

**DOUTORADO INTER-INSTITUCIONAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS/UFAM
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU/UNESP**

MARIA ERMELINDA FILGUEIRAS DE AZEVEDO

**Identificação de *Enterococcus spp.* e Avaliação da
Ocorrência de Genes de Resistência à Vancomicina em
Amostras de Pacientes de Hospitais de Manaus, AM.**

BOTUCATU

- 2013 –

MARIA ERMELINDA FILGUEIRAS DE AZEVEDO

**Identificação de *Enterococcus* spp. e Avaliação da
Ocorrência de Genes de Resistência à Vancomicina em
Amostras de Pacientes de Hospitais de Manaus, AM.**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiopatologia em
Clínica Médica da Faculdade de
Medicina de Botucatu, da
Universidade Estadual Paulista
UNESP, para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Adjunto José Roberto Fioretto

Coorientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

BOTUCATU

- 2013-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Azevedo, Maria Ermelinda Filgueiras de.

Identificação de *Enterococcus* spp. e avaliação da ocorrência de genes de resistência à vancomicina em amostras de pacientes de hospitais de Manaus, AM / Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Roberto Fioretto

Coorientador: João Vicente Braga de Souza

Capes: 21202010

1. Infecção hospitalar. 2. *Enterococcus*. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Drogas - resistência em microorganismos.

Palavras-chave: *Enterococcus*; *Enterococos* resistentes à vancomicina; Infecção hospitalar; Reação da Polimerase em Cadeia; Resistência antimicrobiana.

MARIA ERMELINDA FILGUEIRAS DE AZEVEDO

Identificação de *Enterococcus spp.* e Avaliação da Ocorrência de Genes de Resistência à Vancomicina em Amostras de Pacientes de Hospitais de Manaus, AM.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista UNESP, para obtenção do título de *Doutor*.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Presidente e Orientador Prof. Adjunto José Roberto Fioretto

1º Examinador.....

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

5º Examinador.....

Botucatu, de setembro de 2013.

DEDICATÓRIA

A Deus, por sentir sua presença sempre ao meu lado nos momentos bons e nas dificuldades e por colocar em meu caminho tantas pessoas amigas para me ajudar nesse período da minha vida.

A minha mãe Hilda e meu pai Ulysses (*in Memoriam*), a minha filha Nila Maria, minhas irmãs, sobrinhos, familiares, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Doutorado Inter-institucional (DINTER) entre a Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e a Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (FMB/UNESP), pela oportunidade de realizar o curso de doutorado e suporte financeiro para realização desse estudo.

Ao Dr. José Roberto Fioretto, orientador desse trabalho, pela compreensão, ensinamentos, valiosas contribuições e dedicação para que eu pudesse chegar ao final.

Ao Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA) e em especial ao Dr. João Vicente Braga dos Santos, coorientador desse trabalho, pela amizade, sugestões, partilha do saber e a oportunidade de disponibilizar seu laboratório para a realização de etapas importantes.

Aos coordenadores do DINTER, Dr. José Reinaldo Cerqueira Brás (FMB/UNESP) e Dr. Fernando Luiz Westphal (UFAM), pelo incentivo, apoio e confiança para a realização desse trabalho.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM) por apoiar e incentivar a qualificação docente.

Aos professores e funcionários da FCF/UFAM, pelo apoio, colaboração, confiança e amizade que foram muito importantes durante esse período.

As amigas Sandra Nunes, Iara, Deuzinha, Naia, Luziane, Claudionora, Fumico, Rosalina, Ana Laranjeira, Glacira, Susi, Bernadete, Mariângela e a todas pela unidade e orações.

Aos amigos do laboratório e farmácia do HUGV, especialmente Rose Santos, Julivalda, Vitória, Aparecida, Célio, Ernanda, Nádia, Viviane, Louzamira pelas dicas, envio dos isolados bacterianos e de tudo que eu precisei, obrigada por tudo.

Aos amigos do laboratório de Micologia do INPA pela ajuda, incentivo, partilha de conhecimentos, agradeço e torço pelo sucesso de todos vocês.

Ao amigo Kleber do Laboratório Reunidos de Manaus, pela amizade, colaboração no envio dos isolados bacterianos e pela disponibilidade em me auxiliar nos testes realizados nesse laboratório.

A farmacêutica Vívian pela colaboração e acesso aos dados dos pacientes junto à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar da Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas (CCIH/SUSAM).

A farmacêutica-bioquímica Ana Lúcia Stone do Lacen pelo apoio e envio dos isolados bacterianos.

As amigas Maurianne Aquino e Karoline Jimenez pela amizade, colaboração em várias etapas do trabalho e especialmente nos momentos que mais precisei.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os *Enterococcus* spp habitam normalmente o trato gastrointestinal de seres humanos e de animais. Desde 1980, foram identificados como importantes agente de infecções hospitalares. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são agentes de diversas infecções, como bacteriemia, sepse, endocardite, infecção do trato urinário, infecções de feridas e meningite. A resistência adquirida, mais predominantemente a penicilina/ampicilina, aminoglicosídeos (alto nível de resistência) e glicopeptídeos são relatados em um número crescente de isolados e o espectro terapêutico nestes casos é limitado. A principal preocupação é que os genes que codificam a resistência para todos esses antibióticos poderiam ser transferidos para outros enterococos ou mesmo para muitos outros patógenos virulentos. A resistência adquirida aos glicopeptídeos é mediada por vários mecanismos (tipos VanA/B/D/E/G/L), sendo que os genótipos VanA e VanB são transferíveis. Fatores relacionados com o hospedeiro, com o hospital, procedimentos invasivos, meio ambiente, e o uso de antibióticos podem aumentar o risco de colonização ou infecção com VRE. Este estudo visa investigar a ocorrência destes microrganismos, em pacientes de hospitais de Manaus - Amazonas, identificando a distribuição das espécies e o perfil de resistência aos antimicrobianos e dos genes de resistência a vancomicina envolvidos. Foram analisados 38 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de pacientes internados ou de atendimento ambulatorial no período de outubro de 2011 a setembro de 2012. Foram confirmados 29 isolados de *E. faecalis* e 8 de *E. faecium* por testes bioquímicos convencionais, pela metodologia automatizada e por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Um isolado de *Enterococcus* spp. foi identificado pelo equipamento automatizado como *E. casseliflavus*, identificação não confirmada pela PCR. A avaliação dos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica foram realizados pelos métodos de disco difusão e automatizado. Não foram detectados nenhum isolado positivo para a enzima beta-lactamase. A resistência à vancomicina foi investigada por testes fenotípicos e confirmada pela PCR. Foram detectados três isolados de *E. faecium* e um de *E. faecalis* resistentes a vancomicina (VRE) e apresentaram o genótipo VanA por PCR.

Palavras-chave: *Enterococcus*; Resistência Antimicrobiana; Infecção Hospitalar; enterococos resistente à vancomicina (VRE); Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).

ABSTRACT

The *Enterococcus* spp. normally inhabit the gastrointestinal tract of humans and animals. Since 1980, have been identified as a major cause of nosocomial infections. The species *E. faecalis* and *E. faecium* are agents of various infections, such as bacteremia, sepsis, endocarditis, urinary tract infections, wound infections and meningitis. Acquired resistance, most predominantly penicillin / ampicillin, aminoglycosides (high-level resistance) and glycopeptides are reported in an increasing number of isolates and therapeutic spectrum in these cases is limited. The main concern is that the genes which encode resistance to these antibiotics could all be transferred to other Enterococci or for many other virulent pathogens. Acquired resistance to glycopeptides is mediated by several mechanisms (types VanA/B/D/E/G/L), with VanA and VanB genotypes are transferable. Factors related to the host, with the hospital, invasive procedures, environment, and the use of antibiotics may increase the risk of colonization or infection with VRE. This study aims to investigate the occurrence of these microorganisms in hospital patients of Manaus - Amazonas, identifying species distribution and antimicrobial resistance profile and vancomycin resistance genes involved. We analyzed 38 *Enterococcus* spp. from inpatient or outpatient care from October 2011 to September 2012. 29 isolates *E. faecalis* and 8 *E. faecium* were confirmed by conventional biochemical tests, the automated methodology and Polymerase Chain Reaction (PCR). An isolate of *Enterococcus* spp. was identified by automated equipment as *E. casseliflavus*, identification was not confirmed by PCR. The evaluation of the antimicrobial susceptibility profiles commonly used in clinical practice were performed by disk diffusion methods and automated. There were differences in the results of sensitivity to penicillin and ampicillin between the two methods. There were no isolated detected positive for beta-lactamase enzyme. Vancomycin resistance was investigated by phenotypic tests and confirmed by PCR. Were detected three isolates of *E. faecium* and one of *E. faecalis* resistant to vancomycin (VRE) and presented the VanA genotype by PCR.

Keywords: Enterococcus; Antimicrobial Resistance; Nosocomial Infection; vancomycin-resistant enterococci (VRE); Polymerase Chain Reaction (PCR).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	As colônias de enterococos em meio de ágar sangue humano.....	37
FIGURA 2 -	Colônias apresentando β -hemólise em meio de ágar sangue humano.....	37
FIGURA 3 -	Isolados de enterococos apresentando Teste PYR positivo.....	38
FIGURA 4 -	Identificação a nível de espécie da amostra n°. 24 com os seguintes testes bioquímicos: a) tolerância a 0,04% de telurito, b) utilização do piruvato, c) desaminação da arginina e fermentação dos carboidratos [d) lactose, e) arabinose, f) manitol, g) rafinose, h) sacarose, i) sorbitol e j) sorbose].....	38
FIGURA 5 -	Prova bioquímica de tolerância a 0,04% de telurito.....	39
FIGURA 6 -	Teste para detecção da motilidade para identificação das espécies de enterococos.....	39
FIGURA 7 -	Teste para verificação de utilização do piruvato de sódio a 1% para identificação das espécies de enterococos...	40
FIGURA 8 -	Teste negativo para detecção da produção de pigmento amarelo em Tryptic Soy Agar.....	40
FIGURA 9 -	Cartão GP para bactérias Gram-positivas contendo 43 testes (bioMérieux).....	43
FIGURA 10 -	Cartão de antibiograma Gram-positivo AST-P585 (bioMérieux).....	45
FIGURA 11 -	Placas de Antibiograma segundo Método de disco difusão com amostras de <i>Enterococcus</i> spp.....	46
FIGURA 12 -	Isolados de enterococos resistentes à vancomicina em meio cromogênico VRE.....	48
FIGURA 13 -	Isolados de enterococos resistente à vancomicina em ágar Mueller Hinton adicionado com 8 μ g/mL de vancomicina.....	48
FIGURA 14 -	Isolados de enterococos resistente à vancomicina em ágar Enterococcosel adicionado com 8 μ g/mL de vancomicina.....	48
FIGURA 15 -	Determinação da CIM utilizando fita com gradiente de concentração de vancomicina para um isolado sensível (amostra 11).....	50
FIGURA 16 -	Isolado de enterococos apresentando resistência à vancomicina no teste de utilização de fita com gradiente de vancomicina.....	50

FIGURA 17 -	Amostras clínicas provenientes dos pacientes participantes do estudo.....	57
FIGURA 18 -	Espécies de <i>Enterococcus</i> identificadas no estudo.....	60
FIGURA 19 -	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão de 29 amostras de <i>E. faecalis</i> .	66
FIGURA 20 -	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão de 8 amostras de <i>E. faecium</i>	67
FIGURA 21 -	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pela metodologia automatizada de 29 isolados de <i>E. faecalis</i> .	68
FIGURA 22 -	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pela metodologia automatizada de 8 amostras de <i>E. faecium</i> .	69
FIGURA 23 -	Isolados resistentes de <i>E. faecium</i> e de <i>E. faecalis</i> nos meios utilizados para detecção de resistência à vancomicina.....	75
FIGURA 24 -	Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie <i>E. faecalis</i> pela PCR.....	77
FIGURA 25 -	Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie <i>E. faecalis</i> pela PCR.....	77
FIGURA 26 -	Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie <i>E. faecalis</i> pela PCR.....	78
FIGURA 27 -	Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie <i>E. faecium</i> pela PCR.....	78
FIGURA 28 -	Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie <i>E. casseliflavus</i> pela PCR.....	79
FIGURA 29 -	Eletroforese em gel de agarose para identificação a nível de espécie do isolado 11 pela PCR.....	79
FIGURA 30 -	Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genótipos de resistência à vancomicina dos isolados de enterococos pela PCR.....	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Características fenotípicas usadas na identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> e algumas espécies de outros cocos Gram-positivos fisiologicamente relacionados.....	35
TABELA 2 -	Relação dos testes realizados para identificação bacteriana pelo Sistema VITEK 2 Compact.....	42
TABELA 3 -	Antimicrobianos dos cartões de antibiograma Gram-positivo AST-P585.....	44
TABELA 4 -	<i>Primers</i> utilizados na identificação genotípica das espécies de Enterococos.....	54
TABELA 5 -	<i>Primers</i> dos diferentes genótipos de resistência à vancomicina em amostras de enterococos para amplificação por PCR.....	55
TABELA 6 -	Unidades de Saúde participantes do estudo.....	58
TABELA 7 -	Características dos pacientes participantes do estudo...	59
TABELA 8 -	Resultados da identificação das espécies do HUGV.....	60
TABELA 9 -	Resultados dos testes fenotípicos dos isolados de enterococos provenientes do HUGV pela metodologia manual do estudo.....	61
TABELA 10 -	Identificação dos 16 isolados de <i>Enterococcus</i> provenientes do HUGV pelo Sistema VITEK 2 Compact.	62
TABELA 11 -	Espécies identificadas pelo Laboratório Reunidos de Manaus.....	62
TABELA 12 -	Resultados dos testes fenotípicos dos isolados de enterococos provenientes do Laboratório Reunidos de Manaus pela metodologia manual do estudo.....	63
TABELA 13 -	Distribuição das espécies de <i>Enterococcus</i> entre os 13 isolados recebidos do Laboratório Reunidos de Manaus pelo SISTEMA VITEK 2 Compact.....	64
TABELA 14 -	Espécies identificadas pelo Lacen.....	64
TABELA 15 -	Distribuição das espécies de <i>Enterococcus</i> entre os 9 isolados recebidos do Lacen pelo Sistema VITEK 2 Compact.....	65
TABELA 16 -	Resultados dos testes fenotípicos dos isolados de enterococos provenientes do Lacen pela metodologia manual do estudo.....	65
TABELA 17 -	Comparação dos resultados entre os testes de disco difusão e automatizado dos 29 isolados de <i>E. faecalis</i> .	70
TABELA 18 -	Comparação dos resultados entre os testes de disco	

	difusão e automatizado dos 29 isolados de <i>E. faecium</i> .	72
TABELA 19 -	Comparação dos resultados entre os testes de disco	
	difusão e automatizado da amostra 11.....	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ágar Tripticaseína Soja:	Tryptic Soy Agar
ATCC:.....	American Type Culture Collection
BE.....	Bile Esculina
Caldo BHI.....	Brain Heart Infusion
CC17	Cluster ou complexo clonal 17
CCIH.....	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC.....	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
CIM.....	Concentração Inibitória Mínima
CLSI.....	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm.....	Centímetros
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
dNTP.....	Desoxirribonucleótido-trifosfato
et al.	e outros
G + C.....	Guanina + Citosina
GRE.....	Enterococos resistentes aos glicopeptídeos
HICPAC.....	Comitê Consultivo de Práticas de Controle de Infecções Hospitalares
HLRA.....	Altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos
LAP	Leucina-beta-naftilamida
mg/mL.....	Miligrama/mililitro
MGP.....	metil- α -D-glicopiranosídeo
mm.....	Milímetro
mM.....	Milimolar
μ M.....	Micromolar
NaCl	Cloreto de Sódio
Ng.....	Nanograma
nm.....	Nanômetro
Pb.....	Pares de bases
PBPs.....	Proteínas que se ligam às Penicilinas
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase
pH.....	Potencial hidrogeniônico
PYR.....	L-pirrolidonil- β -naftilamida
rpm.....	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SAME.....	Serviço de Atendimento Médico e Estatístico
Solução tampãoTBE....	Tris/Borato/EDTA
sp.	Espécie

spp.	Espécies
TSB	Tryptone Soya Broth (caldo triptona de soja)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultra violeta
VanA/B/C/D/E/G/L	Genótipos que conferem resistência à vancomicina
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina
VSE	Enterococos sensíveis à vancomicina
β -lactamase	Beta-lactamase
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Gênero <i>Enterococcus</i>	16
1.2	Resistência aos Antimicrobianos.....	18
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Geral.....	27
2.2	Específicos.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Procedimentos Iniciais.....	28
3.2	Testes fenotípicos de identificação – Metodologia Manual.....	29
3.2.1	Identificação do gênero <i>Enterococcus</i>	29
3.2.2	Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i>	31
3.3	Testes fenotípicos de identificação pela metodologia automatizada.....	41
3.3.1	Identificação bacteriana de gênero e espécie.....	41
3.4	Testes fenotípicos para avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pela metodologia automatizada.....	43
3.5	Testes fenotípicos para avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco difusão.....	45
3.6	Investigação da existência de resistência à vancomicina dos isolados de <i>Enterococcus</i> spp. pelos seguintes testes fenotípicos....	47
3.6.1	Testes de triagem com a utilização de meio cromogênico e meios adicionados com vancomicina.....	47
3.6.2	Utilização de fitas com gradiente do antimicrobiano para determinação da CIM.....	49
3.7	Deteção da produção da enzima beta-lactamase.....	51
3.8	Investigação de genes que determinam a resistência à vancomicina.....	52
3.8.1	Extração do DNA bacteriano.....	52
3.8.2	Quantificação do DNA bacteriano.....	53
3.8.3	Confirmação das espécies de enterococos por PCR.....	53
3.8.4	Deteção dos genótipos de resistência à vancomicina por PCR.....	54
3.8.5	Eletroforese em gel de agarose.....	55
3.9	Análise dos dados.....	56
4	RESULTADOS.....	57
4.1	Amostras clínicas e pacientes.....	57
4.2	Identificação bacteriana.....	60
4.3	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	66
4.4	Comparação entre os testes do método de disco difusão e	

metodologia automatizada.....	70
4.5 Utilização de meio cromogênico e meios adicionados com vancomicina.....	75
4.6 Utilização de fitas com gradiente do antimicrobiano para determinação da CIM.....	76
4.7 Detecção da produção da enzima beta-lactamase.....	76
4.8 Métodos genotípicos.....	77
4.8.1 Confirmação das espécies de enterococos por PCR.....	77
4.8.2 Detecção dos genótipos de resistência à vancomicina por PCR	80
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
APÊNDICE 1.....	104
APÊNDICE 2.....	105
ANEXO 1.....	106
ANEXO 2.....	107
ANEXO 3A.....	108
ANEXO 3B.....	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Enterococcus*

Os enterococos foram considerados por longo tempo pertencentes ao gênero *Streptococcus*, possuidores do antígeno D. Esses microrganismos eram diferenciados das espécies de estreptococos, denominadas grupo D não-enterococos, com base em características fisiológicas e de suscetibilidade a agentes físicos e químicos incluindo antimicrobianos. Essas diferenças, associadas a dados de hibridização de ácidos nucleicos e de sequenciamento da subunidade 16S do rRNA demonstraram a distância genética entre amostras identificadas como pertencentes ao grupo D não-enterococos e aquelas denominadas *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*, resultando na proposta de transferência destas para um novo gênero, em 1984, denominado *Enterococcus* (Schleifer e Kilpper-Bals, 1984; Trabulsi e Alterthum, 2008).

Atualmente, são conhecidas mais de 30 espécies de *Enterococcus*, entre as quais se destacam: *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; *Enterococcus casseliflavus*; *Enterococcus durans*; *Enterococcus gallinarum*; *Enterococcus hirae*; *Enterococcus mundtii*; *Enterococcus avium*; *Enterococcus raffinosus* (Trabulsi e Alterthum, 2008).

O gênero *Enterococcus* compreende um grupo de bactérias que se apresentam como cocos Gram-positivos, ocorrendo como células isoladas, aos pares e em cadeias curtas. Nos esfregaços corados pelo Gram preparados a partir de crescimento em meios sólidos, geralmente apresentam a forma cocobacilar, mas

tendem a ter a forma oval e agrupados em cadeias quando a partir de crescimento em caldo tioglicolato (Teixeira et al., 2007).

A partir do crescimento de 24 horas em meio de ágar sangue, as colônias apresentam tamanho entre 1 a 2 mm de diâmetro embora alguns isolados possam formar colônias menores. Cerca de 1/3 das culturas de *Enterococcus faecalis* podem ser beta-hemolíticas em ágar contendo sangue de coelho, cavalo ou humano, mas não hemolíticas em ágar contendo sangue de carneiro. Algumas culturas de *Enterococcus durans* são beta-hemolíticas independentemente do tipo de sangue utilizado. Todas as outras espécies são geralmente alfa-hemolíticas ou não hemolíticas (Teixeira et al., 2007).

Como os estreptococos, estes microrganismos não têm enzimas citocromo e são catalase negativos, embora alguns isolados produzam uma pseudo-catalase (Murray, 1990).

Os enterococos são anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e pertencem a um grupo de microrganismos conhecidos como bactérias ácido lácticas que produzem bacteriocinas (LAB) (Fisher e Phillips, 2009). Os gêneros pertencentes ao grupo dos microrganismos LAB apresentam baixo conteúdo G + C, < 50mol% (Klein et al., 1998).

São extremamente resistentes e toleram grande variação de condições de crescimento, como temperaturas entre 10 a 45°C, com ótimo de crescimento a 35°C, em ambientes hipotônicos, hipertônicos, ácidos ou alcalinos. A maioria das espécies cresce em caldo contendo 6,5% de cloreto de sódio e hidrolisam a esculina na presença de sais biliares (teste bile-esculina) (Huycke et al., 1998; Teixeira et al., 2007). Habitam normalmente o trato gastrointestinal dos seres humanos e de animais, embora também possam ser encontradas em outros sítios anatômicos

como a vagina e a cavidade oral e também em plantas e insetos (Marques e Suzart, 2004).

Os enterococos também são encontrados no solo, na água e nos alimentos. Nos seres humanos adultos, os enterococos representam 1% da microflora intestinal (Sghir et al., 2000).

