

Angelma Genaro

**Estudo comparativo “in vitro” da suscetibilidade à
ciprofloxacina e à vancomicina em linhagens de
Enterococcus faecalis isoladas de processos
infecciosos**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Doenças
Tropicais (Modalidade Biologia Tropical)
da Faculdade de Medicina de Botucatu -
Universidade Estadual Paulista -
UNESP, para obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Magalhães Lopes

Botucatu - SP
2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU -
UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Genaro, Angelma.

Estudo comparativo “in vitro” da suscetibilidade à ciprofloxacina e à vancomicina em linhagens de *Enterococcus faecalis* isoladas de processos infecciosos / Angelma Genaro. – 2002.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002.

Orientador: Carlos Alberto de Magalhães Lopes

Assunto CAPES: 40101096

1. Enterobactérias 2. Drogas - Resistência

CDD 616.92

Palavras-chave: Suscetibilidade; Resistência; *Enterococcus faecalis*; Mutação; Vancomicina; Ciprofloxacina

Agradecimento Especial

Ao Prof Dr. Carlos Alberto de
Magalhães Lopes,

minha eterna gratidão, pela paciência,
oportunidade profissional e orientação durante a
elaboração deste trabalho. Exemplo de amizade e
dedicação que nunca será esquecido.

Agradecimentos

A Deus,

pela minha vida, dom maior.

Aos Professores

do Programa de Pós-Graduação em Doenças
Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu-
UNESP.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani,

do Departamento de Bioestatística da FMB/
UNESP, pelo fundamental trabalho estatístico.

Ao Pedro Miguel Oyan,

funcionário do Departamento de Microbiologia e
Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP,
Campus de Botucatu pelo auxílio e paciência.

À Sônia Maria Faraldo,

funcionária do Departamento de Microbiologia e
Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP,
Campus de Botucatu, pela amizade, apoio e
dedicação. Serei eternamente grata.

À Rosemary Cristina da Silva e
Luciana Pizani,

bibliotecárias da UNESP, Campus de Botucatu.

À todos os funcionários e professores

do Departamento de Microbiologia e Imunologia
do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de
Botucatu.

Aos funcionários

do Departamento de Moléstias Infecciosas e
Parasitárias da Faculdade de Medicina de
Botucatu- UNESP.

Ao Fábio Kenji Okamura,

pelo amor e incentivo.

À todos os amigos de longa data e aos
novos e especiais amigos conquistados
em Botucatu,

pelo apoio e incentivo sempre recebidos.

Dedicatória

Aos meus pais, Valdeci e Virginia e aos meus irmãos, Jean e Mirela

Aos que amamos

“**T**em gente que é só passar
pela gente
que a gente fica contente.

Tem gente que sente o que a gente
sente e passa isso docemente.

Tem gente que vive como a gente vive,

Tem gente que fala e nos olha na
face,

Tem gente que cala e nos faz olhar...

Toda essa gente que convive com a
gente

Leva da gente o que a gente tem

e passa a ser gente dentro da gente

Um pedaço da gente em outro
alguém...”

“Fernando Sabino”

Epígrafe

“É preciso ter o sonho e a certeza de que tudo vai mudar. É necessário abrir os olhos e descobrir que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sonhos não precisam de motivos e nem os sentimentos de razão.”.

John Lennon

Resumo

O *Enterococcus faecalis* é considerado, atualmente, um dos grandes agentes responsáveis pelas infecções hospitalares, onde sua resistência a diversas drogas tem sido motivo de preocupação das autoridades. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo determinar a suscetibilidade antimicrobiana e a presença de linhagens mutantes em *E. faecalis*. Foram obtidas 74 linhagens provenientes de hemoculturas e de secreções purulentas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de 1995 a 2001. Foram analisadas “in vitro”, quanto à sua suscetibilidade, a vancomicina e a ciprofloxacina através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), da concentração bactericida mínima (CBM) e a presença de linhagens mutantes através da determinação da taxa de mutação espontânea à ciprofloxacina. Os resultados demonstraram uma maior efetividade da vancomicina, que inibiu 98,6% das linhagens de *E. faecalis* (CIM 0,06 a 1µg/ml). Entretanto, quando da análise bactericida, o perfil de sensibilidade desta droga apresentou-se elevado, onde 73% das linhagens tiveram a CBM igual ou maior que 64µg/ml. Para a ciprofloxacina, o perfil de sensibilidade ficou distribuído entre as classes de CIM e CBM. Nesse estudo, não foi encontrada a presença de linhagens mutantes. Há probabilidade de algumas linhagens serem tolerantes à vancomicina, sendo necessário então, a realização de testes mais apurados, no sentido de confirmar esta característica.

Summary

Enterococcus faecalis has been considered one of the major agents of nosocomial infection; its resistance to several drugs has been the concern of health authorities. The objective of this study was to determine antimicrobial susceptibility and the presence of mutant strains in *E. faecalis*. Seventy-four strains were obtained from hemocultures and purulent secretions of patients hospitalized at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP between 1995 and 2001. They were analyzed in vitro for their susceptibility to vancomycin and ciprofloxacin by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and the presence of mutant strains through determination of the spontaneous mutation rate to ciprofloxacin. Our results showed vancomycin higher efficacy, inhibiting 98.6% of *E. faecalis* strains (MIC 0.06 µg/ml). The bactericidal analysis, however, showed vancomycin high susceptibility profile, with 73% of strains, presenting MBC equal or higher than 64 µ/ml. Ciprofloxacin sensitivity profile was found in MIC and MBC classes. No mutant strains were found in this study. It is probable that some strains are resistant to vancomycin, which requires that further tests be performed.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
SUMMARY.....	12
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	16
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1. Amostras Clínicas.....	27
2.2. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana “in vitro”.....	31
2.2.1. Drogas Antimicrobianas.....	31
2.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	31
2.2.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima...	33
2.3. Determinação da Taxa de Mutação Espontânea a Ciproflo- xacina.....	33
2.4. Análise Estatística.....	34
3. RESULTADOS.....	35
4. DISCUSSÃO.....	43
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Informações sobre os pacientes, as linhagens de <i>Enterococcus faecalis</i> e a procedência do material.....	28
TABELA 2.	Padronização para a interpretação das Concentrações Inibitórias Mínimas - CIM ($\mu\text{g/ml}$).	33
TABELA 3.	Distribuição percentual de 74 linhagens de <i>Enterococcus faecalis</i> suscetíveis em quatro classes de Concentração Inibitória Mínima (CIM $\mu\text{g/ml}$) e Concentração Bactericida Mínima (CBM $\mu\text{g/ml}$).....	36
TABELA 4.	Suscetibilidade “in vitro” de 74 linhagens de <i>Enterococcus faecalis</i> em relação às respectivas CIM e CBM ($\mu\text{g/ml}$).....	37
TABELA 5.	Distribuição de 74 linhagens de <i>Enterococcus faecalis</i> quanto a correlação CIM/CBM.....	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Percentuais de freqüências acumuladas de sensibilidade de 74 linhagens de <i>Enterococcus faecalis</i> em relação às Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMS) da vancomicina e da ciprofloxacina.....	39
FIGURA 2.	Percentuais de freqüências acumuladas de sensibilidade de 74 linhagens de <i>Enterococcus faecalis</i> em relação às Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) da vancomicina e da ciprofloxacina.....	40
FIGURA 3.	Comparação dos percentuais de sensibilidade entre a Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMS) e a Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) das 74 linhagens de <i>Enterococcus faecalis</i> frente à vancomicina e à ciprofloxacina...	41

1. Introdução

Os enterococos são cocos Gram-positivos. Dispõem-se em pares e em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, catalase negativa e crescem a 35°C, na presença de NaCl a 6,5%, em Ágar Sangue, em Ágar Chocolate, produzindo colônias grandes brancas, onde, geralmente, não são hemolíticas e toleram sais biliares a 40%, podendo hidrolisar a esculina. Não sintetizam toxina potente ou enzima hidrolítica, mas, devido à combinação de fatores de virulência, os enterococos são capazes de produzir doenças graves. São bactérias entéricas encontradas em seres humanos, principalmente no intestino grosso e no trato geniturinário, bem como em uma variedade de animais. Apesar da escassez de fatores de virulência, os enterococos são bem conhecidos por sua capacidade de causar infecções potencialmente fatais. Tornaram-se patógenos hospitalares mais temidos na década de 90, visto que muitas cepas são muito resistentes a todos antibióticos convencionais, constituindo-se na quarta causa principal de infecções no âmbito hospitalar. As vias urinárias e a corrente sangüínea são os locais mais comumente afetados, onde a espécie *E. faecalis* é a maior causa de endocardites bacterianas. Estas infecções são, particularmente, comuns em pacientes com cateteres urinários ou intravasculares, bem como em pacientes hospitalizados por longos períodos de tempo e que receberam antibiótico de amplo espectro (Murray¹, 1995; Prasad & Fraser², 1995).

