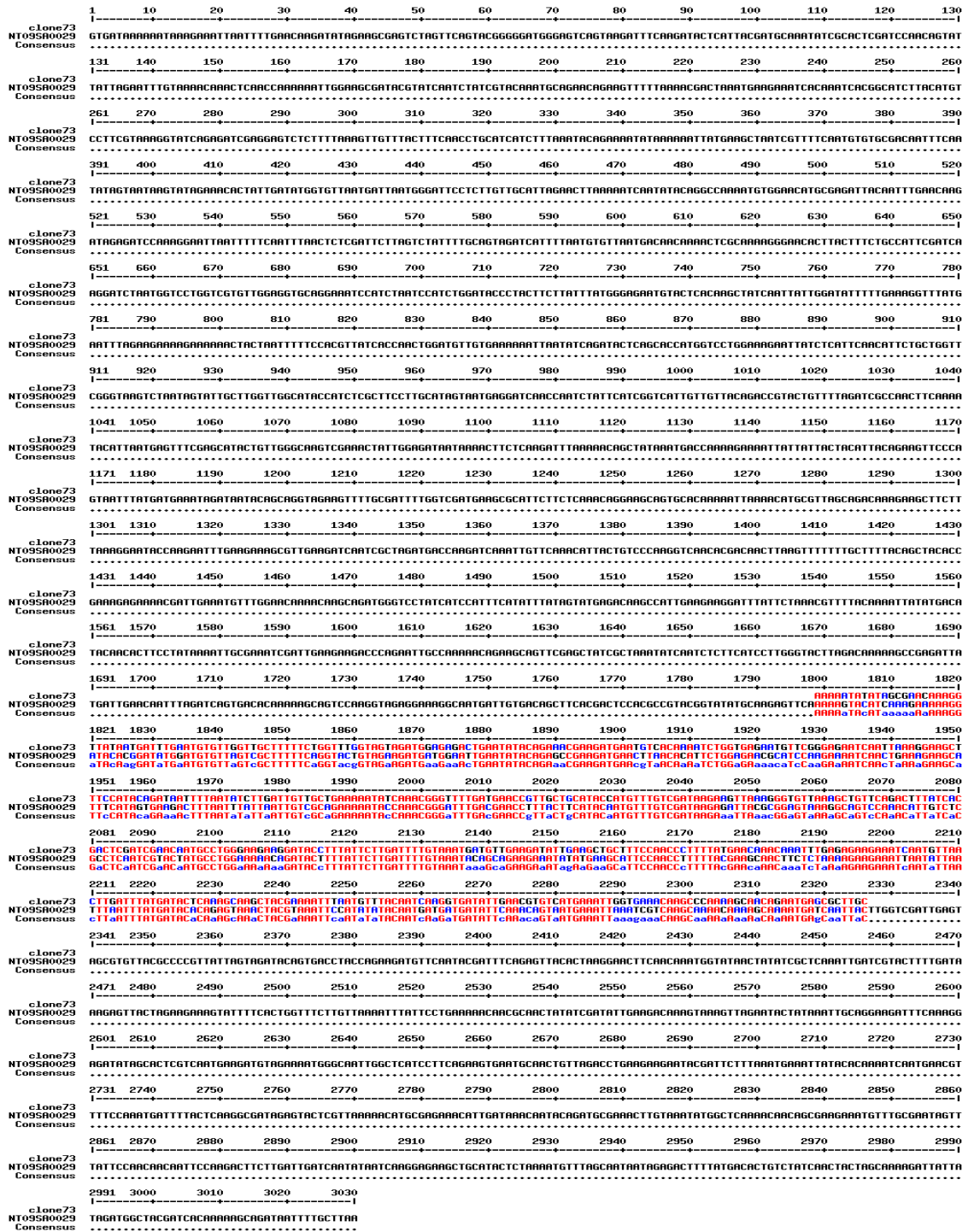


Figura B.33: Alinhamento dos fragmentos obtidos dos clones 73 e 152 com o SAS0025.

