

TIPAGEM DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* POR PULSED-FIELD GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE¹

TYPING OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* BY PULSED FIELD GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS AND POLIMERASE CHAIN REACTION

João Bedendo*
Antonio Carlos Campos Pignatari[#]

RESUMO

Pulsed-field gradient gel electrophoresis (PFGE) conhecido também como orthogonal-field-alternation gel electrophoresis (OFAGE) e reação em cadeia da polimerase (PCR) foram usados para tipificar 10 amostras clínicas de *Enterococcus faecalis*. PFGE, empregando-se a endonuclease de restrição Sma I gerou 10 padrões de restrição variando de 10 para 20 fragmentos. A técnica de PCR, realizada com os primers REP-1 e 2R, proporcionou 7 padrões de bandas variando de 4 para 10 fragmentos. Adotando-se a sequência repetitiva JB1-5'GATTTTATGGCCGTCCGC3' como iniciador na reação de amplificação, foram obtidos 6 padrões de bandamento variando de 4 para 6 fragmentos. Por PCR os genótipos foram agrupados de acordo com a similaridade contudo apenas duas amostras foram consideradas idênticas simultaneamente através das técnicas de REP-PCR e JB1-PCR. Devido ao pequeno número de amostras não se aplicou qualquer tratamento estatístico para se avaliar a prevalência de algum genótipo. A heterogeneidade genética das cepas foi demonstrada por PFGE e PCR. Os padrões de restrição obtidos por PFGE foram mais facilmente interpretados do que os padrões de bandamento gerados por PCR os quais apresentaram bandas grossas, sobrepostas e de baixa nitidez. O primer JB1, empregado pela primeira vez em estudo com *Enterococcus faecalis*, foi útil para a diferenciação de cepas desta espécie.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, PFGE, PCR.

INTRODUÇÃO

Enterococcus faecalis é freqüentemente associado à etiologia de infecções hospitalares, particularmente aquelas do trato urinário, ferida cirúrgica, sangue e endocárdio, e as fontes destes agentes infecciosos podem ser tanto endógenas como exógenas (BACHELLIER, et al., 1993). A tipificação de enterococos tem sido desenvolvida a partir da análise de perfil de proteínas, perfil bioquímico e susceptibilidade aos antibióticos (GOERING, 1993; GORDILLO, SINGH, MURRAY, 1993). O baixo poder discriminatório destas técnicas, entretanto, tem levado pesquisadores a desenvolver métodos moleculares alternativos

baseados na análise de DNA (HALL, et al., 1992.; GORDTS, et al., 1995). O DNA é a unidade fundamental de identidade celular, e a utilização de métodos de tipagem baseados no estudo desta molécula tem se mostrado uma ferramenta útil no estudo de microrganismos, entre os quais o *Enterococcus faecalis* (HEAT, 1995).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) é uma técnica na qual a molécula de DNA, após ser digerida por endonucleases, gera um padrão de restrição (JAYARÃO, DORE, OLIVER 1992.; HUCKLE, SAHM, GILMORE, 1998). O polimorfismo no padrão de restrição – “restriction fragment length polymorphism (RFLP)”- tem sido uma ferramenta útil para

¹ Extraído da tese “Tipagem de *Enterococcus spp* por Pulsed Field Gel Electrophoresis e reação de polimerização em cadeia” apresentada à Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, em outubro de 1998.

* Enfermeiro. Doutor em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Professor do Departamento de Enfermagem da UEM desde agosto de 1983. Disciplina de Enfermagem em Centro Cirúrgico.

