

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de
Enterococcus spp. isoladas em dois hospitais de Porto Alegre

EDUARDO ANDRÉ BENDER

Porto Alegre, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de
Enterococcus spp. isoladas em dois hospitais de Porto Alegre

Dissertação apresentada por **Eduardo André Bender**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de janeiro de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Carmen Regla Vargas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Elizabeth de Andrade Marques
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Pedro Alves d' Azevedo
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

B458c	Bender, Eduardo André Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas em dois hospitais de Porto Alegre / Eduardo André Bender – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xx p., 78 p. : il., tab. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. <i>Enterococcus</i> . 2. Microbiologia. 3. Testes bioquímicos. I. Barth, Afonso Luís. II. Título. CDU: 615.4
-------	--

Bibliotecária responsável:

Heloísa do Canto Canabarro – CRB10/1036

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Afonso Luís Barth pelos seus valiosos ensinamentos e pelo seu exemplo profissional e pessoal.

À Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia P. de Freitas (Usha) por sua amizade e seus conhecimentos compartilhados ao longo da execução deste trabalho.

Aos meus amigos do HCPA: Denise, Isolete, Cátia, Alice, Ariane, Ivan, Fabiana. Em especial a Larissa e a Keli por suas amizades, companheirismos e dedicações na execução dos testes moleculares.

Agradeço ao pessoal do terceiro andar da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em especial a Ana Lúcia Antunes pelo seu entusiasmo, apoio e conhecimento despendido em todos os momentos. Também um sincero agradecimento ao Carlos e a Juliane por suas imensas disponibilidades em ajudar.

À Silvana do Hospital São Lucas pelo auxílio com a obtenção das amostras. A Carina e a Bianca do Laboratório Weimann pelas participações durante a fase de identificação microbiana.

Ao Teodoro e Clara Colomé pelo incentivo e carinho despendido em todos os momentos.

Aos meus pais, Vilson e Marli, pela formação que me propiciaram e pelo carinho incondicional que tem facilitado minha caminhada.

Aos meus irmãos: Rodrigo, Leandro e Vinícius e toda minha família pelo apoio e carinho constantes. Ao Lucas por sua parceria e valiosa amizade.

À Leticia pelo seu imensurável amor, apoio e companhia em todos os momentos.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos. Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio financeiro e a BioMérieux pelo material fornecido.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo Geral	5
2.2 Objetivos Específicos	5
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1 Perspectiva histórica.....	7
3.2 Características da bactéria.....	9
3.3 Incidência e fatores de risco para colonização e infecção com enterococos.....	9
3.4 Reservatórios para enterococos resistentes.....	11
3.5 Infecções causadas pelo enterococos.....	12
3.6 Identificação laboratorial de enterococos.....	13
3.7 Tipagem do gênero enterococos.....	14
3.7.1 Métodos de tipagem genotípica.....	15
3.8 Resistência aos antimicrobianos.....	17
3.8.1 Mecanismos de resistência aos Beta-lactâmicos.....	18

3.8.2 Mecanismos de resistência aos Aminoglicosídeos.....	19
3.8.3 Mecanismos de resistência à Vancomicina.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Amostras bacterianas.....	27
4.2 Procedimentos de coleta.....	28
4.2.1 Obtenção das amostras.....	28
4.2.2 Preenchimento de fichas com dados relativos as amostras.....	28
4.3. Caracterização do gênero.....	28
4.3.1 Observação da atividade da catalase.....	29
4.3.2 Observação da hidrólise da L-pirroglutamil- β -naftilamida (teste de PYR).....	29
4.3.3 Hidrólise de esculina na presença de bile.....	29
4.3.4 Avaliação do crescimento em caldo contendo cloreto de sódio (NaCl) a 6,5%	29
4.4 Identificação de espécies de <i>Enterococcus</i>	30
4.4.1. Método convencional.....	30
4.4.1.1 Utilização de carboidratos.....	30
4.4.1.2 Produção de pigmento e verificação da motilidade.....	30
4.4.1.3 Utilização do piruvato de sódio a 1%.....	31
4.4.1.4 Desaminação da arginina.....	31
4.4.2 Caracterização por sistema automatizado (VITEK 2, BioMérieux SA, Marcy- l'Etoile, França).....	31
4.5. Testes de suscetibilidade.....	32

4.5.1 Método de disco-difusão.....	32
4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	33
4.6. Tipagem molecular (genotipagem).....	35
4.6.1 Preparação do DNA.....	35
4.6.2 Digestão do DNA.....	36
4.6.3 Eletroforese em campo pulsado (<i>pulsed field gel eletrophoresis</i> -PFGE).....	36
4.7. Tratamento de resíduos e segurança do trabalho.....	36
5 RESULTADOS.....	39
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÕES.....	65
8. REFERÊNCIAS	67
9. ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Síntese do peptídeoglicano e mecanismo de ação dos glicopeptídeos. Ligação do antibiótico ao C-terminal D-ala-D-ala do precursor do peptídeoglicano que impede as reações de transglicosilações e transpeptidação.....23
- Figura 2** Esquema do mecanismo de resistência à vancomicina.....24
- Figura 3** Perfil de macrorrestrição de DNA por PFGE em amostras de *Enterococcus faecalis* apresentando HLR-Ge/St.....48
- Figura 4** Perfil de macrorrestrição de DNA por PFGE em amostras de *Enterococcus faecalis* apresentando HLR-Ge.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características fenotípicas para a identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> e gêneros relacionados.....	14
Tabela 2 <i>Enterococcus</i> spp. Interpretação da detecção de altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos.....	20
Tabela 3 Características dos principais fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em <i>Enterococcus</i>	22
Tabela 4 Padrão de interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano para <i>Enterococcus</i> spp.....	33
Tabela 5 Concentrações testadas de aminoglicosídeos para a determinação da CIM em amostras de <i>Enterococcus</i> spp.....	34
Tabela 6 Distribuição de acordo com a origem dos enterococos nos hospitais estudados.....	39
Tabela 7 Distribuição dos enterococos por origem dos pacientes internados.....	40
Tabela 8 Distribuição de enterococos de acordo com o tipo de material clínico.....	40
Tabela 9 Distribuição das espécies de <i>Enterococcus</i> entre 203 isolados, segundo um método manual convencional para identificação.....	41
Tabela 10 Discrepâncias entre identificações de espécies de enterococos: sistema VITEK 2 e método convencional.....	41
Tabela 11 Comparação entre a determinação de espécies de <i>Enterococcus</i> em 80 amostras previamente identificados pelo método convencional com o sistema VITEK 2.....	42
Tabela 12 Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco-difusão de 203 amostras de enterococos provenientes de duas instituições de saúde de Porto Alegre, RS.....	43

Tabela 13 Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco-difusão de amostras de enterococos conforme cada instituição [HCPA (n = 121) e HSL (n = 82)].....	45
Tabela 14 Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de disco-difusão e diluição em ágar para detecção de HLAR e ampicilina.....	46
Tabela 15 Determinação da CIM para estreptomicina e gentamicina pelo método de diluição em ágar de 203 amostras de enterococos isoladas em dois hospitais de Porto Alegre, RS.....	47
Tabela 16 Características das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> resistentes a níveis elevados de estreptomicina e gentamicina analisadas por eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	49
Tabela 17 Características das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> resistentes a níveis elevados de gentamicina analisadas por eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain-Heart Infusion*

CFU – *Colony Forming Unit*

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

D- D-ala-D-ala – D-alanina-D-alanina

D-ala-D-lac – D-alanina-D-lactato

D-ala-D-ser – D-alanina-D-serina

DNA – ácido desoxiribonucleico

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

ERV – Enterococo resistente à vancomicina

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSL – Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do RS

HLAR – *High-Level aminoglycosides resistant*

HLR-Ge – *High level gentamicin resistant*

HLR-Ge/St – *High level gentamicin and streptomycin resistant*

HLR-St – *High level streptomycin resistant*

Kb - Kilobase

LAP – leucina aminopeptidases

LBA – Lavado Broncoalveolar

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

ME – *Major error*

MH – Mueller Hinton

MI – *Minor error*

MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*

mg- miligrama (s)

mL – mililitro (s)

mM - milimolar

MRSA – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NNIS – *National Nosocomial Infections Surveillance*

PBP – *Penicillin Binding Protein*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

pH – potencial de hidrogênio iônico

PYR – Pirrolidonil-β-Naftilamida

RFLP – *Restriction fragment lenght polymorfism*

RNA – ácido ribonucleico

SDS – dodecil sulfato de sódio

TBE – solução de Tris, EDTA e ácido bórico

TE – solução de tris, EDTA

Tn – transposon

Tris – hidroximetil amino metano

U – unidade

VME – *Very major error*

VRE – *Vancomycin resistant Enterococcus*

RESUMO

As características fenotípicas e genotípicas de 203 isolados de *Enterococcus* spp. proveniente de diferentes amostras clínicas em dois hospitais localizados na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, foram estudadas. As espécies foram identificadas através de testes bioquímicos convencionais e pelo uso do sistema automatizado VITEK 2 (BioMérieux). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para aminoglicosídeos foram determinadas pelo método de diluição em ágar. O alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR) e à ampicilina foi avaliado pelo mesmo método e adicionalmente pelo método de disco-difusão. A diversidade genética de amostras de *Enterococcus faecalis* com HLAR foi determinada através da digestão do DNA cromossômico com a enzima *Sma*I seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE). O *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente (93,6%) seguido por *E. faecium* (4,4%). A resistência entre os isolados clínicos foi de 2,5% à ampicilina, 0,5% à vancomicina, 0,5% à teicoplanina, 33% ao cloranfenicol, 2% à nitrofurantoína, 62,1% à eritromicina, 64,5% à tetraciclina, 24,6% à rifampicina, 30% ao ciprofloxacino e 87,2% à quinupristina-dalfopristina. A prevalência de HLAR foi de 10,3%, sendo 23,6% para gentamicina e 37,4% para estreptomicina. A maioria das amostras sensíveis aos aminoglicosídeos pelo método de disco-difusão apresentaram CIM inferior a 125 µg/mL e 500µg/mL para gentamicina e estreptomicina, respectivamente. A prevalência de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV) foi muito baixa neste estudo. Um grupo clonal predominante foi encontrado entre amostras de *E. faecalis* com HLR-Ge/St. Os isolados incluídos no grupo clonal foram provenientes de ambos os hospitais, indicando uma disseminação intra e inter-hospitalar deste clone.

Palavras-chave: *Enterococcus*, aminoglicosídeos, suscetibilidade, PFGE, clonalidade.

ABSTRACT

The phenotypic and genotypic characteristics of 203 *Enterococcus* spp isolates recovered from different clinical sources of two hospitals in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, were studied. The species were identified by conventional biochemical tests and the automated system VITEK 2 (BioMérieux). The minimal inhibitory concentrations (MIC) for aminoglycosides were evaluated by agar dilution method. The evaluation of high-level resistance to aminoglycosides (HLAR) and resistance to ampicillin were carried out by the same method as well as by the disc-diffusion method. The genetic diversity of HLAR *E. faecalis* was assessed by pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA after *Sma*I digestion. The *E. faecalis* was the most frequent species (93.6%), followed by *E. faecium* (4.4%). The percentage of resistance among the clinical isolates was: 2.5% to ampicillin, 0.5% to vancomycin, 0.5% teicoplanin, 33% to chloramphenicol, 2% to nitrofurantoin, 66.1% to erythromycin, 66.5% to tetracycline, 24.6% to rifampicin, 30% to ciprofloxacin and 87.2% to quinupristin-dalfopristin. A total of 10.3% proved to be HLAR, with 23.6% resistant to gentamicin and 37.4% to streptomycin. Most of the aminoglycosides susceptible isolates by the disc-diffusion method presented MIC lower than 125 µg/mL and 500µg/mL for gentamicin e streptomycin, respectively. The prevalence of vancomycin resistance *Enterococcus* (VRE) was very low in this study. One predominant clonal group was found among *E. faecalis* exhibiting HLR-Ge/St. The isolates included in the clonal group were recovered from both hospitals, indicating both intrahospital and interhospital spread of this clone.

Key-words: *Enterococcus*, aminoglycosides, susceptibility, PFGE, clonality.

1 INTRODUÇÃO

Antigamente considerado como um gênero bacteriano de poucas conseqüências em doenças infecciosas, os enterococos têm emergido rapidamente como um dos principais patógenos nosocomiais e na comunidade em geral (MURRAY, 2000). Sua freqüência nos isolamentos de amostras clínicas tem aumentado, e isso representa um considerável desafio aos esquemas terapêuticos utilizados em seu tratamento (HÖRNER *et al.*, 2005). A natureza deste desafio tem por base os mecanismos pelos quais os enterococos causam doenças, a resistência crescente dos enterococos para muitos, e, em alguns casos, à todos os agentes antimicrobianos aprovados atualmente para tratar de infecções (HÖRNER *et al.*, 2005; JETT *et al.*, 1994; MUNDY *et al.*, 2000).

Os enterococos são cocos Gram-positivos que geralmente se dispõem aos pares e em curtas cadeias e que apresentam reação da catalase negativa. São comensais e atuam como patógenos oportunistas, embora não causem respostas inflamatórias sistêmicas severas, como choque séptico, freqüentemente causam infecções em pacientes hospitalizados por um longo período e/ou que receberam múltipla terapia antimicrobiana (CENTINKAYA *et al.*, 2000; ZARRILI *et al.*, 2005).

Nos Estados Unidos, os enterococos tornaram-se o segundo microrganismo mais comumente isolado a partir do trato urinário e de lesões ulcerosas, sendo a terceira causa mais comum de bacteremia hospitalar (CENTINKAYA *et al.*, 2000; BAZET *et al.*, 2005).

Normalmente colonizante do trato intestinal, os enterococos podem ser encontrados ainda, embora com menos freqüência, em cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina. Por muito tempo foram utilizados como indicadores de contaminação de água e de alimentos, mas, merecem atenção como agentes de endocardite infecciosa, bacteremia, síndromes diarréicas em recém-nascidos, infecções do trato urinário e infecções de ferida cirúrgica (HÖRNER *et al.*, 2005; KONEMAN *et al.* 2001).

Os enterococos apresentam resistência intrínseca à baixas concentrações de aminoglicosídeos, o que ocorre em todas as espécies e decorre de uma baixa penetração do antimicrobiano pela parede bacteriana (JETT et al., 1994, ZARRILI et al., 2005). A resistência adquirida a altas concentrações dos antimicrobianos aminoglicosídeos é devida a dois fatores: mutações, que resultam na diminuição da ligação do agente ao ribossomo, como a que ocorre com a estreptomicina (chamada resistência ribossômica), ou, mais comumente, aquisição de novos genes que codificam enzimas capazes de modificar os aminoglicosídeos. Muitos isolados de *Enterococcus faecium* possuem ainda alta resistência às penicilinas, uma vez que suas proteínas de ligação às penicilinas (PBP) têm baixa afinidade por este grupo de antimicrobianos (HÖRNER et al., 2005). Assim, as amostras de *E. faecium* tendem a serem mais resistentes aos antimicrobianos do que as amostras de *E. faecalis* (FACKLAM et al., 2007).

Na terapia antimicrobiana para tratar de infecções enterocócicas sistêmicas como endocardite e bacteremias são comumente utilizados um agente que atue na parede celular (um beta-lactâmico, como a ampicilina, ou um glicopeptídeo, como a vancomicina) e um aminoglicosídeo (usualmente gentamicina ou estreptomicina). Esses agentes atuam sinergicamente para promover a ação bactericida. Entretanto a resistência aos aminoglicosídeos, à ampicilina, à penicilina e à vancomicina tem se tornado um importante problema, contribuindo para a redução das opções de tratamento (MCNAMARA et al. 1995).

Assim, a soma de todas essas capacidades adquiridas tornou os enterococos organismos bem adaptados, facilitando a sobrevivência de amostras multirresistentes, capazes de crescer em ambientes inóspitos (extremos de pH e temperatura, ou em concentrações de cloreto de sódio (NaCl) a 6,5%, sendo que a transmissão potencial de pessoa a pessoa contribui para sua difusão. Os atributos adquiridos pelo gênero *Enterococcus* sugerem que estas bactérias e sua resistência a fármacos antimicrobianas persistirão como graves agentes patogênicos nos próximos anos (LEME e FERREIRA, 2001).

Até o ano de 2000 não existiam relatos de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) na cidade de Porto Alegre. Em maio de 2000 foi descrito o primeiro caso de ERV em um paciente internado em UTI de um hospital de Porto

Alegre. Desde então outros hospitais desta cidade começaram a pesquisar ERV como colonizante em pacientes de risco, sendo que, deste então, diversas instituições de saúde tem relatado a identificação desta bactéria à divisão de vigilância sanitária municipal.

Diante do exposto, entende-se como relevante a realização de um estudo avaliando a presença de *Enterococcus* spp. em ambientes hospitalares, com o intuito de atualizar os dados de prevalência e características do gênero.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização fenotípica e genotípica em amostras de *Enterococcus* spp., como também, o perfil de suscetibilidade destes enterococos utilizando diferentes métodos entre amostras clínicas provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a distribuição das espécies de enterococos isoladas a partir de diferentes amostras clínicas obtidas de pacientes em dois hospitais da cidade de Porto Alegre.
- Comparar os resultados de identificação das espécies de enterococos obtidos pelo emprego de um sistema automatizado (VITEK 2, BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) com um método manual convencional (testes bioquímicos) de identificação.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos comumente usados na terapêutica, em especial a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, através do emprego dos métodos de disco-difusão e de diluição em ágar.
- Determinar, através do emprego do método de diluição em ágar, os níveis de Concentração Inibitória Mínima (CIM) à estreptomicina e gentamicina
- Avaliar a diversidade genética de isolados resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos entre as duas instituições de saúde.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Perspectiva histórica

O nome enterococo é proveniente da palavra francesa *entérocoque* a qual foi utilizada pela primeira vez por Thiercilin em 1899 com a finalidade de enfatizar a origem entérica desse coco Gram-positivo. No entanto, somente em 1970 o termo enterococo foi utilizado para designar um gênero de bactérias que antes pertenciam ao gênero *Streptococcus*. O nome *Streptococcus faecalis* (*faecalis* para relacionar com fezes) foi proposto por Andrewes e Horder, em 1906, os quais isolaram estes microrganismos de um paciente com endocardite e consideraram este estreptococo tão característico da flora intestinal humana que o termo claramente se justificava. Em 1919, Orla-Jensen decreveu um segundo organismo desse grupo, *Streptococcus faecium*, o qual diferia dos padrões de fermentação do *Streptococcus faecalis* (MURRAY, 1990).

Em 1937, Sherman propôs uma classificação na qual separava os estreptococos em quatro grupos: piogênicos, viridans, láctico e enterococo. Neste sistema, os enterococos reagiam com anti-soro do grupo D. O *Streptococcus bovis*, classificado por Sherman como *Streptococcus viridans*, foi demonstrado, mais tarde, reagir com anti-soro do grupo D (MURRAY, 1990; FACKLAM *et al.*, 2002).

No decorrer dos anos, vários outros enterococos foram isolados de fontes humanas e animais, de plantas e de alimentos. Enterococos móveis foram verificados em 1935 e alguns, que se assemelhavam ao *Streptococcus faecium*, ficaram conhecidos com *Streptococcus faecium* subespécie *mobilis*. Em 1950, foi identificada a produção de um pigmento amarelo por alguns enterococos móveis, e, em 1968, foi sugerido o nome *Streptococcus faecium* var. *casseliflavus* (pela cor amarela). Em 1950, um enterococo isolado do queijo Gouba foi chamado *Streptococcus malodoratus* devido ao seu mau cheiro. Algumas cepas de enterococos foram identificadas por reagir não apenas com anti-soro do grupo D de Lancefield, mas também com o grupo Q. Como estes microrganismos ocorriam de forma mais prevalente nas fezes de galinhas, foi proposta, em 1967, a denominação *Streptococcus avium* (FACKLAM *et al.*, 2002).