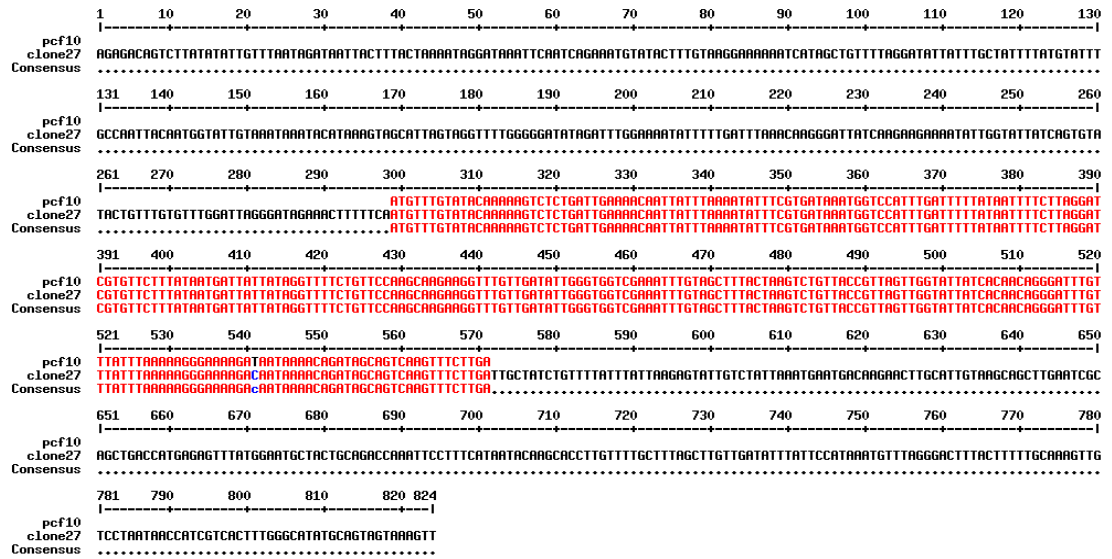


Figura B.34: Alinhamento do fragmento obtido do clone 27 com o gene *pcfW*.

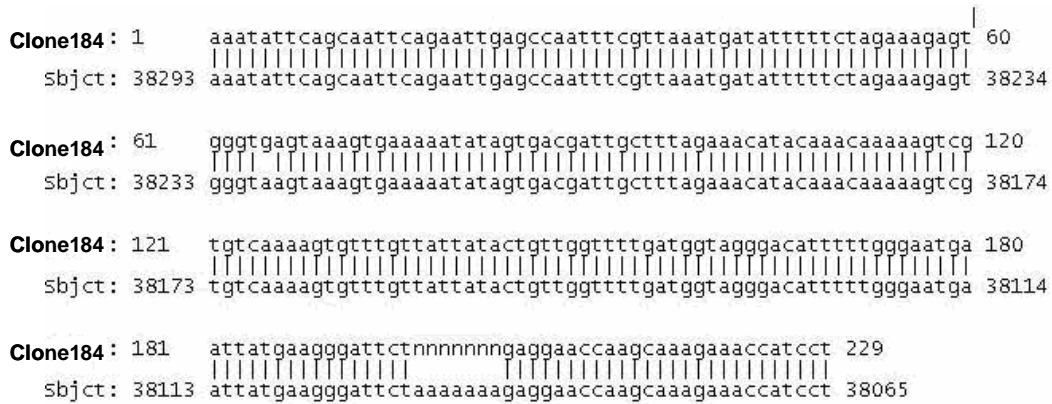


Figura B.35: Alinhamento do fragmento obtido do clone 184 uma sequência do genoma da estirpe *E. faecalis* OG1.

APÊNDICE C: Comunicação oral

Este trabalho foi apresentado, na forma de comunicação oral, no “20th International ICFMH symposium - FoodMicro 2006 – Food safety and food biotechnology: diversity and global impact” em Bolonha, Itália.

Ruivo, M.; Ribeiro, T., Abrantes, M., Lopes, MFS; Evidence of cross-transmission of *vanA*-carrying *E. faecalis* between dairy food products and Humans.



EVIDENCE FOR CROSS-TRANSMISSION OF *vanA*- CARRYING *E. faecalis* BETWEEN DAIRY FOOD PRODUCTS AND HUMANS

Marta Ruivo

Tânia Ribeiro

Marta Abrantes

M^a Fatima Lopes

31st of August 2006

Italy, Bologna

Enterococcus

- Genus recognised since 1984.
- Currently there are 37 species of *Enterococcus*.
- Most common species: *E. faecalis* and *E. faecium*

- Enterococci are widespread in nature, being able to persist and grow in harsh environments.
- Are part of the normal flora of the gastrointestinal tract, the urinary tract and the oral cavity of humans and animals.

- Enterococci also play a important role in the ripening of raw milk cheeses, contributing to their typical taste and flavour.