[#] Orientador do estudo. Professor Titular da Disciplina de Doença Infecciosa e Parasitária da UNIFESP.

discriminar cepas bacterianas (JAYARÃO; DORE; OLIVER, 1992. BOYLE, 1993). Embora o PFGE seja considerado excelente para tipificar enterococos (GILSON, 1990; HALL, 1992) seu uso é limitado, pois se trata de uma técnica de execução complexa, de alto custo e que demanda longo tempo para se obter resultados (BOYLE, et al., 1993).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica mais simples, de baixo custo e que proporciona resultados rápidos. Através desta metodologia diferentes grupos de iniciadores homólogos, aleatórios e/ou degenerados, são empregados para amplificar regiões da molécula de DNA, produzindo um padrão de bandeamento. Polimorfismo no padrão de bandeamento possibilita o agrupamento de amostras idênticas ou similares e a diferenciação daquelas não relacionadas (KOSTMAN, et al., 1995; KUHN, et al., 1995; MALATHUM, et al., 1995; MERCIER, et al., 1996).

REPs- “repetitive extragenic palindromic sequences”, que ocorrem entre dois genes ou após eles, com função ainda não totalmente conhecida, são unidades encontradas em diferentes regiões do DNA de espécies bacterianas (MIRANDA, SINGH, MURRAY, 1991). A amplificação das regiões entre estas unidades produz um padrão de bandas útil para diferenciar cepas do gênero *Enterococcus sp* (MORRISON, et al., 1997). Além das sequências REP1 e REP2R, outras sequências repetitivas têm sido identificadas no genoma de diversos microrganismos e empregadas em estudos de tipagem (GILSON, et al., 1990; SHARPLES, LLOYD, 1990; SAIK, 1992.; PFALLER, 1993; PITCHER, SAUNDERS, COURVALIN, 1993; MERCIER, et al., 1996; OLIVE ; BEAN, 1999). Neste estudo as técnicas de PFGE e PCR foram empregadas para estudar amostras de *Enterococcus faecalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Dez amostras clínicas de *Enterococcus faecalis*, procedentes do Banco de Microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) foram

submetidas a tipagem empregando-se as técnicas de PFGE e PCR. A técnica de PCR foi desenvolvida empregando-se DNA genômico extraído conforme metodologia proposta por Pitcher; Saunders; Courvalin (1993).

PFGE

Pellets de cepas de *Enterococcus faecalis*, crescidas em caldo de soja tripticaseína obtidos a partir da centrifugação de células, 5,000 x g por 3 minutos, foram adicionados em moldes tipo bio-rad (Bio rad, Laboratories, Richmond CA, USA) contendo gel de agarose low melting a 1% a 58°C. Após o esfriamento e a consequente solidificação do gel o DNA genômico, foi extraído conforme metodologia proposta por Pfaller (1993). Em resumo: Em um tubo de ensaio contendo o pellet da amostra bacteriana, obtido por centrifugação de cultura de aproximadamente 1×10^8 células crescidas em 10 ml de caldo de soja tripticaseína, foi adicionado 1 ml de solução salina a 0,09%. A seguir, após homogeneização, este conteúdo foi transferido para tubo tipo eppendorf, previamente pesado, centrifugado procedendo-se a seguir o cálculo para se determinar a quantidade de células em miligramas. À massa do pellet, em mg, foi adicionado volume igual, em (µl, de 50 mM de solução de EDTA (pH 8.0) sendo esta mistura agitada em vortex. Quinze microlitros desta mistura, adicionada de 200 (µl de tampão TEN (Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, EDTA 0,1M, CIORETO DE SÓDIO 0,15M), foi homogeneizada em agarose low melting à 1% e a seguir dispensada em moldes tipo Bio-rad. Após secagem o bloco de gel foi tratado com solução tampão de EC (Tris 6 mM, NaCl 1M, EDTA 0,1M, Brij 58 0,5%, Deoxycholate 0,2%, Sarkosyl 0,5%, pH 7,5), de CHEF TE (Tris 0,1M pH 7,5, EDTA 0,1M), de ES (EDTA 0,4M pH 9,3 Sarkosyl 1%) e de PROTEINASE K.