Desde 1980 os *Enterococcus* spp. têm sido identificados como importantes agentes de infecções hospitalares. Entre estas infecções, 85% a 90% são causadas pelo *E. faecalis* e 10% pelo *E. faecium* (Leclercq, 2009).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são agentes de diversas infecções, como bacteriemia, sepse, endocardite, infecção do trato urinário, infecções de feridas e meningite neonatal (Marques e Suzart, 2004). *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. durans* ou *E. hirae*, ocasionalmente, causam infecções em humanos (Mundy et al., 2000).

Nas últimas décadas, vários fatores de virulência foram descritos em *Enterococcus*, como citolisinas, gelatinase, serina protease, hialuronidase, substância agregativa, proteína de superfície extracelular e outras adesinas envolvidas na ligação a células do hospedeiro e na formação de biofilmes, e ferormônios codificados por plasmídios (Valenzuela et al., 2009).

1.2 Resistência aos Antimicrobianos

Enterococcus spp. são resistentes a grande variedade de antibióticos. Esta característica permite sua sobrevivência no ambiente hospitalar, onde os

antibióticos são usados, possibilitando a disseminação de microrganismos resistentes (Barbosa et al., 2009).

Junto com o aumento da resistência aos antimicrobianos, a aquisição de fatores de virulência e a habilidade de enterococos de formar biofilmes também contribuíram para o aumento de infecções hospitalares (Sava et al., 2010).

A resistência aos antimicrobianos em enterococos pode ser dividida em duas classes: resistência intrínseca e resistência adquirida (Top et al., 2008).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes a vários antibióticos. Ao contrário da resistência adquirida e de fatores de virulência que normalmente são codificados por plasmídeos e transposons, a resistência intrínseca é baseada em genes cromossômicos, que são tipicamente intransferíveis (Huycke et al., 1998).

Os enterococos apresentam resistência intrínseca a cefalosporinas, sulfonamidas, lincosamidas, vários beta-lactâmicos e a níveis baixos de aminoglicosídeos. A aquisição de determinantes genéticos confere resistência a todas as classes de antibióticos. A principal preocupação é que os genes que codificam a resistência para todos esses antibióticos possam ser transferidos por ferormônio, plasmídeos conjugativos ou transposons para outros *Enterococcus* spp. ou mesmo para muitos outros patógenos virulentos (Barbosa et al., 2009).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos devido expressarem proteínas que se ligam às penicilinas (PBPs) com baixa afinidade aos agentes beta-lactâmicos (Top et al., 2008). Eles possuem pelo menos cinco e, às vezes, mais do que nove diferentes PBPs (Williamson et al., 1986). As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* expressam, respectivamente, PBP5 e PBP4 de baixa afinidade que se ligam fracamente aos antibióticos beta-lactâmicos (Hollenbeck e Rice, 2012). Como resultado, a concentração inibitória mínima (CIM)

para as penicilinas está entre 2-8 mg/mL para *E. faecalis* e entre 8-16 mg/mL para *E. faecium* (Sifaoui et al., 2001) e a CIMs muito superiores em relação aos estreptococos e aos microrganismos Gram-positivos relacionados que não contêm genes cromossomicamente codificados para PBPs de baixa afinidade (Murray, 1992). Na população, a CIM dos enterococos tem aumentado ao longo do tempo (Grayson et al., 1991; Galloway-Peña JR et al., 2009).

O nível de resistência intrínseca difere entre os antimicrobianos beta-lactâmicos. Geralmente, os enterococos possuem a mais alta atividade para penicilinas (exemplo a ampicilina), sendo que para carbapenens a atividade é um pouco mais baixa e, ainda, possuem a menor atividade para cefalosporinas (Murray, 1990; Top et al., 2008).

Níveis altos de resistência a ampicilina raramente são encontrados em *E. faecalis*, mas, principalmente, para *E. faecium* isolado de amostras clínicas. O alto nível de resistência a ampicilina em *E. faecium* é devido ou a alterações por mutações na PBP5, resultando em menor afinidade para ampicilina ou a superprodução de PBP5 (Top et al., 2008).

A produção de beta-lactamase tem sido descrita quase exclusivamente em *E. faecalis* e é atribuída, na maioria dos casos, a aquisição do operon, responsável pela produção de beta-lactamase do *Staphylococcus aureus* (Murray e Mederski-Samoraj, 1983; Coudron et al., 1992; Rice, 2001).

Segundo Rossi e Andreazzi (2005), *E. faecalis* é a espécie menos propensa ao desenvolvimento de resistência, ao contrário de *E. faecium*, o que exige o monitoramento de pacientes infectados. *E. faecium* apresenta resistência principalmente a penicilina-ampicilina, aos aminoglicosídeos (alto nível) e

glicopeptídeos, sendo relatado número crescente de isolados, os quais limitam as possibilidades terapêuticas (Leclercq, 2009).

Enterococcus faecium emergiu como importante patógeno hospitalar em todo o mundo, e este fato está associado com a disseminação de uma linhagem genética denominada cluster clonal 17 (CC17) (Panesso et al., 2010).

Embora a emergência de *E. faecium* CC17 já tenha sido relatada no Brasil, Chile e Paraguai (khan et. al. 2010; López et. al., 2009; Willems et. al., 2005), estudos prospectivos não foram realizados e os dados disponíveis são limitados a presença de potenciais determinantes de virulência de *E. faecium* CC17 (incluindo plasmídios contendo hyEfm) na América do Sul (Panesso et. al., 2010).

Os aminoglicosídeos como gentamicina, tobramicina, amicacina, estreptomicina são comumente utilizados para o tratamento de infecções por microrganismos Gram positivos e Gram negativos. Estes agentes se ligam aos ribossomos, interferindo na síntese proteica (Remonatto et al., 2005).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes às concentrações de aminoglicosídeos usadas clinicamente, devido à pequena permeabilidade de sua parede celular, impossibilitando que os aminoglicosídeos penetrem nessas bactérias para alcançar seu sítio alvo (Top et al., 2008).

A combinação de antibióticos que inibem a síntese da parede celular e aminoglicosídeos resulta em atividade bactericida (sinergismo bactericida) (Hollenbeck e Rice, 2012).

É importante a detecção de cepas que apresentam altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos (HLRA), pois essas deixam de apresentar a ação sinérgica clássica entre beta-lactâmicos e aminoglicosídeos no tratamento de infecções graves por enterococos. Na rotina dos testes de sensibilidade,

gentamicina e estreptomicina são os únicos aminoglicosídeos que devem ser testados, uma vez que funcionam como marcadores. Todo enterococo resistente à gentamicina é considerado resistente a todos os outros aminoglicosídeos, com exceção da estreptomicina, cuja resistência é determinada por um tipo particular de mecanismo (Rossi e Andreazzi, 2005).

A resistência aos glicopeptídios é uma característica clinicamente relevante. Quase todas as bactérias Gram-positivas são suscetíveis a essa classe de antimicrobianos. Ao contrário, os glicopeptídios são moléculas relativamente grandes, solúveis em água, e que não conseguem penetrar na membrana externa lipídica de bactérias Gram-negativas (Barbosa et al., 2009).

Os primeiros relatos de isolados clínicos de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) surgiram na Europa, em 1988 (Leclercq et al., 1988; Uttley et al., 1988). Microorganismos semelhantes foram posteriormente detectados em hospitais da costa leste dos Estados Unidos (Frieden et al., 1993). Desde então, VRE se espalharam com inesperada rapidez e são encontrados em hospitais da maioria dos países (Bell et al., 1998).

O primeiro caso documentado de infecção devido ao *E. faecium* com fenótipo de resistência a vancomicina A (VanA) ocorreu no Brasil em 1997 (Zanella et al., 1999). A cepa foi isolada de um caso de meningite em São Paulo. Um ano mais tarde, vários *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes a vancomicina foram isolados do mesmo hospital, evidenciando surto causado por enterococos VanA (Zanella et al., 2003). Um estudo destes isolados identificou diferentes clones de *E. faecium* (Camargo et al., 2006).

Os glicopeptídeos atuam bloqueando a formação da parede celular e a resistência deve-se a síntese de precursores de peptidoglicano modificados,

terminando em D-alanil-D-lactato ou D-alanina-D-serina. Foram identificados seis fenótipos de resistência adquirida aos glicopeptídeos em *Enterococcus* spp.: tipos VanA, VanB, VanD, VanE, VanG e VanL. Os genótipos de resistência *vanA* e *vanB* são os mais prevalentes na Europa, sendo encontrados predominantemente em *E. faecium*. Os *Enterococcus* spp. resistentes aos glicopeptídeos (GRE) são altamente prevalentes nos Estados Unidos e em alguns países da Ásia. Na Europa, a situação é diferente, com variação na prevalência entre 1% e 40% (Leclercq, 2009).

Segundo Rossi e Andreazzi, (2005), cinco fenótipos de resistência aos glicopeptídeos podem ser descritos da seguinte forma: O tipo VanA (plasmídeo-mediada) é caracterizado por apresentar alto nível de resistência à vancomicina ($\geq 64\mu\text{g/ml}$) e à teicoplanina ($\geq 16\mu\text{g/ml}$). A expressão é mediada pelo gene *vanA*, é induzível e pode ser transferida para cepas de *Enterococcus* sensíveis e para outras bactérias Gram-positivas. O tipo VanB (cromossomo mediada) apresenta baixo nível de resistência à vancomicina sem apresentar resistência à teicoplanina. Essa resistência foi relatada em *E. faecium* e *E. faecalis*. O tipo VanC (cromossomo mediada) apresenta baixo nível de resistência (intrínseca) à vancomicina sem apresentar resistência à teicoplanina. O gene *vanC* é cromossômico, constitutivo e não transferível. Essa resistência foi relatada em *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*. O tipo VanD apresenta moderado nível de resistência à vancomicina e à teicoplanina. Resistência reportada em *E. faecium*. O tipo VanE apresenta resistência reportada em *E. faecalis* com baixo nível de resistência à vancomicina e sensível à teicoplanina.

Na Europa, o principal reservatório identificado de GRE foi a população saudável na comunidade, das quais 2% a 10% eram de portadores. Os animais eram provavelmente o reservatório dos GRE, devido o aumento na utilização,

durante a década de 1980, de avoparcina (um glicopeptídeo semelhante à teicoplanina) para promover seu crescimento (Leclercq, 2009).

Os relatos dos aumentos da colonização e infecção de VRE entre pacientes hospitalizados são causa de preocupação por várias razões. As infecções causadas pelos VRE podem estar associadas com maior morbidade, mortalidade, aumento do tempo de internação e dos custos hospitalares do que aqueles devido aos *Enterococcus* spp. sensíveis à vancomicina (VSE), independente das condições de comorbidade que pode ter levado a infecção (Stosor et al., 1998; Salgado e Farr, 2003).

A progressão da colonização e infecção devido ao VRE em uma instituição geralmente é proveniente de casos esporádicos para surtos monoclonais e então para endemidade policlonal. Uma vez estabelecida, a endemidade é difícil de erradicar (Kim et al., 1999; Nelson et al., 2000). Devido à combinação de resistência intrínseca com resistência adquirida, as opções de tratamento para infecções causadas por VRE são extremamente limitadas (Bruin e Riley, 2007).

Muitos fatores podem aumentar o risco de colonização ou infecção com VRE. Eles podem ser divididos em fatores relacionados com o hospedeiro, com o hospital, com os procedimentos invasivos, meio ambiente e com o uso de antibiótico. Estes últimos incluem, antibioticoterapia anterior, número e duração de antibióticos recebidos, hospitalização prolongada, hospitalização em unidade de terapia intensiva, doença grave concomitante, exposição a equipamentos ou materiais contaminados com VRE e exposição a outros pacientes que estão colonizados ou infectados com VRE (Weber e Rutala, 1997).

Os *Enterococcus* spp. podem se difundir entre hospitais por meio de profissionais da saúde que trabalham em mais de uma instituição ou entre pacientes

que foram infectados anteriormente em outra instituição. Medidas contínuas de controle nos hospitais são importantes na prevenção do desenvolvimento de cepas de *Enterococcus* spp. multirresistentes. Estas medidas de controle deveriam ser multidisciplinares, envolvendo os epidemiologistas, farmacêuticos e todos os membros da comissão de controle de infecção hospitalar (Kauffman, 2003).

Em 1995, como resposta para o aumento das taxas de colonização e infecção, o *Comitê Consultivo de Práticas de Controle de Infecções Hospitalares* (HICPAC) do *Centro de Prevenção e Controle de Doenças* (CDC) estabeleceu um guia para o controle de VRE. O guia inclui o uso prudente da vancomicina, bem como medidas de controle da infecção para limitar a contaminação cruzada (Bruin e Riley, 2007).

Alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções com GRE e estafilococo resistente a metilina (MRSA) com suscetibilidade diminuída aos glicopeptídeos são restritas a antibióticos introduzidos recentemente na prática clínica, tais como linezolide, tigeciclina e daptomicina. Contudo, estas medicações são aprovadas apenas para certas indicações e já tem sido relatada resistência para algumas delas (Leclercq, 2009).

Isolados clínicos de VRE foram reconhecidos primeiro na década de 1980 na Europa e Estados Unidos (Murray, 2000). Aproximadamente dez anos mais tarde, os primeiros VRE isolados no Brasil, foram nos estados do Paraná e São Paulo. Embora esses isolados VRE pertencessem a espécie *E. faecium*, até recentemente no Brasil, *E. faecalis* foi o VRE predominante relatado em hospitais no estado de São Paulo (Conceição et al., 2011).

Na América do Sul (Brasil e Argentina), as infecções por VRE foram descritas a partir de 1998. Em estudo prospectivo multicêntrico de vigilância ocorrido

em 2003, a prevalência de VRE entre enterococos na Colômbia foi mais baixa (9,7%) do que nos Estados Unidos (Arías et al., 2003) e o isolamento de percentuais similares de VRE foi descrito mais recentemente (Moeta et. al., 2007).

Muitos estudos já foram realizados em vários países (Jones, 2001; Leavis et al., 2006; Lode, 2009) e em alguns estados do Brasil, confirmando a grande importância de *Enterococcus* spp. como agente de infecção hospitalar (Marques e Suzart, 2004; Maschieto et al., 2004; Barbosa et al., 2009).

Embora grande número de estudos tenham sido publicados sobre a evolução da resistência aos antimicrobianos em enterococos em diferentes países, dados publicados sobre esse assunto ainda são esporádicos no Brasil (Conceição et al., 2011).

Em Manaus, pouco se conhece sobre este tema, embora já tenham sido detectadas cepas multiresistentes de *Enterococcus* spp. em hospitais universitários, inclusive com o relato de um surto recente em um deles (dados não publicados).

Este estudo visa detectar a ocorrência de isolados de *Enterococcus* spp. em pacientes atendidos em hospitais na cidade de Manaus - Amazonas, para identificar a distribuição das espécies e o perfil de resistência aos antimicrobianos e dos genes de resistência a vancomicina envolvidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a ocorrência e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de isolados laboratoriais de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras de pacientes atendidos em hospitais de Manaus, AM.

2.2 Específicos

2.2.1 Verificar a distribuição das espécies de *Enterococcus* isoladas de pacientes atendidos em hospitais de Manaus, AM;

2.2.2 Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados de *Enterococcus* spp. aos antimicrobianos comumente utilizados no seu tratamento pelo método de disco difusão e metodologia automatizada;

2.2.3 Investigar a existência de resistência à vancomicina dos isolados de *Enterococcus* spp. pela utilização de testes fenotípicos;

2.2.4 Investigar, por meio de métodos de biologia molecular, a existência de genes que determinam a resistência à vancomicina nos isolados de *Enterococcus* spp.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no laboratório da disciplina de Bacteriologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM). Os testes genotípicos foram realizados no laboratório de Bioativos Pró-Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

A presente pesquisa obteve dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) e foi aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM), no dia 17/08/2011 com CAAE nº. 0322.0.115.000-11, e emendas aprovadas por este mesmo comitê em 20/06/2012, segundo Ofício nº. 053/12 – CEP/UFAM de 26/06/12 (Anexos 1 e 2).

3.1 Procedimentos Iniciais

Foram analisados 38 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de pacientes internados ou de atendimento ambulatorial no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.

Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram obtidos dos livros de registro dos laboratórios de Análises Clínicas, assim como dos Serviços de Atendimento Médico e Estatístico (SAME) e das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) das unidades de Saúde. Estes dados foram anotados na “Ficha do Paciente” (Apêndice 2).

Os isolados de *Enterococcus* spp. vieram encaminhados em ágar sangue ou em caldo BHI (Brain Heart Infusion) dos laboratórios onde foram identificados inicialmente.

Para verificação da pureza dos isolados bacterianos recebidos, estes foram repicados para caldo BHI (Himedia, Brasil) e após crescimento de 24 horas, foram semeados em ágar sangue (Tryptic Soy Agar [Difco, EUA] + 5% sangue de carneiro) e incubados por mais 24 horas. Observavam-se, então, as características macroscópicas das colônias e a morfologia das células bacterianas pela coloração de Gram. A partir de colônias isoladas foram realizados os testes para confirmação do gênero e espécie e repiques para caldo BHI com glicerol (15%), em microtubos, e após crescimento a 35 °C durante 24 horas, armazenadas a -20°C para realização dos testes genotípicos.

3.2 Testes Fenotípicos de Identificação – Metodologia Manual

Foram realizados testes para confirmação do gênero e espécie com todos os isolados de *Enterococcus* spp. recebidos.

3.2.1 Identificação do Gênero *Enterococcus*

Os testes para confirmação do gênero foram os seguintes: característica das colônias e padrão de hemólise em ágar sangue humano; comportamento tintorial pelo método de coloração de Gram; ausência de produção de catalase; hidrólise da esculina em presença de 40% de bile; crescimento em presença de cloreto de sódio (6,5%) e hidrólise da L-pirrolidonil- β -naftilamida (teste

do PYR), conforme descrição a seguir (Facklam e Collins, 1989; Teixeira et al., 2007).

- *Observação da atividade da catalase*

Uma gota da suspensão de cada amostra bacteriana foi depositada em uma lâmina e, em seguida, adicionou-se 0,5 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (Laborclin, Brasil). Homogeneizou-se e observou-se a formação de bolhas.

- *Hidrólise da esculina na presença da bile a 40%*

As amostras foram semeadas na superfície inclinada do ágar bile-esculina (Difco, EUA) e incubadas a 35°C por 18 a 24 horas. Foi considerado positivo quando houve escurecimento do meio, indicando a hidrólise da esculina na presença de 40% de bile.

- *Avaliação do crescimento em cloreto de sódio (NaCl) a 6,5%*

As amostras foram semeadas em caldo BHI (Himedia, Brasil) com 6,5% de cloreto de sódio (Nuclear, Brasil). A turvação do meio indicava crescimento da bactéria nesta concentração de NaCl e, portanto, o teste era considerado positivo.

- *Hidrólise da L-pirrolidonil-β-naftilamida (Teste do PYR)*

O teste do PYR foi realizado utilizando-se um kit comercial (Dry Slide PYR-C/15 slides C/60 Tests BD-BBL™, EUA). Por meio deste teste verifica-se a produção de uma enzima chamada pirrolidonil arilamidase que hidrolisa o substrato L-pirrolidonil- β -naftilamida. Essa reação libera β -naphtylamida livre que produz uma coloração vermelho-cereja na presença de p-dimetil-aminocinamaldeído a 0,01%. Conforme instruções do fabricante, o disco de papel contendo o substrato foi umedecido com 10 μ L de água destilada estéril. Em seguida, com o auxílio de uma alça descartável, realizou-se um esfregaço da bactéria isolada sobre o disco do PYR umedecido. Após 2 minutos, adicionou-se uma gota do PYR reagente (p-dimetil aminocinamaldeído a 0,01%). O desenvolvimento de uma cor vermelho-cereja caracterizou resultado positivo e a coloração amarela ou alaranjada indicava resultado negativo. A reação foi observada até 1 minuto.

3.2.2 Identificação das Espécies de *Enterococcus*

Os isolados que se enquadraram no gênero *Enterococcus* foram submetidos a testes bioquímicos convencionais descritos abaixo, segundo esquema proposto por Teixeira et al. (2007).

- *Produção de ácidos a partir da fermentação de diferentes carboidratos*

A verificação da fermentação dos carboidratos manitol, arabinose, lactose, sacarose, rafinose e sorbitol foi realizada em purple broth base (Difco, EUA). Inoculou-se duas gotas de uma suspensão bacteriana recente, anteriormente

acertada para a escala 0,5 de McFarland, em 2 mL de caldo púrpura de bromocresol e em seguida, adicionou-se um disco (Laborclin, Brasil) referente ao carboidrato a ser testado, proporcionando uma concentração final 1% do carboidrato. E, para finalizar, cada tubo foi selado com 0,5 mL de óleo mineral esterilizado (Mariol, Brasil). A verificação da fermentação da sorbose foi feita em purple broth base (Difco, EUA) acrescido de sorbose 1% (Inlab, Brasil) e adicionado de duas gotas da suspensão de cada isolado bacteriano e em seguida os tubos foram selados conforme descrito acima. A leitura foi realizada no período entre 24h e 48h de incubação a 35°C. A utilização do carboidrato pela bactéria torna o pH ácido com viragem do indicador de púrpura para amarelo.

- *Deteção da produção de pigmento amarelo*

A detecção do pigmento amarelo foi feita em Trypticase Soy Ágar (Difco, EUA). Após crescimento de 24 horas, as colônias foram tocadas com o *swab* e observadas a olho nu. Assim, as colônias que apresentaram coloração amarela intensa foram consideradas positivas e a ausência de coloração ou presença de uma coloração creme ou amarela pálida foi considerada negativa.

- *Tolerância a 0,04% de telurito de potássio*

Para este teste utilizou-se o caldo TSB (Tryptone Soya Broth - Himedia, Brasil) acrescido de 0,04% de telurito de potássio purex (Inlab, Brasil). A solução estoque de telurito de potássio a 0,04% foi esterilizada por filtração e depois foi adicionada em caldo TSB estéril. O meio foi distribuído em tubos. Os isolados

bacterianos foram inoculados com alça e incubados durante 18-24 horas a 35°C. O aparecimento de um precipitado negro foi considerado positivo e a ausência deste, negativo.