Baseando-se no arranjo celular e nas características fenotípicas, Kalina propôs em 1970 a criação de um novo gênero para os estreptococos do grupo enterococo, sugerindo que *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* e subespécies fossem denominados *Enterococcus*. No entanto esta proposta não foi levada adiante e a denominação *Streptococcus* continuou a ser utilizada (FACKLAM *et al.*,2002).

Com o auxílio das técnicas moleculares na década de 80, a classificação dos estreptococos foi ampliada. Em 1983, Farrow apresentou dados bioquímicos e de hibridização de DNA que confirmaram a distinção entre as espécies: *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus casseliflavus*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus durans* e *Streptococcus faecalis* var. *malodoratus*. Em 1984, Schleifer e Kilpper-Bälz, usando hibridização DNA-DNA e DNA-rDNA, mostraram que o *Streptococcus faecalis* e o *Streptococcus faecium* eram fracamente relacionados aos estreptococos, incluindo *Streptococcus bovis*, de forma que deveriam ser transferidos para outro gênero: o gênero *Enterococcus* (MURRAY, 1990; FACKLAM *et al.*,2002).

Collins, Jones e Farrow, utilizando metodologia semelhante, constataram que as espécies *Streptococcus avium*, *Streptococcus casseliflavus*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus faecalis* subespécie *malodoratus* e *Streptococcus gallinarum* também deveriam ser transferidas para o gênero *Enterococcus* (MURRAY, 1990).

Estudos moleculares foram utilizados para definir outras espécies incluindo *Enterococcus hirae* (*hirae* com o significado de intestino) e *Enterococcus mundtii* a qual inclui algumas espécies atípicas pigmentadas e imóveis. Além disso, três outras novas espécies foram propostas, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus solitarius* e *Enterococcus pseudoavium* (CLIMO *et al.* 2003).

Existem diversas espécies conhecidas do gênero *Enterococcus*, entre elas podemos citar: *E. avium*, *E. asini*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. díspar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. sacharolyticus*, *E. sulfureus* e *E. villorum* (FACKLAM *et al.*, 2007).

3.2 Características da bactéria

Os enterococos são células esféricas ou ovóides, com dimensões variando de 0,6 a 2,5 µm, ocorrendo geralmente em pares ou cadeias curtas em meio líquido. Algumas vezes podem se apresentar em formas cocobacilares, quando o crescimento ocorre em ágar, ou formas ovaladas e em cadeias quando o crescimento se dá em caldo tioglicolato. São organismos Gram-positivos e podem ser móveis, apresentando poucos flagelos e ausência de cápsula. São anaeróbios facultativos sendo capazes de fermentar diversos carboidratos com produção de L (+)-ácido láctico principalmente. Essa fermentação ocorre sem produção de gás, com pH final variando entre 4,2 e 4,6. Possuem necessidades nutricionais complexas, sendo catalase negativos (LEME e FERREIRA, 2001). Crescem geralmente entre 10°C e 45°C sendo que a temperatura ótima de crescimento é 37°C em pH 9,6. Também se observa crescimento em solução de NaCl 6,5% e na presença de sais biliares a 40% (KONEMAN *et al.*, 2001).

São pertencentes ao grupo D na classificação de Lancefield, pois a maioria das amostras produz antígenos contra o ácido-glicerol teicóico associado a parede celular, o que os identifica com o grupo D de antígenos estreptocócicos. Raramente reduzem nitrato, porém a maioria das espécies hidrolisam pirrolidoni-β-naftilamida (PYR), com exceção das espécies *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus columbae* e *Enterococcus saccharolyticus*. Todas as espécies produzem leucina aminopeptidases (LAP) (LECLERCQ *et al.* 1992; FACKLAM *et al.*, 2007).

3.3 Incidência e fatores de risco para colonização e infecção com enterococos

A emergência de enterococos resistentes aos antimicrobianos β-lactâmicos e aminoglicosídeos e o desenvolvimento da administração oral da vancomicina precipitou um elevado aumento do uso da vancomicina nas duas últimas décadas. Este aumento foi acompanhado conseqüentemente por um contínuo crescimento linear na freqüência de identificação de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) entre isolados clínicos (CETINKAYA *et al.*, 2000). De acordo com o *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS), durante o ano de 1999 os ERV representavam 24,7% de todas as infecções enterocócicas identificadas nas

unidade de tratamento intensivo em hospitais americanos (SHEPARD e GILMORE, 2002).

Análises epidemiológicas permitiram distinguir os padrões de resistência entre isolados clínicos de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. Para padrões isolados entre os anos de 1995 e 1997 nos Estados Unidos, menos de 2% de todos os isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* demonstraram resistência a vancomicina, entre os isolados de *Enterococcus faecium*, 52 % foram resistentes para vancomicina e 83% foram resistentes para ampicilina (SHEPARD e GILMORE, 2002).

Embora a dinâmica da transmissão comunitária de enterococos resistentes a múltiplos antimicrobianos não esteja bem compreendida, a transmissão nosocomial de reservatórios para hospedeiros está associada com vários fatores de risco bem definidos que podem ser agrupados dentro de três principais categoriais. A primeira categoria inclui aqueles fatores de risco que facilitam o contato potencial de um paciente com a bactéria dentro do ambiente hospitalar. Estes fatores incluem hospitalização prolongada, proximidade com um paciente colonizado, transferências dentro e entre hospitais e cuidado do pessoal com requisitos básicos de segurança (HAYDEN, 2000, MURRAY, 2000). Fatores como diarreia que aumentam a contaminação da pele ou do ambiente, ou instrumentos médicos podem também favorecer a transmissão nosocomial (HAYDEN, 2000; SHEPARD e GILMORE, 2002). Uma segunda categoria de fatores de risco para transmissões nosocomiais inclui características do hospedeiro que predispõe o paciente a uma colonização ou infecção. Tais fatores incluem idade avançada, severidade de doenças de base, malignidade hematológica, neutropenia, cirrose, cirurgia intra-abdominal recente, diálise renal, presença de úlcera de decúbito e histórico de colonização prévia. A terceira categoria inclui terapia antimicrobiana antecedente, como tratamentos prévios com cefalosporinas ou fármacos antimicrobianos com significativa atividade contra bactérias anaeróbicas (exemplo: metronidazol, clindamicina, imipenem) as quais estão associadas com um risco aumentado de colonização ou infecção principalmente com ERV (HAYDEN, 2000; MURRAY, 2000; SHEPARD e GILMORE, 2002).

3.4 Reservatórios para enterococos resistentes

Os enterococos se encontram amplamente disseminados na microbiota do trato intestinal, cavidade oral e do trato genitourinário de humanos e animais (STOBBERINGH *et al.*, 1999). A presença do enterococo no solo e na água de superfície pode ser atribuída à contaminação dessas áreas por fezes de animais ou por materiais de esgotos não tratados. Desse modo, por quase um século os enterococos foram utilizados como indicadores de contaminação fecal em água e alimentos para consumo humano (AARESTRUP *et al.* 2002). Em trabalho publicado por STOBBERINGH *et al.* (1999) na Holanda, foram identificados enterococos resistentes a glicopeptídeos com as características genéticas semelhantes em perus e em criadores e abatedores destas aves, concluindo que estes animais podem ser reservatórios e transmissores destes microrganismos para o homem.

Segundo CETINKAYA *et al.* (2000), a ocorrência de ERV tem sido relatada em fontes animais como aves e porcos em alguns países europeus. A ocorrência nestes animais teria relação com o fato da avoparcina, um glicopeptídeo semelhante à vancomicina e teicoplanina, ser acrescentado na ração animal como um promotor do crescimento. Estes achados sugerem que animais contaminados podem servir como um reservatório, pelo qual, indivíduos não hospitalizados podem adquirir o microrganismo.

Dados nortes americanos já apontam a infecção por enterococos como a segunda maior causa de infecção nosocomial nos Estados Unidos, estando particularmente associados a infecções do trato urinário, infecções de ferida cirúrgica e bacteremias (ZARRILI *et al.*, 2005; CORVALIN, 2006). Dessa forma se entende que os principais reservatórios dos enterococos resistentes aos aminoglicosídeos, glicopeptídeos dentre outros antimicrobianos de uso corrente no ambiente hospitalar, sejam os próprios pacientes, colonizados ou infectados, assim como a equipe assistencial. As superfícies ambientais e os equipamentos médicos também são fontes possíveis, já tendo sido verificada sobrevivência desses microrganismos, por um período superior a quatro dias (NOSKIN *et al.*, 1995).

De acordo com TORNIEPORTH *et al.* (1996) o modo mais comum de transmissão nosocomial de enterococos resistentes a múltiplos fármacos é

ocasionado pela equipe assistencial, cujas mãos tornam-se momentaneamente contaminadas com o organismo enquanto trata de pacientes infectados. Este conceito está baseado pela descoberta de enterococos a partir de exames de cultura microbiana realizado das mãos de trabalhadores da saúde.

3.5 Infecções causadas pelo enterococos

As infecções mais associadas com os enterococos são as infecções do trato urinário, intra-abdominais, pélvicas, bacteremia, endocardite, cutâneas, neonatais, do sistema nervoso central e do trato respiratório (LEME e FERREIRA, 2001; PALAVECINO *et al.*, 2001; GOULD *et al.*, 2004).

A infecção do trato urinário é a infecção mais freqüente no homem. A maioria destas infecções tem origem hospitalar e estão associadas, principalmente a instrumentalização/cateterização prévia, a anormalidades do trato urinário, ao uso extensivo de antimicrobianos e à debilidade do paciente. Além de infecções de trato urinário inferior e pielonefrites, também já foram descritos casos de prostatite e abscesso periférico atribuídos a enterococos. Os enterococos raramente causam infecções do trato urinário não complicadas em mulheres não hospitalizadas (GOULD *et al.*, 2004; SANDRI, 2004). As infecções intra-abdominais são consideradas como o segundo tipo mais freqüente de infecção relacionado ao enterococo. (MOELLERING, 1992; SANDRI, 2004).

Bacteremia é o terceiro tipo de infecção mais comumente atribuída ao enterococo (HÖRNER *et al.*, 2005; DESHPANDE *et al.*, 2007). Segundo MOELLERING (1992) a relação de bacteremia com endocardite é variada, ou seja, se a origem da bacteremia for hospitalar, apenas em 1% dos casos há evolução para endocardite; se a origem for comunitária, no entanto, em aproximadamente um terço dos casos há evolução para endocardite. Apesar da bacteremia poder se associar ao choque séptico ou à coagulação intravascular disseminada, tais complicações são raras e quando ocorrem, geralmente estão relacionadas a bacilos Gram-negativos que acompanham os enterococos em bacteremias polimicrobianas (MURRAY, 1990).

Os enterococos são responsáveis por 5 a 15% dos casos de endocardite infecciosa, sendo o *Enterococcus faecalis* a espécie mais freqüentemente relacionada. Essa doença é mais comum entre idosos do sexo masculino e segue, em geral um curso subagudo. Acomete mais freqüentemente pacientes com valvulopatias ou com válvulas prostéticas, embora também possa determinar infecção em válvulas previamente normais (LEME e FERREIRA, 2001; SHEPARD e GILMORE, 2002).

Infecções menos freqüentes causadas pelos enterococos incluem infecções neonatais, do sistema nervoso central e do trato respiratório, normalmente envolvendo pacientes com múltiplas invasões ou muito debilitados (LEME e FERREIRA, 2001).

3.6 Identificação laboratorial de enterococos

A determinação das espécies de enterococos passou a ter importância clínica com o aumento da resistência a antimicrobianos, principalmente nas espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. A identificação correta do gênero e a espécie de isolados resistentes à vancomicina é primordial, pois existem gêneros intrinsecamente resistentes a glicopeptídeos (HÄLLGREN *et al.*, 2001; SHEPARD *et al.*, 2002; AVALOS *et al.*, 2006).

A identificação das espécies de enterococos, através dos testes bioquímicos convencionais foi atualizada por FACKLAM *et al.* (2002). Essa classificação estabelece cinco grupos baseando-se na formação de ácidos em presença de alguns substratos como: manitol, arabinose, lactose, sacarose, rafinose; produção de pigmento, motilidade, utilização do piruvato e hidrólise da arginina (Tabela 1).

Apesar desta técnica fornecer informações úteis, ela é demorada e de difícil reprodução e/ou interpretação. Além disso, a falta de variação fisiológica das espécies de enterococos que permita sua diferenciação é umas das limitações deste método (FACKLAM *et al.*, 2002). A aplicação de métodos eletroforéticos para separação de proteínas tem sido utilizada com bons resultados na identificações de padrões que apresentam atipias fisiológicas pelo método convencional (MERQUIOR

et al., 1994; d'AZEVEDO *et al.*, 2006). O uso de sistemas automatizados tem identificado corretamente as cepas de *Enterococcus faecalis*, no entanto a identificação de *Enterococcus faecium* e outras espécies pode não ser correta devido à similaridade fenotípica e a falta de alguns testes como motilidade e produção de pigmento nestes sistemas (GARROTE *et al.*, 2000; LIGOZZI *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2004).

Tabela 1. Características fenotípicas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e gêneros relacionados (FACKLAM *et al.*, 2002).

<i>Espécies</i>	MA	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP	EFR
Grupo 1													
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V	R
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V	S
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V	R
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	R
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	R
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	
Grupo 2													
<i>E. faecalis</i>	+*	-	+*	-	+	-	+	-	-	+*	+	- ^o	R
<i>E. faecium</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	S
<i>E. casseliflavus</i>	+*	-	+	+	V	V	-	-	-	+*	-	-	S
<i>E. flavescens</i>	+	-	+*	+	V	+	-*	+*	+*	+	-	+	R
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-	S
<i>E. gallinarum</i>	+*	-	+*	+	-	+	-	+*	-	+	-	+	R
Grupo 3													
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	S
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	R
Grupo 4													
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	R
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	R
Grupo 5													
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	-	+	V	+	V	+	+	+	V	+	
<i>E. gallinarum</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	R
<i>Vagococcus spp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	R

Abreviações e símbolos: MA, manitol; SOR, sorbose; ARG, arginina; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; TEL, 0,04% telurito; MOT, motilidade; PIG, pigmento; SUC, sucrose; PYU, piruvato; MGP, metil-alfa-glicopiranosida; EFR, disco de efrotomicina (100 µg); +, > 90% positivo; -, < 10% positivo; V, variável; *, exceções ocasionais (< 3% das cepas apresentam reações aberrantes); R, resistente; S, sensível.

OBS: O grupo V consiste de espécies variantes de *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. faecalis* que não hidrolizam a arginina.

3.7 Tipagem do gênero enterococos

No passado, as infecções causadas por enterococos eram tradicionalmente consideradas de origem endógena e a epidemiologia dessa bactéria não atraía muita

atenção. Mais recentemente, a epidemiologia do enterococo passou a merecer atenção devido à alta frequência da sua participação nas infecções hospitalares, ao desenvolvimento de resistência a múltiplos antimicrobianos, bem com as evidências de origem exógena (STOBBERINGH *et al.*, 1999; SANDRI, 2004; DESHPANDE *et al.*, 2007). Dessa forma, a caracterização molecular passou a ter um papel fundamental, auxiliando os Serviços de Controle de Infecção no entendimento de surtos intra e extra-hospitalares.

3.7.1 Métodos de tipagem genotípica

A identificação dos perfis moleculares permite o esclarecimento de surtos hospitalares envolvendo germes com perfis de sensibilidade epidemiologicamente importantes. As primeiras técnicas desenvolvidas para tipagem do enterococo foram a análise dos fragmentos de DNA plasmidial resultantes de sua digestão total ou parcial realizada por enzimas de restrição como endonucleases (enzimas que clivam o DNA em seqüências específicas). Estes fragmentos de DNA são separados por eletroforese, e a distância migratória do mesmo mostra o polimorfismo do DNA (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP), o qual pode ser específico para cada cepa. Essas técnicas podem ser úteis em algumas situações, porém, a inconsistência dos plasmídeos no que se refere à possibilidade de carregarem diversos determinantes de virulência, de serem sujeitos à forte pressão seletiva e de poderem ser perdidos espontaneamente ou adquiridos de outras bactérias, limita o método (MASLOW *et al.*, 1993; FACKLAM *et al.*, 2002; SANDRI, 2004).

A análise dos perfis de DNA cromossomal clivado com enzimas de restrição de ação rara (macrorrestrição do DNA) para o estudo epidemiológico de amostras bacterianas, foi amplamente auxiliada pelo desenvolvimento de técnicas de eletroforese de campo variável ou pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE). O PFGE tem sido aplicado para o estudo de vários organismos e demonstrado ser altamente discriminatório e reprodutível, com desempenho superior ou comparável ao de outras técnicas de tipagem. A discriminação alcançada por este método é grande uma vez que detecta variações em todo o genoma, podendo apresentar capacidade elevada para distinguir entre linhagens de uma espécie. As limitações

dessa técnica residem na necessidade de equipamentos especializados e caros, no tempo prolongado exigido para que as soluções e enzimas atuem, como também na dificuldade de interpretação dos resultados devido à complexidade dos padrões (FACKLAM *et al.*, 2002; SANDRI, 2004).

A macrorrestrição de DNA seguida por PFGE se constitui no método de tipagem mais utilizado, considerado como padrão-ouro, para o estudo epidemiológico de infecções enterocócicas hospitalares. A enzima de restrição normalmente utilizada para digerir o DNA do enterococo é a *SmaI*, embora também possam ser utilizadas a *Apal* e a *Sfil*. No processo de clivagem do DNA de *Enterococcus* spp., são gerados em média 15 a 20 fragmentos de restrição, com tamanho aproximado de 5 a 400 Kb. O uso de diferentes condições de eletroforese e de enzimas específicas de restrição pode ser necessário para a melhor separação de fragmentos obtidos de amostras de espécies enterocócicas.

Para a interpretação dos dados obtidos, são utilizados princípios gerais baseados nas diferenças dos fragmentos. Atualmente, a utilização de sistemas de processamento de imagens para auxiliar na análise e interpretação dos perfis das bandas tem se tornado cada vez mais comum, embora, ainda pouco disponíveis (CEREDA, 1999).

Para a interpretação dos resultados obtidos por PFGE, foi proposto um padrão de avaliação baseado na similaridade das bandas geradas. Perfis migratórios idênticos traduzem origem comum (de uma mesma cepa ou clone); diferenças em até seis bandas no perfil migratório, representando um ou dois eventos genéticos diferentes, são consideradas semelhantes a um mesmo clone; sete ou mais bandas discordantes, representando três ou mais eventos genéticos diferentes, são consideradas amostras não relacionadas epidemiologicamente (TENOVER *et al.*, 1995; CEREDA, 1999).