Após extraído, o DNA foi digerido com a endonuclease *Sma* I (Promega Corp. Madison, Wisconsin, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A eletroforese dos fragmentos digeridos foi feita em aparelho Chef Dry II (Bio-rad Laboratories, Richmond, CA, USA), empregando-se gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5 vezes concentrado (45 mM Tris, ácido bórico 45mM, EDTA 1 mM).

Alternância no padrão de variação da direção das correntes elétricas inicial e final, respectivamente de 5 para 20 segundos, foi empregada durante a corrida eletroforética que foi realizada a 200 volts por 21 horas a 4°C. Esta alternância na direção da corrente elétrica de 5 para 20 segundos significa que no início da eletroforese a direção da corrente elétrica se altera a cada 5 segundos e esse espaço de tempo aumenta progressivamente até atingir 20 segundos no final da corrida.

JB1- Oligonucleotídeo

O *primer* 5'GATTTTATGGCCGTCCGC3', neste trabalho denominado JB1, foi obtido de uma sequência de DNA de *Enterococcus faecium* depositada pelos autores no Gen Bank database em 1998. Esta sequência de DNA de 703 bp, identificada no banco de dados como AFO28836, foi obtida da região compreendida pelos genes 16S/23S. Na sequência AF028836 o *primer* JB1 ocupa a posição 331 para 348 reversa. O *primer* JB1 foi sintetizado pelo Laboratórios Gibco (Gibco-BRL) por solicitação do autor.

JB1-PCR

A reação de amplificação com o *primer* JB1 foi desenvolvida com tampão de PCR 10 vezes concentrado (200 mM Tris HCl pH 8,4, 500 mM KCl)(Gibco-BRL), 2mM de cada um dos 4 dNTPs, 2mM de Cloreto de Magnésio, 100 pmoles do *primer* (42 nM), 1 U.I de Taq polymerase (Gibco - BRL), 100 ng de DNA genômico, água bidestilada em quantidade suficiente para 25 µl. O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 8 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C; e 1 ciclo final de 3 minutos a 72°C. A eletroforese foi feita em gel de agarose a 1,2% por 3 horas a 80 volts. Os fragmentos amplificados, corados com brometo de etídio, foram detectados em transiluminador de luz ultravioleta.

REP 1 e REP 2R- PCR

Os primers	REP1	-
5'TTCGICGICATCIGGC3'	e REP2R	-
5'ICGICTTATCIGGCCTAC3'		(

VERSALOVICH, KOEUTH, LUPSKI, 1991) foram empregados para amplificar DNA genômico. A reação de amplificação foi desenvolvida com 50 pmoles de cada primer (67 nM), 100 ng de DNA, 1.25 mM de cada um dos 4 dNTPs, 1U.I de Taq polymerase (Gibco BRL), tampão de PCR 10 vezes concentrado (200 mM Tris HCL pH 8,4, 500mM KCL), 2mM MgCl e água bidestilada em quantidade suficiente para 25 µl. O ciclo de amplificação foi realizado conforme proposto por Versalovic, Koeuth, Lupski (1991). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose à 1,2% por 3 horas a 80 volts.

Critérios empregados para análise de similaridade entre cepas

A análise de similaridade dos padrões de bandas produzidos por PCR entre as amostras foi feita visualmente, comparando-se o peso molecular dos fragmentos. Foram considerados idênticos aqueles padrões de bandas que apresentaram exatamente o mesmo número de fragmentos com pesos moleculares iguais. Para a técnica de PFGE, convencionou-se que duas ou mais amostras seriam consideradas idênticas quando o padrão de restrição apresentasse o mesmo número de fragmentos de mesmo peso molecular. Amostras similares seriam aquelas que apresentassem 1 ou 2 fragmentos diferentes, e aquelas que apresentassem 3 ou mais fragmentos diferentes seriam consideradas diferentes ou não relacionadas (MULLIGAN; ARBEIT, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura mostra os resultados obtidos com PFGE (A), REP-PCR (B) e JB1-PCR (C) para as amostras de *E. faecalis*. O número de fragmentos nos padrões obtidos por PFGE variou entre 10 e 20, por REP-PCR o número de bandas variou entre 4 e 10 e com JB1-PCR variou entre 4 e 6. Na eletroforese dos produtos amplificados com o *primer* JB1 os fragmentos não ficaram totalmente separados, havendo a presença de bandas sobrepostas, espessas e de fraca nitidez. Possivelmente a sobreposição de bandas não ocorreria se a eletroforese tivesse sido realizada em gel de agarose adicionado de

