

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Incidência e Caracterização de Amostras de *Enterococcus* e  
*Staphylococcus saprophyticus* em Infecção Urinária Comunitária**

Luisa Barbosa Gomes da Silva dos Santos

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**Incidência e Caracterização de Amostras de *Enterococcus* e  
*Staphylococcus saprophyticus* em Infecção Urinária Comunitária**

**Luisa Barbosa Gomes da Silva dos Santos**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).**

**Orientadoras: Prof. Angela Christina Dias de Castro  
Prof. Beatriz Meurer Moreira**

**Rio de Janeiro  
Fevereiro, 2007**

# **Incidência e Caracterização de Amostras de *Enterococcus* e *Staphylococcus saprophyticus* em Infecção Urinária Comunitária**

**Luisa Barbosa Gomes da Silva dos Santos**

Orientadoras: Prof. Angela Christina Dias de Castro e Prof. Beatriz Meurer Moreira

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Microbiologia e Imunologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Aprovada por:

---

Presidente, Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, UFRJ

---

Prof. Márcia Giambiagi de Marval, UFRJ

---

Prof. Vânia Lúcia Carreira Merquior, UERJ

Rio de Janeiro  
Fevereiro, 2007

Santos, Luisa Barbosa Gomes da Silva.

Incidência e Caracterização de Amostras de *Enterococcus* e *Staphylococcus saprophyticus* em Infecção Urinária Comunitária/ Luisa Barbosa Gomes da Silva dos Santos.-Rio de Janeiro: UFRJ/ IMPPG, 2007.

ix, 81f.: il.; 1cm

Orientadoras: Angela Christina Dias de Castro e Beatriz Meurer Moreira

Dissertação (mestrado) - UFRJ/ IMPPG/ Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Imunologia, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 68-81.

1. Infecção Urinária. 2. *Staphylococcus saprophyticus*. 3. *Enterococcus*. 4. Resistência aos antimicrobianos. 5. Diversidade genética. I. Castro, Ângela Christina Dias. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes. III. Título.

A Deus, com toda a minha gratidão.

Aos meus pais, Mário e Mirtes e às minhas irmãs Flávia, Mariana e Daniela, cujos carinho e apoio têm sido constantes.

Ao meu marido Rafael, meu grande companheiro.

## AGRADECIMENTOS

---

À Prof<sup>a</sup> Angela Christina Dias de Castro pela orientação, atenção e todo o incentivo durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação.

À Prof<sup>a</sup> Beatriz Meurer por todas as boas idéias e apoio para a realização desta dissertação.

À Prof<sup>a</sup> Lúcia Teixeira pela colaboração nos estudos moleculares.

Ao Rubens Dias, pela ajuda na parte inicial do trabalho.

À amiga Renata Rabello, que não mediu esforços para me ensinar e ajudar em toda a parte molecular do estudo.

À Luiza Lessa, pela amizade e boa convivência.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia Molecular de Infecções Bacterianas, por toda a ajuda e pela boa convivência.

Às amigas Aline Uehara e Ana Carolina, pela amizade e apoio.

À Semiramis e ao Sr Luiz pelo apoio técnico.

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes representado pela atual diretora Prof<sup>a</sup> Agnes Marie e aos professores da Instituição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/PRONEX) pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

---

---

### Incidência e Caracterização de Amostras de *Enterococcus* e *Staphylococcus saprophyticus* em Infecção Urinária Comunitária