Maki & Agger³ (1988) desenvolveram um estudo de bacteremia enterocócica, onde os principais fatores associados com o aumento da taxa de mortalidade estavam diretamente relacionados aos pacientes que apresentaram idade acima de 56 anos, traumas, lesões cirúrgicas, aquisição de infecções intra-hospitalar, várias doenças e terapias antimicrobianas anteriores.

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. Em geral, classificam-se como resistentes as bactérias que crescem “in vitro”, nas concentrações médicas que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral. São sensíveis as que não crescem nestas concentrações. A resistência pode ser natural ou adquirida, onde a natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana e a adquirida, a característica de uma ou mais amostras da espécie. De um modo geral, a resistência natural das espécies bacterianas aos antimicrobianos, está relacionada com a incapacidade dos mesmos em atingir seus sítios de ação. A resistência adquirida é um fenômeno espontâneo da bactéria, sendo os antimicrobianos, apenas, agentes seletos de amostras resistentes. (Trabulsi et al.⁴, 1999)

Para alcançar a atividade bactericida adequada contra os patógenos altamente resistentes, tem-se utilizado a associação de antibióticos como a vancomicina ou a ampicilina a um aminoglicosídeo apropriado (Bush et al.⁵, 1989; Carrizosa & Kaye ⁶, 1976; Mandel et al.⁷, 1970; Watanakunakorn ⁸, 1971).

Os enterococos resistentes à vancomicina têm emergido como um patógeno importante e responsável por sérias infecções sistêmicas, especialmente em pacientes debilitados com baixo mecanismo de defesa. A espécie *E. faecalis* adquiriu alto nível de resistência aos aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos. Entretanto, a resistência à ampicilina ainda é rara (Sastry et al.⁹, 1995; Cereda et al.¹⁰, 1997; Lai et al.¹¹, 1997; Gordts et al.¹², 1995). Foi realizada uma análise de dados que foram enviados ao Center for Disease Control (CDC) nos Estados Unidos, no período de janeiro de 1989 a março de 1993, que demonstrou um aumento de vinte vezes na prevalência de resistência à vancomicina em enterococos associadas a infecções nosocomiais

(Jones¹³, 1995).

Von Baum et al.¹⁴ (1999) avaliaram a predominância de colonização por enterococos resistentes à vancomicina em crianças com deficiência renal em estágio final (ESRF), em 13 unidades pediátricas de Nefrologia na Europa. Os autores observaram que 24 pacientes (7,1%) apresentaram enterococos com sensibilidade moderada à vancomicina (CIM 4 g/ml) e 2 apresentaram essa bactéria com elevado nível de resistência à mesma droga, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 32g/ml.

Montelli & Sadatsune¹⁵ (1995) realizaram levantamento na Enfermaria de Clínica Médica (ECM) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu sobre as taxas de infecções hospitalares, uso de antimicrobianos e resistência das bactérias às drogas. Os autores obtiveram o índice de sensibilidade aos 10 antimicrobianos mais utilizados no combate às bactérias encontradas, com maior frequência em materiais clínicos dos pacientes internados, onde a espécie *E. faecalis* foi sensível à vancomicina, ao imipenem, à ampicilina, à ofloxacina e à penicilina G, e resistente à netilmecina, à gentamicina, à tobramicina, à eritromicina e à amicacina.

Foi realizado um estudo por Torfoss et al.¹⁶ (1999), onde analisaram 82 pacientes (33 da hematologia e 49 da cirurgia gastrointestinal) do Hospital de Norwegian. Os resultados demonstraram que 51% apresentaram cultura positiva para enterococos, onde 33 linhagens eram *E. faecalis* (46%), 20 eram *E. faecium* (28%) e os outros 19 (26%) eram de outras espécies de *Enterococcus*. Uma linhagem de *E. faecalis* era resistente à vancomicina (CIM > 256 µg/ml) e 10 apresentaram elevado nível de resistência à gentamicina (CIM >1024

µg/ml), sendo 9 de *E. faecalis* e 1 *E. faecium*.

Hsieh¹⁷ (2000), realizou um estudo sobre a sensibilidade antimicrobiana em 96 amostras de enterococos isolados principalmente de urina, pus e feridas no Hospital de Taichung, no período de junho a novembro de 1998, onde a espécie *E. faecalis* foi a mais freqüente (86,5%) apresentando CIM₉₀ para a vancomicina e ciprofloxacina de 2µg/ml e 1µg/ml, respectivamente, onde o *Enterococcus faecalis* foi sensível às duas drogas.

Em um outro estudo desenvolvido por Zouain & Araj¹⁸ (2001), no Líbano, sobre a resistência antimicrobiana de 53 amostras de *Enterococcus* isoladas, no período de 1998 a 1999, os autores concluíram que a maioria das espécies eram *E. faecalis*, nas quais 23% eram resistentes à ciprofloxacina.

Hallgren et al.¹⁹ (2001) investigaram a CIM para 14 antimicrobianos diferentes em amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Swedish, no período de dezembro de 1996 a dezembro de 1998. Foram coletadas 322 amostras clínicas de pacientes internados na UTI, das quais 244 eram *Enterococcus faecalis*. Através da CIM, foi possível observar que todas as linhagens de *E. faecalis* foram sensíveis à vancomicina e 23% à ciprofloxacina.

O nível de resistência para os glicopeptídeos em *E. faecalis* e *E. faecium* é determinado por três genótipos diferentes: VanA, VanB e VanD. Os enterococos resistentes à vancomicina estão categorizados em dois fenótipos: VanA ou classe A, que determina elevado nível de resistência para a vancomicina e teicoplanina; VanB ou classe B, onde as linhagens são resistentes à vancomicina mas sensíveis

à teicoplanina (CIM $\leq 8\mu\text{g/ml}$). Um quarto genótipo, VanC, é encontrado em *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, que codifica resistência, em baixos níveis, somente para a vancomicina (Leclercq & Courvalin²⁰, 1997; Eliopoulos²¹, 1997). Neste sentido, Cereda et al.²² (2000) descobriram a presença de fenótipo VanA em *Enterococcus faecalis* em um estudo realizado com uma paciente que tinha recebido um transplante no Hospital São Paulo na Universidade Federal de São Paulo, em dezembro de 1997. Foi testada a sensibilidade do isolado, através do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), onde a amostra apresentou elevado nível de resistência à gentamicina e à estreptomicina (CIM $> 1024\mu\text{g/ml}$). Foi, também, resistente à vancomicina e à teicoplanina (CIM $> 256\mu\text{g/ml}$), mas apresentou sensibilidade à ampicilina (CIM $> 4\mu\text{g/ml}$). Já Oon et al.²³ (2001) determinaram a presença e a prevalência de enterococos resistentes à vancomicina presente no intestino de pacientes internados. Foram colhidas 299 amostras de 284 pacientes entre janeiro e março de 1997, onde 35 pacientes (12,3%) apresentaram *Enterococcus* com reduzida suscetibilidade à vancomicina (CIM $> 4\mu\text{g/ml}$). Dessas 35 linhagens resistentes à vancomicina (VRE), quatro tinham o fenótipo VanB e 31 VanC. Dois dos que apresentaram VanB tinham elevado nível de resistência à vancomicina, sendo um *E. faecalis* e um *E. faecium*.