poliacrilamida. O gel de poliacrilamida apresenta maior poder de resolução do que a agarose, e sendo possível separar fragmentos de DNA que apresentam diferença no seu peso molecular de apenas uma base (BROWN, 1994). A adequação da reação de polimerização, incluindo verificação da quantidade de magnésio, de DNA bem como a temperatura de anelamento possivelmente aumentaria a especificidade do produto com bandas mais finas e nítidas (SAIK, 1992). Na técnica de PFGE os resultados da eletroforese com bandas claras, nítidas e bem resolvidas foram mais facilmente interpretados do que aqueles obtidos por PCR. Este resultado é compatível com a literatura, que tem destacado a facilidade da leitura dos resultados obtidos com a técnica de PFGE em relação à de PCR (MALATHUM et al., 1998).

A tabela apresenta a classificação e distribuição dessas amostras de acordo com a técnica empregada. PFGE identificou 10 padrões de restrição diferentes classificados de A a J; REP-PCR apresentou 7 padrões de bandas classificados de A a G e com JB1-PCR foram obtidos 6 padrões (A a F).

As 10 amostras de *E. faecalis* constituíram 10 grupos diferentes pela técnica de PFGE, não sendo possível correlacioná-los com REP-PCR e JB1-PCR, que propiciaram a composição de grupos de amostras com perfis idênticos. Apenas as amostras de número 70 e 184 mostradas nas raias 4 e 6 da figura foram consideradas idênticas por REP-PCR e JB1-PCR simultaneamente.

A heterogeneidade genética observada entre as amostras demonstrou o alto poder discriminatório das técnicas de PFGE e REP-PCR, sendo compatível com a literatura, que tem destacado o uso destas técnicas na tipificação de enterococos (VanBELKUM, 1994; BARBIER, 1996; VanBELKUM, 1998). O *primer* JB1 foi empregado pela primeira vez para amplificar DNA extraído de amostras clínicas de *Enterococcus faecalis*. A heterogeneidade genética observada entre as amostras empregando-se este *primer* demonstrou que o mesmo foi útil para a tipificação de *E. faecalis*.

Através da técnica de PFGE pode-se, teoricamente, tipificar todos os microrganismos; entretanto, trata-se de uma técnica que exige

grande dispêndio de tempo e é de alto custo (BARG, 1993; SADER, HOLLIS, PFALLER, 1995; MORRISON et al., 1997). O método de extração de DNA que mantém a integridade da molécula de DNA, utilizado na técnica de PFGE, pode ser um fator importante que proporciona uma maior acurácia dos resultados em relação à técnica de PCR. O DNA utilizado para PCR neste estudo foi obtido através de uma técnica que envolveu, entre outros, procedimentos de centrifugação e pipetagem do material biológico. Estes procedimentos podem alterar a integridade da molécula e conseqüentemente influenciar os resultados obtidos.