- *Detecção da motilidade*

A motilidade foi avaliada em meio semissólido utilizando o meio Motility Test Medium (BD-BBL™, EUA). A bactéria foi inoculada utilizando-se uma agulha bacteriológica. A motilidade foi considerada positiva na detecção de uma zona difusa de crescimento projetada a partir da linha de inoculação (Koneman et al., 2001). Motilidade negativa quando o crescimento ocorria apenas na linha de inoculação. O teste foi lido entre 24-72h de incubação a 35°C. Este teste também foi realizado a 30°C e lido entre 24h até 7 dias com a amostra 11.

- *Utilização do piruvato de sódio 1%*

A utilização do piruvato de sódio 1% foi realizado em caldo BHI (Himedia, Brasil) adicionado com 1% de Triptona (Himedia, Brasil), 0,5% de extrato de levedura (Himedia, Brasil), 0,5% de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) (Nuclear, Brasil), 0,5% de cloreto de sódio (Nuclear, Brasil), 1% de piruvato de sódio (Inlab, Brasil) e 0,01% de indicador de pH azul de bromotimol (Vetec, Brasil). Foi inoculada uma gota de suspensão bacteriana recente no meio, anteriormente acertada para a escala 0,5 de McFarland e incubou-se a 35°C e realizou-se leitura entre 24-48h. A presença de coloração amarela indicou reação positiva e a não alteração da cor do meio, reação negativa.

- *Desaminação da arginina*

Foi realizada em meio Descarboxylase Base Moeller (Difco, EUA), acrescido de 1% de L-arginina (Inlab, Brasil). Após inoculação de uma gota da suspensão da bactéria, anteriormente acertada para a escala 0,5 de McFarland, acrescentou-se 0,5 mL de óleo mineral estéril. Incubou-se a 35°C e observou-se em até sete dias. A presença da coloração púrpura turva indicou reação positiva ou alcalinização do meio devido à hidrólise da arginina e consequente liberação de grupos aminas. A presença da coloração amarela indicou reação negativa, o que demonstra apenas a ocorrência da acidificação do meio devido ao consumo de glicose.

A tabela 1 é uma representação do esquema de características fenotípicas para identificação das espécies de enterococos, segundo Teixeira et al. (2007).

Tabela 1 - Características fenotípicas usadas na identificação das espécies de *Enterococcus* e algumas espécies de outros cocos Gram-positivos fisiologicamente relacionados (Teixeira et al., 2007).

Espécies	Características Fenotípicas ^a												
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SAC	PIR	MGP	
Grupo I													
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V	
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V	
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
<i>E. saccharolyticus</i> ^b	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V	
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	
<i>“E. hawaiiensis”</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	

Espécies	Características Fenotípicas ^a												
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SAC	PIR	MGP	
Grupo II													
<i>E. faecium</i>	+ ^c	-	+	+	V	V	-	-	-	+ ^c	-	-	
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+ ^c	+	V	+	- ^c	+ ^c	+ ^c	+	V	+	
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+ ^c	+	-	+	-	+ ^c	-	+	-	+	
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-	
<i>E. faecalis</i>	+ ^c	-	+ ^c	-	+	-	+	-	-	+ ^c	+	-	
<i>E. haemoperoxidus</i> ^b	+ ^d	-	+ ^d	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
“ <i>E. sanguinicola</i> ”	+	-	+	-	-	-	+ ^e	-	-	+	-	-	
<i>Lactococcus sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	

[illegible]

Espécies	Características Fenotípicas ^a											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SAC	PIR	MGP
Grupo IV												
<i>E. cecorum</i> ^b	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. phoeniculicola</i> ^b	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. asini</i> ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. coccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+ ^d
<i>E. canis</i> ^b	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. columbae</i> ^b	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. moraviensis</i> ^b	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hermannienseis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. italicus</i>	V	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+
<i>Vagococcus fluvialis</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

^a**Abreviações e Símbolos:** **MAN**, manitol; **SOR**, sorbose; **ARG**, arginina; **ARA**, arabinose, **SBL**, sorbitol; **RAF**, rafinose, **TEL**, 0,04% telurito; **MOT**, motilidade; **PIG**, pigmento; **SAC**, sacarose; **PIR**, piruvato; **MGP**, metil- α -D-glicopiranosídeo; +, 90% ou mais dos isolados são positivos; -, 90% ou mais dos isolados são negativos; V, variável (11 a 89% dos isolados são positivos).

^bCaracterísticas fenotípicas baseadas nos dados dos isolados padrão.

^cOcorrência de exceções ocasionais (<3% dos isolados mostram reações atípicas).

^dPositivo tardio (3 dias de incubação ou mais).

^eReações fracas.

As figuras de 1 a 8 são fotografias representativas de testes bioquímicos convencionais para a identificação dos isolados de enterococos estudados.

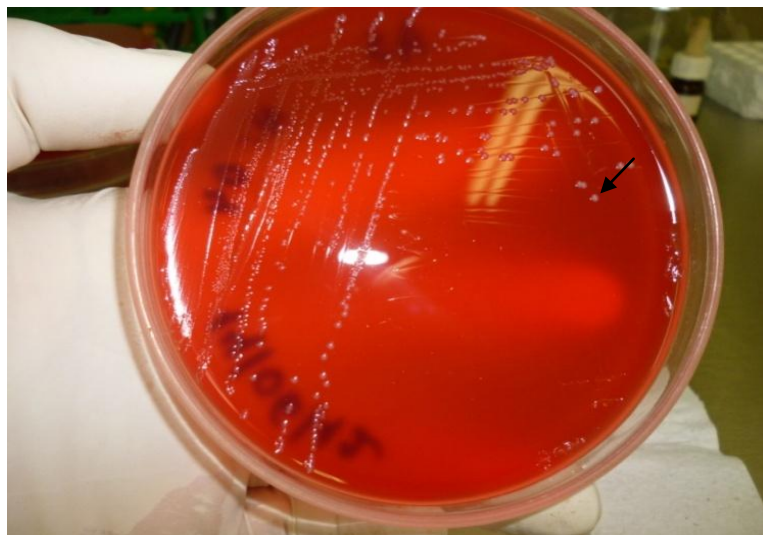


Figura 1 - Colônias características de *Enterococcus* spp. em meio de ágar sangue (seta). (Fonte Laboratório da Disciplina Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).



Figura 2 - Colônias apresentando β -hemólise em ágar sangue humano (seta). (Fonte Laboratório da Disciplina Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).

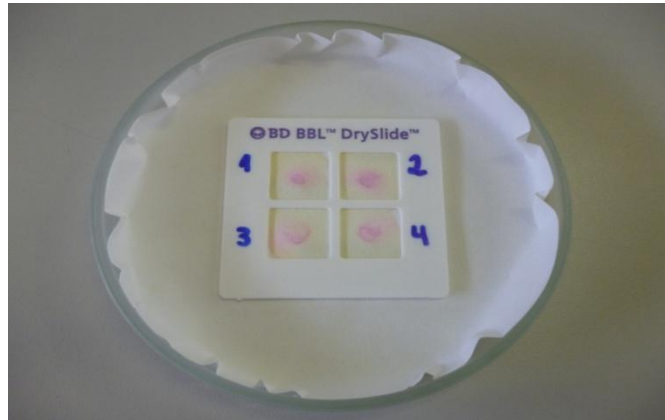


Figura 3 - Isolados de enterococos apresentando Teste PYR positivo. (Fonte Laboratório da Disciplina Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).

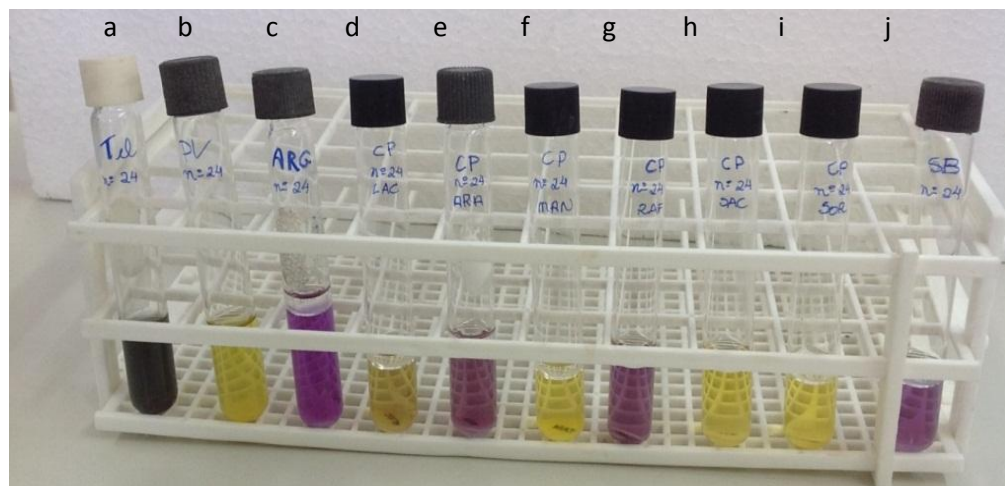


Figura 4 – Identificação de espécie da amostra nº. 24 (*E. faecalis*) com os seguintes testes: a) tolerância a 0,04% de telurito, b) utilização do piruvato, c) desaminação da arginina e fermentação dos carboidratos [d) lactose, e) arabinose, f) manitol, g) rafinose, h) sacarose, i) sorbitol e j) sorbose]. (Fonte Laboratório da Disciplina Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).

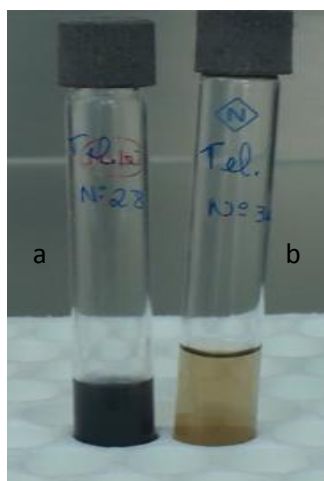


Figura 5 - Prova de tolerância a 0,04% de telurito para identificação das espécies de enterococos (amostras n°. 28 e n°. 32). O escurecimento do meio indica teste positivo (a) e o não escurecimento, teste negativo (b). (Fonte: Laboratório da Disciplina de Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).

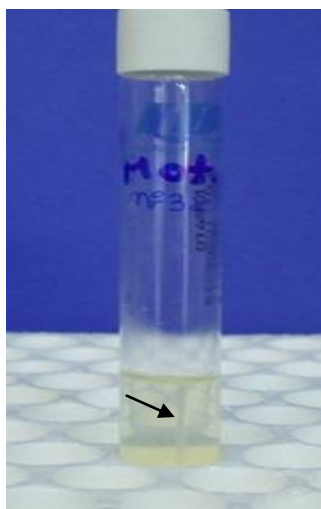


Figura 6 – Teste para detecção da motilidade com isolados de enterococos (seta) (Fonte: Laboratório da Disciplina Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).

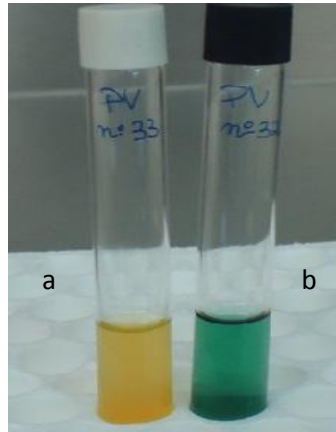


Figura 7 – Teste para verificação de utilização do piruvato de sódio a 1%. A alteração da coloração do meio para amarelo indica prova positiva (a) e a permanência da coloração verde, prova negativa (b) (Fonte: Laboratório da Disciplina Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM)

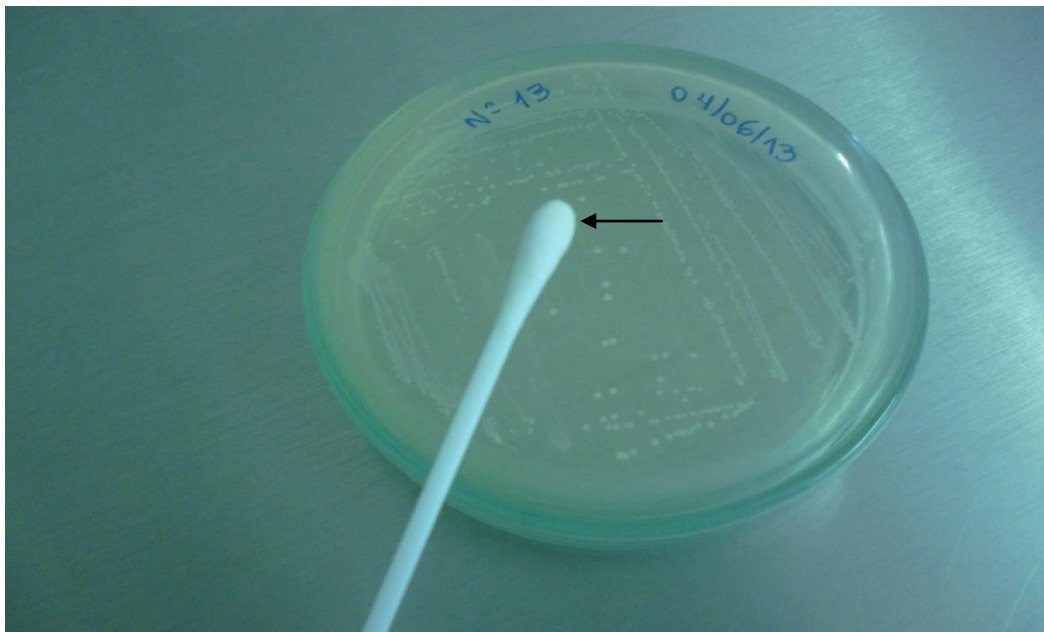


Figura 8 – Teste negativo para detecção da produção de pigmento amarelo em Tryptic Soy Agar. (Fonte: Laboratório da Disciplina Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM)

3.3 Testes Fenotípicos de Identificação pela Metodologia Automatizada

As análises, em todos os isolados de *Enterococcus* spp. recebidos, foram realizadas num equipamento totalmente automatizado, o VITEK 2 Compact (bioMérieux) que apresenta sistemas de identificação bacteriana e de antibiograma.

3.3.1 Identificação Bacteriana de Gênero e Espécie

Para a identificação bacteriana, o VITEK 2 Compact dispõe de uma tecnologia denominada “Advanced Colorimetry™”. Mais de 330 espécies microbianas podem ser identificadas por meio de uma base de dados otimizada e aos cartões de identificação colorimétrica VITEK 2. Esta base de dados abrange mais de 95% dos testes de rotina em microbiologia. Tem a aprovação de AOAC® OMA (Métodos oficiais de Análise SM) para o cartão GP (utilizada para identificar as bactérias Gram-positivas) e para a identificação de bactérias Gram-negativas.

Nesse estudo foram utilizados os cartões de identificação GP para bactérias Gram-positivas. Cada cartão dispõe de 43 testes bioquímicos que possibilitou a identificação de gênero e espécie (Tabela 2 e Figura 9).

Tabela 2 – Relação dos testes realizados para identificação bacteriana pelo Sistema VITEK 2 Compact.

Conteúdo dos Testes no Cartão GP			
Poço	Testes	Abreviações	Conteúdo/Poço
1	D-amigdalina	AMY	0,1875 mg
2	Fosfatidilinositol fosfolipase c	PIPLC	0,015 mg
3	D-xilose	dXYL	0,3 mg
4	Arginina dihidrolase 1	ADH1	0,111 mg
5	Beta-galactosidase	BGAL	0,036 mg
6	Alfa-glucosidase	AGLU	0,036 mg
7	Ala-fe-pro arilamidase	APPA	0,0384 mg
8	Ciclodextrina	CDEX	0,3 mg
9	L-aspartato arilamidase	AspA	0,024 mg
10	Beta galactopiranosidase	BGAR	0,00204 mg
11	Alfa-manosidase	AMAN	0,036 mg
12	Fosfatase	PHOS	0,0504 mg
13	Leucina arilamidase	LeuA	0,0234 mg
14	L-prolina arilamidase	ProA	0,0234 mg
15	Beta-glucuronidase	BGURr	0,0018 mg
16	Alfa-galactosidase	AGAL	0,036 mg
17	L-pirrolidonil arilamidase	PyrA	0,018 mg
18	Beta-glucuronidase	BGUR	0,0378 mg
19	Alanina arilamidase	AlaA	0,0216 mg
20	Tirosina arilamidase	TyrA	0,0276 mg
21	D-sorbitol	dSOR	0,1875 mg
22	Urease	URE	0,15 mg
23	Resistência à polimixina b	POLYB	0,00093 mg
24	D-galactose	dGAL	0,3 mg
25	D-ribose	dRIB	0,3 mg
26	Alcalinização l-lactato	ILACTK	0,15 mg
27	Lactose	LAC	0,96 mg
28	N-acetil-d-glucosamina	NAG	0,3 mg
29	D-maltose	dMAL	0,3 mg
30	Resistência à bacitracina	BACI	0,0006 mg
31	Resistência à novobiocina	NOVO	0,000075 mg
32	Crescimento em NaCl 6,5%	NC6,5	1,68 mg
33	D-manitol	dMAN	0,1875 mg
34	D-manose	dMNE	0,3 mg
35	Metil-b-d-glucopiranosida	MBdG	0,3 mg
36	Pululano	PUL	0,3 mg
37	D-rafinose	dRAF	0,3 mg
38	Resistência O/129 (comp.vibrio)	O129R	0,0084 mg
39	Salicina	SAL	0,3 mg
40	Sacarose/sucrose	SAC	0,3 mg
41	D-trealose	dTRE	0,3 mg
42	Arginina dihidrolase 2	ADH2s	0,27 mg
43	Resistência à optoquina	OPTO	0,000399 mg



Figura 9 - Cartão GP para bactérias Gram-positivas contendo 43 testes (bioMérieux). (Fonte: Laboratório Reunidos de Manaus).

3.4 Testes Fenotípicos para Avaliação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos pela Metodologia Automatizada

O VITEK 2 Compact utiliza o método de microdiluição em caldo e está equipado com programa para a validação dos testes de resistência aos antibióticos e a interpretação dos resultados, o Advanced Expert System (AES™). Este programa permite identificar os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos e, até, as resistências emergentes ou de baixo nível.

Para avaliar o perfil de suscetibilidade foram usados os cartões de antibiograma Gram-positivo AST-P585 específico para *Staphylococcus* spp. *Enterococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae*. Cada cartão apresenta 64 poços contendo de duas a quatro diluições de cada antimicrobiano, as quais geralmente representam as concentrações correspondentes aos limites de sensibilidade e resistência de cada antimicrobiano (Tabela 3 e Figura 10). Dessa maneira, o sistema relata se a bactéria apresentou CIM superior ou abaixo dos limites de resistência ou sensibilidade, respectivamente. O sistema também pode reportar se o valor da CIM encontra-se na categoria intermediária. Por isso, pode-se dizer que os resultados

fornecidos por estes sistemas são semi-quantitativos e não substituem as informações fornecidas pelos métodos de sensibilidade que quantificam a CIM.

Para os isolados de *Enterococcus* spp., os seguintes antimicrobianos foram usados: Penicilina G; Ampicilina; Gentamicina alto nível (sinergia); Estreptomicina alto nível (sinergia); Ciprofloxacina; Moxifloxacina; Norfloxacina; Eritromicina; Clindamicina; Linezolide; Teicoplanina; Vancomicina; Tigeciclina.

Foram seguidas todas as instruções do fabricante no que diz respeito ao preparo do inóculo, incubação, leitura e interpretação dos resultados.

Este equipamento, portanto, forneceu o resultado das provas bioquímicas para o gênero e espécie e o perfil de sensibilidade com a CIM para a amostra analisada. A partir de então, comparavam-se estes resultados com os resultados manuais realizados.

Tabela 3 - Antimicrobianos dos cartões de antibiograma Gram-positivo AST-P585.

Antimicrobiano	Sigla	Concentrações	CIM	
			≤	≥
Ampicilina	AM	0.5, 4, 8, 32	2	32
Penicilina G	P	0.125, 0.25, 1, 2, 8, 64	0.12	64
Gentamicina alto nível (Sinergia)	HLG	500	S	R
Estreptomicina alto nível (Sinergia)	HLS	1000	S	R
Ciprofloxacina	CIP	1, 2, 4	0,5	8
Moxifloxacina	MXF	0.25, 2, 8	0.25	8
Norfloxacina	NOR	0.5, 1, 4	0.25	16
Eritromicina	E	0.25, 0.5, 2	0.25	8
Clindamicina	CM	0.5, 1, 2	0.25	8
Linezolide	LNZ	0.5, 1, 2	0.5	8
Teicoplanina	TEC	1, 4, 8, 16	0.5	32
Vancomicina	VA	1, 2, 4, 8, 16	0,5	32
Tigeciclina	TGC	0.25, 0.5, 1	0.12	2



Figura 10 - Cartão de antibiograma Gram-positivo AST-P585 (bioMérieux). (Fonte: Laboratório Reunidos de Manaus).

3.5 Testes Fenotípicos para Avaliação do Perfil de Sensibilidade a Antimicrobianos pelo Método de Disco Difusão

O teste de disco difusão foi realizado conforme preconiza o manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (M100-S21, 2011).

Utilizou-se o ágar Mueller-Hinton (Difco, EUA), esterilizado em autoclave e distribuído em placas de Petri de 150 mm, com altura de 4 mm. As placas foram armazenadas em geladeira (2 a 8°C) e utilizadas em até 7 dias após a preparação. O inóculo foi ajustado segundo a escala padrão 0,5 de McFarland com a utilização do aparelho DensiCHEK Plus (bioMérieux). A suspensão bacteriana foi semeada no ágar Mueller-Hinton com um *swab*, em toda superfície do meio de cultura. Em seguida, os discos com antimicrobianos a serem testados foram aplicados com auxílio de uma pinça estéril. As placas foram colocadas em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, atmosfera ambiente, de 16 a 18 horas e 24 horas para vancomicina. Todos os testes de sensibilidade foram realizados em duplicata e quando apresentavam dados discrepantes, em triplicata. Desta forma, a leitura foi realizada

após 24 horas de incubação, onde, o diâmetro da zona de inibição foi medido e comparado com a tabela 2D do CLSI, 2011 (Anexos 3A e 3B), que padroniza a técnica de disco difusão (Figura 11). Pela leitura (medição do diâmetro do halo de inibição em milímetros), o microrganismo foi classificado como sensível, intermediário ou resistente. Os antimicrobianos (Laborclin, Brasil) que foram utilizados para o teste de sensibilidade foram: ampicilina (10µg); penicilina G (10U); vancomicina (30µg); teicoplanina (30µg); eritromicina (15µg); tetraciclina (30µg); ciprofloxacina (5µg); levofloxacina (5µg); norfloxacina (10µg); nitrofurantoína (300µg); rifampicina (5µg); cloranfenicol (30µg); gentamicina 120 µg e estreptomicina 300 µg (Altos Níveis de Resistência aos aminoglicosídeos [HLAR]) (Rossi e Andreazzi, 2005).