3.8 Resistência aos antimicrobianos

A emergência de bactérias resistentes a diversas classes de antimicrobianos é um consenso global. Recentes estudos multicêntricos de vigilância nosocomial indicam que até 20% das bacteremias enterocócicas isolados nos Estados Unidos foram resistentes a vancomicina (CHANG *et al.*, 2007; DESHPANDE *et al.*, 2007). De um modo geral são dois os fatores que estão relacionados ao desenvolvimento e persistência de resistência: o primeiro está ligado ao acúmulo de resistências adquiridas, para uma determinada bactéria patogênica, quando classes inteiras de antimicrobianos tornam-se inativos contra ela; o segundo seria a ausência de novas classes de antimicrobianos nos últimos anos (LEME e FERREIRA, 2001)

Os enterococos demonstram uma variedade de mecanismos para se tornarem resistentes a muitas classes de fármacos antimicrobianos testadas. A variabilidade genética e a multiplicação acelerada permitem que as bactérias desenvolvam mutações específicas para adaptarem-se a ambientes diversos. Uma mutação conferindo resistência à determinada substância permitirá à bactéria sobreviver à ação de antimicrobianos usados nos procedimentos terapêuticos (CENTINKAYA *et al.*, 2000).

Muitos enterococos são tolerantes aos efeitos inibitórios dos antimicrobianos ativos contra a parede celular, incluindo a penicilina e vancomicina, sugerindo que esta propriedade pode não ser inerente, mas adquirida após exposições sistemáticas a antimicrobianos (SHEPARD e GILMORE, 2002; ZARRILLI *et al.*, 2005).

A resistência do gênero *Enterococcus*, assim como em outras bactérias, pode ser classificada em intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é própria da espécie, e seus genes determinantes se encontram no cromossomo. A resistência adquirida pode ser consequência de uma mutação no DNA original ou pela aquisição de material genético externo à célula bacteriana (ASLANGUL *et al.*, 2005; ZARRILLI *et al.*, 2005).

Ao longo das décadas passadas, os passos para as descobertas de novas classes de antimicrobianos tem sido lento em comparação com o surgimento da resistência a antimicrobianos (ZARRILLI *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2007;

DESHPANDE *et al.*, 2007). Entre as fontes potenciais para novos agentes, as plantas medicinais tem sido investigadas largamente. Segundo o estudo conduzido por CHANG *et. al* (2007), a baicaleína, que é uma das ervas chinesas mais largamente usadas, demonstrou efeitos anti-alérgicos, anti-inflamatórios, ação antioxidante e efeito bactericida contra inúmeros patógenos, tendo demonstrado um promissor papel desta em relação a atividade antimicrobiana. Ainda existe pouco conhecimento de como a baicaleína pode ter um efeito sinérgico quando usada em combinação com outros agentes antimicrobianos, principalmente contra *Enterococcus* resistentes a vancomicina. Neste mesmo estudo, os autores concluem que a associação de baicaleína com gentamicina atua sinergicamente sobre a inibição de ERV *in vitro*.

3.8.1 Mecanismos de resistência aos Beta-lactâmicos

A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos podem ocorrer de duas maneiras. A primeira é devido a alterações das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e a segunda ocorre através da produção de enzimas β -lactamases (ASLANGUL *et al.*, 2005). Quando a bactéria é exposta a beta-lactâmicos, através dos canais de porinas, e esta se liga as PBPs, na membrana celular são liberadas enzimas autolíticas que degradam a parede celular levando a morte bacteriana (ROSSI e ANDREAZZI, 2005). Por sua vez os enterococos resistentes apresentam afinidade diminuída à penicilina e isso se torna mais evidente para as penicilinas semi-sintéticas resistentes a penicilinase, tais como nafcilina e meticilina. A grande maioria das amostras de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina são também resistentes aos beta-lactâmicos. Por outro lado, amostras de *Enterococcus faecalis* tendem a ser sensíveis aos β -lactâmicos, independentemente do padrão de sensibilidade a glicopeptídeos (PATTERSON *et al.*, 1990; SHEPARD e GILMORE, 2002).

A resistência a ampicilina e penicilina também tem sido atribuída a produção de enzimas beta-lactamase, descrita quase que exclusivamente para o *Enterococcus faecalis* e atribuída, na maioria dos casos, a aquisição de operon responsável pela produção de beta-lactamase do *Staphylococcus aureus* (ROSSI e

ANDREAZZI, 2005). Essa resistência pode não ser detectada por testes de sensibilidade de rotina devido ao erro na preparação do inóculo a ser analisado. Pequenas variações na concentração do inóculo podem levar a grandes variações na concentração inibitória mínima destes microrganismos. Este mecanismo de resistência é considerado mais raro, sendo encontrado em apenas 1% a 2% das cepas resistentes a ampicilina (ASLANGUL *et al.*, 2005). Atualmente, através do teste rápido da cefalosporina cromogênica, pode-se realizar uma pesquisa direta da presença da enzima beta-lactamase. A produção de beta-lactamase indica resistência a penicilina, ampicilina e a ureidopenicilinas (piperacilina e mezlocilina). Os *Enterococcus* beta-lactamases positivos são bastante raros, sendo recomendado o teste para detecção desta enzima somente em alguns casos como para pesquisa em isolados bacterianos obtidos a partir do sangue e líquido (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

3.8.2 Mecanismos de resistência aos Aminoglicosídeos

Os enterococos apresentam resistência intrínseca a baixos níveis aos aminoglicosídeos. Assim estes fármacos só apresentam efeito sinérgico quando associados aos antimicrobianos beta-lactâmicos ou glicopeptídeos, (ZARRILLI *et al.*, 2005). Isto ocorre porque a adição de um fármaco antimicrobiano que interrompe a síntese da parede celular desorganiza suficientemente o glicopeptídeo desta para que os aminoglicosídeos possam penetrar o citoplasma e ter acesso aos seus sítios ribossômicos (KONEMAN *et al.*, 2001; SHEPARD e GILMORE, 2002;).

Existem enterococos que expressam alto grau de resistência aos aminoglicosídeos e isto decorre geralmente da produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tais como 6'-acetiltransferase (AAC-6') e 2-fosfotransferase (APH-2"). Com exceção da AAC-6' do *Enterococcus faecium* que é cromossomicamente modificada, os genes correspondentes as demais enzimas são localizados em plasmídeos. Este alto grau de resistência a aminoglicosídeos leva a perda de sinergismo com antimicrobianos beta-lactâmicos e glicopeptídeos, não ocasionando desta maneira efeito bactericida no tratamento de infecções graves por enterococos (LECLERCQ *et al.* 1992; SHEPARD e GILMORE, 2002).

A detecção de altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos deve ser realizada através de discos com concentrações especiais ou por determinação da CIM por métodos de diluição. Na rotina dos testes de suscetibilidade, gentamicina e estreptomicina são os únicos aminoglicosídeos que devem ser testados, uma vez que funcionam como marcadores para os demais aminoglicosídeos (ROSSI e ANDREAZZI, 2005; KOLAR *et al.*, 2006).

O CLSI (2007) define como alto grau de resistência CIMs superiores a 500 µg/mL para gentamicina e CIMs superiores a 2.000 µg/mL para estreptomicina. Todo enterococo resistente a gentamicina é considerado resistente a todos os outros aminoglicosídeos, com exceção da estreptomicina, cuja resistência é determinada por um tipo particular de mecanismo (Tabela 2).

Tabela 2. *Enterococcus* spp. Interpretação da detecção de altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos (Adaptado de ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Gentamicina (500µg/mL)	Estreptomicina (2.000µg/mL)	Interpretação
Sensível	Sensível	HLAR ^a negativo para estreptomicina, gentamicina, tobramicina e netilmicina.
Sensível	Resistente	HLAR para estreptomicina. HLAR negativo para gentamicina, tobramicina e netilmicina.
Resistente	Resistente	HLAR para todos os aminoglicosídeos
Resistente	Sensível	HLAR para todos os aminoglicosídeos, exceto para estreptomicina

^a HLAR – High-level aminoglicosydes resistance (aminoglicosídeos resistentes em altos níveis)

3.8.3 Mecanismos de resistência à Vancomicina

Devido ao surgimento de resistência aos principais antimicrobianos utilizados no combate de infecções ocasionadas por enterococos, tornou-se crescente o uso de glicopeptídeos como vancomicina e teicoplanina, principalmente em caso de infecções mais graves (KIRST *et al.*, 1998; CORVALIN *et al.*, 2006).

A resistência à vancomicina em enterococos foi detectada pela primeira vez na Inglaterra no ano de 1986, em pacientes com insuficiência renal crônica, aproximadamente 30 anos após a introdução deste antimicrobiano (UTTLEY *et al.*, 1988). Nos Estados Unidos os primeiros isolamentos foram descritos em 1987, mas logo se seguiram relatos da Ásia, Austrália e África (MARIN, *et al.*, 1998). Na América Latina cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina foram detectadas pela primeira vez em 1998 no Brasil e na Argentina (DALLA COSTA *et al.*, 1998; MARIN, *et al.*, 1998).

De acordo com ROSSI e ANDREAZZI (2005), o percentual de infecções nosocomiais causadas por enterococos resistente a vancomicina nos EUA aumentou significativamente desde o seu descobrimento, sendo que em torno de 95% das cepas reconhecidas eram *Enterococcus faecium*. A emergência dessa resistência pode estar relacionada ao aumento do uso de vancomicina nos últimos anos, decorrente da terapêutica em colites associadas a antimicrobianos e em infecções por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA).

Até o momento foram descritos sete fenótipos de resistência a glicopeptídeos denominados de *VanA* a *VanG*, dos quais somente dois (*VanA* e *VanB*) tem impacto clínico pela sua capacidade de transferência entre espécies e gêneros diferentes e por, normalmente, conferirem alto níveis de resistência (CENTINKAYA *et al.*, 2000; BAZET *et al.*, 2005). As cepas com genótipo *vanA* apresentam alto índice de resistência à vancomicina (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) e teicoplanina (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$). Isto resulta da aquisição de novos determinantes genéticos de resistência carregados no transposon *Tn1546*, freqüentemente localizado em um plasmídeo. As cepas *vanB* apresentam uma indução de resistência de nível variado à vancomicina (CIM 4-1024 $\mu\text{g/mL}$) mas permanecem sensíveis a teicoplanina (CIM $< 0,5-1$ $\mu\text{g/mL}$). Os determinantes de resistência *vanB* residem geralmente no cromossomo, mas podem estar localizados em plasmídeos e serem transferidos por conjugação a certas cepas (LEME e FERREIRA, 2001; BAZET *et al.*, 2005). O fenótipo *VanC* está envolvido com resistência intrínseca de nível moderado ou baixo a vancomicina (CIM 2-32 $\mu\text{g/mL}$) e permanece sensível a teicoplanina (CIM 0,5-1 $\mu\text{g/mL}$). O *vanD*, descrito em *E. faecium*, confere resistência de nível moderado à vancomicina (CIM 16-64 $\mu\text{g/mL}$) e sensibilidade ou baixo nível de resistência à teicoplanina (CIM 2-4 $\mu\text{g/mL}$). Já o

fenótipo *vanE* foi descrito em amostra de *E. faecalis* apresentando baixo nível de resistência (CIM de 16 µg/mL) para vancomicina e sensível a teicoplanina (CIM 0,5 µg/mL). No ano de 2000 foi detectado um novo determinante genético denominado *vanG*, em *E. faecalis*, que confere resistência em níveis moderados de vancomicina e sensibilidade à teicoplanina (CENTINKAYA *et al.*, 2000; SANDRI, 2004; BAZET *et al.*, 2005) (Tabela 3).

Tabela 3. Características dos principais fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em *Enterococcus*.

Fenótipo	Gene	Expressão	Vancomicina MIC (µg/mL)	Teicoplanina MIC (µg/mL)	Espécies envolvidas
VanA	VanA	Induzível e transferível	≥ 64 Resistente	≥ 16 Resistente	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. galinarum</i> (raro)
VanB	VanB	Induzível e transferível	≥ 4 (16 a 64) Resistente	0,5 a 1 Sensível	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
VanC1	VanC1	Constitutiva e não transferível	2 a 32 Resistente	0,5 a 1 Sensível	<i>E. galinarum</i>
VanC2	VanC2	Constitutiva e não transferível	4 a 16 Resistente	0,5 a 1 Sensível	<i>E. casseliflavus</i>
VanC3	VanC3	Constitutiva e não transferível	4 a 16 Resistente	0,5 a 1 Sensível	<i>E. galinarum</i>
VanD	VanD	Em estudo	64 a 128 Resistente	4 a 8 Resistente	<i>E. faecium</i>
VanE	VanE	Em estudo	16 Resistente	0,5 a 1 Sensível	<i>E. faecalis</i>

Referente ao mecanismo molecular de resistência, o fenótipo mais estudado é o *VanA*. Os glicopeptídeos agem inibindo a síntese da parede celular através da sua ligação nas terminações D-Ala-D-Ala do precursor do peptideoglicano, impedindo a ação de enzimas envolvidas nas reações de transglicosilações e transpeptidação na síntese da parede celular bacteriana (Figura 1) (WOODFORD *et al.*, 1995; LEME e FERREIRA, 2001).

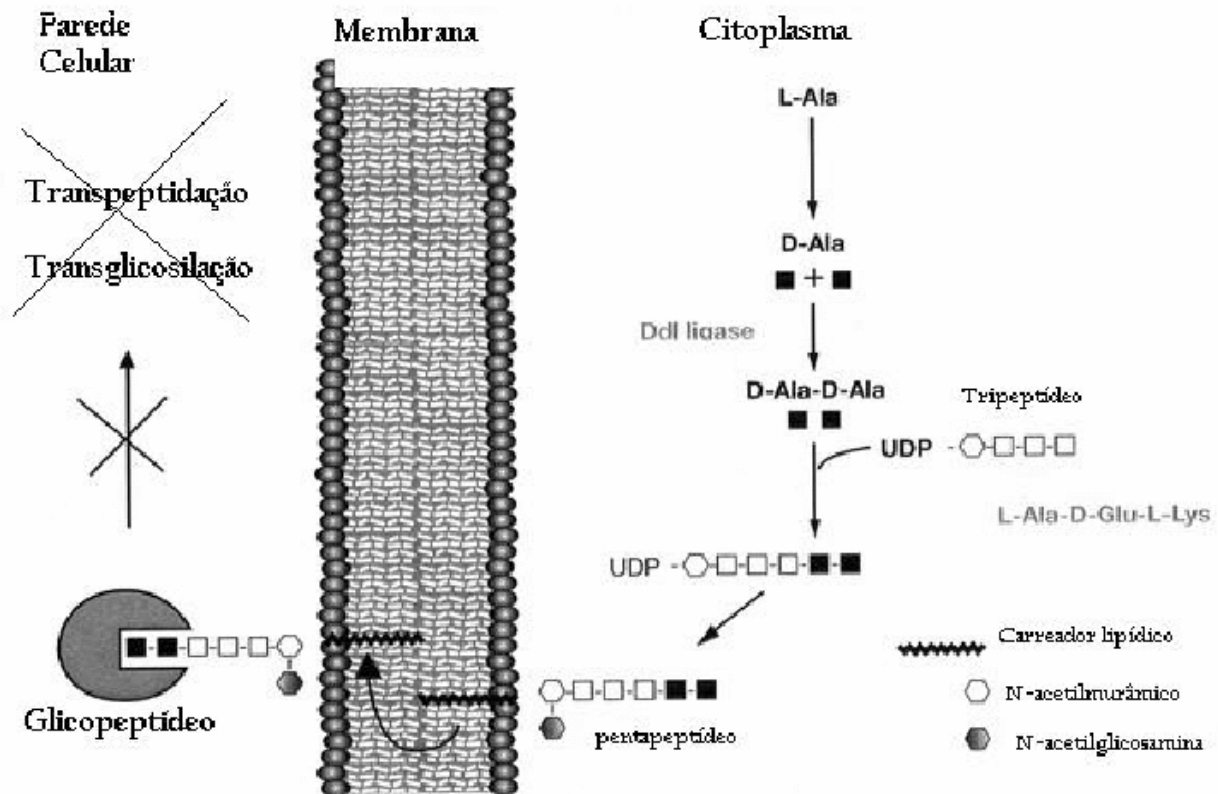


Figura 1. Síntese do peptídeoglicano e mecanismo de ação dos glicopeptídeos. Ligação do antimicrobiano ao C-terminal D-ala-D-ala do precursor do peptídeoglicano que impede as reações de transglicosilações e transpeptidação (COURVALIN, 2006).

O mecanismo de resistência das cepas *vanA* está codificado em sete genes, sendo três essenciais e quatro reguladores. A expressão destes genes tem como resultado final a síntese de terminações D-Ala-D-Lac, os quais são diferentes dos habituais (D-Ala-D-Ala) e isto impede a união do glicopeptídeo a seu sítio de união no precursor do peptídeoglicano (Figura 2) (WOODFORD *et al.*, 1995; CETINKAYA, 2000; SHEPARD e GILMORE, 2002).

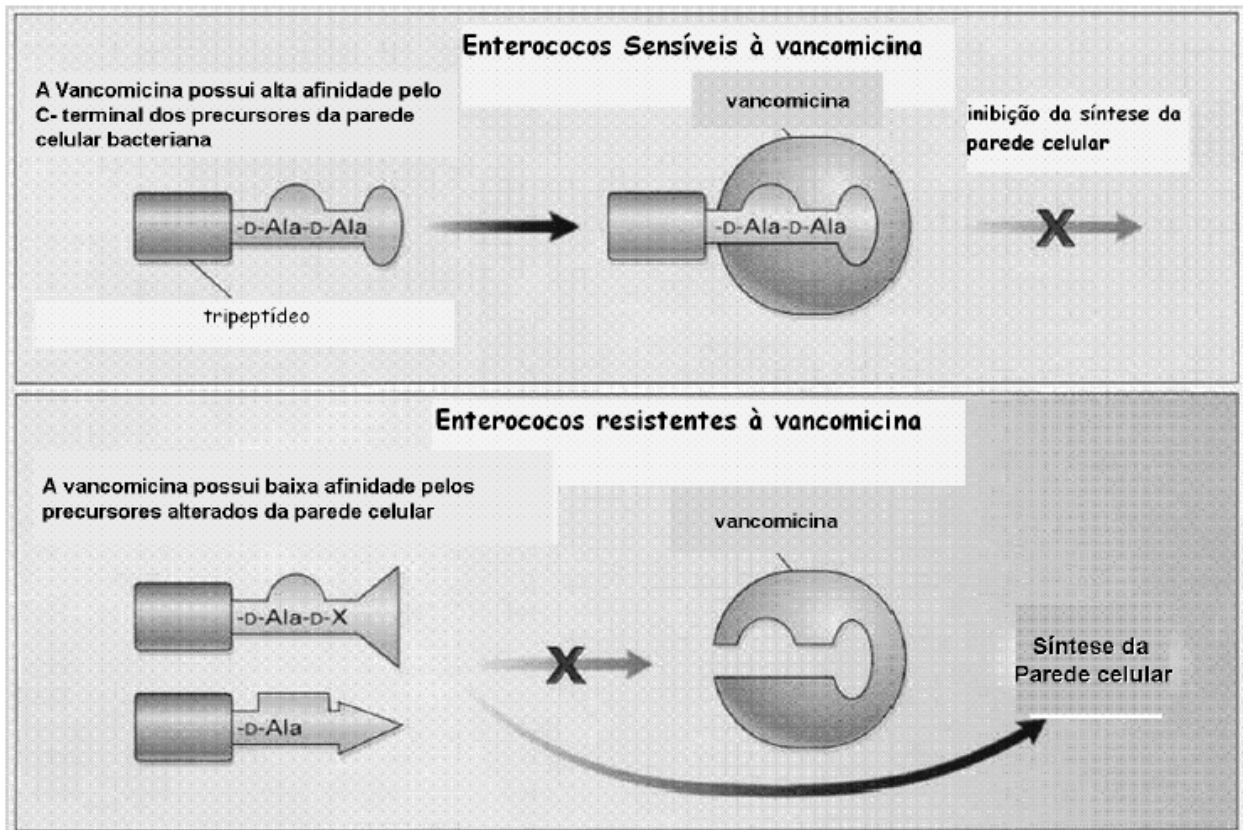


Figura 2. Esquema do mecanismo de resistência à vancomicina (MURRAY, 2000).