- Can also be found in fermented meat products.

Enterococcus

Enterococci have been recognised as pathogens for a long time, being one of the most important nosocomial pathogens.

Enterococci:

- Are the third leading cause of bloodstream infections;
- Are the fourth leading cause of urinary tract Infections;
- Cause 10-15% of infectious endocardites;
- Are related to many tissue and wound infections.

Enterococcus

VRE – Vancomycin Resistant Enterococci

There are 6 different resistance phenotypes: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG



High level resistance (64-1000 mg/L)



Background study

In a previous study:

1. It was observed that none of our strains were resistant to vancomycin.
2. Most of the strains carried the *vanA* gene.
3. The majority of strains were *E. faecalis*.

Ribeiro *et al*, "Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry *vanA* and *vanB* genes", *Int. J. Food Microbiol. In press*

Molecular Typing

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis

- Considered the "Gold Standard"
- Allows clear separation of large DNA fragments ranging from 10 to 800 kb
- Data can be analysed using a commercial available software.
- In this study total DNA was digested with restriction enzyme *SmaI*.
- The data was analyzed using Bionumerics (Applied Maths)

Interpretation of results:

1. Same Pattern – same strain
2. Less than 6 bands difference – strains are related
3. More than 6 bands of difference – strains unrelated

Molecular Typing

MLST – Multi Locus Sequence Typing

Based on the identification of alleles from DNA sequences of internal fragments of 7 housekeeping genes:

gdh – glucose-6-phosphate dehydrogenase

gyd – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

pstS – phosphate ATP binding cassette transposer

gki – putative glucokinase

aroE – shikimate 5-dehydrogenase

xpt – xanthine phosphoribosyltransferase

yiqL – acetyl-coenzyme A acetyltransferase

The different sequences are assigned as alleles. The alleles of the seven genes result in an allelic profile which defines the Sequence Type (ST) of the strain.

Molecular Typing

The screenshot shows the MLST website interface. On the left is a navigation menu with sections: DATA ANALYSIS, DATABASES (listing various bacterial species like *B. cereus*, *E. coli*, etc.), SUBMISSIONS, NEWS, and LINKS. The main content area features a central image of purple-stained bacteria. Below the image are three buttons: 'Profile Query', 'Locus Query', and 'Batch Query', each with a 'Please choose...' dropdown menu. At the bottom of the main area, there is a small text block: 'This MLST scheme was developed and is managed by Prof. Willison, University of Wales at Cardiff, U.K.' and 'This site is hosted at Imperial College and development is funded by the Wellcome Trust.'

Strains in study

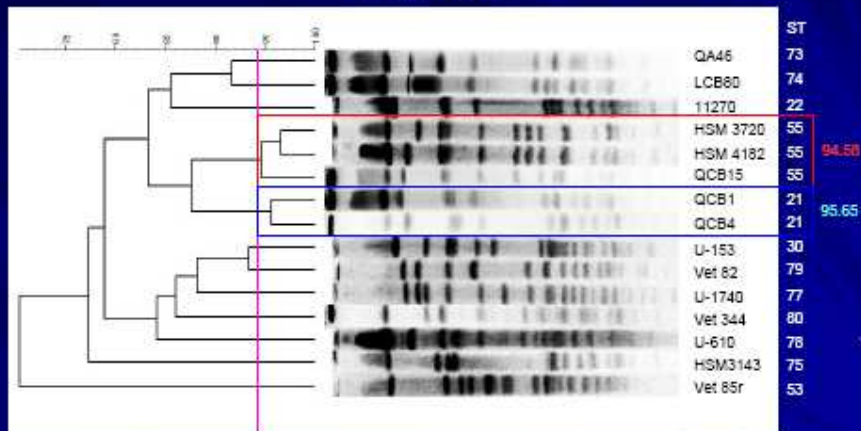
Total of 15 *Enterococcus faecalis* isolates

- 5 from dairy products (milk and cheese)*
- 7 from human infections (Several Portuguese hospitals)
- 3 from veterinary infections

*Isolates from 3 different RDO (Registered Designation of Origin)