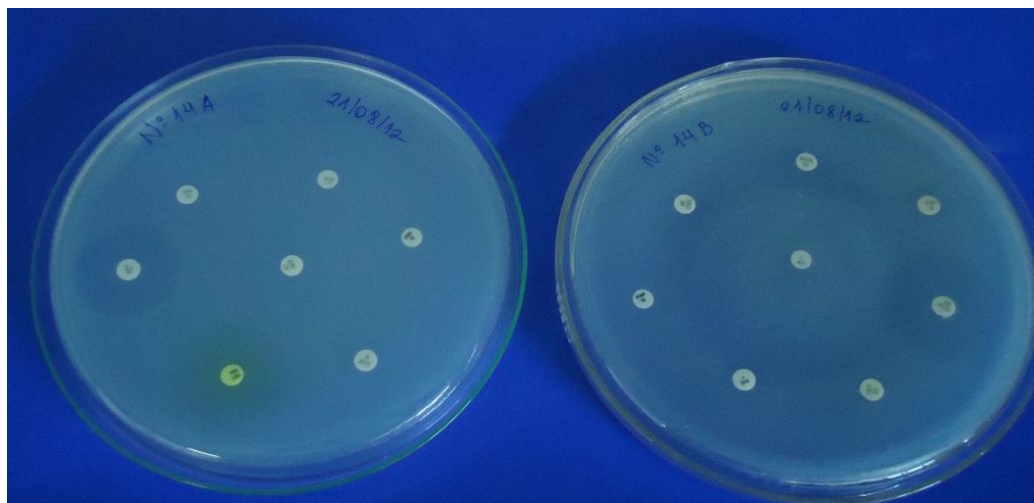


Figura 11 – Placas de Antibiógrama segundo Método de disco difusão com amostras de *Enterococcus* spp. (Fonte: Laboratório da Disciplina de Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM)

3.6 Investigação da Existência de Resistência à Vancomicina dos Isolados de *Enterococcus* spp. pelos Seguintes Testes Fenotípicos:

3.6.1 Testes de Triagem com a Utilização de Meio Cromogênico e Meios Adicionados com Vancomicina

Este teste foi realizado com vinte e nove isolados identificados como *E. faecalis*, com oito isolados identificados como *E. faecium* e com um isolado (amostra 11) identificado como *E. casseliflavus* pelo método automatizado.

Foram utilizados os seguintes meios: Meio Cromogênico chromID[®] VRE que contém 8µg/mL de vancomicina (bioMérieux); meio de Ágar Mueller Hinton (Difco, EUA) adicionado com 8µg/mL de vancomicina e o meio de Ágar Enterococcosel (Difco, EUA) adicionado com 8 µg/mL de vancomicina. Os inóculos dos isolados de *Enterococcus* spp. foram ajustados na escala 0,5 de MacFarland. Foi depositado 10µL de cada inóculo na superfície de cada meio, e após a absorção no ágar, foi incubado a 35°C por 24 horas completas.

O crescimento de qualquer número de colônias indicou que esses microrganismos eram resistentes à vancomicina (teste de triagem positivo). A ausência de crescimento nos meios indicou sensibilidade a este antimicrobiano (teste de triagem negativo).

As figuras de 12 a 14 são fotografias representativas do crescimento de colônias de isolados resistentes à vancomicina nos meios ChromID[®] VRE, Ágar Mueller Hinton e Ágar Enterococcosel adicionado com 8µg/mL de vancomicina.



Figura 12 - Isolados de enterococos resistentes em meio cromogênico VRE (setas). (Fonte: Laboratório da Disciplina de Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).

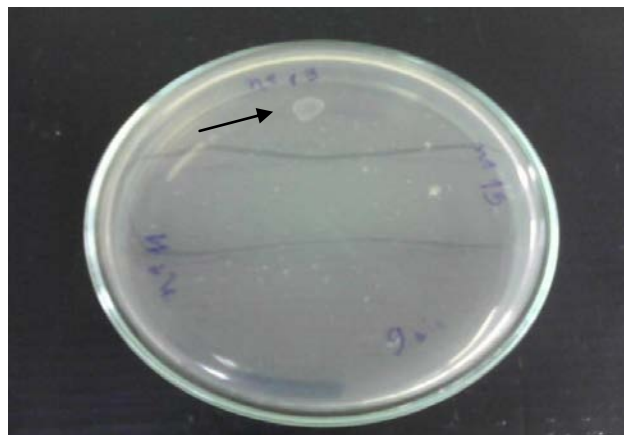


Figura 13 - Isolados de enterococos resistentes em ágar Mueller Hinton adicionado com 8µg/mL de vancomicina (seta). (Fonte: Laboratório da Disciplina de Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).

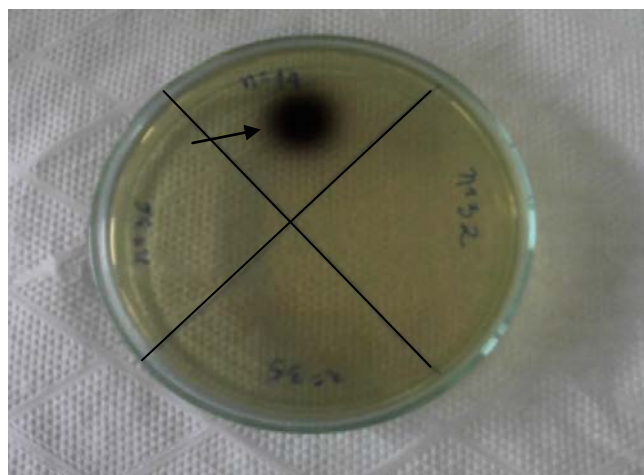


Figura 14 - Isolados de enterococos positivos em ágar Enterococcosel adicionado com 8µg/mL de vancomicina. (Fonte: Laboratório da Disciplina de Bacteriologia Clínica – FCF/UFAM).

3.6.2 Utilização de Fitas com Gradiente do Antimicrobiano para Determinação da CIM

Este teste foi realizado com os isolados de *Enterococcus* spp. que foram resistentes nos testes de disco difusão e/ou pela metodologia automatizada e positivos no teste de triagem para detecção de resistência a vancomicina.

As suspensões dos isolados de enterococos testados foram ajustadas segundo a escala padrão 0,5 de McFarland com a utilização do aparelho DensiCHEK Plus (bioMérieux). Em seguida, essas suspensões bacterianas foram semeadas no ágar Mueller-Hinton (Difco, USA) com um *swab*, em toda superfície do meio de cultura. Após 5 a 15 minutos, as fitas de vancomicina com concentrações entre 256-0,015µg/mL (M.I.C. Evaluator - Oxoid, England) foram depositadas com auxílio de uma pinça estéril com a face que continha o antimicrobiano voltada para a superfície do ágar. As placas foram colocadas em estufa a 35°C, atmosfera ambiente por 24 horas. Após o período de incubação, a leitura foi realizada para determinação da CIM que é obtida com o ponto de interseção entre a fita e a zona de inibição do crescimento do microrganismo, que assume a forma elíptica. A CIM $\leq$ 4 µg/mL indica sensibilidade a vancomicina, entre 8-16 µg/mL, intermediário e $\geq$ 32 µg/mL resistente (CLSI, 2011).

As figuras 15 e 16 são fotografias representativas de testes utilizando fitas com gradiente de concentração da vancomicina para determinação da CIM com isolados de enterococos.

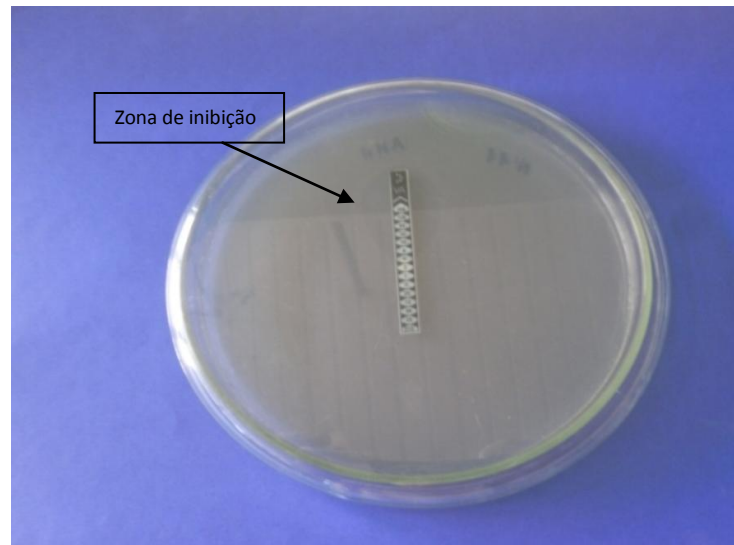


Figura 15 – Determinação da CIM utilizando fita com gradiente de concentração de vancomicina para um isolado sensível (amostra 11).

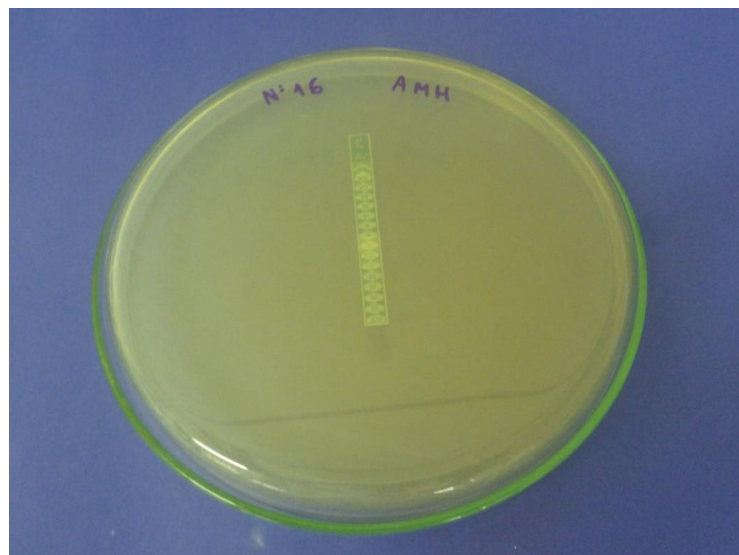


Figura 16 – Isolado de enterococos apresentando resistência a vancomicina no teste de utilização de fita com gradiente de vancomicina.

3.7 Detecção da Produção da Enzima beta-lactamase

Foi realizada com os discos Cefinase (Interlab - BD,USA) que são impregnados com a cefalosporina cromogênica, o nitrocefin. Este composto exhibe mudança rápida da cor amarelo para vermelho quando a ligação amida do anel beta-lactâmico é hidrolisada por uma beta-lactamase. Quando uma bactéria produz esta enzima, em quantidades significativas, a cor amarela do disco fica vermelha na área onde o isolado bacteriano foi semeado. Deve ser usado um disco para cada isolado bacteriano para pesquisa da presença de beta-lactamase.

Todos os isolados de *Enterococcus* spp. foram testados para a produção de β -lactamase, de acordo com as recomendações do fabricante. Umedecer o disco de cefinase com uma gota de água destilada estéril. Com uma alça descartável, remover algumas colônias isoladas de uma cultura pura de 24 horas de incubação e aplicar na superfície do disco. O desenvolvimento de coloração vermelha na área onde foi aplicada indicou teste positivo. A maioria das bactérias desenvolve teste positivo dentro de 5 minutos. Para o controle positivo foi usada uma cepa-padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

A produção de beta-lactamase indica resistência à penicilina, ampicilina e a ureidopenicilinas (piperacilina, mezlocilina). São sensíveis os beta-lactâmicos em combinação com inibidores de beta-lactamase e o imipenem (Rossi e Andreazzi, 2005).

3.8 Investigação de Genes que Determinam a Resistência à Vancomicina

3.8.1 Extração do DNA Bacteriano

As culturas estocadas em meio com crioprotetor foram descongeladas à temperatura ambiente. Em seguida, foram feitos repiques em caldo BHI (Himedia, Brasil) e incubadas a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Após o crescimento no caldo BHI (Himedia, Brasil), foi feita a extração do DNA bacteriano.

A extração do DNA bacteriano foi realizada segundo o protocolo DNeasy® Blood & Tissue Handbook da Quiagen. Resumidamente, os procedimentos consistiram de tratamento com proteinase K de volumes de crescimento bacteriano de 1mL e 24 horas em BHI. Após adição de proteinase K e 200 μL de tampão AL, a massa de crescimento bacteriano foi incubada a 56°C durante 30 minutos. O homogenato foi tratado com 200 μL de etanol 96-100% e transferido para um microtubo com coluna para separação do DNA. As colunas foram centrifugadas para separação do DNA e detritos celulares a 10.000 rpm/minuto. A coluna e DNA foi lavado com tampão AW1 e 500 μL de tampão AW2. As centrifugações seguiram as recomendações do fabricante. A eluição das amostras de DNA foi feita com 100 μL do tampão AE à temperatura ambiente por um minuto e centrifugação a 10.000 rpm/minuto. Este procedimento foi realizado por duas vezes para garantir eluição correta do DNA das amostras de estudo. Após eluição as amostras foram identificadas e estocadas a -20°C até o momento das análises.

3.8.2 Quantificação do DNA Bacteriano

As quantificações do DNA bacteriano foram realizadas no equipamento GeneQuant pro – RNA/DNA Calculator (GE Health Care®). Para determinação da pureza do DNA utilizou a relação 260/280 nm e foram consideradas amostras com boa pureza quando a relação apresentava valores próximos a 1,8.

3.8.3 Confirmação das Espécies de Enterococos por PCR

A PCR foi realizada para confirmar a identificação fenotípica obtida pela metodologia manual através das de provas bioquímicas convencionais e pela metodologia automatizada no Vitek 2 Compact (bioMérieux).

A identificação das espécies foi realizada utilizando *primers* específicos para as espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*, conforme a tabela 4 (Dutka-Malen et al., 1995).

Para a amplificação foram utilizados 2µL (contendo 50 ng de DNA) da suspensão do DNA extraído como descrito anteriormente. O volume de reação final foi de 25µL e composto por: solução tampão de reação 1x, 1,5mM de cloreto de magnésio (Invitrogen – Life Technologies), 200µM de dNTP para cada nucleotídeos (Invitrogen – Life Technologies), 1,5U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen – Life Technologies), 0,5µM dos primers e água (Isofar, Brasil) para completar o volume de 25 µL de reação. O termociclador utilizado foi da marca Kyrtec, modelo SC200 (CE, Australia).

A amostra utilizada como controle para *Enterococcus faecalis* foi *E. faecalis* CCCD-E002 (Cefar, Brasil) similar a cepa ATCC 29.212 vancomicina sensível.

As condições da reação de amplificação foram compostas por um ciclo de 94°C por dois minutos; 30 ciclos de 94°C por um minuto, 54°C por um minuto, 72°C por um minuto e a extensão final a 72°C por 10 minutos (Dutka-Malen et al., 1995).

Tabela 4 - *Primers* utilizados na identificação genotípica das espécies de *Enterococos* baseado em Dutka-Malen et al., 1995.

Espécie	Gene amplificado	Fragmento amplificado (pb)	Primers (5'- 3')	
			Pares	Sequência
<i>E. faecalis</i>	ddl <i>E. faecalis</i>	941	E-1 E-2	ATC AAG TAC AGT TAG TCT T ACG ATT CAA AGC TAA CTG
<i>E. faecium</i>	ddl <i>E. faecium</i>	550	F-1 F-2	GCA AGG CTT CTT AGA GA CAT CGT GTA AGC TAA CTT C
<i>E. gallinarum</i>	vanC-1	822	vanC-1A vanC-1B	GGT ATG AAG GAA ACC TC CTT CCG CCA TCA TAG CT
<i>E. casseliflavus</i>	vanC 2/3	439	vanC-2/3A vanC-2/3B	CTC CTA CGA TTC TCT TG CGA GCA AGA CCT TTA AG

3.8.4 Detecção dos Genótipos de Resistência à Vancomicina por PCR

A detecção dos genes de resistência a vancomicina foi realizada de forma semelhante à descrita anteriormente, com modificação apenas dos *primers* que codificam a resistência à vancomicina, vanA (Woodford et al., 1993) e vanC-1 e vanC-2/3 (Dutka-Malen et al., 1995) como descritos na tabela 5.

As condições da reação de amplificação foram baseadas nos protocolos descritos por Woodford et al., (1993) com modificações e Dutka-Malen et al., (1995), sendo composta por 1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e a extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 5 - *Primers* dos diferentes genótipos de resistência à vancomicina em amostras de enterococos para amplificação por PCR.

Genótipo	Tamanho do produto da PCR (pb)	Primers (5' - 3')	
		Pares	Sequências
VanA	399	A ₁ A ₂	ATG GCA AGT CAG GTG AAG ATG G TCC ACC TCG CCA ACA ACT AAC G
vanC-1	822	C-1A C-1B	GGT ATG AAG GAA ACC TC CTT CCG CCA TCA TAG CT
vanC-2/3	439	C-2/3A C-2/3B	CTC CTA CGA TTC TCT TG CGA GCA AGA CCT TTA AG

3.8.5 Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos amplificados da PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em solução tampão TBE 1x (Invitrogen - Life Technologies). A esse gel assim preparado, acrescentou-se 4µL de sybr® safe DNA Gel Stain para visualização das bandas (Invitrogen - Life Technologies).

A corrida eletroforética ocorreu nas seguintes condições: 90volts/20cm, 90mA e 40 minutos. Após a corrida o gel foi visualizado em luz UV, usando um transiluminador Safe Imager TM(Invitrogen - Life Technologies).

As cepas *E. faecalis* E206 (vanA) e *E. faecium* E2781 (vanB) foram usadas como controle nas reações da PCR.

3.9 Análise dos Dados

Todos os resultados obtidos foram digitados em um banco de dados.

Foi realizada análise descritiva dos dados para determinar a frequência de isolamento das diferentes espécies de *Enterococcus* e a porcentagem de espécies isoladas com perfis sensível, intermediário e resistente aos antimicrobianos testados pelos diferentes testes utilizados, assim como a detecção de genes de resistência a vancomicina.

4. RESULTADOS

4.1 Amostras Clínicas e Pacientes

Os 38 isolados de *Enterococcus* spp. foram obtidos a partir de culturas de diferentes amostras clínicas (Figura 17) . Entre todas as amostras, apenas três de urina eram de pacientes provenientes de ambulatório e as demais de pacientes internados.

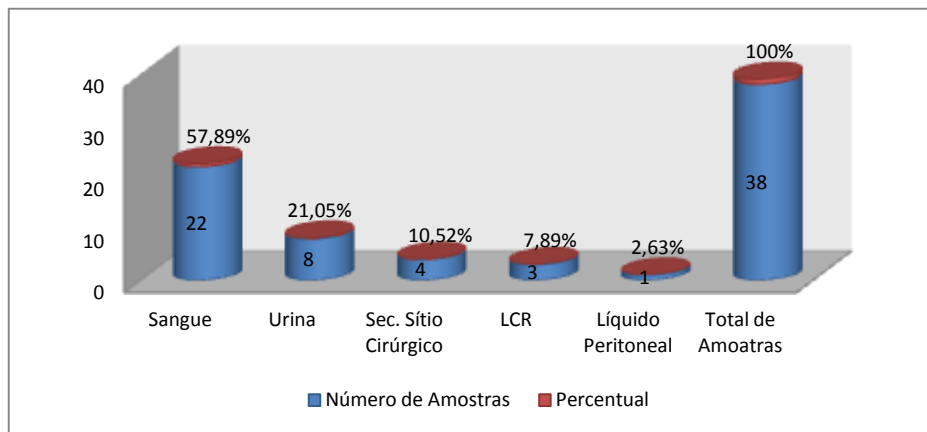


Figura 17 - Amostras clínicas provenientes dos pacientes incluídos no estudo.

Os pacientes internados e de atendimento ambulatorial foram provenientes de 10 unidades de saúde, sendo que 16 isolados foram encaminhados via Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV), 13 via Laboratórios Reunidos de Manaus e 9 via Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (Lacen), conforme tabela 6.

Tabela 6 - Unidades de Saúde participantes do estudo.

Nº. de Amostras	Unidades de Saúde	Local de encaminhamento
16	Hospital Universitário Getúlio Vargas	HUGV
3	Hospital e PS Dr. João Lúcio Machado	Lab. Reunidos
1	Hospital e PS Dr. João Lúcio Machado	Lacen
3	Hospital e PS Dr. Platão Araújo	Lab. Reunidos
1	Hospital e PS Dr. Platão Araújo	Lacen
3	Clínica Renal de Manaus	Lacen
3	Hospital e PS da Criança Zona Sul	Lab. Reunidos
1	Hospital e PS da Criança Zona Sul	Lacen
1	Hospital e PS da Criança Zona Oeste	Lab. Reunidos
1	Hospital e PS da Criança Zona Oeste	Lacen
2	Instituto de Saúde da Criança do Amazonas (ICAM)	Lab. Reunidos
1	Maternidade Balbina Mestrinho	Lab. Reunidos
1	Hospital Beneficente Portuguesa	Lacen
1	Hospital Universitário Francisca Mendes (HUFM)	Lacen

Os pacientes internados estavam em diferentes enfermarias, sendo elas: 8 na Nefrologia adulto (21,05%), 7 na Clínica Médica adulto (18,42%), 4 na Clínica Neurológica adulto (10,52%), 2 na Clínica Cirúrgica adulto (5,26%), 6 na UTI adulto (15,78%), 4 na Clínica Médica Pediátrica (10,52%) e 4 na UTI Pediátrica (10,52 %).