As fluoroquinolonas disponíveis, incluindo a ciprofloxacina, são de interesse limitado no tratamento de infecções por *Enterococcus*, pois sua atividade "in vitro" é moderada. Todavia, novas drogas como NIN 57273 ou DU-6859a demonstraram um aumento na atividade contra patógenos Gram positivos, incluindo os *Enterococcus*. Desta forma, as fluoroquinolonas podem representar uma alternativa de uso no tratamento de infecções enterocócicas (Sahm & Koburov²⁴, 1989; Sato et al.²⁵, 1992). Entretanto, há uma preocupação sobre a emergência e rápida expansão da aquisição de resistência a fluoroquinolonas por

Enterococcus, como já tem sido relatado para outras bactérias (Shalit et al.²⁶, 1989).

Shaberg et al.²⁷ (1992) relataram que a resistência à ciprofloxacina aumentou significativamente (de 1 para 15%) entre as linhagens de *E. faecalis*, no período de 1985-1986 e de 1989-1990. Já Tankovic et al.²⁸ (1996) analisaram o desenvolvimento de resistência às fluoroquinolonas, entre 1986 a 1993, em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis*, na França. Elas foram analisadas quanto à sua resistência à ciprofloxacina (CIM >2 µg/ml) e à gentamicina (CIM>1 µg/ml). Em 1986, não foi encontrada linhagem resistente à ciprofloxacina, sendo rara também de 1987 a 1989 ($\leq 2\%$) aumentando, significativamente, de 1991 a 1993 ($\geq 14\%$). Os autores concluíram que a maioria das linhagens era altamente resistente à ciprofloxacina com a CIM variando entre 32 a 64 µg/ml. O aumento da resistência entre os *E. faecalis* às fluoroquinolonas, no período de 1986 a 1993, foi associado ao aumento na quantidade de uso desta droga.

A resistência das bactérias às quinolonas surgiu devido às alterações na subunidade gyrA do DNA gyrase e na subunidade do ParC da topoisomerase IV. Nesse sentido, Nakanishi et al.²⁹ (1991) mostraram que a mutação, no gene gyrA em duas linhagens de *E. faecalis*, foi o maior responsável pela resistência às fluoroquinolonas. Kanematsu et al.³⁰ (1998), também, realizaram um trabalho para determinar a alteração na sequência das regiões gyrA e ParC de 31 linhagens de *E. faecalis*, das quais 18 foram resistentes às fluoroquinolonas (norfloxacina, ofloxacina e ciprofloxacina), apresentando alterações no gene gyrA e ParC. Os autores sugeriram a associação entre a presença de alteração nos genes com o desenvolvimento de resistência às fluoroquinolonas por *E. faecalis*. Korten et al.³¹ (1994) realizaram, também, um trabalho com o objetivo de

determinar a relação entre a mutação do *gyrA* e a resistência às fluoroquinolonas por *E. faecalis* e *E. faecium*, através do seqüenciamento de linhagens suscetíveis e resistentes. Os autores não encontraram diferenças na região do gene estudado, nas linhagens de *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes à ciprofloxacina, sugerindo que outro mecanismo poderia ser responsável pela resistência de alguns enterococos às fluoroquinolonas.

A caracterização do perfil de sensibilidade às drogas antimicrobianas, bem como a mutação de algumas espécies, constitui base de estudos extremamente importantes para uma boa conduta terapêutica.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos:

- Determinar a sensibilidade antimicrobiana à ciprofloxacina e à vancomicina em linhagens de *Enterococcus faecalis*.
 - Determinar a presença de mutação espontânea à ciprofloxacina.
-

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras Clínicas

Foram estudadas 74 linhagens de *Enterococcus faecalis* isoladas de hemoculturas e de secreções purulentas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, no período de 1995 a 2001 (Tabela 1).

As linhagens foram transportadas do laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu- UNESP, em meio Ágar Estoque, onde foram previamente identificadas.

Após este procedimento, as linhagens foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sangue objetivando-se analisar sua pureza, bem como as características coloniais, além de serem submetidas às provas de catalase, crescimento na presença de bile e hidrólise da esculina, crescimento em 6,5% de NaCl e em M *Enterococcus* Ágar (DIFCO), para a confirmação da espécie *Enterococcus faecalis*.

A identificação final das espécies foi realizada seguindo-se os critérios de Murray¹ (1995), conforme a realização dos seguintes testes: produção de ácido, a partir de: arabinose, glicerol, inulina, lactose, maltose, melibiose, rafinose, ramnose, salicina, sorbitol, sacarose e trealose; resistência ao telurito de potássio, redução de tetrazólio, desaminação da arginina, motilidade, produção de pigmento, Teste de Voges & Proskauer e produção de hemolisinas.

TABELA 1. Informações sobre os pacientes, as linhagens de *Enterococcus faecalis* e a procedência do material.

PACIENTE ¹	SEXO	IDADE	LINHAGENS	MATERIAL	PROCEDÊNCIA
A.A.B.	M	50a	S-5497/95	Secreção Traqueal	UTI - Neuro
K.C.S.	F	-	S-5507/95	Líquido Ascítico	Cirurgia Pediátrica
S.S.D.	F	1a	S-5524/95	Líquido Pleural	Pediatria
J.L.	F	24a	S-5547/95	Cânula Endotraqueal	UTI - Berçário
M.A.O.	F	R.N.	S-5553/95	Ponta de Cânula	UTI - Berçário
A.P.B.M.	F	21a	S-5607/95	Colo Uterino	Obstetrícia
M.R.M.	M	23a	S-5634/95	Ponta Cistostomia	Hematologia
C.P.	M	64a	S-5636/95	Pele-Secreção	Ambulatório
N.S.M.	F	50a	S-5648/95	Líquido Dreno	Gastro
I.B.S.	M	65a	S-5661/95	Secreção	Cirurgia Vascular
M.A.G.O.	M	R.N.	S-5675/95	Orofaringe	UTI - Berçário
E.M.S.	M	51a	S-5745/95	Esperma	Urologia
A.P.B.M.	F	21a	S-5780/95	Colo Uterino	Obstetrícia
F.S.S.	F	27a	S-2887/96	Líquido Ascítico	Uro Gastro
M.T.B.R.	M	22a	S-2925/96	Secreção	Dermatologia
D.N.O.	M	56a	S-3402/96	Dreno	Gastro Cirurgia
A.C.L.	M	42a	S-4428/96	Esperma	Uro Ambulatório
F.A.B.	F	R.N.	S-4442/96	Orofaringe	UTI - Berçário
O.P.B.	M	53a	S-4555/96	Ponta de Flebot.	Gastro Clínica
J.A.S.	M	39a	S-4578/96	Secreção Cateter	UTI - Central
F.A.B.	F	R.N.	S-4639/96	Ponta Cateter	UTI - Neonatal
M.S.M.	F	4a	S-4795/96	Secreção Traqueal	UTI - Pediátrica
J.B.	M	72a	S-4887/96	Secreção Traqueal	UTI
C.S.	F	30a	S-4932/96	Secreção	Obstetrícia
M.B.S.	M	15a	S-4952/96	Secreção Traqueal	UTI

continuação da tabela 1

TABELA 1. Informações sobre os pacientes, as linhagens de *Enterococcus faecalis* e a procedência do material.