Padrões de restrição obtidos com o uso da técnica de PFGE, quando comparados entre si, podem ser classificados como idênticos, similares e diferentes (MULLIGAN; ARBEIT, 1993). A maioria dos autores concordam que duas ou mais amostras sejam consideradas idênticas quando os fragmentos que compõem o padrão de restrição coincidem em número e peso molecular. Há controvérsia, entretanto, quando se trata de, classificar padrões de restrição como similares e diferentes. Sader, Hollis e Pfaller, (1995) consideram que padrões de restrição similares são aqueles que apresentam 1 e/ou 2 fragmentos de DNA coincidentes, e padrões diferentes quando 3 ou mais fragmentos não coincidem. Goering, (1993) e Tenover, (1995) classificam padrões como similares se o número de fragmentos não coincidentes varia de 1 a 3, e como diferentes se apresentam 4 ou mais fragmentos não coincidentes. MORRISON et al., (1997) consideram que padrões diferentes são aqueles que apresentam mais de 7 fragmentos diferentes. A carência de padronização dos critérios de classificação dos padrões de PFGE influencia na identificação de isolados similares e diferentes, dificultando análises comparativas.

O coeficiente de Dice, que é um método numérico de análise de similaridade, correlaciona pares de isolados, originados de um ancestral comum, que sofreram eventos genéticos (SADER; HOLLIS; PFALLER, 1995). A aplicação deste método, entretanto, foi criticada, pois isolados altamente relacionados, que diferem de um ancestral comum por apenas um evento genético, poderiam apresentar um

coeficiente de Dice de .08, o qual seria extremamente baixo (GOERING, 1993). Neste estudo, a partir do critério adotado, pode se observar heterogeneidade genética entre os isolados através do uso de PFGE. Outros estudos

envolvendo o uso de 2 ou mais enzimas de restrição poderiam ser úteis para se estabelecer com maior clareza o grau de relacionamento entre as amostras.

TYPING OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* BY PULSED FIELD GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS AND POLIMERASE CHAIN REACTION

ABSTRACT

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) using *Sma* I restriction enzyme and polymerase chain reaction (PCR) employing REP-1 (^{5'} IIIICGICGICATCIGGC ^{3'}), REP-2R (^{5'} ICGICTTATCIGGCCTAC ^{3'}) and JB1- (^{5'} GATTTTATGGCCGTCCGC ^{3'}) primers were used to study genomic DNA from 10 *Enterococcus faecium* clinical samples. By PFGE we found 10 restriction patterns varying from 10 to 20 fragments. Using REP-1/2R primers we found 7 banding patterns, changing from 4 to 10 fragments, while with JB1-PCR primer it was found 6 banding patterns changing from 4 to 6 fragments. Identical genotypes were found by both REP-PCR and JB1-PCR however only 2 strains were considered identical by two PCR techniques simultaneously. Due to low number of isolates it was not applied any statistical method to analyse the prevalence of genotypes among the samples. Genetic heterogeneity was observed among isolates by both PFGE and PCR techniques and the restriction pattern was easier interpreted than PCR banding pattern. The primer JB1 ^{5'} GATTTTATGGCCGTCCGC ^{3'} was used by the first time to study *Enterococcus faecalis* and was a useful tool to discriminate strains of this specie

Key words *Enterococcus faecalis*, PCR, PFGE.

REFERÊNCIAS

- BACHELLIER, S. et al. Bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs) are present in the genome of *Klebsiella*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 537-544, 1993.
- BARBIER, N. et al. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant *Enterococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 34, no 5, p. 1096-1099, 1996.
- BARG, N. L. Molecular hospital epidemiology: an introduction to molecular hospital epidemiology. **Infection Control Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 14, p. 395-396, 1993.
- BEDENDO, J. **Tipagem de *Enterococcus spp* por Pulsed Field Gel Electrophoresis e reação de polimerização em cadeia**. 1998. Tese (Doutorado em Imunologia). Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. São Paulo, 1998.
- BOYLE, J. F. et al. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of the nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 31, no 5, p. 1280-1285, 1993.
- BROW, T. A **DNA Sequencing**: the Basics. New York : IRL Press; Oxford University Press, 1994.
- CHOW, J. W. et al. Clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 31, no 6, p. 1609-1611, 1993.
- DOLZANI, L. et al. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v. 119, no. 1/2, p. 167-173, 1994.
- DUNNE, W. M.; WANG, W. Clonal dissemination and colony morphotype variation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in metropolitam Detroit, Michigan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 35, no. 2, p. 388-92, 1997.
- ERLICH, A. H. **PCR technology**: principles and applications for DNA amplification. New York: W.H. Freeman and Company, 1992.
- GILSON, E. et al. Palindromic unit highly repetitive DNA sequences exhibit species specificity within enterobacteriaceae. **Research in Microbiology**, Paris, v. 141, no. 9, p. 1103-1116, 1990.
- GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed field gel electrophoresis. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 14, n. 10, p. 595-600, 1993.
- GORDILLO, M. E.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Comparison of ribotyping and pulsed field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 31, p. 1570-1574, 1993.
- GORDTS, B. et al. Vancomycin-resistant *enterococci* colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 33, n. 11, p. 2842-2846, 1995.
- HALL, M. C. et al. Typing of enterococcus species by DNA restriction fragments analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 30, no. 4, p. 915-919, 1992.
- HEAT, D. G. et al. Phase variation of *Enterococcus faecalis* pAD1 conjugation: functions relates to changes in iteron sequence regions. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 177, p. 5453-5459, 1995.