Dentre os 38 pacientes, 23 (60,52%) eram do sexo masculino e 15 (39,47%) do sexo feminino.

Em relação à idade, 8 (21,05%) apresentava até 1 ano de idade, 1 paciente era criança com idade entre 2 e 10 anos (2,63 %), 5 pacientes (13,15%) eram adolescentes com idade entre 11 e 21 anos, 12 (31,57%) eram adultos com idade entre 22 e 59 anos, 10 (26,31%) idosos com idade igual ou superior a 60 anos e, por fim, 2 pacientes (5,26%) não tinham registro da idade. A tabela 7 demonstra as principais características clínicas dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 7- Características dos pacientes participantes do estudo.

Nº	Idade	Diagnóstico	Procedência	Antibióticos utilizados	Desfecho
1	N/I	ITU	HUGV	N/I	Ambulatório
2	28 anos	ITU	HUGV	Ciprofloxacina, clindamicina	Alta
3	11 anos	Meningite	HUGV	Vancomicina, cefepime, amoxicilina, azitromicina	Alta
4	17 anos	Meningite	HUGV	Cefalotina, cefazolina	Alta
5	48 anos	Meningite	HUGV	Levofloxacina, vancomicina, cefepime	Alta
6	64 anos	ITU	HUGV	N/I	Alta
7	17 anos	Inf. sítio cirúrgico (cesariana)	Maternidade Balbina Mestrinho	Cefalotina, gentamicina, metronidazol	Alta
8	56 anos	Pneumonia aspirativa	Hosp. e PS Dr. João Lúcio Machado	Ciprofloxacina, metronidazol, ceftriaxona, clindamicina, tazocin, fluconazol, vancomicina, imipenem, ampicilina	Alta
9	87 anos	Diabetes mellitus com complicações circulatórias	Hosp. e PS Dr. Platão Araújo	N/I	N/I
10	1 mês	Insuficiência respiratória aguda	Hosp. e PSC Zona Sul	Ceftriaxona	Alta
11	17 anos	Sepse	HUGV	cefepime + meropenem	Óbito
12	5 anos	Pneumonia	Hosp. e PSC Zona Oeste	Vancomicina, meropenem, cefepime, tazocin, ampicilina	Alta
13	4 meses	ITU, diarreia, vômito, desidratação grave	Hosp. e PSC Zona Sul	Ceftriaxona, meropenem, anfotericina B, vancomicina	Alta
14	11 meses	Pneumonia	Hosp. e PSC Zona Oeste	Penicilina cristalina	Alta
15	72 anos	Instalação cateter TENKOFF	Clínica Renal de Manaus	Levofloxacina	Alta
16	65 anos	Sepse	Hosp. Beneficente Portuguesa	N/I	N/I
17	50 anos	Infecção cateter duplo lúmen + IRC	Clínica Renal de Manaus	Ciprofloxacina	Óbito
18	55 anos	IRC + pé diabético + seps	Clínica Renal de Manaus	Cefazolina	Alta
19	66 anos	Sepse	Hosp. e PS Dr. Platão Araújo	Ceftriaxona	N/I
20	21 anos	LES + IRC	HUGV	N/I	Alta
21	66 anos	Pneumonia	HUGV	Cefepime, claritromicina	Alta
22	43 anos	Politrauma por queda de laje	Hosp. e PS Dr. João Lúcio Machado	Cefepime, vancomicina	Alta
23	5 meses	Pneumonia	Hosp. e PSC Zona Sul	Meropenem, vancomicina	Alta
24	62 anos	IRC	HUGV	N/I	Alta
25	52 anos	IRC	HUGV	N/I	Alta
26	2 meses	Pneumonia microcefalia +	ICAM	Tazocin, anfotericina B, vancomicina, meropenem	Óbito
27	63 anos	IRC + ITU	HUGV	N/I	N/I
28	59 anos	cardiopatia reumática + seps	Hosp. e PS Dr. Platão Araújo	Cefepime, vancomicina	Alta
29	1 ano	ITU	HUGV	N/I	Ambulatório
30	N/I	ITU	HUGV	N/I	Ambulatório
31	56 anos	Infecção de cirurgia cardíaca	Hosp. Univ. Francisca Mendes	N/I	N/I
32	2 meses	Pneumonia	Hosp. e PSC Zona Sul	Penicilina cristalina, cefepime	Alta
33	6 meses	Pneumonia	ICAM	Ceftriaxona, oxacilina, cefepime, ampicilina, vancomicina, meropenem, piperacilina, tazobactam	Alta
34	78 anos	IRC + seps	Hosp. e PS Dr. João Lúcio Machado	Cefepime, metronidazol, claritromicina	Óbito
35	53 anos	IRC + seps	Hosp. e PS Dr. João Lúcio Machado	N/I	N/I
36	88 anos	N/I	Hosp. e PS Dr. João Lúcio Machado	N/I	N/I
37	45 anos	Neoplasia de medula + ITU	HUGV	Ciprofloxacina, cefazolina	Alta
38	69 anos	Infecção sítio cirúrgico (histeretomia)	HUGV	Clindamicina, ciprofloxacina	Alta

ITU: Infecção do Trato Urinário; N/I: Não Informado; IRC: Insuficiência Renal Crônica; LES: Lupus Eritematoso Sistêmico; PSC: Pronto Socorro da Criança.

4.2 Identificação Bacteriana

Os testes fenotípicos manuais e automatizados realizados no estudo confirmaram que todos os isolados pertenciam ao gênero *Enterococcus*, conforme identificação prévia das unidades de saúde onde foram cultivados.

As seguintes espécies foram identificadas pelos testes fenotípicos manuais e pelos testes do equipamento automatizado conforme figura 18.

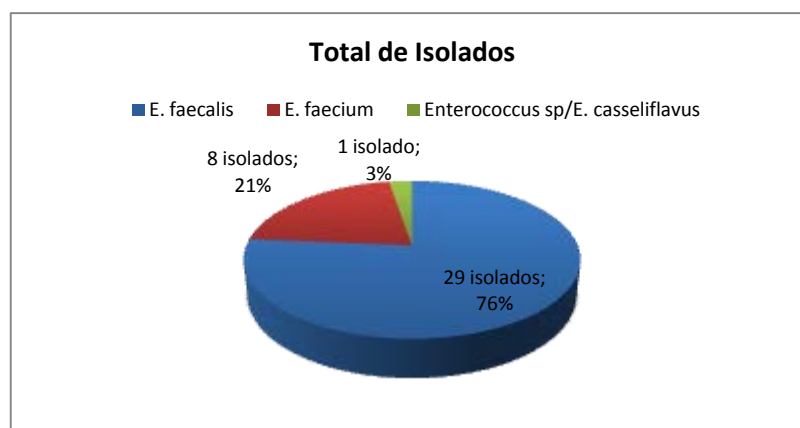


Figura 18 - Espécies de *Enterococcus* identificadas no estudo.

Os 16 isolados de enterococos recebidos do Hospital Universitário Getúlio Vargas, vieram identificados como demonstra a tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da identificação das espécies do HUGV.

Espécies	Total de isolados
<i>Enterococcus</i> sp.	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	13
<i>Enterococcus faecium</i>	1

De acordo com a metodologia manual, confirmou-se a identificação dos 13 isolados de *E. faecalis*. Os dois isolados recebidos como *Enterococcus* sp. foram identificados como *E. faecalis*.

Já, o isolado recebido como *E. faecium* (amostra 11) apresentou o perfil como observado na tabela 9. Verificou-se que o teste de desaminação da arginina não foi compatível com a espécie *E. faecium* e que o teste de fermentação da Methyl-alfa-D-glucopyranoside (MGP) (não disponível na metodologia manual) seria chave para a diferenciação entre as espécies *E. faecium* e *E. casseliflavus* (Devriese et al, 1996; Teixeira et al., 2007).

Tabela 9 - Resultados dos testes fenotípicos dos isolados de enterococos provenientes do HUGV pela metodologia manual do estudo.

Amostras	01	02	03	04	05	06	11	20	21	24	25	27	29	30	37	38
Identificação do Gênero																
Hemólise ASH	Y	Y	Y	Y	Y	Y	α	Y	β	β	β	Y	Y	A	α	Y
Gram	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP	C GP
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Identificação da Espécie																
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piruvato	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pigmento	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	^t	^t	^t	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	^t	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	-	-	-	-	-	-	^t	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	^t	+	^t	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Telurito 0,04%	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^t =fermentação tardia; ASH=Agar Sangue Humano; CGP=Cocos Gram Positivos; α=Alfa-hemólise ou hemólise parcial; β=Beta-hemólise ou hemólise total; γ=Gama-hemólise ou sem hemólise; BE=Bile-Esculina 40%.

Pelos testes bioquímicos do equipamento automatizado, a espécie correspondente a amostra 11 foi identificada como *E. casseliflavus* (Tabela 10).

Tabela 10 – Identificação dos 16 isolados de *Enterococcus* provenientes do HUGV pelo Sistema VITEK 2 Compact.

Nº. das amostras	Espécie	Probabilidade	Total de amostras
1, 2, 3, 4, 5, 6, 20, 21, 25, 27, 29, 38	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	12
30	<i>Enterococcus faecalis</i>	98%	1
24	<i>Enterococcus faecalis</i>	97%	1
37	<i>Enterococcus faecalis</i>	91%	1
11	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	94%	1

Considerando os esquemas de identificação desenvolvidos por Facklam e Collins, (1989) e Teixeira et al., (2007) como padrão, verificou-se boa concordância para os 15 isolados identificados como *E. faecalis*, havendo discrepância apenas no resultado referente a amostra 11 que, na metodologia automatizada, apresentou 94% de probabilidade de ser *E. casseliflavus*.

Os 13 isolados de enterococos recebidos do Laboratório Reunidos de Manaus-AM, vieram identificados como demonstra a tabela 11.

Tabela 11 - Espécies identificadas pelo Laboratório Reunidos de Manaus.

Espécies	Total de isolados
<i>Enterococcus faecalis</i>	08
<i>Enterococcus faecium</i>	05

As identificações dos isolados de enterococos no Laboratório Reunidos de Manaus foram realizadas pela metodologia automatizada no Sistema Vitek 2

Compact, utilizando os cartões de identificação GP para bactérias Gram-positivas, como descrito na tabela 2.

Na tabela 12 estão apresentados os testes bioquímicos da metodologia manual utilizados no estudo para a confirmação das espécies recebidas do Laboratório Reunidos.

Tabela 12 - Resultados dos testes fenotípicos dos isolados de enterococos provenientes do Laboratório Reunidos de Manaus pela metodologia manual do estudo.

Amostras	07	08	09	10	12	23	26	28	32	33	34	35	36
Identificação do Gênero													
Hemólise ASH	β	γ	γ	β	β	α	α	γ	α	β	β	γ	α
Gram	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Identificação da Espécie													
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piruvato	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Pigmento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	^t	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	^t	+	+	^t
Arabinose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	-	-	-	-	-	^t	+	-	-	-	-	+	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	^t	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Telurito 0,04%	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-

^t=fermentação tardia; ASH=Agar Sangue Humano; CGP=Cocos Gram Positivos; α = Alfa-hemólise ou hemólise parcial; β =Beta-hemólise ou hemólise total; γ =Gama-hemólise ou sem hemólise; BE=Bile-Esculina 40%.

A tabela 13 apresenta a confirmação da identificação dos isolados de enterococos, feitas no estudo, recebidos do Laboratório Reunidos de Manaus pelo equipamento automatizado.

Tabela 13 - Distribuição das espécies de *Enterococcus* entre os 13 isolados recebidos do Laboratório Reunidos de Manaus pelo Sistema VITEK 2 Compact.

Número das amostras	Espécie	Probabilidade	Total de amostras
7, 8, 9, 10, 12, 28, 33, 34	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	8
32, 35, 36	<i>Enterococcus faecium</i>	99%	3
26	<i>Enterococcus faecium</i>	98%	1
23	<i>Enterococcus faecium</i>	97%	1

Os 9 isolados de enterococos recebidos do Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (Lacen) foram identificados como demonstra a tabela 14.

Tabela 14 - Espécies identificadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (Lacen).

Espécies	Total de isolados
<i>Enterococcus faecalis</i>	06
<i>Enterococcus faecium</i>	03

Foram também realizadas as confirmações das identificações dos isolados de enterococos do Lacen pela metodologia automatizada no Sistema Vitek 2 Compact, utilizando também os cartões de identificação GP para bactérias Gram-positivas (Tabela 15).

Tabela 15 - Distribuição das espécies de *Enterococcus* entre os 9 isolados recebidos do Lacen pelo Sistema VITEK 2 Compact.

Número das amostras	Espécie	Probabilidade	Total de amostras
15, 17, 18, 22	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	4
19	<i>Enterococcus faecalis</i>	98%	1
16	<i>Enterococcus faecalis</i>	97%	1
14, 31	<i>Enterococcus faecium</i>	99%	2
13	<i>Enterococcus faecium</i>	91%	1

As nove espécies recebidas do Lacen foram confirmadas pelos testes bioquímicos da metodologia manual utilizadas no estudo (Tabela 16).

Tabela 16 - Resultados dos testes fenotípicos dos isolados de enterococos provenientes do Lacen pela metodologia manual do estudo.

Amostras	13	14	15	16	17	18	19	22	31
Hemólise ASH	α	α	γ	γ	β	γ	γ	γ	α
Identificação do Gênero									
Gram	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP	CGP
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BE	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 6,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Identificação da Espécie									
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piruvato	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Pigmento	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Telurito 0,04%	-	-	+	+	+	+	+	+	-

^t=fermentação tardia; ASH=Agar Sangue Humano; CGP=Cocos Gram Positivos; α=Alfa-hemólise ou hemólise parcial; β=Beta-hemólise ou hemólise total; γ=hemólise ou sem hemólise; BE=Bile-Esculina 40%.

4.3 Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

Método de Disco Difusão

No total de 29 isolados de *E. faecalis* identificados no estudo, verificou-se que todos foram sensíveis a nitrofurantoína e a ampicilina e apresentaram maior sensibilidade para penicilina, vancomicina e teicoplanina. Em relação ao perfil de resistência, as maiores taxas foram para a tetraciclina, eritromicina e rifampicina (Figura 19). Foi encontrado um isolado resistente à vancomicina.

O isolado n°. 9 de *E. faecalis* foi sensível a todos os antimicrobianos testados na metodologia de disco difusão.

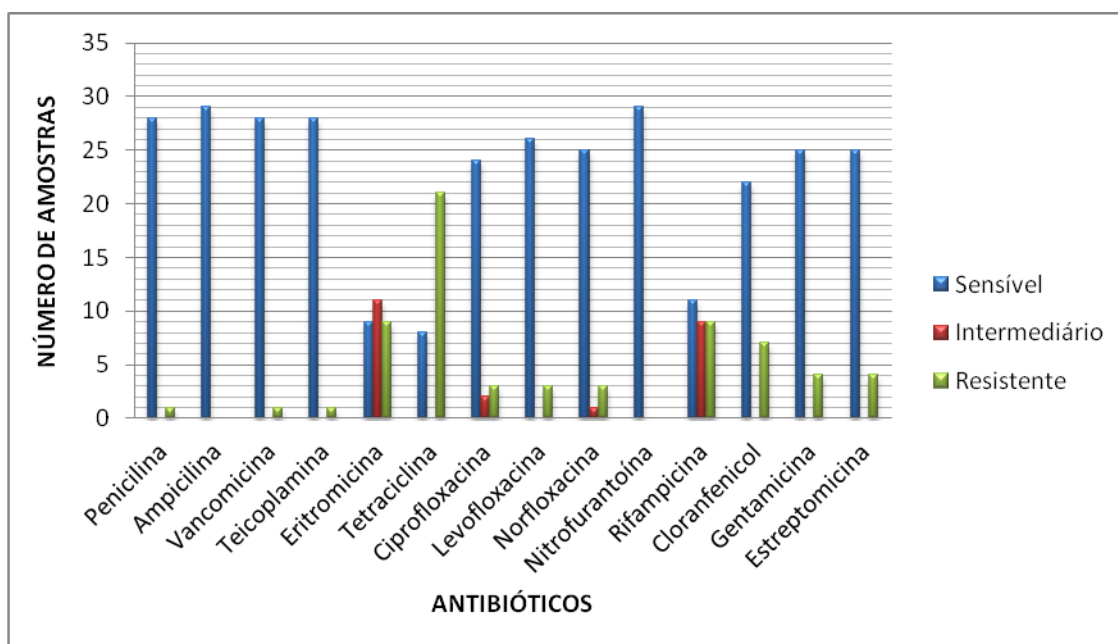


Figura 19 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão de 29 amostras de *E. faecalis*.

Em relação aos oito isolados de *E. faecium*, verificou-se que apresentaram maior sensibilidade para nitrofurantoína, gentamicina, estreptomicina,

vancomicina e teicoplanina. As maiores taxas de resistência foram para penicilina, ampicilina, eritromicina e rifampicina (Figura 20).

Foram encontrados três isolados de *E. faecium* resistentes a vancomicina.

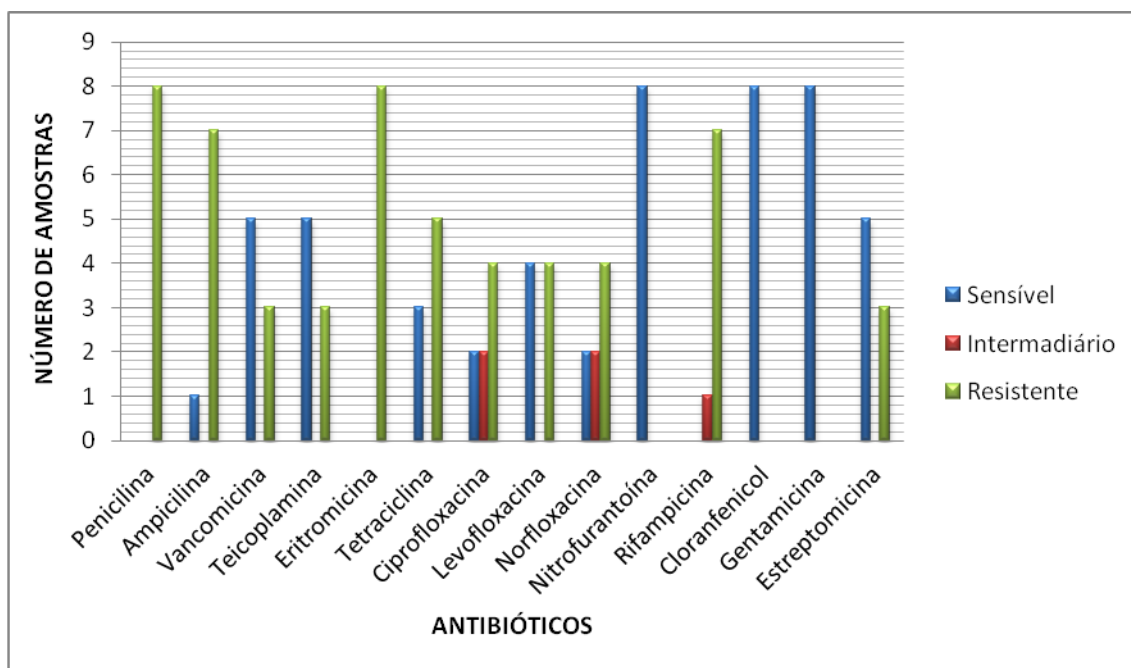


Figura 20 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão de oito amostras de *E. faecium*.

A amostra 11 apresentou sensibilidade para penicilina, ampicilina, vancomicina, teicoplanina, tetraciclina, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, nitrofurantoína, rifampicina, cloranfenicol, gentamicina e estreptomicina e perfil intermediário para eritromicina.

Os isolados números 8, 16 e 27 de *E. faecalis* e os 14, 26, 31 e 32 de *E. faecium* apresentaram resistência às quinolonas ciprofloxacina, levofloxacina e norfloxacina.

Metodologia Automatizada (SISTEMA VITEK 2 Compact)

Nesta metodologia, todos os isolados de *Enterococcus* apresentaram sensibilidade a tigeciclina e resistência a clindamicina, testadas somente por esta metodologia.

Para a maioria dos isolados de *E. faecalis* foram observadas taxas de sensibilidade para vancomicina, teicoplanina, linezolide, moxifloxacina, ciprofloxacina, gentamicina e estreptomicina. E apresentaram maior resistência para penicilina, ampicilina e eritromicina (Figura 21).

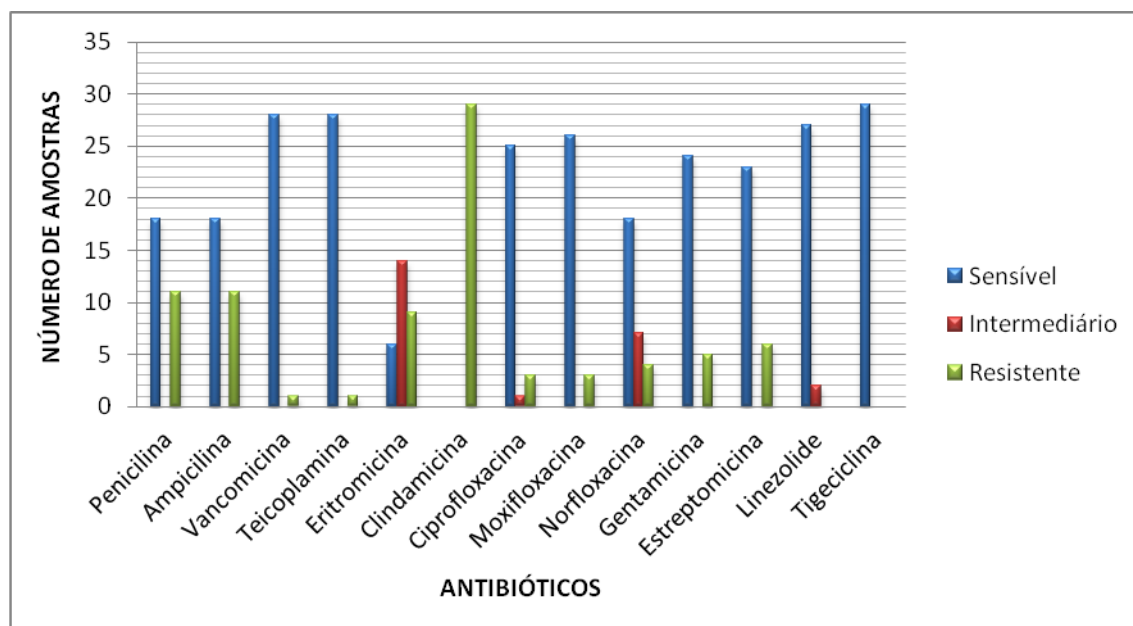


Figura 21 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pela metodologia automatizada de 29 isolados de *E. faecalis*.