Strain	Origin	Resistance Phenotypes	Resistance Genotypes
QA46	Cheese	CN, K, DA, MY, E, Sp, CT, PB, RD, Met, CRO, Ba	vanA, ermB
LCB80	Milk	CN, K, Net, Tet, Oxt, DA, MY, E, Sp, CT, PB, Clp, Nor, SxT, RD, Met, CRO, Ba	vanA, gelE, aph(2)-Ic
QCB1	Cheese	CN, K, Net, Tet, Oxt, Clor, DA, MY, Sp, CT, PB, Clp, Ofl, Enr, SxT, RD, Aml, Amp, P, Met, PRL, Imp, CFP, CRO, Ba	vanA
QCB4	Cheese	CN, K, Net, Tet, DA, MY, Sp, CT, PB, Met, CFP, CRO, Ba	vanA
QCB15	Cheese	CN, K, Net, Tet, Oxt, Clor, DA, MY, E, Sp, CT, PB, RD, Met, Ba	vanA
HSM3143a	Human	CN, K, DA, MY, CT, PB, RD, Met, CFP, CRO, Ba	vanA
HSM3720	Human	CN, K, Tet, Oxt, Clor, DA, MY, E, Sp, CT, PB, Clp, RD, P, Met, CRO, Ba	vanA
HSM4182	Human	CN, K, Tet, Oxt, Clor, DA, MY, E, Sp, CT, PB, RD, Met, CFP, CRO, Ba	vanA, ermB, gelE
11270	Human	CN, K, DA, MY, CT, PB, Ofl, Met, CFP, CRO, Ba	vanA
U1740	Human	CN, K, Tet, Oxt, Clor, DA, MY, E, Sp, CT, PB, Met, CRO, Ba	vanA, ermB
U610	Human	CN, Tet, Oxt, DA, MY, CT, PB, RD, Met, Ba	vanA
U153	Human	CN, K, DA, MY, CT, PB, Met, CFP, CRO, Ba	vanA
V82	Dog	CN, K, Net, Tet, Oxt, DA, MY, E, Sp, CT, PB, RD, Aml, Amp, P, Met, PRL, Imp, CFP, CRO, Nf, Ba	vanA, vanB, gelE, aac(8)aph(2)
85R	Dog	CN, K, Net, Tet, Oxt, DA, MY, E, Sp, CT, PB, Clp, Nor, Ofl, Enr, SxT, RD, Aml, Amp, P, Met, PRL, Imp, CFP, CRO, Nf, Ba	vanA
344	Dog	CN, K, Net, Tet, Oxt, DA, MY, E, Sp, CT, PB, Clp, Nor, Ofl, Enr, RD, Aml, Amp, P, Met, PRL, Imp, CFP, CRO, Nf, Ba	vanA

Results



We have 12 PFGE types;

10 correspond to single strains;

PFGE Type 4 : 3 strains (2 clinical and 1 from cheese)

ST 55

PFGE Type 5 : 2 strains from cheese

ST 21

Results

Comparison with MLST database:

ST 21

- Holland from 1996 – Cow milk
- Spain from 2001 – Pig faeces
- Spain from 2001 – Human faeces
- Spain from 2001 – Human faeces

2 cheese strains

ST 55

- Spain from 2001 – Human blood
- Spain from 2001 – Human faeces (lab strain)

2 Human strains; 1 cheese strain

ST 22

- Spain from 2001 – Human blood
- Spain – Human faeces

1 Human strain

ST 30

- Holland from 1998 – Human faeces
- Spain from 2001 – Human faeces

1 Human strain

ST 53

- Spain from 2001 – Human faeces

1 veterinary strain

Conclusion

Evidence of cross-transmission between dairy products, animals and humans.

Discussion



Are food enterococcal isolates safe????



Acknowledgements

Antibiotic Stress and Virulence of Enterococci
Laboratory



M^o Fátima Lopes

Tânia Ribeiro



Marta Abrantes

Neuza Teixeira



Paulo Marujo

Frédéric Gaspar



Fundação para a Ciência e Tecnologia through Project POCI/CVT/59836/2004 - "Antibiotic stress by vancomycin on enterococci: risk assessment of food safety"



APÊNDICE D: Poster

Este trabalho foi apresentado, na forma de Poster, no “XII International congress of Bacteriology and Applied Microbiology – IUMS2008 – Microbes: Then, Now and hereafter” em Istambul, Turquia

Ruivo, M., Marujo, P., Lopes, MFS; Genomic comparison of two *E. faecalis* strains from different environments by Suppression Subtractive Hybridization.