PACIENTE ¹	SEXO	IDADE	LINHAGENS	MATERIAL	PROCEDÊNCIA
S.O.G.	F	43a	S-4957/96	Secreção Cervical	Obstetrícia
L.C.	M	77a	S-4965/96	Secreção	Ortopedia
L.C.T.	M	35a	S-5028/96	Esperma	Urologia
B.M.C.	F	53a	S-5035/96	Secreção Dreno	Urologia
G.R.C.	M	38a	S-5143/96	Deiscência	Gastro Cirurgia
R.M.M.	F	R.N.	S-5167/96	Cânula	UTI - Berçário
I.D.S.C.	F	8m	S-5202/96	Orofaringe	Pediatria
R.M.M.	F	R.N.	S-5206/96	Orofaringe	UTI - Berçário
G.R.C.	M	38a	S-5240/96	Incisão	Gastro Cirurgia
V.N.	F	30a	S-5258/96	Colo Uterino	Obstetrícia
J.S.D.	F	74a	S-5269/96	Traqueal	Clínica Médica
B.M.C.	F	53a	S-5399/96	Dreno	Urologia
B.P.M.	M	45a	S-5502/96	Secreção Vesical	UTI - Central
R.H.R.	F	-	S-5543/96	Secreção Vaginal	Ginecologia
P.T.S.	M	67a	S-5734/96	Ponta de Sonda Vesical	Cirurgia Cardíaca
M.F.D.	F	30a	S-5809/96	Esperma	Urologia
F.C.	M	57a	S-5931/96	Líquido Pleural	Nefrologia
L.L.F.	F	1a	S-5932/96	Líquido Peritoneal	UTI
L.F.	F	R.N.	S-5949/96	Ponta de Cateter	UTI - Neonatal
L.L.M.F.	F	2m	H-138/97	Sangue	UTI
N.S.S.	F	52a	H-1356/97	Sangue	UTI - Neonatal
A.C.N.	M	77a	H-1873/97	Sangue	Endócrino
L.F.S.C.	M	34a	H-2051/97	Sangue	Nefrologia
L.F.S.C.	M	34a	H-2076/97	Sangue	Urologia
L.F.S.C.	M	34a	H-2083/97	Sangue	Urologia

continuação da tabela 1

TABELA 1. Informações sobre os pacientes, as linhagens de *Enterococcus faecalis* e a procedência do material.

PACIENTE ¹	SEXO	IDADE	LINHAGENS	MATERIAL	PROCEDÊNCIA
L.F.C.	M	32a	H-2382/97	Sangue	Nefrologia
L.F.S.C.	M	32a	H-2424/97	Sangue	Nefrologia
J.F.	M	46a	H-157/99	Sangue	Pneumologia
P.R.A.	M	-	H-430/99	Sangue	Pronto Socorro
A.C.B.	M	57a	H-1207/99	Secreção Purulenta	Gastro Cirurgia
N.C.C.	F	1a	H-1140/00	Sangue	UTI - Pediátrica
E.W.L.	M	60a	H-1254/00	Líquido Ascítico	Gastro Clínica
U.U.R.	F	32a	H-1704/00	Secreção Dreno Biliar	MIP
J.B.N.	M	56a	H-1864/00	Secreção	Clínica Médica
F.R.M.	F	85a	H-1936/00	Sangue	Ortopedia
J.P.S.	M	-	H-1960/00	Líquido Peritoneal	Nefrologia
M.J.S.F.	F	46a	H-2175/00	Secreção Dreno	Gastro Cirurgia
M.A.S.F.	F	46a	H-2214/00	Abscesso Hepático	Gastro Clínica
M.J.S.	F	34a	H-2682/00	Sangue	Obstetrícia
M.J.	F	34a	H-2702/00	Sangue	Obstetrícia
M.F.R.	F	-	H-2777/00	Secreção	Pronto Socorro
N.S.M.	F	48a	H-2796/00	Líquido Ascítico	Gastro Clínica
A.C.P.	F	78a	H-40/01	Líquido Ascítico	Gastro Clínica
E.A.F.	M	37a	H-173/01	Sangue	Neuro Clínica
A.P.S.	F	2m	H-196/01	Sangue	Berçário
R.S.L.	M	45a	H-223/01	Secreção	Urologia
S.M.M.	M	17a	H-253/01	Sangue	Pronto Socorro
Z.J.X.	M	32a	H-376/01	Líquido Pleural	Gastro Cirurgia
L.S.C.	M	3m	H-700/01	Sangue	Pediatria

2.2. Teste de sensibilidade antimicrobiano “in vitro”

2.2.1. Drogas Antimicrobianas

As drogas testadas contra *Enterococcus faecalis* fazem parte da categoria de indicação primária com reporte seletivo (vancomicina) e do grupo suplementar com reporte seletivo (ciprofloxacina).

A escolha das duas drogas antimicrobianas foi conforme sugerido pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS³² (1999) para *Enterococcus faecalis*.

As drogas antimicrobianas foram utilizadas na forma de sais comerciais: vancomicina (Biossintética), ciprofloxacina (Hipolabor).

2.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A sensibilidade antimicrobiana das linhagens, frente à ciprofloxacina e à vancomicina, foi avaliada pela utilização de sais comerciais através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela diluição da droga em agar, preparadas em microplacas, conforme as normas estipuladas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS - M7-A3³³ (1997). Nesse sentido, foram empregadas culturas de 18 horas de incubação a 35^o.C e diluídas de acordo com o padrão de turvação, a partir da escala 0,5 de McFarland. Assim, para o inóculo final, foram preparadas suspensões bacterianas

com 1×10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) /ml (1×10^4 UFC por poço), as quais foram semeadas através de micropipeta Eppendorf multicanal em micro-placas (96 poços dispostos em 12 fileiras) contendo 100 μ L de Mueller Hinton Broth (Difco) adicionado de 50 mg de Ca^{++} e de 25mg de Mg^{++} / l por poço. As microplacas, em referência, apresentaram previamente as seguintes concentrações de cada antimicrobiano: 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 μ g/ml.

Todos os experimentos foram acompanhados de um controle de qualidade, utilizando-se uma estirpe de referência de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), cujo nível de resistência foi previamente determinado. Como controle da qualidade do meio de cultura, em cada microplaca, uma fileira de poços foi reservada à observação de crescimento da linhagem em estudo no meio de cultura sem a adição de antimicrobiano.

Os resultados foram anotados depois de decorridas 18 h/ 35 $^{\circ}$.C, que indicaram a CIM como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do microrganismo. A interpretação e avaliação do padrão de sensibilidade da linhagem em estudo e da linhagem de referência foram realizadas conforme as normas estabelecidas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS³² (1999).

TABELA 2. Padronização para a interpretação das Concentrações Inibitórias Mínimas - CIM ($\mu\text{g/ml}$).

DROGAS	Resistente	Intermediário	Sensível
Vancomicina	≥ 32	8-16	≤ 4
Ciprofloxacina	≥ 4	2	≤ 1

National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS³² (1999)

2.2.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Esta determinação foi realizada em conformidade com a técnica descrita por Shanholtzer et al.³⁴ (1986), Peterson & Zervos³⁵ (1990). Assim, a partir dos poços da microplaca que evidenciaram inibição de crescimento de uma linhagem frente à droga em estudo, foram aspirados 100 μl através de micropipeta, os quais foram inoculados em superfície de placas contendo Columbia Ágar Base adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. A Concentração Bactericida Mínima foi caracterizada como a menor concentração da droga capaz de produzir a morte de 99,99% das bactérias, em relação ao inóculo inicial (1×10^5 UFC/ml).

2.3. Determinação da Taxa de Mutação Espontânea à Ciprofloxacina

A taxa de mutação espontânea à droga, em referência, foi avaliada através do plaqueamento de 0,1 ml de uma suspensão de 1×10^8 UFC/ml das linhagens em estudo em superfície de Mueller Hinton

Ágar (DIFCO), adicionado de 50 mg de Ca⁺⁺ e de 25mg de Mg⁺⁺ / e de quatro e oito vezes a CIM específica da droga. Para a obtenção da taxa de mutação, as mesmas linhagens foram também plaqueadas no mesmo meio de cultura sem a adição de droga. Após incubação a 35°C/ 24 h, o resultado final foi conseguido através da equação (Lopes et al.³⁶, 1993):

$$\text{Taxa de Mutação} = \frac{\text{N.º de UFC/ml em meio sem droga}}{\text{N.º de UFC/ml em meio com 4x ou 8x a CIM}}$$

O nível de resistência das linhagens mutantes selecionadas foi confirmado através da técnica da diluição de concentrações seriadas da droga em Ágar (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS³⁷, 1998).

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos à distribuição percentual de linhagens sensíveis nas diferentes classes de sensibilidade foram analisados, estatisticamente, através do teste de Goodman^{38, 39} (1964, 1965) para a comparação das proporções obtidas entre as referidas classes.