Os oito isolados de *E. faecium* foram sensíveis a linezolide. Destacam-se perfis de sensibilidade maiores para gentamicina, teicoplanina, vancomicina e estreptomicina. As maiores taxas de resistência foram para eritromicina (100%), penicilina e ampicilina (Figura 22).

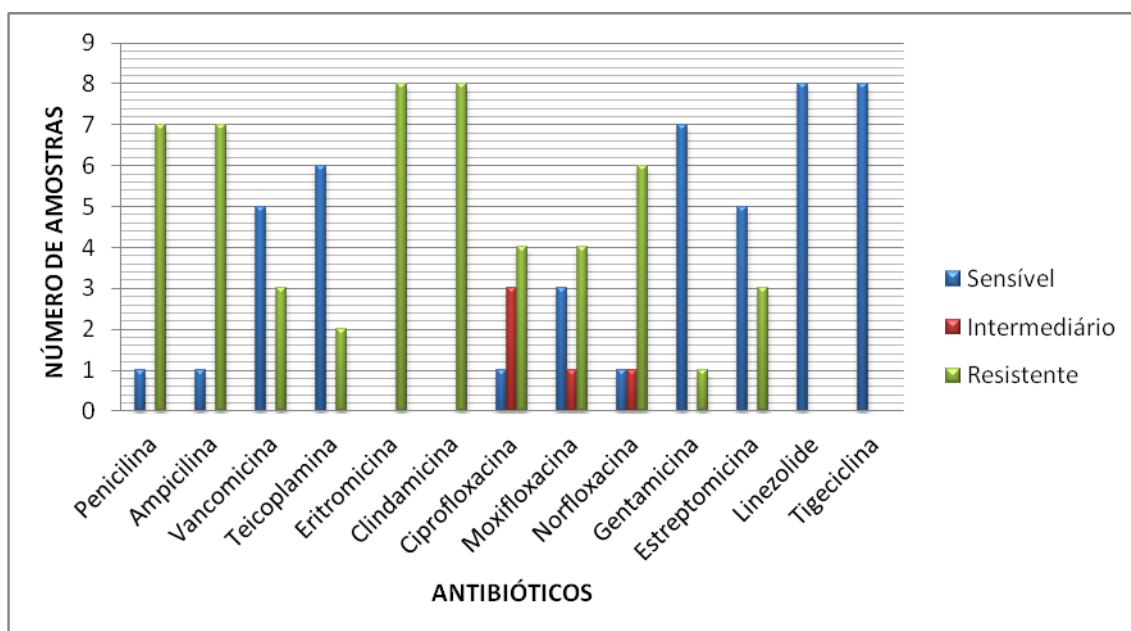


Figura 22 - Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pela metodologia automatizada de oito amostras de *E. faecium*.

Foram observados os seguintes resultados para a amostra 11: sensibilidade para penicilina, ampicilina, gentamicina, estreptomicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, linezolide, teicoplanina e tigeciclina. Perfil intermediário para norfloxacina, e eritromicina e resistente para clindamicina e vancomicina.

Os isolados números 8, 16 e 27 de *E. faecalis* e números 14, 26, 31 e 32 de *E. faecium* apresentaram resistência às quinolonas ciprofloxacina, moxifloxacina e norfloxacina como já foi descrito no método de disco difusão.

4.4 Comparação entre os Testes do Método de Disco Difusão e Metodologia Automatizada

Para analisar comparativamente as duas metodologias, foram equiparados somente os nove antimicrobianos em comum aos dois testes e analisou-se esse perfil para os 38 isolados estudados. Os antimicrobianos foram: penicilina, ampicilina, vancomicina, teicoplanina, eritromicina, ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina e estreptomicina. E observaram-se algumas discrepâncias de resultado para o perfil de sensibilidade, conforme tabela 17.

Tabela 17 – Comparação dos resultados entre os testes de disco difusão e automatizado dos 29 isolados de *E. faecalis*.

Antimicrobiano	Sigla	DISCO DIFUSÃO			AUTOMATIZADO		
		Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Penicilina	PEN	28 (96,55)*	0	1 (3,44)	18 (62,06)	0	11 (37,93)
Ampicilina	AMP	29 (100)	0	0	18 (62,06)	0	11 (37,93)
Vancomicina	VAN	28 (96,55)	0	1 (3,44)	28 (96,5)	0	1 (3,44)
Teicoplanina	TEC	28 (96,55)	0	1 (3,44)	28 (96,55)	0	1 (3,44)
Eritromicina	ERI	9 (31,03)	11 (37,93)	9 (31,03)	6 (20,68)	14 (48,27)	9 (31,03)
Ciprofloxacina	CIP	24 (82,75%)	2 (6,89)	3 (10,34)	25 (86,20)	1 (3,44)	3 (10,34)
Norfloxacina	NOR	25 (86,20)	1 (3,44)	3 (10,34)	18 (62,06)	7 (24,13)	4 (13,79)
Gentamicina	GEN	25 (86,20)	0	4 (13,79)	24 (82,75)	0	5 (17,24)
Estreptomicina	EST	25 (86,20)	0	4 (13,79)	23 (79,31)	0	6 (20,68)

* Porcentagens.

Os percentuais de sensibilidade nas metodologias de disco difusão e automatizada, respectivamente, dos 29 isolados de *E. faecalis*, para penicilina foram de 96,55% e 62,06% e para ampicilina de 100% e 62,06%. A diferença de sensibilidade entre os dois métodos para penicilina foi de 34,49% e para ampicilina foi de 37,94%. Observou-se que 10 isolados a mais foram

resistentes a penicilina na metodologia automatizada e 11 isolados a mais para ampicilina.

Os perfis de sensibilidade para norfloxacinina foram de 86,20% e 62,06% nas metodologias de disco difusão e automatizada, respectivamente. Notou-se diferença de sensibilidade de sete amostras entre os métodos de disco difusão e automatizado. Observou-se, também, que no método de disco difusão apenas um isolado apresentou perfil intermediário em relação a sete isolados com esse perfil na metodologia automatizada.

Pequenas variações foram encontradas nos resultados entre as duas metodologias para ciprofloxacina, gentamicina e estreptomicina.

A eritromicina apresentou o maior percentual de isolados com perfil intermediário nas duas metodologias.

Os 29 isolados de *E. faecalis* apresentaram concordância nos perfis de sensibilidade (96,55%) e de resistência (3,44%) para vancomicina e teicoplanina nas duas metodologias. Nenhum isolado apresentou perfil intermediário para estes dois antimicrobianos nas duas metodologias.

Em relação aos oito isolados de *E. faecium*, verificou-se que houve diferenças discretas nos resultados dos perfis de sensibilidade, intermediário e resistência entre os métodos de disco difusão e automatizado (ViteK 2), conforme tabela 18.

Tabela 18 - Comparação dos resultados entre os testes de disco difusão e automatizado dos 29 isolados de *E. faecium*.

Antimicrobiano	Sigla	DISCO DIFUSÃO			AUTOMATIZADO		
		Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Penicilina	PEN	0	0	8 (100)*	1 (12,5)	0	7 (87,5)
Ampicilina	AMP	1 (12,5)	0	7 (87,5)	1 (12,5)	0	7 (87,5)
Vancomicina	VAN	5 (62,5)	0	3 (37,5)	5 (62,5)	0	3 (37,5)
Teicoplanina	TEC	5 (62,5)	0	3 (37,5)	6 (75)	0	2 (25)
Eritromicina	ERI	0	0	8 (100)	0	0	8 (100)
Ciprofloxacina	CIP	2 (25)	2 (25)	4 (50)	1 (12,5)	3 (37,5)	4 (50)
Norfloxacina	NOR	2 (25)	2 (25)	4 (50)	1 (12,5)	1 (12,5)	6 (75)
Gentamicina	GEN	8 (100)	0	0	7 (87,5)	0	1 (12,5)
Estreptomicina	EST	5 (62,5)	0	3 (37,5)	5 (62,5)	0	3 (37,5)

* Porcentagens.

Comparando os resultados dos dois testes para as duas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, constatou-se maior percentual de resistência à vancomicina para *E. faecium* (37,5%) em relação a *E. faecalis* (3,44%). Para teicoplanina, *E. faecium* mostrou resistência de 37,5% no método de disco difusão e 25% na metodologia automatizada e *E. faecalis* apresentou 3.44% nas duas metodologias.

Em relação a *E. faecium*, verificou-se perfis de resistência elevados para penicilina, 100% no método de disco difusão e 87,5% no automatizado; para ampicilina, percentual de 87,5% nos dois métodos. Ao ser comparado com os perfis de resistência para penicilina e ampicilina de *E. faecalis* verificou-se que foram elevados somente na metodologia automatizada.

Para eritromicina, todos os isolados de *E. faecium* foram resistentes, enquanto para *E. faecalis* predominou o perfil intermediário, embora apresentando percentual de resistência de 31,03% nos dois métodos.

Para ciprofloxacina observou-se que a metade dos isolados apresentou perfil resistente para *E. faecium* e predomínio de perfil sensível para *E. faecalis* nos dois métodos.

Para norfloxacina, os isolados de *E. faecium* apresentaram perfil resistente mais alto nos dois métodos, enquanto que para *E. faecalis* apesar de certa discrepância entre os dois métodos, houve predomínio de isolados sensíveis nos dois métodos.

Os isolados de *E. faecalis* e de *E. faecium* apresentaram predominância de perfis sensíveis pelos dois métodos para gentamicina e estreptomicina, embora para *E. faecalis* a estreptomicina tenha apresentado um perfil um pouco maior na metodologia automatizada em relação a gentamicina, o mesmo ocorrendo para *E. faecium* nos dois métodos.

Na tabela 19 verifica-se os resultados dos testes fenotípicos de suscetibilidade para a amostra 11.

Tabela 19 – Comparação dos resultados entre os testes de disco difusão e automatizado da amostra 11.

Antimicrobiano	Sigla	DISCO DIFUSÃO			AUTOMATIZADO		
		Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Penicilina	PEN	1	0	0	1	0	0
Ampicilina	AMP	1	0	0	1	0	0
Vancomicina	VAN	1	0	0	0	0	1
Teicoplanina	TEC	1	0	0	1	0	0
Eritromicina	ERI	0	1	0	0	1	0
Ciprofloxacina	CIP	1	0	0	1	0	0
Norfloxacina	NOR	1	0	0	0	1	0
Gentamicina	GEN	1	0	0	1	0	0
Estreptomicina	EST	1	0	0	1	0	0

* Porcentagens.

Em relação à amostra 11, notou-se perfil de sensibilidade marcante para a maioria dos antimicrobianos testados. Apresentou perfil

intermediário nos dois métodos para eritromicina e para norfloxacin na metodologia automatizada. Foi resistente para vancomicina somente pela metodologia automatizada.

4.5 Utilização de Meio Cromogênico e Meios Adicionados com Vancomicina

No meio Cromogênico chromID® VRE verificou-se que entre oito isolados de *E. faecium*, três (amostras 13, 14 e 26) apresentaram crescimento de colônias de coloração violeta e entre vinte e nove isolados de *E. faecalis*, um (amostra 16) apresentou crescimento de colônias de coloração azul anil. Foram considerados resistentes a vancomicina os isolados que apresentaram crescimento de colônias (colônias violeta são *E. faecium* e colônias azul anil, *E. faecalis*) e os que não apresentaram crescimento foram considerados sensíveis a vancomicina (Figura 12).

Nos meios Ágar Mueller-Hinton e Ágar Enterococcusel adicionados com 8µg/mL de vancomicina, os três isolados de *E. faecium* (amostras 13, 14 e 26) e um isolado de *E. faecalis* (amostra 16) apresentaram crescimento de colônias brancas e colônias pretas, respectivamente, indicando resistência a vancomicina. A amostra 11 não apresentou crescimento em nenhum dos meios usados, sendo considerado como sensível à vancomicina por estes testes (Figura 23).

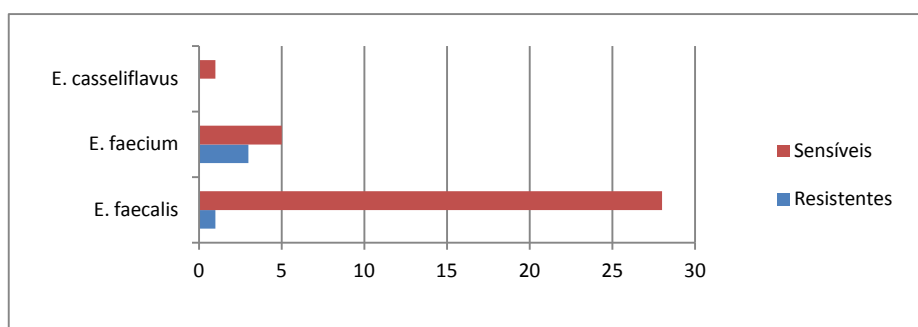


Figura 23 – Isolados sensíveis e resistentes de *E. faecium* e de *E. faecalis* nos testes de triagem utilizados para detecção de resistência a vancomicina.

4.6 Utilização de Fitas com Gradiente do Antimicrobiano para Determinação da CIM

Este teste foi realizado com três isolados de *E. faecium* e com um isolado de *E. faecalis* que foram resistentes a vancomicina nos testes de triagem (meios Cromogênico chromID® VRE, Ágar Mueller Hinton e Ágar Bile Esculina Azida acrescido de 8µg/mL de vancomicina), nos testes de disco difusão e/ou pela metodologia automatizada.

Os resultados dos testes de sensibilidade utilizando as fitas com gradiente de vancomicina demonstraram que os três isolados de *E. faecium* e um isolado de *E. faecalis* foram resistentes a este antimicrobiano pois não houve formação de zona de inibição de crescimento para estes microrganismos.

O isolado identificado como *E. casseliflavus* na metodologia automatizada apresentou zona de inibição de crescimento de 4µg/mL, indicando sensibilidade a vancomicina (CLSI, 2011).

4.7 Detecção da Produção da Enzima beta-lactamase

Foi realizada com os discos Cefinase (Interlab - BD, USA) que são impregnados com a cefalosporina cromogênica, o nitrocefin.

Todos os 38 isolados de *Enterococcus* spp. foram testados para a produção de beta-lactamase utilizando os discos Cefinase. Verificou-se que todos os isolados testados apresentaram resultados negativos, não sendo detectados isolados produtores de beta-lactamase por este método.

4.8 Métodos Genotípicos

4.8.1 Confirmação das Espécies de Enterococos por PCR

Os 29 isolados de *E. faecalis* identificados fenotipicamente pela metodologia manual com a utilização de provas bioquímicas convencionais e pela metodologia automatizada no Vitek 2 Compact (bioMérieux) foram confirmados pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) com o aparecimento da banda de 941 pb (Figuras 24, 25, 26). O *primer* utilizado foi E1 e E2, segundo Dutka-Malen et al., (1995).

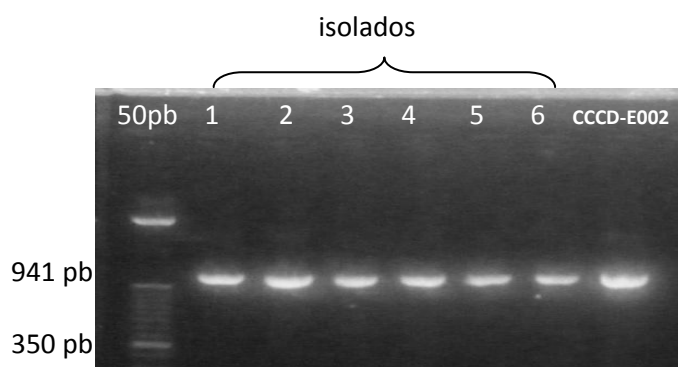


Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie *E. faecalis* pela PCR. **Linha 1:** Marcador de Peso Molecular (50 pb); **2-7:** amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6; **8:** controle positivo *E. faecalis* CCCD-E002.

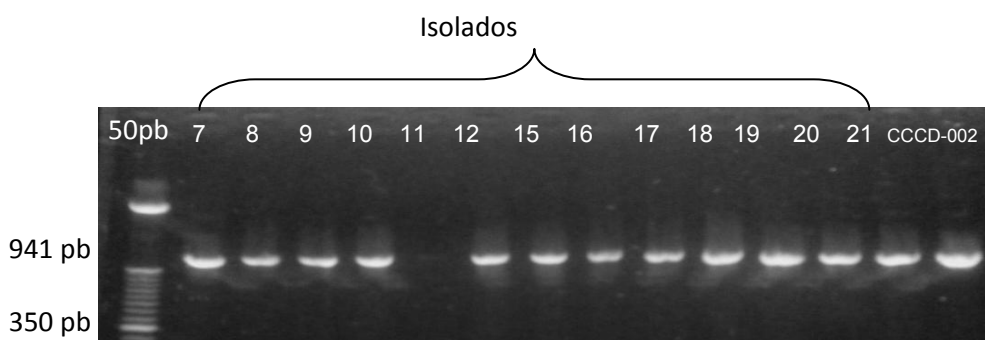


Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie *E. faecalis* pela PCR. **Linha 1:** Marcador de Peso Molecular (50 pb); **2-5:** amostras 7, 8, 9, 10; **6:** amostra 11; **7-14:** amostras 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21; **15:** controle positivo *E. faecalis* CCCD-E002.

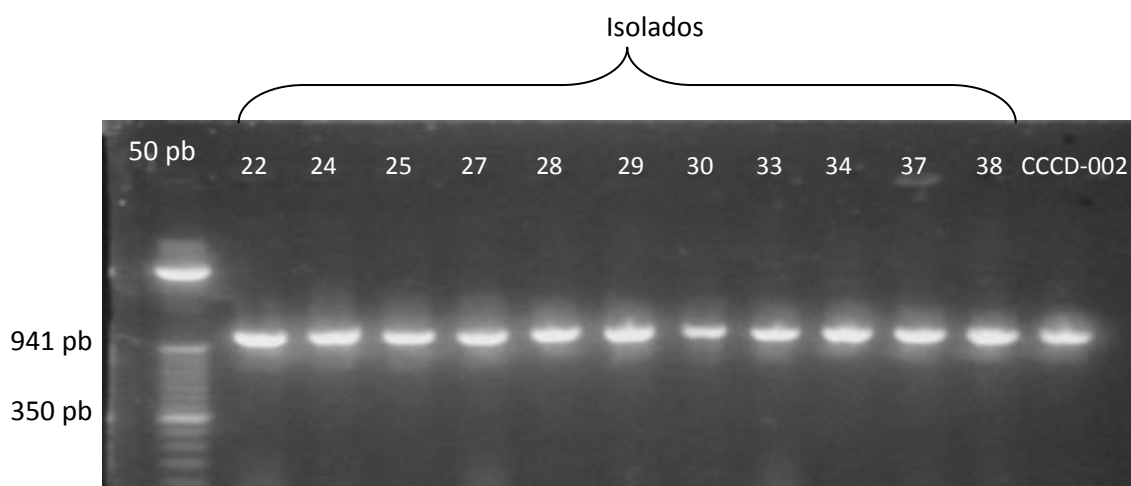


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie *E. faecalis* pela PCR. **Linha 1:** Marcador de Peso Molecular (50 pb); **2-12:** amostras 22, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 37, 38; **13:** controle positivo *E. faecalis* CCCD-E002.

Os oito isolados de *E. faecium* identificados fenotipicamente pela metodologia manual e pela metodologia automatizada no Vitek 2 Compact (bioMérieux) foram confirmados pela PCR com o aparecimento da banda de 550 pb (Figura 27). O *primer* utilizado foi F1 e F2, segundo Dutka-Malen et al., (1995).

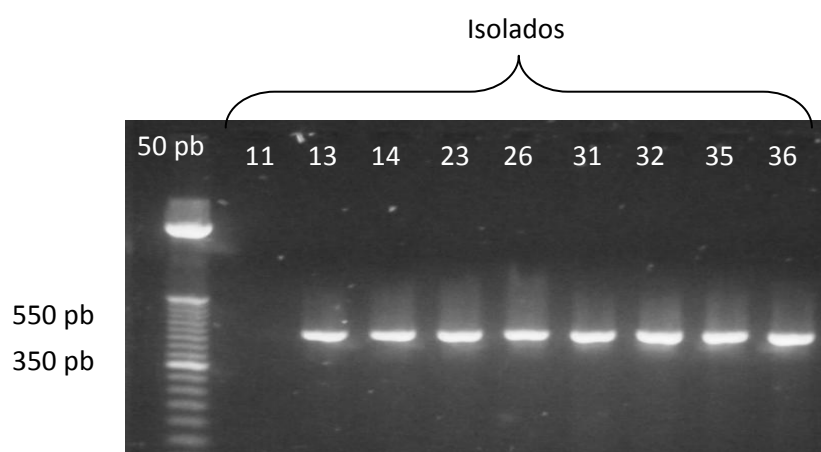


Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie *E. faecium* pela PCR. **Linha 1:** Marcador de Peso Molecular (50 pb); **2:** amostra 11; **3-9:** *E. faecium* amostras 13, 14, 23, 26, 31, 32, 35, 36.

A amostra 11, linha 2, identificada como *E. casseliflavus* pela metodologia automatizada no Vitek 2 Compact (bioMérieux) não foi confirmada pela PCR devido o não aparecimento da banda de 439 pb (Figura 28). O *primer* utilizado foi vanC 2/3-A e vanC 2/3-B, segundo Dutka-Malen et al., (1995).