Genomic Comparison of two *E. faecalis* strains from different environments by Suppression Subtractive Hybridization

Marta Ruivo, Paulo Marujo, Maria F. S. Lopes



Antibiotic Stress and Virulence of Enterococci Laboratory, IBET/ITQB, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal

mruivo@itqb.unl.pt



INTRODUCTION

Enterococci are part of the normal human intestinal microbiota, but are frequently found in fermented foods. In recent years they have become the fourth most common cause of nosocomial blood infections in Europe. *E. faecalis* alone accounts for 60 to 80% of enterococcal infections. This recent prevalence of enterococci as major nosocomial pathogen is mostly due to acquisition of multiple antimicrobial resistances, namely to vancomycin. In Europe, emergence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) may be due to glycopeptide use in animal feeds and VRE are found in healthy outpatients and in food products. Thus, there is an urgent need to evaluate the real risk food enterococci present.

Genomic comparison is an effective tool to understand the similarities and differences between pathogenic and non-pathogenic strains. In the few studies where several *E. faecalis* strains were compared, by Microarrays[®] and Microarrays[®], it was shown that its genome presents a great diversity and shows great plasticity. In the study by Aakra et al it was found a number of exogenous genetic material, which may result in a different response to external selective pressure¹. This indicates that related strains by Typing methods, may actually and greatly differ in genomic composition.

Although arrays are a good tool to understand the genomic differences between strains, the results only correspond to the used probes. A new effective method, Suppression Subtractive Hybridization (SSH) was developed to compare two genomes, and was applied for the first time to bacteria by Akopyants et al (1996) in *Helicobacter pylori*. With this method the specific regions of one genome are amplified, while the remaining similar sequences are suppressed.

Figure 1 shows a scheme of the SSH method:

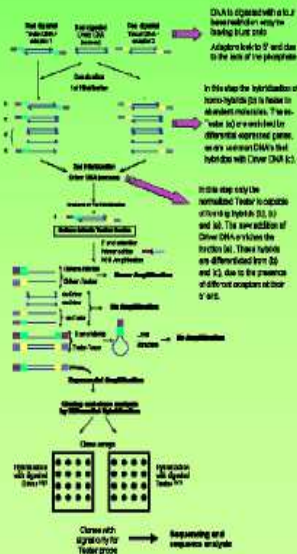


Figure 1: Scheme and brief explanation of the SSH method; adapted from www.wygen.com/med/SSH_SHT.pdf accessed 29th February 2008

METHODS

For this study we selected two *E. faecalis* isolates, both with the same MLST 6156: a dairy strain (OC815) was used as Tester and a Hospital strain (HSM3720) was the Driver.

- The DNA was extracted according to the Ultraclean TM Microbial DNA kit (MO Bio Laboratories Inc, USA).
- The SSH method was performed according to the PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit (Clontech, USA).
- The final product was cloned into the pGEM-T vector (Promega, USA) and transformed into electrocompetent JM101-TR cells. Positive clones were screened on LB medium supplemented with ampicillin, X-Gal and IPTG.
- The clones were confirmed by Differential Hybridization, using the PCR-Select Differential Screening Kit (Clontech, USA).
- Briefly, two arrays of the clones were applied in Nylon membranes, which were hybridized, respectively, with digested Driver and Tester method with ³²P and detected on a laser scanner STORM 860 (GE Healthcare, England).
- The fragments of the confirmed clones, where amplified by PCR using PstI and Pst2 primers, followed by purification using QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) and sequenced by Basecallor (Gardien, The Netherlands).
- The sequences were searched against GenBank using BLAST.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação para a Ciência e Tecnologia through project grant POCI/BIA-BCM/60643/2004 co-financed through FEDER.

RESULTS

A total of 192 clones were isolated. The ones putatively containing the subtractive fragments found only in the lactic strain were identified by differential hybridization. 25 (13%) were found to be false positives: two only hybridized with the Driver probe; 4 did not hybridize with none of the probes; 19 hybridized with both probes. From the other 167, the fragments of 22 clones were amplified by PCR and sequenced. The analysis of the sequences and respective homologues found by using BLAST are shown in Table 1. To confirm that these sequences were only present in the lactic strain, primers for each sequence were designed and PCR was performed to both strains. Only two sequences were (shown in Table 1 in different colour) were confirmed to be present only in the lactic strain.