3. Resultados

Os percentuais de sensibilidade antimicrobiana das linhagens, em estudo, distribuídos em quatro classes de CIM e CBM, acham-se expostos na tabela 3.

TABELA 3. Distribuição percentual de 74 linhagens de *Enterococcus faecalis* suscetíveis em quatro classes de Concentração Inibitória Mínima (CIM µg/ml) e Concentração Bactericida Mínima (CBM µg/ml).

DROGAS	CL1		CL2		CL3		CL4	
	0,06-1		2 - 4		8 - 32		3 64	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Vancomicina	73	6	0	5	1	9	0	54
	(99,6)	(8,1)	(0,0)	(6,7)	(1,4)	(12,2)	(0,0)	(73)
Ciprofloxacina	36	19	21	17	13	14	4	24
	(48,6)	(25,7)	(28,4)	(23)	(17,6)	(18,9)	(5,4)	(32,4)

CBM = Concentração Bactericida Mínima
 CIM = Concentração Inibitória Mínima
 CL1 = Classe de Concentração 1
 CL2 = Classe de Concentração 2
 CL3 = Classe de Concentração 3
 CL4 = Classe de Concentração 4

Em relação a Concentração Inibitória Mínima os resultados revelaram que a vancomicina apresentou uma ótima atividade antimicrobiana, inibindo 98,6% das linhagens na classe1 e apenas a linhagem S-3402/96 foi intermediária apresentando a CIM de 16 µg/ml. A ciprofloxacina apresentou atividade inibitória em todas as classes de

concentração, sendo mais representativa na classe 1 com 48,6% das linhagens estudadas.

Nossos resultados também mostraram que na Concentração Bactericida Mínima a vancomicina foi mais efetiva na classe 4, sendo bactericida para 73% das linhagens. Não houve diferenças estatísticas entre as quatro classes de concentração para a ciprofloxacina.

A relação entre a sensibilidade antimicrobiana, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) está representada na tabela 4.

TABELA 4. Suscetibilidade in vitro de 74 linhagens de *Enterococcus faecalis* em relação às respectivas CIMs e CBMs ($\mu\text{g/ml}$).

DROGAS	Variação					
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	50%	50%	90%	90%		
Vancomicina	0,55	>64	0,92	>64	0,25 - 6	0,5 - >64
Ciprofloxacina	0,96	6	14,7	>64	0,125 - >64	0,5 - >64

CIM_{50%} = Concentração Inibitória Mínima 50%
 CBM_{50%} = Concentração Bactericida Mínima 50%
 CIM_{90%} = Concentração Inibitória Mínima 90%
 CBM_{90%} = Concentração Bactericida Mínima 90%
 CBM = Concentração Bactericida Mínima
 CIM = Concentração Inibitória Mínima

Estes dados demonstraram que as drogas foram caracterizadas com CIM_{50%} baixa, a ciprofloxacina apresentou CIM_{90%} elevada. As duas drogas foram representadas com valores elevados na CBM_{90%} (> 64 µg/ml).

Os resultados da correlação CIM/CBM estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5. Distribuição de 74 linhagens de *Enterococcus faecalis* quanto à correlação CIM/CBM.

Nº (%) de linhagens indicando a relação CIM/CBM							
DROGAS	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Vancomicina	5	0	5	3	4	3	54
	(6,8)	(0,0)	(6,8)	(4)	(5,4)	(4)	(73)
Ciprofloxacina	30	8	6	4	0	2	24
	(40,6)	(10,8)	(8,1)	(5,4)	(0,0)	(2,7)	(32,4)

CBM = Concentração Bactericida Mínima

CIM = Concentração Inibitória Mínima

Os dados mostraram que a ciprofloxacina foi caracterizada com uma maior porcentagem de linhagens no índice 1:1, com 40,6% e a vancomicina no índice 1:64, com 73% das linhagens estudadas.

Na figura 1, acham-se representados os percentuais da frequência acumulada da sensibilidade de 74 linhagens de *Enterococcus faecalis*, em relação às Concentrações Inibitórias Mínimas das drogas estudadas. Observa-se que o melhor desempenho antimicrobiano foi da vancomicina, na qual 100% das amostras foram inibidas na concentração de 16µg/ml, enquanto que para a ciprofloxacina, o mesmo efeito ocorreu somente na concentração acima de 64µg/ml.

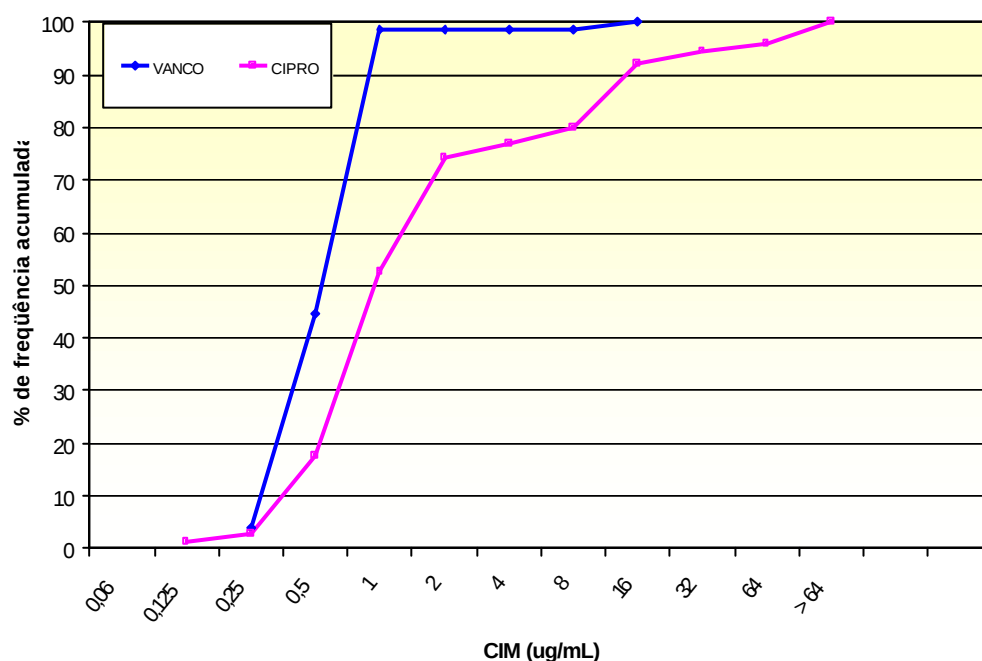


FIGURA 1. Percentuais de frequências acumuladas de sensibilidade de 74 linhagens de *Enterococcus faecalis* em relação às Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) da vancomicina e da ciprofloxacina.

Na figura 2, estão representados os percentuais de frequência acumulada da sensibilidade de 74 linhagens de *Enterococcus faecalis*, em relação às Concentrações Bactericidas Mínimas das drogas estudadas. Observa-se que ambas as drogas foram bactericidas para 100% das linhagens estudadas na concentração acima de 64 µg/ml. Entretanto, o melhor desempenho em termos populacionais foi o da ciprofloxacina, uma vez que este antimicrobiano foi mais efetivo, quando usado em menor concentração para a mesma porcentagem de linhagens estudadas.