De todos representantes do gênero, o *E. faecium* é o que apresenta maior dificuldade de tratamento devido a predominância de resistência à vancomicina e também à ampicilina (PATTERSON *et al.*, 1990; SHEPARD e GILMORE, 2002; ZARRILLI *et al.*, 2005).

Os enterococos dispõem de vários sistemas de conjugação que permitem a disseminação de genes de resistência para outras bactérias. Estes sistemas incluem os plasmídeos que podem se replicar em várias outras bactérias Gram-positivas e também incluem os plasmídeos responsivos a ferormônios que podem ser transferidos entre cepas de *E. faecalis* numa frequência que pode chegar a 100%. Por fim um tipo especial de transposon de conjugação, ou seja, pode ser transferido de forma intercelular entre vários gêneros bacterianos e se integrar no genoma do novo hospedeiro bacteriano (ZARRILLI *et al.*, 2005).

A identificação da transferência de genes de resistência à vancomicina tanto por conjugação quanto através de transposição reforça a preocupação de

disseminação dessa resistência a bactérias mais patogênicas, como estafilococos e estreptococos, o que agrava as conseqüências clínicas (MURRAY, 2000).

De acordo com SANDRI (2004), pacientes com ERV estão relacionados a uma maior morbidade avaliada por um tempo de internação mais prolongado, maior consumo de antimicrobianos, por um maior número de infecções hospitalares bem como um maior número de outros germes isolados. No entanto, o ERV não aumenta a mortalidade quando presente apenas como colonizante. Porém, sua evolução para bacteremia pode ocorrer e, nesse caso, confere um risco de óbito significativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras bacterianas

As amostras utilizadas para a realização deste estudo foram provenientes de duas instituições de saúde situadas na cidade de Porto Alegre: o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e o Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL) entre dezembro de 2006 e março de 2007. Foram obtidas 203 amostras de enterococos isolados de materiais clínicos diversos a partir de pacientes encaminhados aos hospitais. As amostras foram independentes, onde foi considerada apenas a primeira cultura clínica positiva isolada com o mesmo germe, para um mesmo paciente, sendo as demais amostras excluídas deste estudo.

Durante a realização do estudo, foram utilizadas as seguintes amostras padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* PAD 380, *Enterococcus faecium* PAD 394, *Enterococcus casseliflavus* PAD 071, *Enterococcus gallinarum* PAD 118, *Enterococcus hirae* PAD 065, *Enterococcus raffinosus* PAD 411, *Enterococcus faecalis* PAD 400 (HLR-Ge) e *Enterococcus faecium* PAD 326 (HLR-St e HLR-Amp). As linhagens de enterococos identificados pela sigla PAD foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo e tiveram sua caracterização de espécies realizada através da análise dos perfis de proteínas totais, pela técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Foi determinado o coeficiente de concordância kappa (K) através do programa estatístico SPSS versão 15.0 para os resultados obtidos nos diferentes métodos de suscetibilidade e de determinação de espécies.

Esta pesquisa teve sua aprovação em seus aspectos éticos e metodológicos pelos seguintes comitês de ética em pesquisa: Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA (CEP/HCPA) e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP 06/03550) (ANEXOS 1 e 2).

4.2. Procedimentos de coleta

4.2.1 Obtenção das amostras

As placas de culturas bacterianas onde se evidenciou o crescimento de *Enterococcus* spp. foram separadas pelo pessoal técnico dos hospitais, sendo que nelas constavam a identificação da bactéria quanto ao gênero e o número da solicitação do exame no cadastro do hospital. As colônias foram repicadas para caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (OXOID, Basingstoke, England) com glicerol (16%) e armazenadas em freezer a 80 graus negativos.

A inoculação dos enterococos em caldo BHI com glicerol nos tubos do tipo Eppendorf foi realizada no HCPA pelo próprio pesquisador. No HSL a coleta foi realizada pelo pessoal técnico do laboratório. Os tubos contendo enterococos foram armazenados em congelador a temperatura de 80 °C negativos.

4.2.2 Preenchimento de fichas com dados relativos as amostras

Os dados relativos aos pacientes e aos materiais clínicos utilizados foram organizados em sistemas de fichas (ANEXOS 3 e 4) e buscavam informações a respeito de: hospital de origem, sexo, idade, unidade de internação ou ambulatorial e tipo de material clínico.

4.3. Caracterização do gênero

As amostras foram repicadas do freezer e semeadas em placas de ágar sangue (ágar trypticase soja + 5% sangue de carneiro) (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) e incubados por 24h a 35°C. Tendo por objetivo a confirmação da prévia identificação do gênero, foram realizados testes convencionais, seguindo as recomendações de FACKLAM e COLLINS (1989) e FACKLAM *et al.* (2002), que incluíram: observação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo Gram, produção de catalase, hidrólise da L-pirroglutamil-β-naftilamida (teste do PYR), hidrólise da esculina na presença de bile e crescimento em caldo com 6,5% de NaCl.

4.3.1 Observação da atividade da catalase

A técnica baseou-se na observação da formação de bolhas após a adição de uma gota de suspensão bacteriana em uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (Lifar, Porto Alegre, RS, Brasil).

4.3.2 Observação da hidrólise da L-pirroglutamil- β -naftilamida (teste de PYR)

O teste foi realizado através da utilização de um Kit de origem comercial denominado PYR Kit (Probac, Produtos bacteriológicos Ltda, São Paulo, Brasil). Impregnou-se o disco de PYR com água destilada estéril e se depositou sobre uma placa de Petri. Com o auxílio de uma alça, fez-se um esfregaço da bactéria isolada sobre o disco de PYR umedecido. Após 5 minutos a temperatura ambiente, colocou-se uma gota do PYR reagente, sendo que as reações positivas ocorrem em até 1 minuto. O desenvolvimento de uma cor vermelha indicava reação positiva e uma coloração amarela ou alaranjada indicava PYR negativo.

4.3.3 Hidrólise de esculina na presença de bile

Para a realização desta técnica utilizou-se o ágar bile-esculina (DIFCO) inclinado, sendo os tubos inoculados e incubados a 35°C, por 18 a 24 horas. Um resultado positivo foi considerado quando houve o escurecimento do meio o que indicou a hidrólise da esculina na presença de 40% de bile.

4.3.4 Avaliação do crescimento em caldo contendo cloreto de sódio (NaCl) a 6,5%

As amostras foram semeadas em caldo com 6,5% de NaCl (Probac, Produtos bacteriológicos Ltda, São Paulo, Brasil). A acidificação do meio (variação da cor púrpura para amarelo) indicava crescimento bacteriano e teste positivo.

4.4. Identificação de espécies de *Enterococcus*

4.4.1. Método convencional.

Foi utilizado um método simplificado baseado nos esquemas propostos por FACKLAM e COLLINS (1989) e FACKLAM *et al.* (2002). Os isolados que se enquadraram no gênero enterococos, foram submetidos a várias provas: produção de ácidos a partir de diferentes carboidratos (manitol, arabinose, lactose, sacarose, rafinose), produção de pigmento, motilidade, utilização do piruvato e hidrólise da arginina.

4.4.1.1 Utilização de carboidratos.

Foram inoculadas 2 gotas de uma suspensão bacteriana de cultura recente em 2 mL de caldo púrpura de bromocresol (Isofar) e posteriormente adicionado um disco (Laborclin - Produtos para laboratório Ltda) do carboidrato a testar (manitol, arabinose, lactose, rafinose e sacarose), proporcionando uma concentração final de 1% do carboidrato. Cada tubo foi selado com 0,5 mL de óleo mineral estéril (Nujol, Ind. Quim. e Farmacêutica Schering Plough S.A.). As leituras foram feitas durante um período de até 24 a 48 horas de incubação a 35°C. A utilização do carboidrato pela bactéria tornava o pH ácido com conseqüente viragem do indicador de púrpura de amarelo.

4.4.1.2 Produção de pigmento e verificação da motilidade.

A detecção da produção de pigmento amarelo foi feita pela análise de parte de uma colônia crescida na superfície de placa com ágar sangue (BioMérieux) após incubação a 35°C por 18-24 h. Com auxílio de um *swab*, examinou-se para a presença de cor amarela ou amarelo-alaranjada.

A motilidade foi avaliada em meio semi-sólido, utilizando o meio *Motility Medium* (DIFCO). O crescimento foi observado por 24 até 48 horas de incubação a 35°C.

4.4.1.3 Utilização do piruvato de sódio a 1%

Inoculou-se 1 gota de suspensão bacteriana em caldo infusão de cérebro coração contendo 1% triptona (DIFCO), 0,5% de extrato de levedura (DIFCO), 0,5% de K_2HPO_4 , 0,5% de NaCl e 0,01% do indicador de pH azul de bromotimol (Sigma). Os testes foram incubados a 35°C e a leitura feita em 24 até 48 horas, sendo que, a presença de uma coloração amarela indicava reação positiva.

4.4.1.4 Desaminação da arginina

Foi determinada em meio de *Decarboxylase Base Moeller* (DIFCO), acrescido de 1% de L-arginina (Sigma). Após inoculação da suspensão do microrganismo, foram acrescentados aproximadamente 0,5 mL de óleo mineral estéril (Nujol, Ind. Quim. e Farmacêutica Schering Plough S.A.). Após incubação a 35°C e observação por até sete dias, a coloração púrpura (cor original) indicava reação positiva, significando que ocorreu alcalinização do meio devido à hidrólise da arginina e conseqüente liberação de grupos amina. A presença de uma coloração amarela foi indicativa de uma reação negativa, o que demonstrava apenas a ocorrência de acidificação do meio devido ao consumo de glicose.

4.4.2 Caracterização por sistema automatizado (VITEK 2, BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França)

Foram testadas 80 amostras bacterianas dentre as quais: 56 *E. faecalis*, incluindo neste grupo 8 amostras que apresentaram reações atípicas em algum teste do método convencional, 9 *E. faecium*, 2 *E. casseliflavus*, 1 *E. gallinarum*, 1 *E. hirae*. Também fizeram parte destas análises as seguintes amostras padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (n=1), *Enterococcus faecium* PAD 236 (n=2), *Enterococcus casseliflavus* PAD 071 (n=2), *Enterococcus gallinarum* PAD 118 (n=2), *Enterococcus hirae* PAD 065 (n=2), *Enterococcus raffinosus* PAD 411 (n=2).

Foram utilizados os cartões ID-GPC do VITEK 2 para identificação de cocos Gram-positivos, conforme as instruções do fabricante no que diz respeito ao preparo do inóculo, incubação, leitura e interpretação.

Resumidamente, as suspensões foram preparadas pela emulsificação dos isolados bacterianos em solução salina ao equivalente 0,5% da escala de McFarland. Os painéis testados (ID-GPC) continham testes fluorimétricos que incluíam testes de mudanças de pH e para detecção de aminopeptidases e oxidases. Além disso, os painéis incluem testes de fermentação, de descarboxilases e outros (urease, piruvato, optoquina, novobiocina, sulfato de polimixina B e NaCl 6%). Os cartões foram automaticamente preenchidos por um sistema a vácuo e inserido dentro do módulo de incubação e leitura (temperatura de incubação, 35,5°C), e submetido a uma medição cinética fluorescente a cada 15 minutos.

4.5. Testes de suscetibilidade

4.5.1 Método de disco-difusão

Quatro ou cinco colônias bem isoladas e com aspecto similar foram transferidas para um tubo contendo 4 a 5 mL de caldo nutritivo.

As amostras foram incubadas a 35°C e a turvação ajustada equivalente ao tubo 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). O inóculo foi semeado em ágar Mueller-Hinton (BioMérieux).

A colocação dos discos de antimicrobianos foi realizada com o auxílio de um dispensador de discos (OXOID, Basingstoke, England) sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton (BioMérieux). Foram testados os seguintes agentes antimicrobianos entre os recomendados pelo CLSI (2007) para *Enterococcus spp*: ampicilina (10µg), gentamicina (120µg), estreptomicina (300µg), quinupristina-dalfopristina (15µg), vancomicina (30µg), rifampicina (5µg), eritromicina (15µg), ciprofloxacino(5µg), nitrofurantoína (300µg), teicoplanina (30µg), tetraciclina (30µg) e cloranfenicol (30µg) (OXOID, Basingstoke, England).

As placas foram incubadas em estufa a 35°C durante 16 a 18 horas e também em 24 horas para a vancomicina. A medida dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor de cada disco foi efetuada, utilizando uma régua padrão.

As cepas de referências: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* PAD 400 (HLR-Ge) e *Enterococcus faecium* PAD326 (HLR-St e HLR-Amp) foram testadas em paralelo aos testes das amostras.

A categorização das amostras em sensível, intermediária ou resistente, foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo CLSI (2007) (Tabela 4).

Tabela 4. Padrão de interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano para *Enterococcus* spp.

Agente antimicrobiano	Concentração do disco	Diâmetro da zona, total aproximado em mm		
		R ^b	I ^c	S ^d
Ampicilina	10 µg	≤ 16	-	≥ 17
Estreptomicina ^a	300 µg	6	7-9	≥ 10
Gentamicina ^a	120 µg	6	7-9	≥ 10
Vancomicina	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Teicoplanina	30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Ciprofloxacino	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Rifampicina	5 µg	≤ 16	17-19	≥ 20
Quinupristina-dalfopristina	15 µg	≤ 15	16-18	≥ 19
Nitrofurantóina	300 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Cloranfenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18

^a High-Level Aminoglycosides Resistance – Aminoglicosídeos resistentes a altos níveis

^b Resistente, ^c Intermediário, ^d Sensível

4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Nesta etapa da pesquisa, foi determinada a CIM das 203 amostras clínicas de enterococos aos antimicrobianos ampicilina, estreptomicina e gentamicina (Sigma, Chemical Company, St Louis, MO, EUA) através da diluição em ágar (CLSI, 2003).

Foram utilizadas como controle de qualidade as seguintes amostras padrão: *E. faecalis* ATCC 29212 (suscetível a ampicilina, gentamicina e estreptomicina), *E. faecalis* PAD 400 (resistente a altos níveis de gentamicina - HLR-Ge), *E. faecium* PAD 326 (resistente a altos níveis de estreptomicina - HLR-St e ampicilina).

Foram testadas diferentes concentrações para os antimicrobianos aminoglicosídeos (Tabela 5). Para a ampicilina avaliamos apenas duas diferentes concentrações (8 e 16 µg/mL).

Tabela 5. Concentrações testadas de aminoglicosídeos para a determinação da CIM em amostras de *Enterococcus* spp.

Antimicrobiano	Concentração (µg/mL)			
Estreptomicina	500	1.000	2.000	3.000
Gentamicina	125	250	500	1.000

O CLSI (2003) sugere como ponto de corte para detecção de resistência à níveis elevados de antimicrobianos aminoglicosídeos, segundo a técnica de diluição em ágar, valores superiores a 2.000 µg/mL para estreptomicina e superior a 500 µg/mL para gentamicina. Para a ampicilina, amostras com CIM menor ou igual a 8 µg/mL são classificadas como suscetíveis, sendo consideradas resistentes aquelas com CIM maior ou igual a 16 µg/mL.

As soluções antimicrobianas foram preparadas 10 vezes mais concentradas, usando os solventes e diluentes indicados para cada antimicrobiano (CLSI, 2003).

Para a preparação das placas, utilizou-se ágar Mueller-Hinton (OXOID, Basingstoke, England), distribuído em tubos de rosca, a razão de 18mL de meio por tubo. Os tubos foram esterilizados e resfriados até 45°C para acrescentar 2mL do antimicrobiano, sendo em seguida vertido em placas de petri estéreis.

Para preparar os inóculos, quatro ou cinco colônias isoladas foram suspensas em 5mL de caldo nutritivo. Os tubos foram incubados a 35°C até o aparecimento de turvação equivalente ao nº 0,5 da escala de McFarland. Uma vez ajustada a turbidez do inóculo, diluiu-se 1:10 em solução salina estéril.

Mediante o emprego do replicador do tipo Steers, depositaram-se volumes de 1µL de cada amostra na superfície das placas contendo os diferentes antimicrobianos. As placas foram incubadas a 35°C e a leitura foi feita após 24 h. A presença de mais de uma colônia foi considerada como resistência à concentração do antimicrobiano na placa e a CIM foi estabelecida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Meios de cultura sem antimicrobianos

foram utilizados como controle do crescimento microbiano. Todos os testes foram efetuados em duplicata.

4.6. Tipagem molecular (genotipagem)

A determinação do perfil genotípico foi realizada na Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram testadas 17 amostras de *Enterococcus faecalis* HLR para os aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina) e 18 amostras *Enterococcus faecalis* HLR para gentamicina. Foi utilizada a técnica de macrorrestrição do DNA bacteriano seguido de eletroforese em campo pulsado (PFGE).

4.6.1 Preparação do DNA

O DNA genômico das amostras de enterococos analisadas foi preparado em gel de agarose de acordo com o protocolo descrito por KAUFMANN (1998), com algumas modificações. Com a obtenção das colônias, após crescimento por 24 horas em ágar-sangue, foi preparada uma suspensão bacteriana de aproximadamente 10^9 UFC/mL para cada amostra. Essas suspensões foram acrescidas de 300 μ L de tampão SE (75mM NaCl e 25 mM EDTA Na₂ [pH 7,5]) e misturadas em igual volume de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (GIBCO BRL, Nova Iorque) em banho-maria a 56°C. A mistura foi colocada em um molde para blocos de agarose de 100 μ L (Bio-Rad, Califórnia). Após a solidificação, os blocos de agarose foram incubados seqüencialmente nas seguintes soluções e tempos indicados: 1,5 mL de tampão de lise (Tris-HCl 6mM, EDTA 100 mM [pH7,5], NaCl 1M, Brij 58 0,5%, Deoxicolato de sódio 0,2%, Lauril sarcosina de sódio 0,5%), contendo lisozina a 1800 μ g/mL (Sigma, St. Louis) e lisostafina a 10 U/ μ L (Sigma, St. Louis) em *overnight* a 37°C; 2 vezes 1,5 mL de tampão de proteólise com proteinase K (GIBCO BRL, Nova Iorque) a 50 mg/mL (EDTA 0,5M [pH 9,5], Lauril sarcosina de sódio 1%), os quais foram misturados no momento do uso e, posteriormente, incubados por 24 horas a 56°C; e 1,5 mL de tampão TE diluído (Tris (hidroximetil) metilamina 10mM, EDTA Na₂ 10mM [pH 7,5]) por 10 minutos a 4°C para inativar a proteinase K. Após as lavagens os blocos de agarose foram estocados a 4°C até digestão com enzima de restrição.

4.6.2 Digestão do DNA

Anteriormente à digestão do DNA bacteriano com a enzima de restrição, os blocos de agarose foram cortados com bisturi esterilizado. Um terço desses blocos foram colocados em *ependorfs*, devidamente numerados, contendo 98 µL de tampão de reação e incubados a 4°C por 30 minutos.

As reações foram realizadas com adição de 98 µL/isolado de solução, contendo 10U da enzima de restrição *Sma*I, conforme indicado pelo fabricante (GIBCO BRL, Nova Iorque). A digestão foi realizada durante 4 horas em banho-maria a 30°C. Após a digestão, as amostras foram aplicadas no gel para a realização da eletroforese em campo pulsado.