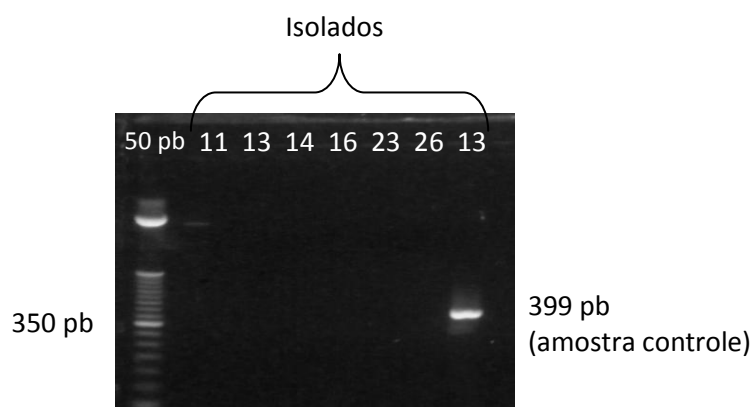


Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose para confirmação da espécie *E. casseliflavus* pela PCR. **Linha 1:** Marcador de Peso Molecular (50 pb); **2:** amostra 11; **3-4:** *E. faecium* amostras 13, 14; **5:** *E. faecalis* amostra 16; **6-7:** *E. faecium* amostras 23, 26; **8:** controle *E. faecium* amostra 13 controle da PCR (primers vanA-1 e vanA-2).

Na figura 29 observa-se que a amostra 11 também foi negativa para a espécie *E. gallinarum* pelo não aparecimento da banda de 822 pb utilizando o primer vanC1-A e vanC1-B.

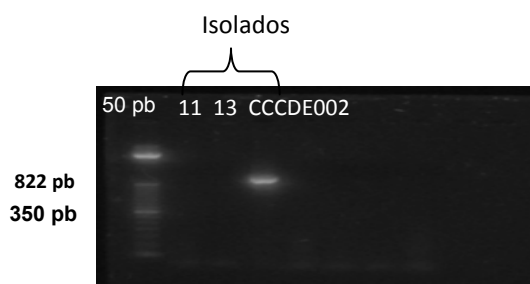


Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose para identificação a nível de espécie do isolado 11 pela PCR. **Linha 1:** Marcador de Peso Molecular (50 pb); **2:** amostra 11; **3:** *E. faecium* amostra 13; **4:** Controle positivo *E. faecalis* CCCD-E002.

4.8.2 Detecção dos Genótipos de Resistência à Vancomicina por PCR

A detecção dos genes de resistência à vancomicina foi realizada com o *primer* vanA-1 e vanA-2. Verificou-se que os três isolados de *E. faecium* (amostras 13, 14 e 26) e um isolado de *E. faecalis* (amostra 16) que foram resistentes a vancomicina pelos testes fenotípicos realizados, apresentaram o genótipo VanA pela detecção da banda de 399 pb na PCR (Figura 30).

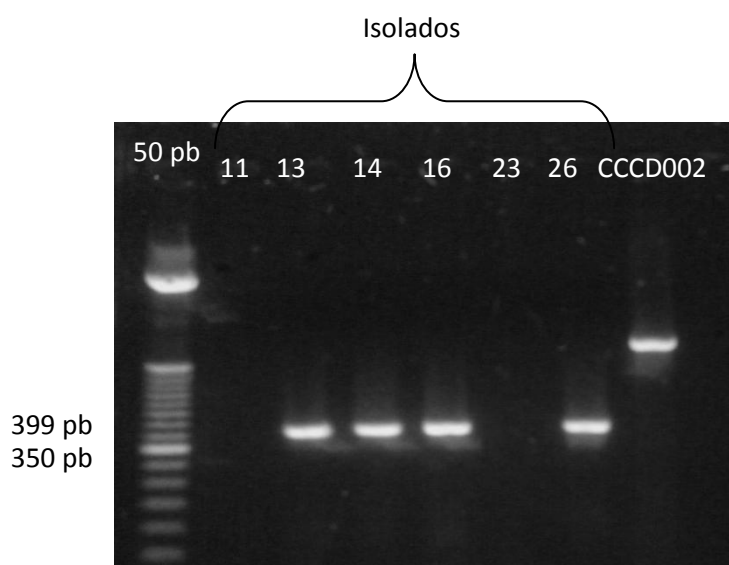


Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genótipos de resistência à vancomicina dos isolados de enterococos pela PCR. **Linha 1:** Marcador de Peso Molecular (50 pb); **2:** amostra 11; **3:** *E. faecium* amostra 13; **4:** *E. faecium* amostra 14; **5:** *E. faecalis* amostra 16; **6:** *E. faecium* amostra 23 (VanA negativo); **7:** *E. faecium* amostra 26; **8:** amostra controle *E. faecalis* CCCD-E002.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo buscou-se caracterizar o gênero e a espécie dos isolados de enterococos provenientes de amostras clínicas de pacientes de várias unidades de saúde e avaliar os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, assim como a demonstração de genes de resistência.

Desde o primeiro relato nacional, observa-se nos enterococos isolados em hemocultura, 18 a 20% de resistência à vancomicina. (Moura et al, 2006).

Os enterococos têm sido reconhecidos como importante causa de endocardite por quase um século. São considerados atualmente patógenos hospitalares ascendentes, tendo tornado-se o segundo microrganismo mais isolado de infecções do trato urinário e de ferida em hospitais e a terceira causa mais comum de bacteremia nosocomial nos Estados Unidos (Cetinkaya et al., 2000).

Foram utilizados dois métodos fenotípicos para identificação dos enterococos quanto ao gênero e espécie, a saber, testes bioquímicos convencionais (metodologia manual) e metodologia automatizada e a Reação em Cadeia da Polimerase, como testes genotípicos.

A confirmação do Gênero *Enterococcus* dos 38 isolados bacterianos por metodologia convencional foi baseada na observação da morfologia colonial e padrão de hemólise, nas características morfológicas e tintoriais no método de coloração de Gram, ausência de produção de catalase,

hidrólise da esculina na presença de 40% de bile, crescimento na presença de 6,5% de NaCl e pelo teste do PYR.

O Gênero *Enterococcus* não possui nenhuma característica marcante que o diferencie de outros cocos Gram-positivos catalase-negativos, contudo há certas características que são encontradas comumente na maioria dos isolados de todas as espécies do gênero. Para se obter identificação presuntiva mais próxima a um enterococo deve-se realizar os testes de Bile-esculina (BE), PYR (L-Pirrolidonil- β -naftilamida), LAP (Leucina- β -naftilamida) e crescimento na presença de NaCl 6,5% e à temperatura de 45°C (Teixeira et al, 2007).

Alguns isolados dos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Vagococcus* possuem similaridades fenotípicas com o gênero *Enterococcus* e, eventualmente, podem ser isolados de infecções humanas e, assim, a identificação presuntiva de enterococos baseada apenas na reação de BE e no crescimento em caldo NaCl 6,5% pode levar a identificações equivocadas (Teixeira et al, 2007).

O teste do PYR, que nem sempre é utilizado na rotina dos laboratórios de Microbiologia Clínica do Brasil para identificação dos enterococos, constitui prova bioquímica importante para diferenciar os cocos Gram-positivos catalase negativos do gênero *Enterococcus* (PYR positivos) daqueles pertencentes aos gêneros *Leuconostoc* e *Pediococcus* (PYR negativos), visto que as demais características usualmente pesquisadas podem ser semelhantes (Conceição, 2008).

Um dos motivos para a identificação correta do gênero *Enterococcus* é devido a alguns gêneros como *Leuconostoc* spp. e

Pediococcus spp. apresentar resistência intrínseca de alto nível a vancomicina e assim ocasionar a identificação incorreta de um VRE (Facklam e Elliot, 1995; Koneman et al., 2001).

A identificação das espécies de *Enterococcus* é realizada por meio de provas bioquímicas e fisiológicas. Somente cerca de 80% das espécies de *Enterococcus* reagem com antissoros antiggrupo D de Lancefield por precipitação em tubo capilar ou aglutinação com látex (Koneman *et al.*, 2001). Isolados de *Pediococcus* e *Leuconostoc* (Facklam e Elliot, 1995), bem como algumas cepas de *Vagococcus*, também podem reagir com antissoros antiggrupo D (Teixeira et al., 1997).

Muitos laboratórios realizam somente a identificação em nível de gênero, sendo liberados desta forma os resultados. No entanto, a identificação da espécie é importante para a epidemiologia das infecções por este microrganismo, bem como, para o tratamento das infecções ocasionadas principalmente por VRE. A resistência antimicrobiana e a sua relação com determinadas espécies faz com que sua identificação seja importante no controle das infecções mais graves, como bacteremias e endocardite. (Quiñones et al, 2005; Cetinkaya et al., 2000).

Foram realizados 17 testes bioquímicos convencionais na metodologia manual e 43 testes bioquímicos na metodologia automatizada para cada isolado recebido.

Na metodologia manual foram testados sete carboidratos (lactose, arabinose, manitol, rafinose, sacarose, sorbitol e sorbose) para a detecção de fermentação. Observou-se algumas variações nos resultados dos testes para lactose e sacarose em *E. faecalis*: a amostra 10 foi lactose negativa, as

amostras 22, 24, 25, 27 e 33 foram lactose positivas com reação tardias (após 24 horas) e as amostras 15, 17, 21, 25 e 33 foram sacarose positivas tardias. Os resultados dos testes para os demais carboidratos foram conforme o padrão para essa espécie, contribuindo para a caracterização da espécie.

Em relação aos isolados *E. faecium*, foi observado positividade para a maior parte dos carboidratos com exceção de lactose tardia para a amostra 36, rafinose negativa para as amostras 32 e 36 e sorbitol negativo para a amostra 36. Estes testes também estavam dentro do padrão *E. faecium* que fermenta maior número de carboidratos que *E. faecalis*.

Todos os 38 isolados foram negativos para a fermentação da sorbose.

Nos testes para detecção de motilidade, todos os 38 isolados foram imóveis a 35°C e a amostra 11 foi imóvel a 30°C e a 35°C.

Os resultados dos testes para detecção da produção de pigmento amarelo, utilização do piruvato de sódio, desaminação da arginina e tolerância a 0,04% de telurito estavam de acordo com o esperado para as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*.

As espécies de enterococos podem ser identificadas rotineiramente através de esquemas, empregando testes convencionais baseados em características fenotípicas que permitem separar estes microrganismos em cinco grupos fisiologicamente diferentes (d'Azevedo et al., 2004). A divisão dos enterococos em cinco grupos fisiológicos baseia-se na produção de ácido a partir do manitol e sorbose e hidrólise da arginina, segundo Tabela 1 (Teixeira et al, 2007).

O grupo II é composto por *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. haemoperoxidus*, *E. mundtii* e “*E. sanguinicola*”. Essas espécies produzem ácido a partir do manitol e hidrolizam a arginina, mas não produzem ácido a partir da sorbose. A maioria das amostras clínicas pertence a espécies incluídas nesse grupo. Isolados atípicos que não hidrolizam a arginina ou não produzem ácido a partir do manitol já foram encontrados. *Lactococcus* está também incluído nesse grupo devido às características fenotípicas de alguns isolados poderem identificá-los erroneamente como um enterococos (Teixeira et al, 2007).

Há vários sistemas de identificação comercialmente disponíveis para a identificação das espécies de *Enterococcus*, tais como os miniaturizados, manuais, semi-automatizados e automatizados. Estes sistemas foram atualizados para melhorar o desempenho e expandir suas capacidades de identificação (Teixeira et al., 2007). Em geral esses sistemas são confiáveis para a identificação de *E. faecalis* e, em menor extensão, para *E. faecium*. A identificação precisa de outras espécies, pela maioria dos sistemas, depende de testes adicionais, embora melhorias tenham sido observadas com formatos atualizados e banco de dados (Teixeira et al., 2007).

Os sistemas para a identificação de enterococos mais utilizados são o Vitek, o MicroScan e o Pasco. Entretanto, em várias situações, seu uso leva à obtenção de identificações errôneas que necessitam ser esclarecidas por meio do uso de métodos convencionais e da análise dos perfis de proteínas totais, a qual demonstrou ser método reprodutível e válido para diferenciar as espécies de enterococos (d’Azevedo et al., 2004).

A amostra 11 veio identificada por um sistema semi-automatizado como *E. faecium* e, depois, no presente estudo, como *E. casseliflavus*, pela metodologia automatizada. Também, foram notadas discrepâncias quanto ao teste do PYR, o qual foi negativo na metodologia manual e positivo na automatizada para essa amostra.

E. casseliflavus e *E. gallinarum* são espécies difíceis de serem diferenciadas de outros enterococos por testes bioquímicos convencionais. As dificuldades crescem particularmente para distingui-los das espécies *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* e *E. mundtii*, os quais são filogeneticamente e fenotipicamente relacionados e constituem as espécies grupo *E. faecium* dentro do gênero *Enterococcus* (Devriese et al., 1996).

A identificação das espécies é altamente importante, nesse contexto, devido às implicações epidemiológicas de encontrar *E. faecium* resistente aos glicopeptídeos. Essa espécie é parte da flora intestinal normal, enquanto *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, não. A maioria dos surtos causados por VRE é devida ao *E. faecium* (Devriese et al., 1996).

E. gallinarum, *E. casseliflavus* e *E. flavescens* possuem o gene vanC apresentando resistência intrínseca a vancomicina e já foram implicados em surtos nosocomiais, mas, possivelmente, poderiam ser transmitidos de paciente para paciente sem causar infecção. A confiabilidade dos sistemas automatizados para identificar com precisão os enterococos vanC tem sido uma preocupação. Testes convencionais como motilidade e produção de pigmento ajudam na identificação de enterococo vanC (Van Horn et al., 2002).

A fermentação do carboidrato metil- α -D-glicopiranosídeo (MGP) com a produção de ácido é um teste que apresenta grande importância na

identificação de enterococos, pois *E. faecium* e *E. faecalis* são negativos enquanto *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens* apresentam reação positiva.

A colonização de *E. faecalis* e *E. faecium* normalmente não têm efeito adverso no hospedeiro. Contudo, a aquisição de fatores de virulência e altos níveis antibiótico-resistência fazem com que esses microrganismos surjam como agentes de infecções nosocomiais, particularmente em pacientes imunocomprometidos (Yoong et al., 2004).

Os enterococos estão na segunda posição (depois de estafilococos) como agentes associados a infecções nos ambientes hospitalares norte-americanos, com *E. faecalis* e *E. faecium* isolados em uma relação de cerca de 1,5:1. Na Europa a prevalência de resistência à vancomicina em enterococos parece estar aumentando com importantes diferenças regionais (mais alto na Grécia, Reino Unido e Portugal) (Arías et al., 2010).

A pressão seletiva resultante do uso intenso de antibióticos nos últimos 50 anos levou ao surgimento de resistência bacteriana e a disseminação de genes de resistência entre os microrganismos patogênicos. O progressivo surgimento e a rápida disseminação de resistência aos glicopeptídeos, o último recurso para o tratamento de infecções hospitalares por enterococos resistentes aos antibióticos atuais, constitui um dos exemplos mais dramáticos de tal resistência (Fines et al., 1999).

No presente estudo avaliamos o perfil de suscetibilidade a 14 antimicrobianos pelo teste de disco-difusão e a 13 antimicrobianos pelo sistema automatizado VITEK 2 Compact, segundo as recomendações do CLSI (2011).

No método de disco difusão a resistência dos enterococos a penicilina foi de 26,68% e a ampicilina foi de 18,42%. No método automatizado a resistência encontrada para penicilina e ampicilina atingiu o mesmo percentual, 47,36%.

Verificou-se discrepância somente relacionada aos 29 isolados de *E. faecalis*, entre os resultados dos testes de disco difusão e automatizado para penicilina e ampicilina. Ao comparar os dois métodos, observou-se que 10 isolados a mais foram resistentes a penicilina e 11 isolados a mais para ampicilina pela metodologia automatizada. Uma das possibilidades para tal discrepância pode ser a própria qualidade dos discos de antimicrobianos disponíveis comercialmente no Brasil. Assunto assim estudado por Sejas et al, (2003), ao realizarem avaliação dos discos de 18 antimicrobianos obtidos de cinco diferentes fontes comerciais seguindo as recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), realizando cada teste 20 vezes. Os autores demonstraram que nenhuma das marcas apresentou desempenho satisfatório para o uso na rotina de um laboratório de microbiologia. Outra possibilidade seria a conservação inadequada dos discos entre o transporte da empresa fornecedora até laboratório que irá utiliza-los. Também, as discrepâncias podem estar relacionadas ao fato da metodologia de disco-difusão não conseguir detectar o fenótipo de resistência a ampicilina pela ação das enzimas beta-lactamases. Entretanto, a ocorrência deste tipo de resistência ainda é pouco relatada (Aslangul et al, 2005).

Em relação a *E. faecium*, verificou-se perfis de resistência elevados para penicilina e ampicilina nos dois métodos fenotípicos.

Uma característica do gênero *Enterococcus* é a sua completa ou relativa resistência aos beta-lactâmicos. Microrganismos da espécie *E. faecalis* são tipicamente de 10 a 100 vezes menos suscetíveis à penicilina do que a maioria dos estreptococos, enquanto que o *E. faecium* é, de 4 a 16 vezes menos suscetíveis do que *E. faecalis*. Enquanto a maioria dos *E. faecalis* são inibidos por concentrações de penicilina ou ampicilina (de 1 a 8 µg/mL) facilmente alcançáveis em seres humanos, isolados de *E. faecium* geralmente requerem de 16 a 64 µg/mL para inibir o crescimento, embora alguns isolados sejam ainda mais resistentes (Cetinkaya et al., 2000; Teixeira et al., 2007).

Exceto para os poucos isolados de *E. faecalis* identificados nos Estados Unidos que produzem β-lactamase, altos níveis de resistência a ampicilina são encontrados principalmente em isolados de *E. faecium* provenientes de amostras clínicas (TOP et al., 2008).

No presente estudo a detecção da produção de β-lactamase foi realizada e verificou-se que todos os isolados testados apresentaram resultados negativos, não sendo detectados isolados produtores de β-lactamase por este método.

Em relação aos aminoglicosídeos, 13,79% dos isolados de *E. faecalis* analisados mostraram resistência tanto à gentamicina (120µg) como à estreptomicina (300µg) pelo método de disco difusão. Na metodologia automatizada, 17,24% foram resistentes a gentamicina (120µg) e 20,68% a estreptomicina (300µg). Em relação aos isolados *E. faecium* não foi detectada resistência a gentamicina (120µg) pelo método disco difusão e na metodologia automatizada a resistência foi de 12,5%. Para estreptomicina (300µg) foi encontrado percentual de 37,5% nos dois métodos.

A resistência dos enterococos a vários antimicrobianos, especialmente a resistência a altas concentrações de penicilina, gentamicina ou glicopeptídeos tem dificultado o tratamento de infecções graves causadas por enterococos. As combinações sinérgicas entre aminoglicosídeos e um antibiótico que inibe a síntese da parede celular (por exemplo, amoxicilina ou vancomicina) são prejudicadas nesses isolados resistentes (Maschieto et al., 2004).

A maior importância da emergência de resistência está na habilidade de enterococos adquirir resistência por mutações cromossômicas ou de elementos externos móveis como transposons ou plasmídios (Witte et al., 1999). Por exemplo, mutações nos genes da DNA girase ou topoisomerase reduzem a afinidade das quinolonas por esses genes (Tankovic, et al., 1996). Em *E. faecalis* e *E. faecium* muitos transposons e plasmídios diferentes têm sido identificados conferindo resistência a uma variedade de antimicrobianos, incluindo eritromicina, gentamicina, canamicina, estreptomicina, tetraciclina e vancomicina (Top et al., 2008).

Obtivemos um isolado (amostra 16) de *E. faecalis* e três isolados (amostras 13, 14 e 26) de *E. faecium* resistentes a vancomicina nos métodos de disco difusão e automatizado. Esses isolados também foram resistentes a teicoplanina, com exceção da amostra 14 que foi sensível a este antimicrobiano somente pelo método automatizado.

Os enterococos resistentes aos glicopeptídeos têm ampla distribuição geográfica e são fenotipicamente e genotipicamente heterogêneos (Fines et al., 1999).

Entre os isolados de enterococos identificados como VRE, verificou-se que o tipo de amostra clínica mais frequente foi o sangue (três amostras) e apenas um isolado foi de urina. Três isolados foram provenientes de crianças na faixa etária até um ano de idade e uma amostra foi de um paciente com mais de 60 anos.

A resistência à vancomicina foi confirmada pela PCR em todos os quatro isolados resistentes a vancomicina pelos dois métodos fenotípicos.

Sistemas de detecção baseados nos ácidos nucleicos proporcionam métodos rápidos e sensíveis para detecção de genes de resistência. O método da PCR para detecção de resistência aos glicopeptídeos foi descrito em 1995 (Dutka-Malen et al., 1995) e, então, seu uso tem aumentado significativamente nos laboratórios de microbiologia clínica. A PCR tem vantagens sobre o uso de métodos fenotípicos por reduzir o tempo para detecção de resistência e possibilitar a implementação de intervenções mais rápidas para o controle de infecções (Seo et al., 2011).

Detectou-se que o isolado de *E. faecalis* (amostra 16) e os três isolados de (amostras 13, 14 e 26) de *E. faecium* apresentaram o fenótipo de resistência VanA detectado pela PCR com *primers* específicos.

No Brasil, os enterococos resistentes aos glicopeptídeos apresentam o genótipo VanA, geralmente, sendo caracterizados pela presença do *Tn1546*, um transposon de 10.851 pb que é carregado por plasmídeos conjugativos. Esse transposon apresenta-se intacto na maioria das amostras isoladas no Brasil (Palazzo et al., 2006).

O genótipo VanA, que induz a expressão de altos níveis de resistência à vancomicina e a teicoplanina, na Europa, é o mais comum. O

cluster *vanA* foi detectado inicialmente em *E. faecium* e *E. faecalis* e menos frequentemente em outras espécies de enterococos. (Biavasco et al., 2007).

No caso de amostras com genótipos transferíveis como o VanA ou VanB já detectados em *E. faecalis* e *E. faecium*, algumas medidas como o isolamento de contato do paciente devem ser tomadas imediatamente pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) para evitar a disseminação do VRE no ambiente hospitalar (Caiaffa Filho et al., 2003; Palazzo et al., 2006).