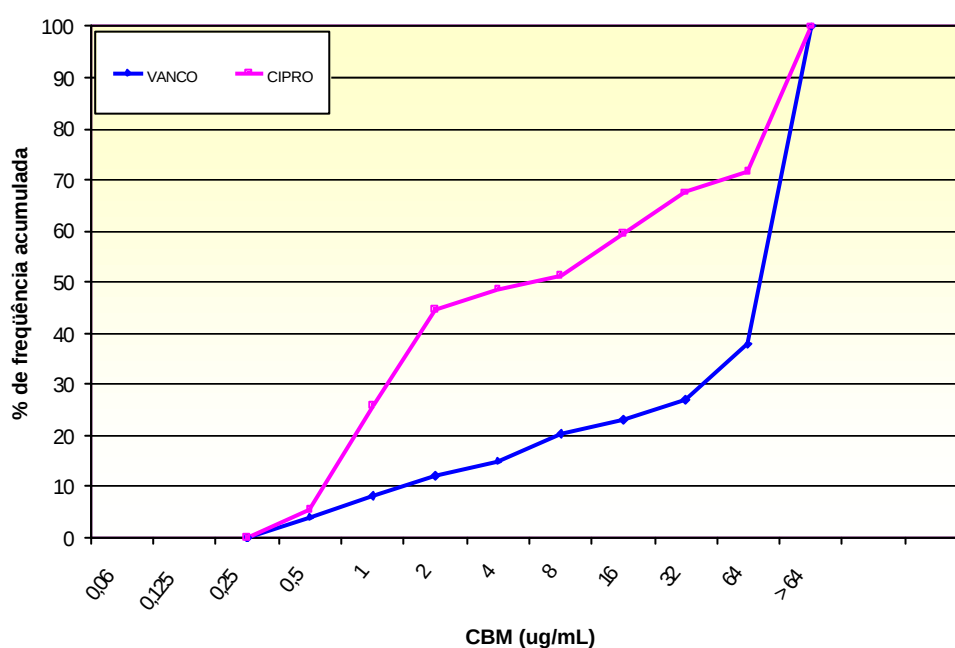


FIGURA 2. Percentuais de freqüências acumuladas de sensibilidade de 74 linhagens de *Enterococcus faecalis* em relação às Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) da vancomicina e da ciprofloxacina

A Figura 3 representa a comparação dos percentuais de sensibilidade entre as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e as Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) das 74 linhagens de *Enterococcus faecalis* frente às drogas estudadas. Nesta figura é possível observar que apenas 14,8% das linhagens estavam dentro do perfil de sensibilidade para a vancomicina e 25,7% para a ciprofloxacina.

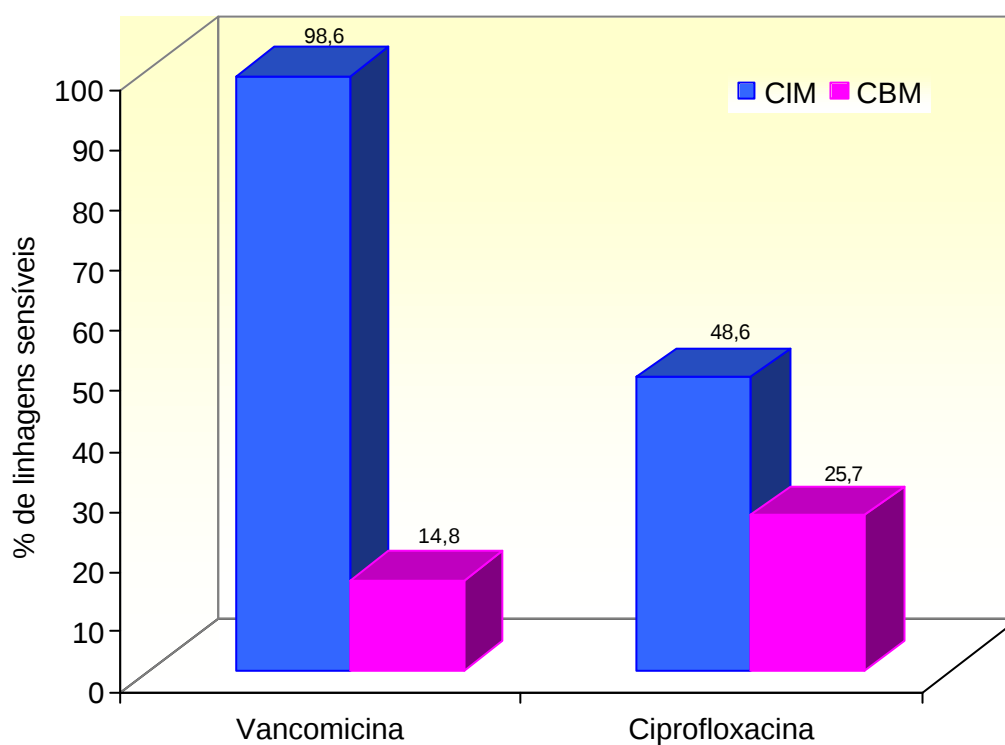


FIGURA 3. Comparação dos percentuais de sensibilidade entre as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e a Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) das 74 linhagens de *Enterococcus faecalis* frente à vancomicina e à ciprofloxacina.

Em relação ao teste para a determinação da Taxa de Mutação Espontânea a Ciprofloxacina, através da metodologia utilizada, não foi possível observar a emergência de linhagens mutantes.

4. Discussão

A emergência de resistência a antimicrobianos em bactérias tem sido considerada um problema sério à terapêutica de infecções em pacientes imunossuprimidos, principalmente quando envolve germes dotados de inúmeros fatores de virulência e de mecanismos genéticos para a aquisição desta característica. (Kadurugamuwa & Beveridge,⁴⁰ 1995; Levy,⁴¹ 1982)

Neste contexto, o estabelecimento de estratégias terapêuticas, que visem controlar ou mesmo impedir a disseminação da multi-resistência antimicrobiana entre patógenos oportunistas, constitui recurso indispensável à saúde pública. (Mendes & Sader,⁴² 1997). Programas de vigilância e de acompanhamento dos padrões de sensibilidade microbiana a drogas, realizados em centros de pesquisas e em universidades, têm objetivado a difusão de informações e de orientação técnica a clínicos e demais profissionais da área de saúde, quanto às restrições ao uso abusivo e indiscriminado de drogas de última geração e com amplo espectro de atividade. (Namias et al.⁴³, 1998)

Outro aspecto a considerar é o fato de que os clínicos, de um modo geral, somente dispõem dos resultados do antibiograma para o estabelecimento da estratégia terapêutica, não estando em questão, de um modo prático, a necessária correspondência da atividade “in vitro” da droga apresentada em discos, com sua apresentação na forma medicamentosa. (Martinez et al.⁴⁴, 1996; Suassuna,⁴⁵ 1985)

Nossos resultados sobre os percentuais de sensibilidade de linhagens de *Enterococcus faecalis*, através da determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas, permitiram-nos observar uma maior efetividade da vancomicina em relação à ciprofloxacina, uma vez que este

antimicrobiano conseguiu inibir 98,6% das linhagens estudadas em faixa de concentrações, que variaram entre 0,06 a 1 µg/ml. O mesmo não foi observado pela ciprofloxacina, onde a inibição por esta droga se caracterizou em todas as classes de CIM sendo, porém, mais representativa na classe 1, com 48,6% das linhagens. Em relação a esses aspectos, o mesmo foi observado por Eliopoulos et al.⁴⁶ (1985), que em um estudo realizado com bactérias Gram positivas, encontraram 48 linhagens de *E. faecalis* sensíveis à vancomicina com CIM_{50%} e CIM_{90%} iguais a 2 µg/ml.

Ainda em nosso estudo, caracterizamos uma linhagem (S-3402/96) com resistência intermediária à vancomicina (CIM de 16µg/ml), isolada de um paciente da cirurgia gástrica. Esta observação foi também evidenciada por outros autores (Vergis et al.⁴⁷, 2001; Sawicka-Grzelak et al.⁴⁸, 1999; Malik et al.⁴⁹, 1999; Christenson et al.⁵⁰, 1998). onde linhagens de *E. faecalis*, com resistência intermediária à vancomicina, foram isoladas de recém nascidos e de pacientes de outras enfermarias. Contudo, enfatizamos que estes resultados devem ser investigados com outras metodologias no intuito de se verificar se essa resistência intermediária se mantém ao longo do tempo.

Já, Venditti et al.⁵¹ (1993), investigando a suscetibilidade de linhagens de enterococos isoladas de hemoculturas e de processos infecciosos, encontraram resultados semelhantes aos nossos, pela observação de 75 linhagens de *E. faecalis* sensíveis à vancomicina, com CIM_{50%} e CIM_{90%} de 1 e 16µg/ml, respectivamente. No mesmo sentido, Martin et al.⁵² (2000) verificaram que todas as linhagens de *E. faecalis*, por eles estudadas eram suscetíveis à vancomicina.