4.6.3 Eletroforese em campo pulsado (*pulsed field gel eletrophoresis*-PFGE)

Os blocos de DNA já digeridos foram aplicados nos respectivos poços do gel de agarose a 1%. Um marcador de peso molecular de 50 a 1000 Kb (Sigma, St. Louis) foi aplicado nas extremidades do gel. Os fragmentos da macrorrestrição foram separados pelo sistema de eletroforese pulsada comercial (CHEF-DR®II; Bio-Rad, Califórnia). A eletroforese foi realizada em tampão TBE 0,5x (TBE 10x foi preparado com Tris 44,5 mM [pH 7,4], EDTA 0,1 mM e ácido bórico 44,5mM) a 14°C. As condições da corrida do PFGE foram: pulso inicial de 5 e final de 35 segundos durante um período de 22 horas a 5,9 V/cm. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com uma solução aquosa de 1 µg/mL de brometo de etídio (GIBCO BRL, Nova Iorque). A descoloração consistiu de 3 lavagens com água destilada, de 30 em 30 minutos cada. As bandas de DNA foram visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta (UV).

4.7. Tratamento de resíduos e segurança do trabalho

Procedimentos padronizados de segurança foram utilizados em todas as etapas experimentais e incluíram, fundamentalmente, uso de luva e avental. Todos os materiais contaminados e/ou potencialmente tóxicos oriundos de resíduos químicos ou de material biológico, gerados durante a execução da pesquisa, foram segregados, acondicionados e identificados segundo normas do Plano de

Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT 01/07 e também em conformidade com a Resolução Normativa 02/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5 RESULTADOS

Este estudo investigou a prevalência de espécies e os padrões de resistência a diferentes antimicrobianos entre 203 amostras de enterococos isoladas de diversos materiais clínicos, provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA; n = 121) e do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL; n = 82), durante o período de dezembro/2006 a março/2007.

Entre as amostras isoladas, 116 (57,1%) se originaram de pacientes internados. Essa característica foi verificada tanto no HCPA como no HSL (61,2% e 51,2% respectivamente), porém, no HSL, a quantidade de isolados de origem ambulatorial e hospitalar foram semelhantes (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição de acordo com a origem dos enterococos nos hospitais estudados.

Origem dos enterococos	Instituição de saúde ¹		Total (%)
	HCPA (%)	HSL (%)	
Pacientes Internados	74 (61,2)	42 (51,2)	116 (57,1)
Pacientes ambulatoriais	47 (38,8)	40 (48,8)	87 (42,9)
Total (%)	121 (100)	82 (100)	203 (100)

¹ HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSL, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Entre os 116 enterococos obtidos de pacientes internados, foi verificada a seguinte distribuição de acordo com a unidade de origem: 52 (44,8%) da clínica médica, 39 (33,6%) do bloco cirúrgico, 13 (11,2%) UTI adulto, 6 (5,2%) UTI pediátrica, 3 (2,6%) pediatria e 3 (2,6%) clínica obstétrica. Observamos também que no HSL a maioria dos isolados foi proveniente da clínica médica, enquanto que, no HCPA o maior percentual de isolados foi a partir de pacientes provenientes do bloco cirúrgico (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos enterococos por origem dos pacientes internados.

Unidade	Instituição de saúde ¹		Total (%)
	HCPA (%)	HSL (%)	
Clínica médica	24 (32,4)	28 (66,7)	52 (44,8)
Bloco cirúrgico	31 (41,9)	8 (19)	39 (33,6)
UTI adultos	9 (12,2)	4 (9,5)	13 (11,2)
UTI pediátrica	5 (6,8)	1 (2,4)	6 (5,2)
Pediatria	3 (4)	0 (0)	3 (2,6)
Clínica obstétrica	2 (2,7)	1 (2,4)	3 (2,6)
Total (%)	74 (100)	42 (100)	116 (100)

¹ HCPA , Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSL, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

O material clínico onde se isolou maior número de enterococos em ambos os hospitais foi a urina (64,5%), seguido de hemocultura, líquidos, secreções em geral e material de biópsia (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição de enterococos de acordo com o tipo de material clínico.

Material Biológico	Instituição de saúde ¹		Total (%)
	HCPA (%)	HSL (%)	
Urina	71 (58,7)	60 (73,2)	131 (64,5)
Hemocultura	9 (7,4)	11 (13,4)	20 (9,8)
Líquidos	12 (9,9)	4 (4,9)	16 (7,9)
Secreções em geral	11 (9,1)	3 (3,7)	14 (6,9)
Material de Biópsia	8 (6,6)	2 (2,4)	10 (4,9)
Abcesso	6 (5,0)	1 (1,2)	7 (3,5)
Ponta de cateter	3 (2,5)	1 (1,2)	4 (2,0)
Escarro	1 (0,8)	0 (0)	1 (0,5)
Total (%)	121 (100)	82 (100)	203 (100)

¹ HCPA , Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSL, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Foram identificadas as espécies das 203 amostras de enterococos através do método convencional, sendo que, em 195 isolados (96,1%) obtivemos a identificação de espécies sem ocorrência de reações atípicas. Em 8 isolados (3,9%), houve divergências no teste de fermentação da lactose, sendo todos os outros testes condizentes com a espécie *E. faecalis*.

O *E. faecalis* foi à espécie com maior prevalência entre isolados do HCPA e HSL, sendo encontrado em 190 amostras (93,6%), seguido de 9 *E. faecium*, 2 *E. casseliflavus*, 1 *E. gallinarum* e 1 *E. hirae* (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição das espécies de *Enterococcus* entre 203 isolados, segundo um método manual convencional para identificação.

Espécie	Instituição de saúde		Total (%)
	HCPA	HSL	
<i>E. faecalis</i>	112	78	190 (93,6)
<i>E. faecium</i>	6	3	9 (4,4)
<i>E. casseliflavus</i>	2	0	2 (1,0)
<i>E. gallinarum</i>	0	1	1 (0,5)
<i>E. hirae</i>	1	0	1 (0,5)
Total	121	82	203 (100)

Em 80 amostras previamente identificadas à nível de espécies pelo método de convencional, foi empregado um método automatizado de identificação (VITEK 2, BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França). Foi obtida uma concordância entre os dois métodos em 71 amostras (88,7%; $\kappa = 0,74$). Em 9 amostras (11,3%) houve discrepância entre as identificações (Tabela 10).

Tabela 10. Discrepâncias entre identificações de espécies de enterococos: sistema VITEK 2 e método convencional.

Número de isolados	Espécies identificadas	
	Método de referência	Sistema VITEK 2
3	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i>
2	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. durans</i>
2	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>
1	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> - <i>E. casseliflavus</i> ¹
1	<i>E. hirae</i>	<i>E. gallinarum</i>

¹ Identificação com baixa discriminação

A identificação de *E. faecalis* demonstrou muito boa concordância entre os métodos analisados ($\kappa = 0,82$). Considerando o método de FACKLAM e COLLINS (1989) e FACKLAM *et al.* (2002) como método padrão, o *E. faecalis* foi corretamente identificado pelo sistema VITEK 2 em 96,5% dos isolados. Em apenas 2 amostras houve discrepância, sendo que, o sistema VITEK 2 identificou *E. gallinarum* e *E. durans*.

Para o *E. faecium*, 72,7% dos isolados foram corretamente identificados ($\kappa=0,79$); três isolados foram classificados como: *E. faecalis*, *E. avium* e *E. gallinarum* no sistema automatizado.

Quanto a identificação de espécies não-*E. faecalis* e não-*E. faecium*, o sistema VITEK 2 apresentou moderada concordância de identificação com o método de referência ($\kappa=0,60$). *E. raffinosus* foi a única espécie onde houve total concordância entre os métodos (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação entre a determinação de espécies de *Enterococcus* em 80 amostras previamente identificados pelo método convencional com o sistema VITEK 2.

Espécie	Número de amostras identificadas	
	Método convencional	Sistema VITEK 2
<i>E. faecalis</i>	57	55
<i>E. faecium</i>	11	8
<i>E. gallinarum</i>	3	2
<i>E. casseliflavus</i>	4	2
<i>E. hirae</i>	3	2
<i>E. raffinosus</i>	2	2

Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

As taxas de resistência aos antimicrobianos testados contra as 203 amostras pela técnica de disco-difusão foram os seguintes: 2,5% à ampicilina, 0,5% à vancomicina, 0,5% a teicoplanina, 33% ao cloranfenicol, 2% a nitrofurantoína, 62,1% a eritromicina, 64,5% a tetraciclina, 24,6% a rifampicina, 30% a ciprofloxacino e 87,2% a quinupristina-dalfopristina. (Tabela 12).

Tabela 12. Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco-difusão de 203 amostras de enterococos provenientes de duas instituições de saúde de Porto Alegre, RS.

Antimicrobianos	Sensível n (%)	Intermediário n (%)	Resistente n (%)
Ampicilina	198 (97,5)	NA	5 (2,5)
Estreptomicina (HLR-St)¹	130 (64)	0 (0)	73 (36)
Gentamicina (HLR-Ge)²	156 (76,8)	2 (1)	45 (22,2)
Vancomicina	200 (98,5)	2 (1)	1 (0,5)
Teicoplanina	202 (99,5)	0 (0)	1 (0,5)
Cloranfenicol	131 (64,5)	5 (2,5)	67 (33)
Nitrofurantoína	195 (96)	4 (2)	4 (2)
Eritromicina	15 (7,4)	62 (30,5)	126 (62,1)
Tetraciclina	68 (33,5)	4 (2)	131 (64,5)
Rifampicina	71 (35)	82 (40,4)	50 (24,6)
Ciprofloxacino	114 (56,2)	28 (13,8)	61 (30)
Quinupristina-dalfopristina	12 (5,9)	14 (6,9)	177 (87,2)

¹ HLR-St: Resistência a níveis elevados de estreptomicina.

² HLR-Ge: Resistência a níveis elevados de gentamicina.

A prevalência das amostras resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR) foi de 36% para a estreptomicina e 22,2% para a gentamicina. Por sua vez a presença de resistência concomitante a ambos, estreptomicina e gentamicina (HLR St/Ge), ocorreu em 21 isolados, representando 10,3% do total de amostras estudadas.

Verificamos elevada resistência para determinados antimicrobianos, principalmente para a eritromicina, tetraciclina e quinupristina-dalfopristina (Q/D) (62,1%, 64,5% e 87,2%, respectivamente). Por outro lado, observamos maior suscetibilidade a nitrofurantoína e uma resistência moderada a cloranfenicol, rifampicina e ciprofloxacino (33%, 24,6% e 30%, respectivamente).

A Tabela 13 demonstra os perfis de susceptibilidade para cada hospital estudado, de acordo com o teste de disco-difusão. HLR-St no HCPA e HSL foi de 34,7% e 37,8% respectivamente e HLR-Ge em 17,4% e 29,3% respectivamente. A concomitante resistência a estes dois antimicrobianos ocorreu em 8,3% e 13,4% dos isolados obtidos do HCPA e HSL, respectivamente. O *E. faecium* apresentou uma maior prevalência de HLR-St, 55,5% contra 35,3% dos *E. faecalis*. No entanto, para a gentamicina, ambas as espécies, apresentaram perfil de resistência semelhantes, 22,2% e 21,6% respectivamente.

Em 85% das amostras que apresentavam HLAR, observamos ocorrência de resistência a pelo menos outros 4 antimicrobianos usados como opção terapêutica. Ainda, dentre as duas espécies mais prevalentemente isoladas, 52,6% dos *E. faecalis* e 62,2% dos *E. faecium* eram resistentes a pelo menos 3 antimicrobianos.

Entre as 5 amostras resistentes a ampicilina, a maioria foi *E. faecium* (4 isolados). O *E. faecalis* é intrinsecamente resistente a Q/D, sendo que este resultado foi detectado em 91% das amostras. Para o *E. faecium*, foi observado uma prevalência de resistência de 11,1% a Q/D.

Foi isolada uma amostra resistente a vancomicina e teicoplanina. Resistência intermediária a vancomicina foi observada em dois isolados identificados como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

Tabela 13. Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco-difusão de amostras de enterococos conforme cada instituição [HCPA (n = 121) e HSL (n = 82)].

Antimicrobianos	Sensível n (%)		Intermediário n (%)		Resistente n (%)	
	HCPA ¹	HSL ²	HCPA	HSL	HCPA	HSL
Ampicilina	116 (95,8)	82 (100)	NA	NA	5 (4,2)	0 (0)
Estreptomicina (HLR-St) ³	79 (65,3)	51 (62,2)	0 (0)	0 (0)	42 (34,7)	31 (37,8)
Gentamicina (HLR-Ge) ⁴	98 (81)	58 (70,7)	2 (1,6)	0 (0)	21 (17,4)	24 (29,3)
Vancomicina	119 (98,4)	81 (98,8)	1 (0,8)	1 (1,2)	1 (0,8)	0 (0)
Teicoplanina	120 (99,2)	82 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (0,8)	0 (0)
Cloranfenicol	85 (70,2)	46 (56,1)	4 (3,3)	1 (1,2)	32 (26,5)	35 (42,7)
Nitrofurantoína	117 (96,7)	78 (95,1)	3 (2,5)	1 (1,2)	1 (0,8)	3 (3,7)
Eritromicina	10 (8,3)	5 (6,1)	42 (34,7)	20 (24,4)	69 (57)	57 (69,5)
Tetraciclina	43 (35,5)	25 (30,5)	3 (2,5)	1 (1,2)	75 (62)	56 (68,3)
Rifampicina	40 (33)	31 (37,8)	49 (40,5)	33 (40,2)	32 (26,5)	18 (22)
Ciprofloxacino	73 (60,3)	41 (50)	16 (13,2)	12 (14,6)	32 (26,5)	29 (35,4)
Quinupristina-dalfopristina	8 (6,6)	4 (4,9)	9 (7,4)	5 (6,1)	104 (86)	73 (89)

¹ HCPA , Hospital de Clínicas de Porto Alegre

² HSL, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

³ HLR-St: Resistência a níveis elevados de estreptomicina.

⁴ HLR-Ge: Resistência a níveis elevados de gentamicina.

Teste de diluição em ágar

A suscetibilidade de enterococos a níveis elevados de aminoglicosídeos e à ampicilina foi também determinada pelo método de diluição em ágar. Houve excelente concordância entre as taxas de resistência observadas nos métodos estudados ($\kappa = 0,89$) (Tabela 14).

Considerando o método de ágar diluição como padrão, a classificação das discrepâncias foi definida em três categorias: erro muito maior (*very major error*-VME), suscetível por disco-difusão mas resistente por diluição em ágar; erro maior (*major error* - ME), resistente por disco-difusão mas suscetível por diluição em ágar; erro menor (*minor error* - MI), resistência intermediária por disco-difusão mas resistente ou sensível por diluição em ágar.

A resistência à ampicilina por ambos os métodos avaliados foi idêntica (2,5%). Foram observadas discrepâncias entre os resultados dos testes com HLR St ($\kappa = 0,86$) e HLR-Ge ($\kappa = 0,87$). Para a gentamicina foi observado VME em um caso (1,3%) e MI em dois outros (2,6%). Com a estreptomicina observamos discrepâncias em 3 casos (6,2%), todos VME. Não foi constatada ocorrência de ME para nenhum dos três antimicrobianos testados.

Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de disco-difusão e diluição em ágar para detecção de HLAR e ampicilina.

Agente Antimicrobiano ¹		Nº de amostras resistentes (%)	
		Disco difusão	Diluição em ágar
Ampicilina	10 µg	5 (2,5%)	-
	≥ 16 µg/mL	-	5 (2,5%)
Estreptomicina	300 µg	73 (36%)	-
	> 2000 µg/mL	-	76 (37,4%)
Gentamicina	120 µg	45 (22,2%)	-
	> 500 µg/mL	-	48 (23,6%)

¹ Pontos de corte utilizados para determinação da resistência pelo método de disco difusão e diluição em ágar, respectivamente: ampicilina: ≥ 17mm e ≤ 16mm ou ≤ 8µg/mL e ≥ 16µg/mL; estreptomicina: ≥ 10mm e ≤ 6mm ou ≤ 2000µg/mL e > 2000µg/mL; gentamicina: ≥ 10mm e ≤ 6mm ou ≤ 500µg/mL e > 500µg/mL. (CLSI, 2007)

A CIM aos aminoglicosídeos foi determinada pelo teste de diluição em ágar (Tabela 15). Para a gentamicina observamos 155 amostras suscetíveis ($CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$), sendo que a grande maioria, 144 (92,9%) apresentaram suscetibilidade a baixa concentração ($CIM \leq 125 \mu\text{g/mL}$). Entre os 48 isolados com altos níveis de resistência a gentamicina ($CIM > 500 \mu\text{g/mL}$), a maioria 41 (85,4%) apresentaram $CIM > 1000 \mu\text{g/mL}$.

Com relação a estreptomicina em 86,6% dos isolados suscetíveis ($CIM \leq 2000 \mu\text{g/mL}$) a CIM foi $\leq 500 \mu\text{g/mL}$. Assim como verificado para a gentamicina, houve uma menor incidência (10,2%) de enterococos que apresentaram CIM na faixa ($> 1000 - \leq 2000 \mu\text{g/mL}$) próxima ao limite de sensibilidade indicado para o método.

Para os isolados com HLR à estreptomicina ($CIM > 2000 \mu\text{g/mL}$), foi verificado uma distribuição semelhante, 52,6% e 47,3%, entre as faixas de $CIM > 2000 - 3000 \mu\text{g/mL}$ e $> 3000 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 15. Determinação da CIM para estreptomicina e gentamicina pelo método de diluição em ágar de 203 amostras de enterococos isoladas em dois hospitais de Porto Alegre, RS.

Estreptomicina			Gentamicina		
CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Categoria interpretativa	Nº de isolados (%)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Categoria interpretativa	Nº de isolados (%)
≤ 500	S	110 (86,6)	≤ 125	S	144(92,9)
$>500-\leq 1000$	S	4 (3,2)	$>125-\leq 250$	S	4 (2,6)
$>1000-\leq 2000$	S	13 (10,2)	$>250-\leq 500$	S	7 (4,5)
$>2000-\leq 3000$	R	40 (52,6)	$>500-\leq 1000$	R	7 (14,6)
> 3000	R	36 (47,3)	>1000	R	41 (85,4)

Caracterização dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Para o estudo das relações clonais, foram avaliadas 35 amostras de *E. faecalis*, sendo, 17 resistentes a altos níveis de gentamicina e estreptomicina (HLR-Ge/St) concomitantemente e 18 resistentes a altos níveis de gentamicina. Todas foram genotipadas por PFGE após terem sido digeridas com a enzima de restrição *Sma*I.

Entre as 17 amostras de *E. faecalis* com HLR-Ge/St, observamos perfil genético idêntico em 8 amostras, por não apresentarem nenhuma diferença visível entre as bandas (perfil A). Observamos também cinco amostras demonstrando estreita similaridade nos perfis de PFGE com o grupo predominante A. Estas se diferenciavam entre si e do grupo predominante em apenas duas bandas, sendo então classificadas em subgrupos denominados A1, A2, A3, A4 e A5. As quatro amostras restantes apresentaram perfis migratórios com mais de sete bandas diferentes, sendo consideradas diferentes do clone padrão e denominadas B, C, e D. Duas amostras foram classificadas no grupo D (Figura 3 e Tabela 16).