Clone	Fragment size (bp)	%GC	Homology to predicted encoded protein	E value
3	743	39	EF2310 – urticin-6-phosphatase 2-dehydrogenase (V583 Genome)	7.2e-72
11	753	34	EF3311 – Glucose inhibited division protein A (V583 Genome)	1.6e-40
16	218	35	EF2225 – Nucleic protein (V583 Genome)	1.4e-102
25	382	39	EF2406 – cell wall surface anchor family protein (V583 Genome)	1.0e-32
42	275	24	EF_A2042 – cell wall surface anchor family protein (pTEP1 parent of V583)	1.2e-51
51	227	41	EF2641 – Lactate dehydrogenase (LDH-2) (V583 Genome)	1.6e-47
81	454	40	EF1206 – malate dehydrogenase, cytosolic/lysing (V583 Genome)	5.1e-60
10	820	41	EF2781 – DNA polymerase II gamma and tau subunits (V583 Genome)	3.5e-138
169	313	38	EF3538 – Phosphotransferase system (phosphotransferase II) family (V583 Genome)	4.0e-84
114	545	42	EF2726 – Voltage gated chloride channel family protein (V583 Genome)	2.2e-118
122	477	40	EF2168 – Nucleic protein (V583 Genome)	3.7e-101
130	191	26	EF1148 – Nucleic protein (V583 Genome)	2e-28
148	371	30	EF2548 – Transposase, IS3 family (V583 Genome)	2.0e-42
169	681	34	EF3682 – Ribosomal protein L33 (V583 Genome)	2.9e-47
169	681	34	EF3683 – Ribosomal protein L33 (V583 Genome)	4.9e-25
169	680	31	EF2546 – Nucleic protein (V583 Genome)	1.2e-21
178	740	26	EF2546 – Nucleic protein (V583 Genome)	2.1e-72
181	438	38	EF2547 – Arabinose transposase (V583 Genome)	1.5e-19
182	501	37	EF1866 – YH1 family protein (V583 Genome)	1.2e-36
17	522	34	SA00025 – putative type I restriction enzyme protein (Staphylococcus aureus subsp. Aureus Genome)	1.2e-50
152	571	35	Genome	2e-50
27	824	29	pCF10 gene - <i>E. faecalis</i> pCF10 plasmid	0.0
192	220	32	<i>E. faecalis</i> OG1 genome	1e-114

DISCUSSION

- 22 fragments were sequenced and 20 different sequences were obtained (clones 114 and 152 had the same sequence as clones 73 and 152).
- 17 sequences had homology with the genome of *E. faecalis* V583.
- Clones 35, 105, 160, 169 and 176 were homologous to regions of the putative PAI of V583.
- Clone 169 had homology to the EF3546, but with a lower score than the one obtained for the clone 176, which had the same homology.
- Only clone 105 and clone 160 were confirmed, both by differential Hybridization and PCR, as being exclusively present in the lactic strain.

Although this study aimed at finding differences in the genome of two strains, we obtained sequences which exist in both strains, and which are of great interest:

- Both strains have the pCF10 plasmid. This plasmid has been studied due to its conjugative and pheromone response properties. No studies have been made in order to search for the presence of this plasmid in environmental strains, which raises the question of the role of this plasmid in these strains.
- Both strains had a sequence homologous to a region of the *E. faecalis* OG1-RF genome. The sequence for the genome of this strain is in publication process.
- Both strains have sequence homologous to a restriction enzyme of *Staphylococcus aureus*.

The clones reported in this work only represent 20% of the total isolated and therefore we may find other clones exclusive in the dairy strain. Some of the sequences found in both *E. faecalis* strains suggest that these bacteria may be acquiring exogenous genetic material, namely from *S. aureus*, demonstrating once again the importance of enterococci as relayers of genetic material.

REFERENCES

1. Aakra, A., O. L. Nyquist, L. Snjben, T. S. Rellesen, and I. F. Nes. 2007. Survey of genomic diversity among Enterococcus faecalis strains by microarray-based comparative genomic hybridization. *Appl Environ Microbiol* 73:2207-17.
2. Akopyants, N. S., A. Prud'homme, D. T. Chutkan, J. E. Hill, P. D. Siebert, S. A. Lubyantsev, E. D. Sverdlov, and D. E. Berg. 1998. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13108-13.
3. Leung, E., S. Bristler, C. Caron, C. Durois-Crepy, L. Rigottier-Gais, G. Doury, C. Hennequin-Ardier, and P. Serrer. 2005. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *J Bacteriol* 188:658-68.
4. McBride, S. M., V. A. Fischel, D. J. LeBlanc, R. C. Moellering, Jr., and M. S. Gilmore. 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis* FLoS ONE 2:e652.
5. Ogier, J. C., and P. Serrer. 2007. The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol*.