A utilização de meio cromogênico e meios adicionados de vancomicina comprovaram ser eficaz como testes para triagem de resistência a vancomicina, sendo observado crescimento de colônias apenas dos isolados resistentes a vancomicina identificados pelos outros métodos no estudo.

O Ágar ChromID VRE apresenta bom desempenho para a detecção e identificação precoce de espécies VRE clinicamente importantes, porque confere cores características para *E. faecium* (roxo) e *E. faecalis* (azul ou azul-anil) que são diferentes de outras espécies de enterococos e de bacilos Gram-positivos.

Segundo o estudo de Seo et al., (2011), a PCR multiplex com o uso de caldo de enriquecimento apresentou boa correlação com o cultivo em meios cromogênicos para rastreamento de VRE.

Foram utilizadas fitas com gradiente de concentração da vancomicina para determinação da CIM com os isolados que apresentaram resistência a esse antimicrobiano pelos outros métodos realizados. Este método é utilizado para determinação da suscetibilidade quantitativa aos agentes antimicrobianos. O teste baseia-se na difusão de um gradiente definido

e contínuo do antimicrobiano a partir de uma tira fina de plástico, produzindo uma elipse de inibição. A determinação da CIM é feita como o ponto de interseção entre a fita e a elipse de inibição do crescimento do microrganismo (Sanchez et al., 1992).

Os testes realizados com as fitas com gradiente de concentração da vancomicina confirmaram o perfil de resistência para o isolado de *E. faecalis* (amostra 16) e para os três isolados de *E. faecium* (amostras 13, 14 e 26). Este método foi utilizado com a amostra 11 e comprovou-se o perfil de sensibilidade dessa amostra, conforme apresentado pelo método de disco difusão. No entanto, a amostra tinha apresentado perfil resistente na metodologia automatizada, não sendo confirmado por este método e nem pela PCR.

A detecção de uma amostra VRE, independente de se tratar de um caso de infecção ou colonização, implica em uma série de medidas que devem ser tomadas, como a identificação da espécie. O resultado da análise pode presumir se a linhagem é intrinsecamente resistente à vancomicina quando há o fenótipo VanC e, conseqüentemente, sem possibilidade de disseminação da mesma (Cetinkaya et al., 2000; Teixeira et al., 2007). Mas em casos de amostras com genótipos transferíveis como o VanA ou VanB, já detectados em *E. faecalis* e *E. faecium*, é necessário medidas como o isolamento do paciente, sob a responsabilidade da CCIH para evitar a disseminação do VRE no ambiente hospitalar (Caiaffa Filho et al., 2003; Palazzo et al., 2006).

É necessário enfatizar a necessidade de uma segura e rápida identificação do enterococos para, conseqüentemente, orientação terapêutica adequada e conduta de controle de infecção hospitalar, principalmente em

casos de cepas com resistência. Assim, o monitoramento contínuo dos hospitais é de extrema importância para controle e prevenção em casos de surtos e ainda em situações endêmicas.

O aparecimento de cepas de bactérias cada vez mais resistentes aos antimicrobianos, principalmente, em ambiente hospitalar é assunto que está em pauta.

Observamos que o uso de múltiplos antimicrobianos pode predispor à infecção enterocócica, pois todos os pacientes que possuíam essa informação usavam no mínimo um antimicrobiano e, conseqüente, aumentar a chance de aparecimento de agentes com resistência cruzada aos antimicrobianos.

6. CONCLUSÕES

- A espécie de enterococos mais frequentemente isolada foi *E. faecalis*.
- Foram detectados um isolado de *E. faecalis* e três de *E. faecium* resistentes à vancomicina tanto pelos métodos fenotípicos como pela PCR.
- Os quatro isolados de enterococos que apresentaram resistência à vancomicina (VRE) apresentaram o genótipo VanA.
- A utilização de meios cromogênicos e meios adicionados com vancomocina e fitas com gradiente de concentração da vancomicina apresentaram correlação com os testes fenotípicos de suscetibilidade e com a PCR, para detecção de resistência à vancomicina.
- Verificou-se que todos os isolados de enterococos apresentaram resultados negativos para a detecção da produção de β -lactamase.

REFERÊNCIAS

- Aslangul E, Ruimy R, Chau F, Garry L, Andremon A, Fantin B. Relationship between the Level of Acquired Resistance to Gentamicin and Synergism with Amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(10):4144-4148.
- Arias CA, Reyes J, Zúniga M, Cortés L, Cruz C, Rico CL, Panesso D. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001–2002. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51:59-68.
- Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16: 555–562.
- Barbosa J, Ferreira V, Teixeira P. Antibiotic susceptibility of *Enterococci* isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiology*. 2009; 26(5): 527-532.
- Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 36:2187–2190.
- Biavasco F, Foglia G, Paoletti C, Zandri G, Magi G, Guaglianone E, Sundsfjord A, Pruzzo C, Donelli G, Facinelli B. VanA-Type *Enterococci* from Humans, Animals, and Food: Species Distribution, Population Structure, Tn1546 Typing and Location, and Virulence Determinants. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(10): 3307-3319.
- Bruin MA, Riley LW. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization in hospitals? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2007; 7(24): 1-11.
- Caiaffa Filho HH, Almeida GD, Oliveira GA, Sarahyba L, Mamizuka EM, Burattini MN. Molecular characterization of van genes found in vancomycin resistant *Enterococcus* spp. isolated from Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2003; 7:173-174.
- Camargo ILBC, Gilmore MS, Darini ALC. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-

sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. Clin Microbiol Infect. 2006; 12: 1123–1130.

Cetinkaya Y, Falk P, Glen Mayhall C. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(4):686-707.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

Conceição, N. Detecção da resistência as penicilinas por testes fenotípicos e à vancomicina por testes fenotípicos e genotípicos em amostras de *Enterococcus*. 2008, 90 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica). – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais.

Conceição N, Oliveira CCHB, Silva PR, Ávila BGM, Oliveira AG. Trends in Antimicrobial Resistance Among Clinical Isolates of Enterococci in a Brazilian Tertiary Hospital: a 4-year Study. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2011; 44(2):177-181.

Coudron PE, Markowitz SM, Wong ES. Isolation of a betalactamase-producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(5):1125-1126.

d'Azevedo PA, Dias CAG, Lemos SK, Bittencourt JAF, Teixeira LM. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. Braz J Infect Dis 2004; 35:199-204.

Devriese LA, Pot B, Kersters K, Lauwers S, Haesebrouck Freddy. Acidification of Methyl- α -D-Glucopyranoside: a useful test to differentiate *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium* species group and from *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol. 1996; 34(10):2607-2608.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant *Enterococci* by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 33(1):24-27. Errata em: 33(1):1434.

Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J. Clin. Microbiol. 1989; 27(4):731-734.

Facklam R, Elliott JA. Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. Clin Microbiol Rev. 1995; 8(4): 479-495.

Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43(9):2161-2164.

Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology. 2009; 155(6): 1749-1757.

Frieden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM, William G, Faur Y, Eisner W, Warren S, Kreiswirth B. Emergence of vancomycin resistant enterococci in New York City. Lancet. 1993; 342:76–79.

Galloway-Peña JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. J Infect Dis 2009; 200:1566-73.

Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL, De Girolami PC, Ferraro MJ, et al. Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 2180-4.

Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. Virulence. 2012; 3(5): 421-433.

Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. Emerging Infectious Diseases. 1998; 4(2): 239-249.

Jones RN. Resistance Patterns Among Nosocomial Pathogens. Chest. 2001; 119:397S-404S.

Kauffman CA. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. J Antimicrobiol Chemotherapy. 2003; 51(suppl.S3):23-30.

Khan MA, Northwood JB, Loor RGJ, Tholen ATR, Riera E, Falcon M, van Westreenen A, Hays JP. High prevalence of ST-78 infection-associated

vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from hospitals in Asunción, Paraguay. Clin. Microbiol. Infect. 2010; 16:624-627.

Kim WJ, Weinstein RA, Hayden MK: The changing molecular epidemiology and establishment of endemicity of vancomycin resistance in enterococci at one hospital over a 6-year period. J Infect Dis. 1999; 179(1):163-171.

Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol. 1998; 41:103–125.

Koneman EW, Allen SD, Janda WD, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology. 2006; 9(5):454-460.

Leclercq R, Derlot E, Durval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Eng J Med. 1988; 319(3): 157-161.

Leclercq R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant *Staphylococci* and *Enterococci*. Clin Microbiol Infect. 2009; 15: 224-231.

Lode HM. Clinical Impact of Antibiotic-resistant Gram-positive Pathogens. Clin Microbiol Infect. 2009; 15:212-217.

Lopez M, Hormazabal JC, Maldonado A, Saavedra G, Baquero F, Silva J, Torres C, del Campo R. Clonal dissemination of *Enterococcus faecalis* ST201 and *Enterococcus faecium* CC17-ST64 containing Tn5382-*vanB2* among 16 hospitals in Chile. Clin. Microbiol. Infect. 2009; 15: 586–588.

Marques EB, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. J Med Microbiol., 2004; 53(11): 1069-1073.

Maschieto A, Martinez R, Palazzo ICV, Darini ALC. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. Isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2004; 99(7):763-767.

Moeta GJ, Jonesa RN, Biedenbacha DJ, Stilwella MG, Fritschea TR. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004). *Diag Microbiol Infect Dis*. 2007; 57(1):7-13.

Moura JDG, Motta EHG, Oliveira CF, Troster EJ, Vaz FAC. Enterococo resistente à vancomicina em UTI pediátrica: descrição de um caso e revisão da literatura. *Rev Paul Pediatría* 2006; 24(2):185-9.

Mundy LM, Sahm DF, Gilmore, M. Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(4):513-522.

Murray BE, Mederski-Samaroj B. Transferable betalactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest*. 1983; 72:1168-71.

Murray BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev*. 1990; 3(1):46-65.

Murray BE. Beta-lactamase-producing enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992; 36:2355-9.

Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med* 2000; 342:710-721.

Nelson RR, McGregor KF, Brown AR, Amyes SG, Young H: Isolation and characterization of glycopeptide-resistant enterococci from hospitalized patients over a 30-month period. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(6):2112-2116.

Palazzo ICV, Camargo ILBC, Zanella RC, Darini ALC. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546-like elements associated with *vanA* plasmids. *FEMS Microbiol. Lett*. 2006 258:29-36.

Panesso D, Reyes J, Rincón, S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, Carrilo C, Merentes A, Guzmán M, Adachi JA, Murray BE, Arias, CA. Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: a Prospective, Multicenter Study in South American Hospitals. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(5): 1562–1569.

Remonatto G, Bolzan V, Zanchi AC, D'azevedo PA. Detecção molecular da resistência bacteriana – Ênfase para *Enterococcus* e *Streptococcus*. NewsLab. 2005; 70: 100-112.

Quiñones D, Goñi P, Rubio MC, Duran, E, Gómez-Lus R. Enterococci spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2005; 51:63–67.

Rice, L.B. Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci. Emerging Infectious Diseases. 2001; 7(2): 183-187.

Rossi, F, Andreazzi, DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. 118 p.

Salgado CD, Farr BM: Outcomes associated with vancomycin-resistant enterococci: a meta-analysis. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24(9):690-698.

Sanchez ML, Barrett MS, Jones RN. The E-test applied to susceptibility tests of gonococci, multiply-resistant enterococci, and Enterobacteriaceae producing potent β -lactamases. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1992; 15:459-463.

Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clin Microbiol Infect. 2010; 16: 533-40.

Schleifer KH, Kilpper-Bals R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. ver. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1984; 34: 31-34.

Sejas LM, Suzane S, Reis AO, Sader HS. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2003; 39(1):27-34.

Seo JY, Kim PW, Lee JH, Song JH, Peck KR, Chung DR, Kang CI, Ki CS, Lee NY. Evaluation of PCR-based screening for vancomycin-resistant enterococci compared with a chromogenic agar-based culture method. J Medical Microbiology. 2011; 60:945-949.

Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 2263–2266.

Sifaoui F, Arthur M, Rice L, Gutmann L. Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 2594-7.

Stosor V, Peterson LR, Postelnick M, Noskin GA: *Enterococcus faecium* bacteremia: does vancomycin resistance make a difference? *Arch Intern Med* 1998, 158(5):522-527.

Tankovic J, Mahjoubi F, Courvalin P, Duval J, Leclercq R. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2558–2561.

Teixeira LM, Carvalho MGS, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 9th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007. 430-442 p.

Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 52(3): 297-308.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5^a ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

Uttley AHC, Collins, CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* 1988; i:57–58.

Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, López RL, Veljovic K, Cañamero MM, Topisirovic MKL, Gálvez A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods the animal origin. *Food Control.* 2009; 20: 381-385.

Van Horn K, Tóth C, Kariyama R, Mitsuhashi R, Kumon H. Evaluation of 15 motility media and a direct microscopic method for detection of motility in *Enterococci*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(7):2476-2479.

Weber DJ, Rutala WA. Role of environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant enterococci. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1997; 18:306–9.

Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, Bonten JM. Global spread of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11:821–828.

Williamson R, Gutmann L, Horaud T, Delbos F, Acar JF. Use of penicillin-binding proteins for the identification of enterococci. *J Gen Microbiol.* 1986; 132: 1929-1937.

Witte W, Wirth R, Klare I. Enterococci. *Chemotherapy.* 1999. 45:135–145.

Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol.* 2004; 186(4):4808-4812.

Zanella RC, Valderato F, Lovgren M et al. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with VanA phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. *Microb Drug Resist* 1999; 5:159–161.

Zanella RC, Brandileone MCC, Bokermann S et al. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 283–291.

APÊNDICES

Apêndice 1

Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM)

Venho através deste solicitar a este Comitê, a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), devido não haver a necessidade de contato direto com os pacientes ou com suas amostras clínicas neste estudo. A obtenção de dados dos pacientes será através dos prontuários médicos.

Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo
Pesquisadora responsável

Manaus, 06 de julho de 2011.



Apêndice 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Projeto: Identificação de *Enterococcus spp.* e Avaliação da Ocorrência de Genes de Resistência à Vancomicina em Amostras de Pacientes de Hospitais de Manaus/AM.

Ficha dos Pacientes**Nº da Amostra:****Data da coleta:****Procedência da amostra:****Nome Completo:****Sexo:** () Masculino () Feminino**Data do Nascimento:****Idade:****Naturalidade:****Endereço:****Instituição que está internado:****Enfermaria/Leito:****Amostra Clínica/Exame solicitado:****Resultado da Cultura:****Diagnóstico de entrada:****Sítio de Infecção:****Período de internação:****Tipo de infecção:** Comunitária () Hospitalar ()**Antimicrobianos usados no período da internação:****Realizou cirurgia?** SIM () NÃO () Qual?**Transferido de outro hospital?** SIM () NÃO ()

Qual?

Outras observações:**Ass.:** _____ **Data:** ____/____/____

ANEXO 1 – Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0322.0.115.000-11, intitulado: **“OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS LABORATORIAIS DE ENTEROCOCCUS SSP. PROVENIENTES DE PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA”**, tendo como Pesquisadora Responsável Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 17 de agosto de 2011.

Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro
Coordenador CEP/UFAM

ANEXO 2 – Ofício de conhecimento do Comitê de Ética em Pesquisa da UFAM para as atualizações do projeto aprovado em 17/08/2011 com a modificação do título e dos critérios de inclusão do projeto.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM



Ofício nº. 053/12 - CEP/UFAM

Manaus, 26 de junho de 2012.

À Profa. MSc. Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo
Pesquisadora Responsável

Em atendimento à solicitação datada de 14 de junho de 2012, acerca do protocolo CAAE 0322.0.115.000-11, intitulado "Ocorrência e caracterização da Sensibilidade a Antimicrobianos de Isolados Laboratoriais de Enterococcus spp. Provenientes de Pacientes com Doença Renal Crônica", sob a responsabilidade de Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo, este comitê **aprovou**, em Reunião Extraordinária do dia 20 de junho de 2012, **as seguintes emendas ao protocolo em tela:**

1 - Alteração do título, o qual ficará com a seguinte redação: "Ocorrência e caracterização da Sensibilidade a Antimicrobianos de Isolados Laboratoriais de Enterococcus spp. Provenientes de Pacientes Atendidos em Centros de Saúde de Manaus-AM".

2 – Critérios de inclusão: serão incluídos neste estudo os isolados de Enterococcus spp, provenientes de culturas de pacientes atendidos em centros de saúde de Manaus, de ambos os sexos, de qualquer faixa etária e que estejam fazendo uso ou não de antimicrobianos ou de qualquer outro medicamento, internados ou não.

Atenciosamente,


Prof. MSc. Pedro Rodolfo Fernandes da Silva
Coordenador do CEP/UFAM

ANEXO 3A – Tabela 2D CLSI. Padrões interpretativos de diâmetro dos halos de inibição e pontos de corte equivalentes das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para *Enterococcus* spp.

For Use With M02-A10 and M07-A8

M100-S21

Table 2D. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments	
			S	I	R	S	I	R		
PENICILLINS	Penicillin Ampicillin	10 units	≥ 15	—	≤ 14	≤ 8	—	≥ 16	(6) Ampicillin is the class representative for ampicillin and amoxicillin. Ampicillin results may be used to predict susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, piperacillin, and piperacillin-tazobactam among non-β-lactamase-producing enterococci. Ampicillin susceptibility can be used to predict imipenem susceptibility, providing the species is confirmed to be <i>E. faecalis</i> . (8) Enterococci susceptible to penicillin are predictably susceptible to ampicillin, amoxicillin, ampicillin-sulbactam, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin, and piperacillin-tazobactam for non-β-lactamase-producing enterococci. However, enterococci susceptible to ampicillin cannot be assumed to be susceptible to penicillin, if penicillin results are needed. Testing of penicillin is required. (7) <i>Re:</i> Combination therapy of ampicillin, penicillin, or vancomycin (for susceptible strains), plus an aminoglycoside, is usually indicated for serious enterococcal infections, such as endocarditis, unless high-level resistance to both gentamicin and streptomycin is documented; such combinations are provided to result in synergistic killing of the <i>Enterococcus</i> . (8) Penicillin or ampicillin resistance among enterococci due to β-lactamase production has been reported very rarely. Penicillin or ampicillin resistance due to β-lactamase production is not reliably detected with routine disk or dilution methods, but is detected using a direct, nitrocefin-based β-lactamase test. Because of the rarity of β-lactamase-positive enterococci, this test need not be performed routinely, but can be used in selected cases. A positive β-lactamase test predicts resistance to penicillin, as well as ampicillin and ureidopenicillins (see Glossary I).	
		10 µg	≥ 17	—	≤ 16	≤ 8	—	≥ 16		
GLYCOPOLYPTIDES	Vancomycin	30 µg	≥ 17	15–16	≤ 14	≤ 4	8–16	≥ 32		When testing vancomycin against enterococci, isolates should be held a full 24 hours for accurate detection of resistance. For isolates for which the vancomycin MICs are 8 to 16 µg/mL, perform biochemical tests for identification as listed under the "Vancomycin Resistance" test found in Supplemental Table 2D-S9 at the end of Table 2D. Zones should be examined using transmitted light; the presence of a haze or any growth within the zone of inhibition indicates resistance. Organisms with intermediate zones should be tested by an MIC method as described in CLSI document M07-A8. See also the Vancomycin Resistance test described in Supplemental Table 2D-S9 at the end of Table 2D.
		30 µg	≥ 17	15–16	≤ 14	≤ 4	8–16	≥ 32		
LIPIDOPOLYPTIDES	Tetracycline Daptomycin	30 µg	≥ 14	11–13	≤ 10	≤ 8	16	≥ 32		(10) Disk testing is not reliable for testing daptomycin. (11) Daptomycin should not be reported for isolates from the lower respiratory tract.
		30 µg	≥ 14	11–13	≤ 10	≤ 8	16	≥ 32		

Table 2D
Enterococcus spp.
M02 and M07

ANEXO 3B – Tabela 2D CLSI (continuação). Padrões interpretativos de diâmetro dos halos de inibição e pontos de corte equivalentes das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para *Enterococcus* spp.

Table 2D
Enterococcus spp.
M02 and M07

Table 2D. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			MIC Interpretive Standard (µg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
MACROLIDES									
O	Erythromycin	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13	≤ 0.5	1-4	≥ 8	(12) Not routinely reported on isolates from the urinary tract.
TETRACYCLINES									
(13) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, some organisms that are intermediate or resistant to tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.									
U	Tetracycline	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14	≤ 4	8	≥ 16	
U	Doxycycline	30 µg	≥ 18	13-15	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16	
O	Minocycline	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14	≤ 4	8	≥ 16	
FLUOROQUINOLONES									
U	Ciprofloxacin	5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4	
U	Levofloxacin	5 µg	≥ 17	14-16	≤ 13	≤ 2	4	≥ 8	
U	Norfloxacin	10 µg	≥ 17	13-16	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16	
O	Gatifloxacin	5 µg	≥ 18	15-17	≤ 14	≤ 2	4	≥ 8	(14) These interpretive criteria apply to urinary tract isolates only.
NITROFURANTOINS									
U	Nitrofurantoin	300 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 32	64	≥ 128	
ANSAMYCINS									
O	Rifampin	5 µg	≥ 20	17-19	≤ 16	≤ 1	2	≥ 4	(15) Rfx: Rifampin should not be used alone for antimicrobial therapy.
FOSFOMYCINS									
O	Fosfomycin	200 µg	≥ 16	13-15	≤ 12	≤ 64	128	≥ 256	(16) Indicated for use against <i>E. faecalis</i> urinary tract isolates only. (17) The approved MIC testing method is agar dilution. Agar media should be supplemented with 25 µg/mL of glucose-6-phosphate. Broth dilution testing should not be performed. (18) The 200-µg fosfomycin disk contains 50 µg of glucose-6-phosphate.
PHENICOLS									
O	Chloramphenicol	30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12	≤ 8	16	≥ 32	See comment (12).
STREPTOGRAMINS									
B	Quinupristin-dalfopristin	15 µg	≥ 18	16-18	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4	(19) For reporting against vancomycin-resistant <i>E. faecium</i> .
OXAZOLIDINONES									
B	Linezolid	30 µg	≥ 23	21-22	≤ 20	≤ 2	4	≥ 8	

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control.

January 2011

Vol. 31 No. 1