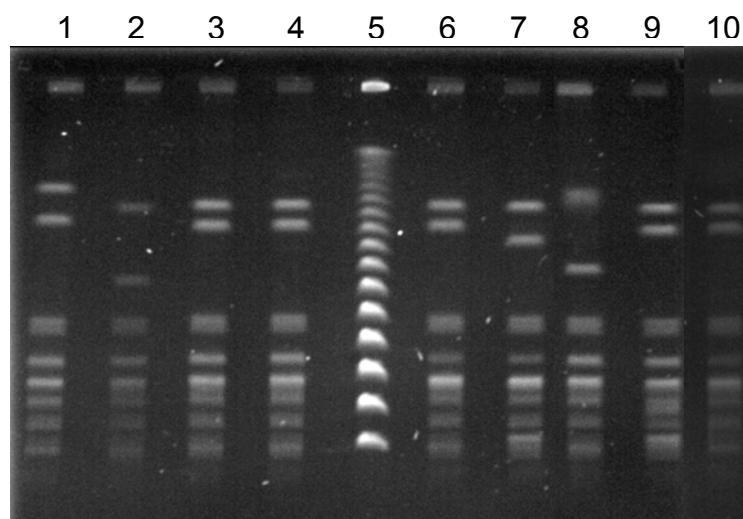


Figura 3. Perfil de macrorrestrrição de DNA por PFGE em amostras de *Enterococcus faecalis* apresentando HLR-Ge/St. Amostras do HSL, linhas 1 a 4 (145, 154, 160, 162) e 6 a 8 (179, 184, 189). Linha 5, MPM – marcador de peso molecular. Amostras do HCPA, linhas 9 e 10 (12 e 15).

Tabela 16. Características das amostras de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de estreptomicina e gentamicina analisadas por eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Amostra	Instituição ^a	Data do isolamento	Fonte	HLR ^b	PFGE
6	HCPA	Dez. 2006	Secreção	GE/ST	A
9	HCPA	Dez. 2006	Urina	GE/ST	B
12	HCPA	Dez.2006	Urina	GE/ST	A
15	HCPA	Dez. 2006	Urina	GE/ST	A
19	HCPA	Dez. 2006	Urina	GE/ST	C
25	HCPA	Jan. 2007	Urina	GE/ST	A1
104	HCPA	Jan. 2007	Urina	GE/ST	D
142	HSL	Dez. 2006	Urina	GE/ST	D
145	HSL	Dez. 2006	Urina	GE/ST	A2
154	HSL	Dez. 2006	Urina	GE/ST	A3
160	HSL	Jan. 2007	Urina	GE/ST	A
162	HSL	Jan. 2007	Urina	GE/ST	A
179	HSL	Jan. 2007	Urina	GE/ST	A
184	HSL	Jan. 2007	Urina	GE/ST	A4
189	HSL	Fev. 2007	Urina	GE/ST	A5
191	HSL	Fev. 2007	Sangue	GE/ST	A
203	HSL	Fev. 2007	Urina	GE/ST	A

^aInstituição: HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; HSL, Hospital São Lucas da PUC-RS

^bResistência a níveis elevados de aminoglicosídeos – GE, gentamicina; ST, estreptomicina.

Os perfis de fragmentação do DNA cromossômico entre as 18 amostras de *E. faecalis* com HLR-Ge foram distribuídos em 10 diferentes grupos clonais denominados de E até N pois apresentaram pouca ou nenhuma relação genética entre si. Os grupos clonais, J, L e M foram compostos por três amostras cada um, as quais demonstraram perfis estreitamente ou possivelmente relacionados. Ainda, uma amostra foi classificada como A₆, pois se diferenciava do grupo predominante A em 2 bandas (Figura 4 e Tabela 17).

A única amostra de enterococo identificada como resistente a vancomicina (amostra 41) demonstrou perfil de fragmentação do DNA cromossômico diferente do grupo clonal predominante A, sendo classificada como F.

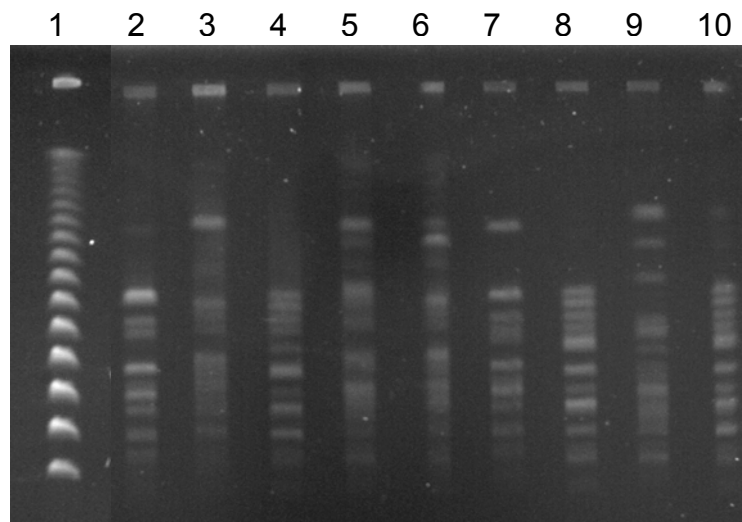


Figura 4. Perfil de macrorrestrição de DNA por PFGE em amostras de *Enterococcus faecalis* apresentando HLR-Ge. Linha 1, MPM – marcador de peso molecular. Linhas 2 a 10 (amostras 14, 41, 46, 50, 52, 57, 61, 72 e 85).

Tabela 17. Características das amostras de *Enterococcus faecalis* resistentes a níveis elevados de gentamicina analisadas por eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Amostra	Instituição ^a	Data do isolamento	Fonte	HLR ^b	PFGE
14	HCPA	Dez. 2006	Urina	GE	E
41	HCPA	Jan. 2007	Líqu.de ascite	GE	F
46	HCPA	Jan. 2007	Urina	GE	G
50	HCPA	Jan. 2007	Urina	GE	H
52	HCPA	Jan. 2007	Urina	GE	H ₁
57	HCPA	Jan. 2007	Urina	GE	I
61	HCPA	Jan. 2007	Urina	GE	J
72	HCPA	Jan. 2007	Secreção	GE	K
85	HCPA	Jan. 2007	Urina	GE	J
122	HSL	Dez. 2006	Sangue	GE	L
124	HSL	Dez. 2006	Sangue	GE	L
128	HSL	Dez. 2006	Urina	GE	L
131	HSL	Jan. 2007	Secreção	GE	M
139	HSL	Jan. 2007	Urina	GE	M ₁
159	HSL	Jan. 2007	Urina	GE	M ₁
168	HSL	Jan. 2007	Sangue	GE	J
170	HSL	Jan. 2007	Urina	GE	N
177	HSL	Jan. 2007	Urina	GE	A ₆

^aInstituição: HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; HSL, Hospital São Lucas da PUC-RS

^bResistência a níveis elevados de aminoglicosídeos – GE, gentamicina.

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a freqüência das espécies, os padrões de resistência antimicrobiana e a distribuição clonal em isolados de enterococos obtidos em amostras clínicas diversas provenientes de dois hospitais da cidade de Porto Alegre, Brasil.

Os enterococos emergiram como um dos mais importantes patógenos hospitalares do mundo, sendo que a freqüência de seu isolamento vem aumentando desde a última década, tendo como agravante o surgimento de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) (d'AZEVEDO *et al.*, 2006; HÖRNER *et al.*, 2005; ZARRILLI *et al.*, 2005). Em nosso estudo os enterococos foram provenientes, na maioria, de pacientes internados (57,1%). Concordando com outros relatos, no HCPA a maior prevalência de amostras foi obtida de pacientes internados (61,2%), ao contrário do HSL, onde encontramos elevada proporção de enterococos de origem ambulatorial (48,2%). De um modo geral os enterococos estão relacionados com infecções em pacientes internados e principalmente naqueles que estão recebendo terapia antibiótica já algum tempo (CORVALIN, 2006; PANKEY, 2005). Os principais reservatórios dos enterococos resistentes aos antimicrobianos de uso no ambiente hospitalar, são os próprios pacientes, colonizados ou infectados, assim como a equipe assistencial (NOSKIN *et al.*, 1995).

Verificamos que a principal fonte de isolamento de enterococos foi a urina (64,5%), seguida da hemocultura (9,8%). Semelhante ao observado em um estudo realizado por QUIÑONES *et al.* (2005), com amostras clínicas de hospitais cubanos, onde foi verificado que 34% eram provenientes de urina e 19% do sangue. Todos estes dados evidenciam o papel preponderante dos enterococos como patógeno urinário. Resultados semelhantes ao nosso demonstrando isolados obtidos de hemoculturas, secreções e líquidos diversos também são citados em outros estudos em diferentes áreas (SHEPARD E GILMORE, 2002; HÖRNER *et al.*, 2005).

A confirmação dos isolados quanto ao gênero *Enterococcus* através de hidrólise da bile-esculina, crescimento em caldo com NaCl 6,5%, coloração pelo Gram e teste do PYR de um modo geral forneceram resultados rápidos e de fácil interpretação. É importante ressaltar que existem outros gêneros de bactérias Gram-

positivas e catalase negativa, ocasionalmente isolados de infecções humanas, que podem ser confundidos com enterococos por crescer em NaCl 6,5% e hidrolisar a bile-esculina e ainda apresentarem uma morfologia semelhante. Entre estes estão os gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Aerococcus* (PALAVECINO *et al.*, 2001). Existem ainda espécies como o *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus* que apresentam resultados negativos para o teste do PYR, porém, este teste ainda é considerado útil na identificação do gênero, visto que o isolamento destas espécies a partir de amostras clínicas é bastante raro (d'AZEVEDO *et al.*, 2006). O uso de métodos automatizados modernos além de efetuar os testes acima para identificar o gênero enterococos, avalia também outros resultados tornando menor a possibilidade de erros de identificação neste gênero.

De um modo geral, grande parte dos laboratórios de microbiologia clínica realiza somente a identificação do gênero enterococos. No entanto a identificação das espécies também é fundamental para estabelecer a epidemiologia das infecções por este microrganismo em determinadas áreas bem como para o tratamento de infecções ocasionadas principalmente por ERV. Ainda, a rápida elevação da resistência antimicrobiana e a relação desta resistência com determinadas espécies de enterococo, faz com que sua identificação seja fundamental para o controle de infecções clinicamente importantes, como bacteremias e endocardite (KAÇMAZ e AKSOY, 2005; QUIÑONES, *et al.*, 2005).

Neste estudo, foram utilizados dois métodos para a identificação de espécies, o primeiro deles compreendeu um esquema simplificado de provas manuais convencionais (FACKLAM e COLLINS, 1989 ; FACKLAM *et al.*, 2002), onde todas as amostras foram testadas frente a diferentes substratos que incluíam diversos carboidratos e aminoácidos, e outras provas como verificação da produção de pigmento e motilidade. O segundo método de identificação consistiu do emprego do sistema automatizado VITEK 2 (BioMérieux).

O método convencional proporcionou a identificação de 195 amostras (96,1%). Em 8 amostras (3,9%) o método manual não forneceu uma identificação conclusiva, pois apesar da maioria das provas indicarem *E. faecalis*, a não fermentação da lactose divergia dos demais. Estas amostras foram

posteriormente submetidas a identificação pelo sistema automatizado, o qual em todos os casos confirmou ser *E. faecalis*.

O *E. faecalis* foi a espécie mais freqüente (93,6%), em segundo lugar o *E. faecium* com 4,4% dos isolados, seguido do *E. casseliflavus* (1%), *E. gallinarum* (0,5%) e *E. hirae* (0,5%). Nossos resultados concordam com MUTNICK *et al.* (2003) e KAÇMAZ e AKSOY (2005), onde *E. faecalis* é a espécie mais freqüentemente isolada (85-95%) seguido do *E. faecium* (5-10%) como as duas espécies mais comumente identificadas em infecções humanas. AVALOS *et al.* (2006) estudando 249 isolados de cinco hospitais chilenos, identificou *E. faecalis* em 85,1%, *E. faecium* 9,6%, *E. durans* (3,2%), *E. avium* (1,2%) e *E. raffinosus* (0,8%). Existem ainda outros estudos recentes que demonstram resultados semelhantes ao nosso (HÖRNER *et al.*, 2005; QUIÑONES *et al.*, 2005; KAÇMAZ e AKSOY, 2005).

Segundo KONEMAN *et al.* (2001), a prevalência de *E. faecalis* como agente etiológico de infecções enterocócicas parece estar relacionado com um maior potencial de virulência dos microrganismos desta espécie, em relação ao *E. faecium*, espécie mais relacionada com resistência a antimicrobianos.

As espécies *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. hirae* relatadas neste estudo, porém com menor freqüência, também estão relacionadas com infecções em seres humanos (HÄLLGREN *et al.*, 2001; FURTADO, *et al.* 2005). Ainda é pouco documentado os casos de infecções humanas causadas por espécies diferentes do *E. faecalis* e *E. faecium*, porém os laboratórios de microbiologia clínica devem estar sempre atualizados no reconhecimento de infecções com estes agentes etiológicos pouco comuns, pois, cada vez mais diferentes espécies de enterococos estão sendo isoladas na rotina laboratorial. Ainda, é de grande importância a identificação de espécies em cepas de ERV, uma vez que se deve fazer a diferenciação entre uma cepa com importância clínica daquela com resistência intrínseca à vancomicina como é o caso do *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* (BAZET *et al.*, 2005; CLIMO *et al.*, 2003; PALAVECINO, 2001).

Atualmente existem métodos automatizados de diagnóstico que são capazes de identificar a maioria das espécies de enterococos, constituindo uma boa alternativa para aqueles laboratórios com um alto volume de amostras e que podem

absorver os custos (PALAVECINO, 2001). No entanto, os métodos convencionais são de baixo custo e podem ser adaptados ao fluxo de trabalho de laboratórios menores. Embora, conforme anteriormente comentado, a maioria dos laboratórios somente realiza a identificação do gênero em enterococos, porém o uso de poucos testes bioquímicos convencionais poderia ser útil na diferenciação das duas espécies mais comuns. Conforme HÄLLGREN *et al.* (2001) a diferenciação destas com as demais é relevante somente quando se tratar de uma cepa resistente à vancomicina.

Considerando o método convencional de identificação de espécies como padrão, a análise comparativa com a utilização do sistema automatizado VITEK 2 apresentou boa concordância (88,7%; $k=0,74$). Resultado semelhante foi demonstrado por GARCIA-GARROTE *et al.* (2000), com 87% de concordância entre o VITEK 2 e o método convencional proposto.

Foi possível obter excelente concordância na identificação de amostras de *E. faecalis* (96,5%, $k=0,82$), sendo que, as duas discrepâncias ocorridas foram relatadas como *E. gallinarum* e *E. durans* pelo método automatizado. Encontramos menor concordância com amostras de *E. faecium* (72,4%; $k=0,74$). Estes dados são semelhantes ao de LIGOZZI *et al.* (2002) com 92,7% e 71,4% e também ao de GARCIA-GARROTE *et al.* (2000) com 98,3% e 76,3% na comparação de métodos convencionais e automatizados para a identificação de *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente.

De um modo geral, os sistemas comerciais apresentam problemas para a identificação de espécies diferentes do *E. faecalis*, sendo que, a identificação presuntiva de gênero, junto com a determinação da suscetibilidade tem sido considerada suficiente na maioria dos laboratórios clínicos (d'AZEVEDO *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2002). Falhas com o uso de sistemas automatizados muitas vezes são ocasionadas por mudanças taxonômicas introduzidas constantemente no gênero, principalmente envolvendo espécies diferentes do *E. faecalis* (FACKLAM *et al.*, 1999; LIGOZZI *et al.*, 2002). Isso provavelmente reflete problemas com as definições das novas espécies ou critérios disponíveis para identificação delas em base de dados de uso automatizado.

Neste estudo a identificação de espécies que não *E. faecalis* e *E. faecium*, apresentou moderada concordância entre os métodos testados (66, 7%; $\kappa = 0,60$). Dois *E. casseliflavus* foram identificados como *E. faecalis*, um *E. hirae* foi identificado como *E. gallinarum* e um *E. gallinarum* foi relatado com baixa discriminação com o *E. casseliflavus*. Neste caso, a realização de testes manuais suplementares como a verificação de motilidade e da produção de pigmento, pode diferenciar estas duas espécies. Por sua vez, a distinção do *E. hirae* e *E. durans* não apresentam testes simples para discriminação entre estas espécies (LIGOZZI *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2004).

As duas amostras de *E. raffinosus* testadas foram identificadas corretamente. Até pouco tempo, esta espécie era incorretamente identificada, uma vez que o banco de dados do sistema VITEK 2 ainda não englobava todas as informações a respeito da mesma (GARCIA-GARROTE *et al.* 2000; WILSON *et al.*, 2002).

Os resultados encontrados com a utilização do VITEK 2 confirmam estudos prévios informando que este sistema é de fácil uso e também fornece resultados rápidos de identificação, sendo a variação de tempo para identificação neste estudo de 2,75 a 8 horas. Também podemos afirmar que este sistema apresenta uma boa performance na identificação de espécies de enterococos mais comumente isolados, porém, ainda necessita de melhorias para a identificação de espécies menos frequentes, concordando com estudos feitos por d'AZEVEDO *et al.* (2004) e WILSON *et al.* (2002).

Trabalhando com amostras de enterococos, d'AZEVEDO *et al.* (2006) e MERQUIOR *et al.* (1994), utilizaram ainda um método de análise do perfil de proteínas totais, o qual é espécie específica. Segundo estes autores, as amostras que apresentam algum tipo de atipia fenotípica, seja por um método convencional ou automatizado de identificação, podem ser corretamente classificadas quanto à espécie através do seu perfil de proteínas totais.

A variabilidade genética e a multiplicação acelerada permitem que as bactérias desenvolvam mutações específicas para adaptarem-se a ambientes diversos e desenvolverem resistência a múltiplos antimicrobianos (LEME E FERREIRA, 2001). Atualmente existem diversas publicações avaliando a

suscetibilidade antimicrobiana em enterococos, porém ainda é escasso o conhecimento acerca de sua forma de disseminação, epidemiologia e principalmente sobre a maneira mais adequada da abordagem terapêutica em casos de infecções graves (AVALOS *et al.*, 2006; CLIMO *et al.*, 2003; CORVALIN, 2006; SARAIVA *et al.*, 1997).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes a grupos de agentes antimicrobianos como cefalosporinas, aminoglicosídeos (em baixas concentrações), clindamicina e cotrimoxazol (CLSI, 2007). Portanto estes agentes não devem ser testados ou informados ao clínico porque podem aparecer suscetíveis *in vitro* sendo clinicamente resistentes.

Avaliamos a suscetibilidade a diversos antimicrobianos, através das técnicas de disco-difusão e teste de diluição em ágar conforme recomendado pelo CLSI (2007).

Neste estudo, 97,5% das amostras estudadas foram suscetíveis a ampicilina. AVALOS *et al.* (2006) encontraram resultado semelhante ao nosso, com 98,4%. De acordo com QUIÑONES *et al.* (2005), a ampicilina é o antibiótico de primeira escolha para tratar de infecções enterocócicas urinárias. O autor também relatou em seu estudo que todos os *E. faecalis* e somente 50% dos *E. faecium* isolados foram suscetíveis a ampicilina. Em nosso estudo foram isolados 5 enterococos resistentes a ampicilina, sendo 4 *E. faecium* e 1 *E. faecalis*. Similar a estes dados, KAÇMAZ e AKSOY (2005) encontrou resistência de 75% em *E. faecium* e 17% em *E. faecalis*. Segundo SHEPARD *et al.* (2002) e CETINKAYA *et al.* (2000), os *E. faecium* são de 4 até 16 vezes mais resistentes a antibióticos beta-lactâmicos que os *E. faecalis*. Outros estudos confirmam o *E. faecium* como tendo maior resistência aos antimicrobianos do que o observado para o *E. faecalis* (AVALOS *et al.*, 2006; CETINKAYA *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2007; DESHPANDE *et al.*, 2007).