- HUCKLE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-drug resistant *enterococci*: the nature of the problem and na agenda for the future. **Emergent Infectious Disease**, Atlanta, v. 4, no. 2, p. 239-249, 1998.
- JAYARÃO, B. M.; DORE Jr., J. J. ; OLIVER, S. P. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16s ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 30, no. 9, p. 2235-2240, 1992.
- KOSTMAN, J. R. et al. The universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 171, no. 1, p. 204-208, 1995.
- KUHN, I. et al. Biochemical fingerprint compared with ribotyping and pulsed field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 33, no. 11, p. 2812-2817, 1995.
- MALATHUM, K. et al. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, no. 1, p. 211-215, 1998.
- MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganism. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 17, p. 153, 1993.
- MERCIER, E. et al . Polymorphism in *Brucella* Strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 34, no. 5, p. 1299-1302, 1996.
- MIRANDA, A. G.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed field gel electrophoresis may be a the useful epidemiological tool. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 29, no. 12, p. 2752-2757, 1991.
- MORRISON, D. et al. PCR typing of *Enterococcus faecium*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 418, p. 387- 391, 1997.
- MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 3, no. 31, p. 46-65, 1990.
- OLIVE, M. D.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-based typing of Microbial Organism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 37, no. 6, p. 1661-16699, 1999.
- PFALLER, M. A. **Molecular epidemiologic typing of nosocomial pathogens**. Iowa City: ASCP Spring, 1993. (Teleconference Série).
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N.; COURVALIN, P. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 151-156, 1993.
- SADER, H. S. ; HOLLIS, J. R.; PFALLER, M. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. **Contemporary issues in clinical microbiology**, [S.l.], v. 15, no. 2, p. 407-431, 1995
- SAIK, R. K. **In PCR technology** : principles and applications for DNA amplification. New York: W.H. Freeman and Company , 1992.
- SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. The novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 18, no. 22, p. 6503-6508, 1990.
- TENOVER, F. C. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 33, p. 2233-2239, 1995.
- THOROSDOTTIR, A. S. et al. IS6770, an the enterococcal insertion-like sequence useful for determining the clonal relationship of clinical enterococcal isolates. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 170, no. 6, p. 1539-1548, 1994.
- TYRREL, G. J. et al. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 35, p. 1054-1060, 1997.
- VanBELKUM, A. DNA fingerprinting of medically important microorganism by uses of PCR. **Clinical Microbiology Rewiews**, Washington, DC, v. 7, no. 2, p. 174-184, 1994.
- VanBELKUM, A. et al . Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 62, no. 2, p. 275-293, 1998.
- VERSALOVICH, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, no. 24, p. 6823-6831, 1991.

Endereço para correspondência: R: Rosas, 303. Jardim Maravilha, 87.080-350 Maringá-PR. E-mail: jbedendo@maringa.com.br