A esse respeito encontramos na literatura poucas

referências que demonstraram a presença de linhagens de *E. faecalis* resistentes à vancomicina e à ciprofloxacina e, dentre estas, a de Johnson et al.⁵³ (1998) que encontraram entre 106 linhagens isoladas de pacientes com endocardite, seis resistentes à vancomicina (CIM $\geq$ 32 μ g/ml). Já as de Vergis et al.⁴⁷ (2001) referem-se a um estudo sobre bacteremia causada por enterococos, no qual foram encontradas 8 % de linhagens resistentes a ciprofloxacina.

Contudo, a emergência de resistência em *E. faecalis* às fluoroquinolonas tem sido relacionada ao incremento de uso destas drogas. (Tankovic et al.²⁸, 1996). Shaberg et al.²⁷ (1992) relataram que a resistência à ciprofloxacina obteve um aumento significativo entre as linhagens de *E. faecalis* nos períodos de 1985-1986 e de 1989-1990 e Tankovic et al.²⁸ (1996), encontraram 83% de linhagens de *E. faecalis*, resistentes à ciprofloxacina .

Nossos dados, quando confrontados aos da literatura, são discordantes pela caracterização de 48,6% das linhagens sensíveis à ciprofloxacina. A análise da sensibilidade antimicrobiana das linhagens de *Enterococcus faecalis*, estudadas através da determinação da Concentração Bactericida Mínima, demonstrou que a vancomicina apresenta atividade bactericida frente a 73% das linhagens em concentração igual ou superior a 64 μ g/ml. Em relação à ciprofloxacina, observou-se atividade bactericida em todas as classes de CBMs analisadas. Estes resultados, pela sua importância, principalmente no que diz respeito a vancomicina, são extremamente significativos pelo fato desta droga haver caracterizado efeito inibitório em conformidade com os dados da literatura e efeito bactericida somente em elevadas concentrações. Não obstante, seja tarefa difícil discutir esses resultados à luz da literatura, nossas observações são semelhantes às de Louie et al.⁵⁴

(1993) que, em um estudo para determinar a atividade inibitória e bactericida de alguns antimicrobianos para várias espécies de enterococos, concluíram que apesar das linhagens de *E. faecalis* apresentarem CIM₉₀ de 2µg/ml para a vancomicina, estas foram consideradas tolerantes a droga, devido às elevadas CBMs_{50%} e 90%.

Diante desses resultados, foi possível enfatizar uma necessária preocupação com o fato de a vancomicina apresentar uma indiscutível atividade de inibição bacteriana e não proporcionar na mesma qualidade, um efeito bactericida esperado. Esta situação, que merece ser investigada com maior profundidade, torna-se uma questão de particular interesse aos clínicos, os quais baseiam a estratégia terapêutica sobre os resultados normalmente oferecidos pelo teste da difusão da droga, a partir de discos impregnados. Nesse sentido, uma possível tolerância do microrganismo diante de uma droga antimicrobiana, acaba se constituindo em parâmetro dificilmente detectado pelos recursos usuais de avaliação clínica laboratorial e uma questão de saúde pública.

Apesar dos testes que determinam a atividade bactericida não serem recomendados na rotina laboratorial (Koneman et al.⁵⁵, 1997), alguns autores acreditam que estes testes poderiam ser realizados nos laboratórios clínicos, se seguissem uma técnica rigorosamente padronizada e com controles adequados. (Peterson & Shanholtzer⁵⁶, 1992).

É importante considerar que, em relação a vancomicina, aspectos relacionados com o tempo de incubação são determinantes nos resultados, uma vez que este antimicrobiano possui ação lenta na fase estacionária do crescimento da bactéria, sendo necessário uma reincubação e, também, a realização dos testes em duplicata para melhor

caracterizar a discrepância entre os resultados (Lance & Peterson⁵⁷, 2000). Este dado foi observado por Hacek et al.⁵⁸ (1999), que resolveram a discrepância dos resultados, reincubando os testes por mais 24 horas, obtendo, assim, 99% de reprodutibilidade, quando comparado com a primeira incubação, onde a mesma havia sido de 91% para os testes de MBC.

Segundo Koneman et al.⁵⁵ (1997), a discrepância entre os valores inibitórios e bactericidas pode ser encontrada, quando linhagens de estafilococos e enterococos são testados contra a vancomicina, fato este observado, também, em nosso trabalho.

No entanto, diante de nossos resultados não podemos descartar a possibilidade de algumas linhagens serem tolerantes à vancomicina. Em etapas futuras de nossa linha de investigação, examinaremos essa possibilidade com períodos de incubação mais prolongados e a realização dos testes em duplicata, seguindo as modificações sugeridas por Hacek et al.⁵⁸ (1999).

Com a não detecção de mutação das linhagens frente à ciprofloxacina, caracterizamos resultados discordantes com os de outros autores, entre eles Tankovic et al.²⁸ (1996) que, ao analisarem o papel da mutação do gene *gyrA* do DNA gyrase na resistência de *E. faecalis* pela ciprofloxacina, verificaram que seis linhagens apresentaram elevado nível de resistência à droga (CIM 32 a 64 µg/ml) e mutação na posição 83 do gene *gyrA*. Já Lopes et al.³⁶ (1993) demonstraram a mutação a ciprofloxacina em linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de abscessos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Através dos resultados alcançados, consideramos importante ressaltar que a avaliação da atividade antimicrobiana da vancomicina, em termos de atividade bactericida, deve ser investigada por outras metodologias que possam melhor elucidar a caracterização de linhagens possivelmente tolerantes à droga e que representem risco às estratégias terapêuticas de última instância.

5. Conclusões

1. Os resultados da sensibilidade antimicrobiana demonstraram um melhor desempenho da vancomicina em relação ao da ciprofloxacina, frente às linhagens de *E faecalis* estudadas.
 2. Ambas as drogas apresentaram CIM_{50%} baixa e CIM_{90%} elevada para a ciprofloxacina.
 3. As duas drogas apresentaram CBM_{90%} elevadas, com valores iguais ou superiores a 64µg/ml.
 4. A análise da correlação CIM/CBM caracterizou uma maior percentagem de linhagens com índice 1:1 para a ciprofloxacina (40,6%) e 1:64 para a vancomicina (73%).
 5. Não foi observada mutação das linhagens estudadas frente à ciprofloxacina.
-

6. Referências Bibliográficas*

1. Murray RR. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington: ASM; 1995.
2. Prasad A, Fraser AG. Prevention of infective endocardites: enthusiasm tempered by realism. Br J Hosp Med 1995; 54: 341-7.
3. Maki DG, Agger W. Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocardites and management. Medicina 1988; 67: 248-69.
4. Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. Resistência bacteriana a drogas. In: Trabulsi LR, Toledo MRF editors. Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 1999:p.105-15.
5. Bush LM, Calmon JC, Cherney CL, Wendelar M, Pitsakis P, Poupard J, et al. High- level penicillin resistance among isolates of enterococci. Implications for tretment of enterococcal infections. Ann Intern Med 1989; 110: 515-20.
6. Carrizosa J, Kaye D. Antibiotic synergism in enterococcal endocarditis. J Lab Clin Med 1976; 88: 132- 41.
7. Mandel GL, Lindsey E, Hook EW. Synergism of vancomycin and streptomycin for enterococci. Am J Med Sci 1970; 10: 335-40.
8. Watanakunakorn C. Penicillin combined with gentamicin or streptomycin synergism against enterococci. J Infect Dis 1971; 124:

* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. J Pediatr 1997; 73: 213-24.

581-6.