Ainda que a resistência a ampicilina possa ser mediada por ação de enzimas beta-lactamases, e sendo este fenotípico de resistência não detectado com o uso da técnica de disco-difusão, a ocorrência de resistência por este mecanismo tem sido pouco relatada (ASLANGUL *et al.*, 2005; SHEPARD *et al.*, 2002; HÄLLGREN *et al.*, 2001). A pesquisa de resistência em enterococos devido a produção da enzima

beta-lactamase tem sido indicada apenas para materiais clínicos como sangue e líquido.

A resistência a eritromicina e tetraciclina foi respectivamente de 62,1% e 64,5%. Tanto no HCPA como no HSL os valores encontrados para resistência a estes dois antimicrobianos foram elevados o que torna estes antimicrobianos inadequados para terapia empírica de infecções por enterococos. Valores elevados de resistência a estes antimicrobianos já foram descritos em outros estudos realizados com amostras brasileiras (d'AZEVEDO *et al.*, 2004; HÖRNER *et al.*, 2005). Ainda, QÜIÑONES *et al.* (2005) além de identificar elevada resistência a estes dois antimicrobianos, também não encontrou o predomínio de uma espécie entre as duas mais freqüentemente isoladas (*E. faecalis* e *E. faecium*), fato este também confirmado em nosso estudo.

Outro antimicrobiano alternativo para tratamento de infecções por enterococos é o cloranfenicol, sendo que este apresentou resistência de 33%. Assim, também não é recomendado o tratamento de infecções por enterococos sem antes conhecer perfil de suscetibilidade a este antimicrobiano. Segundo DESHPANDE *et al.* (2007), o cloranfenicol é um agente terapêutico ativo contra enterococos. Sua resistência se deve a produção bacteriana da enzima Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT). Atualmente existem poucos dados tratando da epidemiologia da resistência do ERV ao cloranfenicol. Segundo GOULD *et al.* (2004), um aumento na prevalência da resistência ao cloranfenicol em ERV pode limitar a sua utilidade futura como agente para tratar de infecções por este tipo de bactéria.

A rifampicina de um modo geral não tem sido utilizada como droga de primeira escolha para tratar infecções por enterococos, porém, ocasionalmente é utilizada em associação com outros antimicrobianos como a vancomicina para o tratamento de infecções graves como a endocardite, onde os germes são multirresistentes e sensíveis a rifampicina (LOMAR e DIAMENT, 1998). Neste estudo observamos, 24,6% de resistência a rifampicina, assim, este dado reforça a possibilidade de uso da rifampicina como uma droga alternativa para tratar de infecções enterocócicas multirresistentes.

Com a crescente limitação no número de antimicrobianos para tratar de infecções por enterococos resistentes a vancomicina, PANKEY *et al.* (2005) realizaram um estudo para avaliar a ocorrência de sinergia *in vitro* da associação de daptomicina com rifampicina contra *E. faecium* resistentes a linezolida e vancomicina, uma vez que a daptomicina poderia facilitar a entrada da rifampicina na célula bacteriana. Neste estudo os autores demonstraram a existência de sinergia *in vitro*, entretanto a aplicabilidade deste mecanismo contra cepas de *E. faecium* ainda necessita de um maior desenvolvimento.

Verificamos apenas 2% de resistência a nitrofurantoína neste estudo, o que reforça a indicação de MURRAY (1990) para o tratamento e à profilaxia das infecções por enterococos do trato urinário, uma vez que, a droga é excretada pelo rim em concentrações bastante elevadas. BEDENDO *et al.* (2003) encontrou 100% de sensibilidade a nitrofurantoína em amostras de enterococos obtidas de um hospital universitário no Paraná. De um modo geral a literatura tem citado bons resultados quanto a suscetibilidade da nitrofurantoína em amostras de enterococos obtidas de urina (PAI *et al.*, 1998, QUIÑONES *et al.*, 2005).

O ciprofloxacino é um antimicrobiano do grupo das fluoroquinolonas e sua resistência bacteriana é devido a ocorrência de mutação no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima DNA-girase (HÄLLGREN *et al.*, 2001). Em nosso estudo, observamos uma resistência de 30% ao ciprofloxacino, sendo que as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* apresentaram resultados similares quanto à resistência a este antimicrobiano (29,5% e 33,3% respectivamente). Estes dados concordam com estudos prévios, demonstrando perfis de suscetibilidade semelhante aos nossos (KAÇMAZ e AKSOY, 2005; HÄLLGREN *et al.*, 2001).

O crescente aumento da resistência no gênero enterococos, principalmente em ambientes hospitalares, tem motivado a pesquisa de novos antimicrobianos. Neste estudo, avaliamos a atividade *in vitro* da Quinupristina-Dalfopristina (Q/D) (Synercid[®]). E obtivemos uma resistência a Q/D em 87,2% das amostras estudadas. Uma análise por espécie, no entanto, mostrou que 11,1% dos *E. faecium* e 91% dos *E. faecalis* foram resistentes a Q/D. É importante destacar que o *E. faecalis* é intrinsecamente resistente a Q/D, entretanto este antibiótico tem sido usado com bons resultados para tratar infecções ocasionadas pelo *E. faecium*, principalmente

como uma opção ao uso de glicopeptídeos (HÄLLGREN *et al.*, 2001 e LINDEN *et al.*, 1997). No entanto, alguns estudos descrevem o surgimento de resistência crescente nesta espécie (CHOW *et al.*, 1997) sendo que HÄLLGREN *et al.* (2001) e MENDES *et al.* (2002), encontraram 22% e 30% dos *E. faecium* resistentes a Q/D respectivamente. Valores ainda maiores foram relatados por JONES *et al.* (1998) onde 51% dos *E. faecium* eram resistentes, sendo que 30% demonstravam resistência intermediária.

Dados do programa SENTRY com amostras de ERV obtidas de diversos centros localizados na América do Norte e na Europa em 2003, demonstraram resistência em *E. faecalis* a Q/D em 98,2% das amostras norte-americanas e 100% nas européias. Para o *E. faecium* a resistência a este antimicrobiano foi de 0,6% e 10% nestas regiões respectivamente. Uma hipótese atribuída para a menor atividade da Q/D em isolados da Europa tem sido o uso de outras estreptograminas (pristinamicina e virginamicina) na prática humana e em rações como aditivo para tratamento de animais (SMITH *et al.*, 2003; DESHPANDE *et al.*, 2007).

Os enterococos apresentam intrinsecamente baixo grau de resistência aos aminoglicosídeos devido a uma baixa permeabilidade celular ao antimicrobiano o que faz com que os antimicrobianos desta classe não apresentem atividade bactericida contra amostras deste gênero quando utilizados isoladamente (SARAIVA *et al.* 1997). A importância da identificação de resistência a altos níveis de aminoglicosídeos (HLAR) está focada principalmente na limitação em alcançar resultados de sinergismo na associação com antibióticos que agem na parede celular bacteriana como beta-lactâmicos e glicopeptídeos. Sem a ocorrência deste efeito sinérgico, não ocorrerá ação bactericida dificultando muito o combate de infecções graves, como endocardite e bacteremias (SHEPARD *et al.*, 2002; ZARRILLI *et al.*, 2005). Em nosso estudo, a detecção de HLAR através de dois métodos de avaliação da suscetibilidade (ágar-difusão e diluição em ágar) apresentaram muito boa concordância entre seus resultados ($\kappa = 0,89$). Isto reafirma o método de disco-difusão, muito difundido entre laboratórios de microbiologia clínica, como um método adequado para detecção de HLAR.

Neste estudo, o teste de disco-difusão para a detecção de HLR para gentamicina apresentou 1,3% de erro muito maior (VME) e 2,6% de erro menor (MI),

quando comparado com ágar diluição, sendo que estes valores estão dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pelo CLSI (2003). No entanto a ocorrência de erro muito maior apresentou índice inaceitável para a estreptomicina (VME= 6,35%). Segundo SCHULZ & SAHM (1993) e QUIÑONES *et al.* (2005), falsa suscetibilidade para a estreptomicina é um problema comumente encontrado, porém pode ser contornado pelo prolongamento da incubação para 48 horas antes da interpretação, o que aumenta a detecção da resistência em alguns padrões de enterococos. Neste estudo os resultados de HLAR foram analisados apenas em 24 horas de incubação.

Observamos em nosso estudo através dos resultados obtidos com o método de disco-difusão, 36% e 22,2% de HLR a estreptomicina e gentamicina, respectivamente, sendo que 10,3% foram resistentes concomitantemente a estes dois antimicrobianos. A resistência de alto nível a estreptomicina pode ser devida alteração ribossômica ou devido a produção de enzimas inativadoras (CETINKAYA *et al.*, 2000; ZARRILLI *et al.*, 2005). Por sua vez, HLR a gentamicina é predominantemente devido à produção de enzimas inativadoras, o que conferem resistência concomitante a tobramicina, netilmicina, amikacina e kanamicina. Por conseguinte, resistência a gentamicina é um bom preditor de resistência para outros aminoglicosídeos, com exceção da estreptomicina. O entendimento da ocorrência destes diferentes mecanismos de resistência, faz com que seja importante a realização do teste de sensibilidade para ambos os antimicrobianos (KAÇMAZ e AKSOY, 2005; PALAVECINO *et al.*, 2001; ZARRILLI *et al.*, 2005).

Um dado interessante verificado em nosso estudo, foi que em 85% dos isolados com HLAR ocorriam concomitantemente resistência à, no mínimo, 4 antimicrobianos usados como alternativas terapêuticas para tratar de infecções por enterococos. Essa elevada resistência a outras classes antimicrobianas restringe ainda mais as opções terapêuticas disponíveis em caso de infecções graves ocasionadas por este microrganismo.

Estudos recentes demonstram prevalências de HLAR semelhantes ao nosso (QUIÑONES *et al.*, 2005; KAÇMAZ e AKSOY, 2005; AVALOS *et al.*, 2006). A crescente prevalência da resistência a estes antimicrobianos nos últimos anos pode ser explicada pela habilidade de disseminação de elementos genéticos (plasmídeos e transposons) codificando para enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, bem

como também pela pressão seletiva que o uso de antimicrobianos exerce sobre a população microbiana de cada instituição e de cada região geográfica.

Foi possível também verificar através do método de diluição em ágar que a maioria dos enterococos sensíveis aos aminoglicosídeos nos dois hospitais estudados apresentaram níveis de concentração inibitória mínima (CIM) muito inferior ao limite de classificação para resistência a altos níveis (86,6% com $CIM \leq 500\mu\text{g/mL}$ para estreptomicina e 92,9% com $CIM \leq 125\mu\text{g/mL}$). Apenas uma menor proporção de isolados apresentaram níveis de CIM próxima ao limite de sensibilidade para ambos os aminoglicosídeos (10,2% e 4,5% para estreptomicina e gentamicina, respectivamente).

Com o desenvolvimento e transmissão entre os enterococos de altos níveis de resistência para antibióticos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, o uso de glicopeptídeos como vancomicina e teicoplanina para tratar infecções enterocócicas e outras infecções por bactérias Gram-positivas mais sérias aumentou substancialmente (SHEPARD e GILMORE, 2002; CORVALIN, 2006). No entanto ao longo do nosso estudo, encontramos apenas 1 amostra resistente a vancomicina e teicoplanina, perfil este característico do fenótipo de resistência VanA. Esta amostra foi obtida do HCPA e foi posteriormente identificada como sendo *E. faecalis* por testes manuais e automatizado.

Resultados do programa SENTRY de vigilância, do período de 1997 a 1999, mostram 2% de ERV na América latina (PFALLER *et al.*, 1999). Dados do mesmo programa, porém com um período de estudo estendido até 2002 confirmam este aumento, onde a incidência de ERV foi de 3,3% (BIEDENBACH *et al.*, 2004).

Existem diversos estudos que avaliando enterococos obtidos de diferentes amostras clínicas apresentam valores baixos de ERV, porém, existe um consenso quanto ao crescente número de isolamentos de ERV em ambientes hospitalares (KARMAKAR *et al.*, 2004; CORVALIN, 2006; DESHPANDE *et al.*, 2007; UDO *et al.*, 2002). Neste aspecto é importante diferenciar estudos que avaliam infecção daqueles que avaliam portadores de ERV. Em situações de surto de ERV, é recomendada a pesquisa de portadores através do *swab* retal (FURTADO *et al.*, 2005). Nestes casos (avaliação de portadores) a prevalência de ERV tende a ser

aumentada visto que se utilizam usualmente meios de cultura seletivos (que contém vancomicina) que permitem uma melhor detecção de ERV.

No caso do surto que iniciou em 2000 na cidade de Porto Alegre, onde mais de dez hospitais relataram ERV para a divisão de vigilância sanitária, a grande maioria isolou bactérias em *swab* retal (dados da divisão de Vigilância Sanitária de Porto Alegre – não relatados na literatura).

De toda forma, a ocorrência de infecções bem como uma colonização com ERV são motivos de grande preocupação na área médica, uma vez que, passam a existir poucas alternativas disponíveis de tratamento e geralmente tem como agravante o fato da natureza destas infecções enterocócicas ocorrerem muito comumente entre pacientes de alto risco (DESHPANDE *et al.*, 2007).

Algumas espécies como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* possuem resistência intrínseca de baixo nível para a vancomicina (CIM, 4 até 32 µg/mL) sendo suscetíveis a teicoplanina (gen *vanC*). Nesta pesquisa, as duas amostras com resistência intermediária a vancomicina pertenciam a estas espécies. Conforme PALAVECINO *et al.* (2001) e CETINKAYA *et al.* (2000) estas espécies não tem tido implicações em surtos epidêmicos, sendo deste modo, de pouca importância para o controle de infecções intra-hospitalares.

Atualmente o uso de métodos moleculares para tipagem de enterococos tem tido grande importância na etiologia de infecções hospitalares, sendo também fundamental para a implementação de medidas de controle (ZARRILI *et al.*, 2005). A macrorrestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) devido a sua boa capacidade de discriminação tem sido considerada como método padrão para tipagem molecular de enterococos (BERTRAND, *et al.*, 2000, TENOVER *et al.*, 1995; MORRISON *et al.*, 1999). Entretanto a realização da técnica consome tempo, sendo também bastante laboriosa. Outros métodos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) fornecem resultados em um curto período de tempo e com menor custo, entretanto este método tem poder discriminatório inferior ao verificado pela PFGE (PAPAPARASKEVAS *et al.*, 2000; BEDENDO e PIGNATARI, 2000).

Em nosso estudo, a tipagem molecular por meio da PFGE demonstrou a existência de um grupo clonal predominante (grupo A) entre as 17 amostras de

E. faecalis que apresentavam HLR-Ge/St. Este grupo predominante foi composto de oito amostras que apresentaram perfis de fragmentação cromossômico idêntico entre si, e também por cinco amostras altamente relacionadas (A1, A2, A3, A4 e A5), uma vez que, diferenciaram-se em apenas duas bandas do perfil principal.

As amostras bacterianas classificadas dentre do grupo clonal predominante (A) foram provenientes dos dois hospitais estudados e haviam sido obtidas principalmente da urina durante um período de 3 meses, sugerindo transmissão intra e inter-hospitalar de uma cepa apresentando características que proporcione nestas instituições de saúde sua sobrevivência e disseminação. No levantamento realizado por MONDINO *et al.* (2003) com amostras obtidas de dois hospitais localizados no estado do Rio de Janeiro, foram identificados três grupos clonais predominantes entre padrões de *E. faecalis*, sendo eles identificados como HLR-Ge, HLR-Ge/St e ainda um terceiro com HLR-St. Como verificado em nosso estudo, estes grupos clonais foram isolados de diferentes hospitais, o que indica também a ocorrência de propagação dentro e entre cada hospital.

Entre as 18 amostras de *E. faecalis* que apresentavam HLR-Ge, encontramos moderada diversidade genética, o que não possibilitou a classificação de um clone predominante neste grupo, uma vez que a maioria dos padrões identificados consistia em clones únicos com algumas exceções. Os padrões J, L e M predominaram, sendo cada um deles isolados em três diferentes pacientes. Seria necessário um acompanhamento futuro destes padrões para sabermos se o crescente aumento da resistência aos antimicrobianos no gênero enterococos, fato este também evidenciado em nosso trabalho, estaria selecionando um destes clones como predominante nos hospitais estudados. Nosso resultado difere do estudo realizado por d'AZEVEDO *et al.* (2006) onde, avaliando amostras de diferentes hospitais de Porto Alegre, incluindo o HCPA, encontraram a presença de um clone predominante de *E. faecalis* com HLR-Ge a partir de diferentes amostras clínicas. Outros autores também encontraram essa disseminação clonal em seus estudos (MONDINO *et al.*, 2003; VAN DEN BRAAK *et al.*, 1999; WENDELBO *et al.*, 2003). Porém, existem estudos que não demonstraram evidências da predominância de um único clone em *E. faecalis* com HLR-Ge (ZARRILI *et al.*, 2005; UDO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006;).

A possibilidade do encontro de apenas um clone predominante é maior quando avaliamos amostras obtidas durante períodos de surtos. Neste estudo não foi avaliada a prevalência de enterococos fora do período de coleta das amostras, portanto não é possível afirmar, nem descartar, que havia aumento de prevalência (surto) de enterococos nos hospitais estudados. Também é interessante especular que, talvez, o fato de não encontrarmos um clone de *E. faecalis* com HLR-Ge possa ser devido à ocorrência de eventos genéticos sobre os padrões de PFGE como a criação ou perda de um sítio de restrição, assim como a inserção ou deleção de fragmentos de DNA, o que podem alterar de maneira significativa padrões bacterianos, porém, isso é menos freqüente quando se analisa amostras isoladas em curto período de tempo e de fontes comuns de isolamento.

A única amostra de enterococos identificada como resistente à vancomicina em nosso estudo (amostra 41 do HCPA) apresentou perfil de fragmentação do DNA cromossômico diferente dos grupos clonais identificados neste estudo, inclusive do grupo clonal predominante A. Esta porém apresentou perfil genético idêntico ao clone de ERV identificado por SANDRI (2004) em amostras do HSL. Através desta observação, poderíamos inferir que, pelo menos nos dois hospitais estudados, o isolamento do clone predominante A em *E. faecalis* com HLR-Ge/ST não estaria relacionado com a seleção de cepas de *E. faecalis* resistente a vancomicina.

A introdução de medidas de controle da transmissão de genes de resistência e disseminação clonal é fundamental para o controle epidemiológico, visto que, a emergência de cepas com resistência a múltiplos antimicrobianos é um grave problema nas instituições de saúde, especialmente pela possibilidade de disseminação a partir de portadores saudáveis e pela escassez de opções terapêuticas eficazes. O monitoramento periódico nos hospitais é imprescindível para o controle e prevenção da emergência de surtos epidêmicos ou situações endêmicas.

7 CONCLUSÕES

- ❖ Os enterococos foram isolados principalmente a partir de pacientes internados (57,1%), sendo o HCPA a instituição de saúde com maior prevalência (61,2%), e tendo o HSL uma elevada proporção de enterococos de origem ambulatorial (48,2%).
- ❖ A principal fonte de isolamento de enterococos foi a urina (64,5%) e em menores proporções a hemocultura (9,8%), líquidos diversos (7,9%) e outros.
- ❖ O *E. faecalis* foi a espécie mais freqüente (93,6%), seguido por *E. faecium* (4,4%), *E. casseliflavus* (1%), *E. gallinarum* (0,5%) e *E. hirae* (0,5%).
- ❖ A utilização do sistema VITEK 2 comparado com o método convencional para identificação de espécies de enterococos apresentou muito boa concordância com amostras de *E. faecalis* (k= 0,82); boa concordância para *E. faecium* (k = 0,79) e moderada concordância para as espécies não-*E.faecalis* e não-*E.faecium* (k= 0,60).
- ❖ A identificação das espécies de enterococos mais freqüentes e também de maior importância clínica (*E. faecalis* e *E. faecium*) poderia ser realizada utilizando poucas provas bioquímicas e fisiológicas manuais por laboratórios que não dispõem de um sistema automatizado.
- ❖ Na avaliação da suscetibilidade antimicrobiana encontramos baixa resistência a ampicilina (2,5%), vancomicina (0,5%) e teicoplanina (0,5%). Moderados valores a HLR-Ge (22,2%), HLR-St (36%) e HLR-Ge/St (10,3%).
- ❖ A suscetibilidade à antimicrobianos alternativos para tratamento de infecções por enterococos demonstrou elevada resistência a eritromicina (62,1%) e tetraciclina (64,5%); moderada resistência ao cloranfenicol (33%), rifampicina (24,6%) e ciprofloxacino (30%) e baixa resistência a nitrofurantoína (2%).
- ❖ A resistência a quinupristina-dalfopristina (Q/D) foi de 11,1% nos *E. faecium*.

- ❖ A detecção de HLR aos aminoglicosídeos e ampicilina pelos métodos de disco-difusão e diluição em ágar demonstraram muito boa concordância ($k= 0,89$). Apenas para a estreptomicina observamos a ocorrência de erros fora dos valores de referência.
- ❖ A tipagem molecular por PFGE evidenciou a existência de um clone predominante em amostras de *E. faecalis* com HLR-Ge/St, sugerindo disseminação intra e inter-hospitalar deste clone.
- ❖ A tipagem molecular de amostras de *E. faecalis* com HLR-Ge indicou que não havia um clone predominante.
- ❖ A tipagem molecular do *E. faecalis* resistente a vancomicina identificado em nosso estudo foi altamente relacionada com o clone de ERV isolado no HSL no ano de 2000. Porém, ela não é relacionada geneticamente com o clone predominante de *E. faecalis* HLR-Ge/St deste estudo.

8 REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; BUTAYE, P.; WITTE, W. Nonhuman Reservoirs of *Enterococci*. In: **The *Enterococci*. Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002. p.55-100.

ASLANGUL, E.; RUIMY, R.; CHAU, F.; GARRY, L.; ANDREMONT, A.; FANTIN, B. Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4144–4148, 2005.

AVALOS, J. S.; ASSERELLA, L. R.; BOLADOS, N. G.; HERRERA, N. H.; LEYTON, J.O. Resistência a antimicrobianos em cepas de *Enterococcus sp* isoladas em hospitales del norte de Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 23, n. 3, p. 226-231, 2006.

BAZET, C.; BLANCO, J.; SEIJA, V.; PALACIO, R. Enterococos resistentes a vancomicina. Un problema emergente en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, v. 21, p. 151-158, 2005.

BEDENDO, J., PIGNATARI, A. C. C. Typing o *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1269-1274, 2000.

BERTRAND, X.; MULIN, B.; VIEL, J. F.; THOUVEREZ, M.; TALON, D. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. **Food Microbiology**, v. 17, p. 543-551, 2000.

BIEDENBACH, D. J.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 50, n. 1, p. 59-69, 2004.

CEREDA, R. F. **Avaliação do perfil de sensibilidade e caracterização molecular de *Enterococcus spp.* isolados em hospitais da América Latina**. São Paulo: USP, Escola Paulista de Medicina, 1999. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias).

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C., G. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 686–707, 2000

CHAMBERS HF Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10th edn, 2001, pp. 1239-1272. New York, USA: McGraw-Hill.

CHANG, P. C.; LI, H. Y.; TANG, H. J.; LIU, J. W.; WANG, J. J.; CHUANG, Y. C. In vitro synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*, **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v.40, p. 56-61, 2007.

- CHOW, J. W.; DONAHEDIAN, S.M.; ZERVOS, M. J. Emergence of increased resistance to quinupristin/dalfopristin during therapy for *Enterococcus faecium* bacteremia. **Clinical Infectious Disease**, v.24, p. 90-91, 1997.
- CLIMO, M. W.; ARCHER, G. L.; MONROE, S. Vancomycin-resistant Gram-positive pathogens: potencial approaches for prevention and control. In: WENZEL; R. P. **Prevention and control of nosocomial infections**, 4rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Sixteenth Informational Supplement – M100-S17. *CLSI*, 2007.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição – M7-A6**. v. 23 n. 2, 2003.
- CORVALIN, P. Vancomycin resistance in gram – positive cocci. **Clinical Infection Disease**. v. 42, p. 25-34, 2006.
- DALLA COSTA, L.M.; SOUZA, D.C.; MARTINS, L.T.; ZANELLA, R.C.; BRANDILONE, M.C.; BOKERMAN, S.; SADER, H. S.; SOUZA, H. A. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.2, n. 3, p. 160-163, 1998.
- D'AZEVEDO. **Diversidade fenotípica e genotípica de Enterococcus isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia).
- D'AZEVEDO, P. A.; DIAS,C. A. G.; LEMOS, S. B.; BITTENCOURT, J. A. F.; TEIXEIRA, L., M. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 199-204, 2004.
- D'AZEVEDO, P. A.; DIAS,C. A. G.; TEIXEIRA, L., M. Genetic Diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48 n. 1, p. 11-16, January-February, 2006.
- DESHPANDE, L. M.; FRITSCH, T. R.; MOET, G. J.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 163-170, 2007.
- FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G.; TEIXEIRA L. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE M. S. **The enterococci pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002.

- FACKLAM, R.R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 731-734, 1989.
- FACKLAM, R. R.; CARVALHO M. G. S.; TEIXEIRA, L.M. Enterococcus. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L. **Manual of Clinical Microbiology**. V. 1, 9th ed. Washington, American Society for Microbiology, 2007. p. 430-442.
- FACKLAM R, WILKINSON H. In STARR MP, STOLP H, TRUPER HG, BALOWS A, SCHLEGEL HG (Eds.) **The prokaryotes**. Springer-Verlag. Berlin. pp. 1572-1597, 1981.
- FASS, R.J. Erythromycin, clarithromycin, and azitromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 2080-2086, 1993.
- FURTADO, G. H. C.; MARTINS, S. T.; COUTINHO, A. P.; SOARES, G. M. M.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em um hospital universitário no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p. 41-46, 2005
- GARROTE, F.G.; CERCENADO, E.; BOUZA, E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 38, n. 6, p. 2108-2111, 2000.
- GOULD, C. V.; FISHMAN, N. O.; NACHAMKIN, I.; LAUTENBACH, E. Chloramphenicol resistance in vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: impact of prior fluoroquinolone use? **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 25, p. 138-145, 2004.
- HALLGREN, A.; ABEDNAZARI, H.; EKDAHL, C.; HANBERGER, H.; NILSSON, M.; SAMUELSSON, A.; SVENSSON, E.; NILSSON, L. E. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 53-62, 2001
- HAYDEN, M. K. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci, **Clinical Infectious Disease**, v.31, p. 1058–1065, 2000.
- HÖRNER, R.; LISCANO, M. G. H.; MARASCHIN, M. M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FORNO, N. F. D.; RIGHI, R. A. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 6, p. 391-395, 2005.
- JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 7, p. 462–478, 1994.

- JONES, R. N.; HARE, R. S.; SABATELLI, F. J. In vitro Gram-positive antimicrobial activity of evernimicin (SCH 27899), a novel oligosaccharide, compared with other antimicrobials: a multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 15-25, 2001.
- KAÇMAZ, B.; AKSOY, A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 25, p. 535-538, 2005.
- KARMAKAR, M. G.; GERSHOM, E.S.; METHA, P.R. Enterococcal infections with special reference to phenotypic characterization & drug resistance. **Indian Journal of Medical Research**, Suppl 119, p. 22-25, 2004.
- KAUFMANN, M. E. Pulsed-field gel electrophoresis. In: WOODFORD, N.; JOHNSON, A. P. **Molecular Bacteriology, Protocols and Clinical Applications**. New Jersey: Humana Press Inc, 1998. p.33-62.
- KIRST, H. A.; THOMPSON, D. G.; NICAS, T. I. Historical yearly usage of vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1303-1304, 1998.
- KOBAYASHI, I.; MURAOKA, H.; IYODA, T.; NISHIDA, M.; HASEGAWA, M.; YAMAGUCHI, K. Antimicrobial susceptibility testing of vancomycin-resistant *Enterococcus* by VITEK 2 system, and comparison with two NCCLS reference methods. **Jornal of Medical Microbiology**. V. 53, p. 1229-1232, 2004.
- KOLAR, M.; URBANEK, K.; VAGNEROVA, I.; KOUKALOVA, D. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics** v. 31, p. 67-72, 2006.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D. **Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas Colorado**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 589-659.
- KRASEMANN, C.; MEYER, J.; TILLOSTON, G. Evaluation of the clinical microbiology profile of moxifloxacin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32 (Suppl 1), p. 51-63, 2001.
- LEME, I. L.; FERREIRA, A. J. P. Enterococcias In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes** 2th ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. p. 132-146.
- LECLERCQ, R.; DUTKA, M. S.; BRISSON, N. A. Resistance of enterococci aminoglycosides and glycopeptides. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, p. 495-501, 1992.
- LIGOZZI, M.; BERNINI, C.; BONORA, M. G.; FATIMA, M. ZULIANI, J.; FONTANA, R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant Gram-positive cocci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 5, p. 1681-1686, 2002.
- LINDEN, P.K.; PASCULLE, A. W.; McDEVITT, D.; KRAMER, D. J. Effect of quinupristin/dalfopristin on the outcome of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteraemia: comparison with a control cohort. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, c. 39, Suppl. A, p. 145-151, 1997.

- LOMAR, A. V.; DIAMENT, D. **Guia de terapia antiinfecçiosa**, in VERONESI, R. e FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 1ª ed., Atheneu, São Paulo, 1997.
- MARIN, M.E.; MERA, J.R.; ARDUINO, R.C.; CORREA, A.P.; COQUE, T.M.; STAMBOULIAN, D. First report of vancomycinresistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n.1, p. 235-236, 1998.
- MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to typing of microorganism. **Clinical Infectious Diseases**, v.17, p. 153-164, 1993.
- MCNAMARA, E.B.; KING, E.M.; SMYTH, E.G. A survey of antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococcus spp.* from Irish hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 185-189, 1995.
- MENDES, C.; SINTO, S. I.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; TEIXEIRA, L.; SEGURA, A.; SOUZA, D.; BARTH, A. L.; NICODEMO, A. C. Atividade antimicrobiana *in vitro* de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 38, n. 3, p. 191-197, 2002.
- MERQUIOR VLC, PERALTA JM, FACKLAM RR, TEIXEIRA LM: Analysis of electrophoretic whole-cell protein profiles as a tool for characterization of *Enterococcus* species. **Current Microbiology**. V. 28, p.149-153, 1994.
- MOELLERING, R. C. J. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical Infectious Disease**, v. 14, p. 1173-1178, 1992.
- MONDINO S. B.; CASTRO A. C. D.; MONDINO, P. J. J.; CARVALHO M. G. S.; SILVA K. M. F.; TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and genotyping characterization of clinical and intestinal Enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian Hospitals. **Microbiology Drug Resistance**, v. 9, n. 2, p. 167-174, 2003.
- MORRISON, D.; WOODFORD, N.; BARRETT, S. P.; SISSON, P; COOKSON, B. D. DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1084-1091, 1999.
- MUNDY, L.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p. 513-522, 2000.
- MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Review**, v. 3, p. 46-65, 1990.
- MURRAY, B. E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 710-721, 2000.
- MUTNICK, A. H.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 46, p. 46-63, 2003.

- NOSKIN, G. A.; PETERSON, L. R.; WARREN, J. R. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* bacteremia: acquisition and outcome. **Clinical Infectious Disease**, v.20, p. 296-301, 1995.
- OLIPHANT, C.M.; GREEN G.M. Quinolones: a comprehensive review. **American Family Physician**, v. 65, p. 455-464, 2002.
- PAI, C. H.; KIM, M. Antimicrobial resistance in enterococci. **Yonsei Medical Journal**, v. 39, n. 6, p. 554-561, 1998.
- PALAVECINO R., E. Puesta al día en enterococos - año 2001: Identificação de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. **Revista Chilena de Infectología**, v. 18, n. 2, p. 95-100, 2001.
- PANKEY, G.; ASHCRAFT, D.; PATEL, N. In vitro synergy of Daptomycin plus Rifampin against *Enterococcus faecium* resistant to both Linezolid and Vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 49, n. 12, p. 5166-5168, 2005.
- PAPAPARASKEVAS, J.; VATOPOULOS, A.; TASSIOS, P. T.; AVLAMI, A.; LEGAKIS, N. J.; KALAPOTHAKI, V. Diversity among high-level aminoglycoside-resistance enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 277-283, 2000.
- PATTERSON, J.E.; WANGER, A.; ZSCHECK, K.K.; ZERVOS, M.J.; MURRAY, B.E.; Molecular epidemiology of β -lactamase producing enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 302-305, 1990.
- PFALLER, M. A.; JONES, R. N., DOERN, G. V., SADER, H. S.; KUGLER, K. C.; BEACH, M. L. Survey of bloodstream infections attributable to gram-positive: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 33, n. 4, p. 283-297, 1999.
- QUIÑONES, D.; GOÑI, P.; RUBIO, M.C.; DURAN, E.; GÓMEZ-LUZ, R. *Enterococci* spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, p. 63-67, 2005.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma**. Editora Atheneu, São Paulo, 2005, p. 27-63.
- SAEEDI B.; HÄLLGREN A.; ISAKSSON B.; JONASSON J.; NILSSON L. E.; HANBERGER H. Genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin resistance from patients with bacteraemia in the South east of Sweden 1994-2001. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, v. 36, n. 6-7, p. 405-409, 2004.
- SANDRI, A. M. ***Enterococcus spp.* resistente à vancomicina: tipagem molecular, caracterização clínica e associação com mortalidade**. Porto Alegre: UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Medicina, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas).

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 215-224, 2002.

SCHULZ, J. E.; SAHM, D. F. Reability of the E Test for detection of ampicilin, vancomycin, and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus spp.*. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 3336-3339, 1993

SMITH, D. L.; JOHNSON, J. A.; HARRIS, A. D.; FURUNO, J. P.; PERENCEVICH, E. N.; MORRIS Jr, J. G. Assessing risks for a pre-emergent pathogen: virginiamycin use and the emergence of streptogramin resistance in *Enterococcus faecium*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 241-249, 2003.

SPECIALE A, MUSUMECI R, BLANDINO G, MILAZZO I, CACCAMO F, NICOLETTI G. Minimal inhibitory concentrations and time-kill determination of moxifloxacin against aerobic and anaerobic isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, p. 111-118, 2002.

STOBBERINGH, E.; BOGAARD, A. V. D.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; TOP, J.; WILLEMS, R. Enterococci with glycopeptide resistance in Turkeys, Turkey farmers, Turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43 n. 9, p. 2215-2221, 1999.

TEIXEIRA, L.; FACKLAM, R.; *Enterococcus*. In. **Symposium update on Gram-positive cocci: taxonomy, identificação and clinical significance**. American Society for Microbiology, 98th General Meeting, Atlanta, USA, 1998.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TORNIÉPORTH, N. G., R. B. ROBERTS, J. JOHN, A. HAFNIER, AND L. W. RILEY. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. **Clinical Infectious Disease** v. 23 p. 767–772, 1996.

UDO E.E, A.L; SWEIH N.; JOHN, P.; CHUG, T.D.; Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.43, p. 233-238, 2002.

UDO E.E, A.L; SWEIH N.; JOHN et al. Characterization of high-level aminoglycoside-resistant enterococci in Kuwait hospitals. **Microbiology Drug Resistance**, v. 10,p. 139-145, 2004.

UTTLEY, A.H.; COLLINS, C.H.; NAIDO, J.; GEORGE, R.C. Vancomycin resistant enterococci. **Lancet**, v.1, p. 57-58, 1988.

VAN DEN BRAAK N.; VAN BELKUM A.; KREFT D.; TE WITT R.; VERBRUGH H. A.; ENDTZ H. P. The prevalence and clonal expansion of high-level gentamicin-resistant enterococci isolated from blood cultures in a Dutch university hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V. 44, n. 6, p. 795-798, 1999.

WALKER; Antimicrobial agents and chemotherapy. *In*: Slots J, Taubman MA, eds. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 242-64, 1992

WENDELBO O.; JUREEN R.; EIDE G. E.; DIGRANES A.; LANGELAND N.; HARTHUG S. Outbreak of infection with high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* (HLGRE) in a Norwegian hospital. **Clinical Microbiology and Infectious**. v. 9, n. 7, p. 662-669, 2003

WILSON, D.; TUOHY, M.; WARNER, D.; PROCOP, G.W.; HALL, G. Accuracy of VITEK 2 (bioMerieux) for identification and susceptibility testing of *Enterococcus* sp. **Abstract Interscience Conference of Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Sep 27-30, 42: Abstract n. D-38, 2002.

YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003. p. 1178-1181.

ZARRILI, R.; TRIPODI, M. F.; PODOLO, A. D.; FORTUNATO, R.; BAGATTINI, M.; CRISPINO, M.; FLORIO, A.; TRIASSI, M.; UTILI, R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 827-835, 2005.

Ficha a ser preenchida pelo hospital de origem da amostra.

Identificação de <i>Enterococcus spp</i> Pesquisador responsável: Eduardo André Bender		
HOSPITAL:	Nº no hospital:	
Referência do paciente:		
<input type="checkbox"/> Ambulatorial <input type="checkbox"/> Internado. Unidade de internação:		
() Clínica médica	() Bloco Cirúrgico	() UTI pediátrica
() UTI adultos	() Clínica obstétrica	() Pediatria
() Outra: _____		
Sexo: <input type="checkbox"/> feminino	<input type="checkbox"/> masculino	Idade:
Tipo de material clínico:		
() Secreções em geral	() Ponta de cateter	
() Urina	() Biópsia	
() Hemocultura	() Abscesso	
() Líquidos	() LCR	
() Escarro	() LBA	
() Outro: _____		
Espécie do enterococo identificado:		
Data do exame:		
Observações:		

Anexo 4:

Ficha a ser preenchida pelo pesquisador no recebimento da amostra:

Origem:	N° no hospital:	N° Pesquisa:	
Data do exame:	Data de recebimento:		
Espécie identificada:	Material clínico:		
Unidade de internação:			
TESTES FENOTÍPICOS			
Data de realização:			
Agente	Halo	Interpretação	CIM
Ampicilina 10µg			
Estreptomicina 300µg			
Gentamicina 120µg			
Vancomicina 30µg			
Teicoplanina 30µg			
Cloranfenicol 30µg			
Nitrofurantoína 300 µg			
Eritromicina 15µg			
Tetraciclina 30µg			
Rifampicina 5µg			
Ciprofloxacino 5µg			
Quinupristina- Dalfopristina 15µg			