9. Sastry V, Brennan PJ, Levy MM. Vancomycin- resistant enterococci: na emerging pathogen in immunosuppressed transplant recipients. Transplant Proc 1995; 27: 954-5.
10. Cereda RF, Pignatari AC, Hashimoto A, Sader HS. In vitro antimicrobial activity against enterococci isolated in a university hospital in São Paulo, Brazil. Braz J Infect Dis 1997; 1: 83-90.
11. Lai KK, Fontecchio AS, Kelley AL. The epidemiology of fecal carriage of vancomycin - resistant enterococci. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18 (11): 762-5.
12. Gordts B, Landuyt H, Ieven M. Vancomycin resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. J Clin Microbiol 1995; 33: 2842-6.
13. Jones R.N. Disk diffusion susceptibility test development for the new glycyclcline, GAR-936. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 35: 249-52.
14. Von Baum H, Schehl J, Geiss HK, Schaefer F. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci among children with end-stage renal failure. Clin Infect Dis 1999; 29: 912-6.
15. Montelli AC, Sadatsune T. Sensibilidade dos germes prevalentes aos antimicrobianos. In: Montelli AC, editors. Elementos para a prática da

- antibioticoterapia racional. Botucatu: UNESP, 1995;p. 42-57.
- 16.Torfoss DAG, Aukrust P, Brinch L, Mathiesen O, Simonsen GS, Axelsen AK, et al. Carrier rate of resistant enterococci in a tertiary care hospital in Norway. Munksgaard Int Publ 1999; 107 (6): 545-9.
- 17.Hsieh SR. Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci. J Microbiol Immunol Infect 2000; 33(4): 253-7.
- 18.Zouain MG, Araj GF. Antimicrobial resistance of enterococci in Lebanon. Int J Antimicrob Agents 2001; 17(3): 209-13.
- 19.Hallgren A, Abednazari H, Ekdahl C, Hanberger H, Nilsson M, Samuelsson A, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. J Antimicrob Chemother 2001; 48(1): 53-62.
- 20.Leclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in enterococci.. Clin Infect Dis 1997; 24: 546-56.
- 21.Eliopoulos GM. Vancomycin- resistant enterococci. Infect Dis Clin North Am 1997; 11: 851-65.
- 22.Cereda RF, Sader HS, Jones RN, Sejas L, Machado AM, Zanatta YP, et al. *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and teicoplanin (VanA phenotype) isolated from a Bone Marrow transplanted patient in

- Brazil. Braz J Infect Dis 2000; 5(1): 40-6.
23. Oon LLE, Ling ML, Chiew YF. Gastrointestinal colonisation of vancomycin-resistant enterococcus in a Singapore teaching hospital. Pathology 2001; 33: 216-21.
24. Sahm DF, Koburov GT. In vitro activities of quinolones enterococci resistant to penicillin-aminoglycoside synergy. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 71-7.
25. Sato K, Hoshinok, Tanaka M, Hayakawa I, Osada Y. Antimicrobial activity of DU-6859, a new potent fluoroquinolone against clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1491-8.
26. Shalit L, Berger SA, Gorea A, Frimerman H. Widespread quinolone resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a general hospital. Antimicrob Agents Chemother 1989; 35: 593-4.
27. Shaberg DR, Dillon WL, Terpenning MS, Robinson KA, Bradley SF, Kauffman CA. Increasing resistance of enterococci to ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 2533-5.
28. 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: 2558-61.

29. Nakanishi N, Yoshida S, Wakebe H, Inoue M, Mitsuhashi. Mechanisms of clinical resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1053-9.
30. Kanematsu E, Deguchi T, Yasuda M, Kawamura T, Nishino Y, Kawada Y. Alterations in the GyrA subunit of DNA Gyrase and the ParC subunit of DNA Topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 433-5.
31. Korten V, Huang WM, Murray BE. Analysis by PCR and direct DNA sequencing of gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 2091-4.
32. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Ninth Informational Supplement M100-S9 NCCLS. Villanova ; 1999.
33. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7- A3. NCCLS. Villanova ; 1997.
-

-
34. Shanholtzer G.M, Wennersten C, Zigelboim – Daum S, Reiszner E, Goldmann D, Moellering RC. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemoter 1986; 32: 1528-32.
35. Petterson JE, Zervos MJ. High-level gentamicin resistance in enterococcus: microbiology, genetic basis, and epidemiology. Rev Infect Dis 1990; 12: 644-52.
36. Lopes CAM, Mendes RP, Curi PC, Watanabe DAS, Decarlis MST, Horácio A, et al. Evaluation of the in vitro susceptibility and emergence of mutants resistant to ciprofloxacin among multidrug resistant clinical isolates. Rev Latinoam Microbiol 1993; 35: 345-9.
37. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved Standard M2-A3. NCCLS. Villanova; 1998.
38. Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. Ann Math Stat 1964; 35(2): 716-25.
39. Goodman LA. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. Technometrics 1965; 7(2): 247-54.
-

40. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Virulence factor are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicina: Novel mechanism of enzyme secretion. J Bacteriol 1995; 177: 3998-4008.
41. Levy SB. Microbiol resistance to antibiotics- No envolveing and persistent problem. Lancet 1982; 83-8.
42. Mendes CMF, Sader HS. Importância do laboratório de microbiologia no apoio à investigação de surtos de infecção hospitalar. J Bras Patol 1997; 33: 203-12.
43. Namias N, Harvill S, Ball S, Mickenney MG, Salomone JP, Sleeman D, et al. Empiric therapy of sepsis in the surgical intensive care unit with broad- sprectrum antibiotic for 2 hours does not lead to the emergence of resistant bacteria. J Trauma 1998; 45: 887-91.
44. Martinez R, Gironi RHAR, Santos VR. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos usados na prática médica- Ribeirão Preto- SP 1994. Medicina (Ribeirão Preto) 1996; 29: 278-84.
45. Suassuna I. Testes de sensibilidade bacteriana aos antibióticos: o antibiograma. Rev Microbiol 1985; 16: 316-22.
-

46. Eliopoulos GM, Reiszner E, Moellering RCJR. *In vitro* activity of Sch 343443 against enterococci and other gram positive bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27: 28-32.
47. Vergis ENMD, Hayden MK, Chow JW, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, et al. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia: a prospective multicenter study. Ann Int Med 2001; 135(7): 484-92.
48. Sawika-Grzelak A, Rokosz A, Lucza KM. Drug resistance of 100 clinical strains of Enterococcus spp. Med Doswiadczalna Mikrobiol 1999; 51(3-4): 239-47.
49. Malik RK, Montecalvo MA, Reale MR, Li K, Man M, Moñoz JL, et al. Epidemiology and control of vancomycin-resistant enterococci in a regional neonatal intensive care unit. Pediatr Infect Dis J 1999; 18(4): 352-6.
50. Christenson JC, Korgenski EK, Jenkins ERN, Daly JA. Detection of vancomycin-resistant enterococci colonization in a children's hospital. Am J Infect Control 1998; 26(6): 569-71.
51. Venditti M, Yarasi A, Gelfusa V, Nicastrì E, Penni A, Martino P. Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from hospitalized patients. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1190-2.

52. Martin MG, De Miguel I, Cañas A, Sánchez AM. Resistance to antibiotics in clinical isolates of the genus *Enterococcus*. Rev Esp Quimioter 2000; 13(4): 412-6.
53. Johnson AP, Warner M, Woodford N, Speller DCE, Livernore DM. Antibiotic resistance among enterococci causing endocarditis in the UK: analysis of isolates referred to a reference laboratory. Br Med J 1998; 317: 629-30.
54. Louie A, Baltch AL, Ritz WJ, Smith RP, Asperilla M. Comparison of *in vitro* inhibitory and bactericidal activities of daptomycin (LY 146032) and four reference antibiotics, singly and in combination, against gentamicin- susceptible and high- gentamicin- resistant enterococci. Chemotherapy 1993; 39(5): 302-9.
55. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 50th ed. New York: Lippincott; 1997.
56. Peterson LR, Shanholtzer CJ. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. Clin Microbiol Rev 1992; 5(4): 420-32.
57. Lance R, Peterson MD, Susan M, Collins MT. Bactericidal testing for infectious disease therapy: the why and how to measure if we kill the bugs. Clin Microbiol News 2000; 22: 153-7.

58. Hacek DM, Dussel DC, Peterson LR. Highly reproducible bactericidal activity test results by using a modified national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution technique. J Clin Microbiol 1999; 37: 1881-4.
-