Luisa Barbosa Gomes da Silva dos Santos

Orientadoras: Angela Christina Dias de Castro e Beatriz Meurer Moreira

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

As infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as infecções mais comumente descritas em pacientes ambulatoriais, apresentando uma alta incidência global. O principal agente etiológico das ITUs é *Escherichia coli*. Dentre as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus* sp. destacam-se como os principais agentes de ITU. Os objetivos deste estudo foram avaliar a incidência e o perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de amostras de *S. saprophyticus* e *Enterococcus* causadores de infecção urinária na comunidade, bem como estudar a diversidade genética entre as amostras. Foram coletados 311 espécimes de urina de pacientes com suspeita de ITU de origem comunitária atendidos em serviços de pronto atendimento de dois hospitais do Rio de Janeiro. Dentre estes pacientes, 163, apresentaram urinocultura positiva. Foram selecionadas até cinco colônias de cada amostra destas espécies para a realização da identificação confirmatória através de testes fenotípicos, totalizando 178 colônias de *S. saprophyticus* e 81 de *Enterococcus*. Entretanto, através da realização de testes confirmatórios, 43 amostras (isoladas de 10 espécimes) não foram confirmadas como *S. saprophyticus*. A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada através do método de difusão em disco, e foi observado que 96,3% das amostras de *S. saprophyticus* apresentaram resistência à oxacilina, porém, apenas 74% apresentaram resistência à cefoxitina. Dentre as amostras de *Enterococcus*, 70% apresentaram resistência a pelo menos uma das quinolonas. Os testes de diluição em ágar para oxacilina confirmaram os resultados dos testes de disco difusão. As técnicas de RAPD-PCR e PFGE possibilitaram a observação de grande diversidade genotípica entre as amostras de *Enterococcus*, entretanto, duas, dentre as 18 amostras, apresentaram um perfil de bandas idêntico. Dentre as 27 amostras de *S. saprophyticus* estudadas, o PFGE permitiu a observação de três amostras com perfil de fragmentação idêntico. Os dados deste estudo confirmaram que *S. saprophyticus* é o segundo agente etiológico mais frequente de ITU comunitária. Deve-se restringir o uso de ciprofloxacina para o tratamento empírico de ITUs comunitárias causadas por *Enterococcus*. Mais de um clone pode estar envolvido em uma ITU comunitária.

Palavras-chave: infecção urinária, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus*, resistência aos antimicrobianos, diversidade genética.



## ABSTRACT

---

---

### Incidence and Characterization of *Enterococcus* and *Staphylococcus saprophyticus* Strains in Urinary Tract Infection

Luisa Barbosa Gomes da Silva dos Santos

Orientadoras: Angela Christina Dias de Castro e Beatriz Meurer Moreira

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

Urinary tract infections (UTIs) are among the most common infections described in outpatients, which presents a high global incidence. The main UTI etiologic agent is *Escherichia coli*. *Staphylococcus saprophyticus* and *Enterococcus* sp. are among the most common gram-positive UTI agents. The aims of the present study were to determine the incidence and the antimicrobial susceptibility profile of *S. saprophyticus* and *Enterococcus* isolates causing community-acquired UTI and to study the genetic diversity among these bacteria. A total of 311 urine specimens were collected from outpatients with community-acquired UTI from two hospitals in Rio de Janeiro. A hundred sixty three of them presented positive urine culture. Up to five colonies were selected from each isolate to test in separate for the confirmatory identification through phenotypic tests, adding up to 178 colonies of suspect *S. saprophyticus* and 81 colonies of *Enterococcus* sp. Confirmatory tests indicated that 43 colonies (isolated from 10 isolates) were not *S. saprophyticus*. The evaluation of susceptibility to antimicrobials was carried out by disc diffusion. About 96,3% of the *S. saprophyticus* strains presented resistance to oxacillin and 74% to cefoxitin. The majority (70%) of *Enterococcus* strains, presented resistance to at least one of the quinolones. The agar dilution test confirmed the oxacillin disc diffusion results. The RAPD-PCR and PFGE tests revealed a high genotypic diversity among the *Enterococcus* strains, but two of the 18 strains presented identical band profiles. PFGE revealed that three of the 27 *S. saprophyticus* strains had also identical band profiles. These results confirmed *S. saprophyticus* like the second most frequent etiologic agent of community UTI. It is necessary to restrict the use of ciprofloxacin to empiric treatment of community UTIs caused by *Enterococcus*. More than one clone can be involved in a community UTI.

Key-words: urinary infection, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus*, antimicrobial resistance, genetic diversity.

## SUMÁRIO

---

---

### Introdução

1. Infecções no Trato Urinário	1
2. <i>Staphylococcus</i> sp.	5
2.1. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6
3. <i>Enterococcus</i> sp.	13

Objetivos	19
-----------	----

### Material e Métodos

1. Coleta do Espécime Clínico	20
2. Processamento das Amostras	20
3. Identificação bacteriana	21
3.1 <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	21
3.2 <i>Enterococcus</i> sp.	24
4. Teste de Suscetibilidade aos Agentes Antimicrobianos	27
5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de oxacilina para <i>S.saprophyticus</i> .	29
6. Avaliação da Diversidade Genética	29
6.1 <i>Enterococcus</i> sp.	29
6.2 <i>S. saprophyticus</i>	32

### Resultados

1. Amostras Bacterianas	35
2. Identificação Bacteriana	36
3. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos	37
3.1 <i>S. saprophyticus</i>	37
3.2 <i>Enterococcus</i> sp.	38
4. Determinação da CMI da oxacilina para amostras de <i>S. saprophyticus</i>	38

5. RAPD-PCR para as amostras de <i>Enterococcus</i> _____	39
6. PFGE para as amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> _____	40
7. PFGE para as amostras de <i>S. saprophyticus</i> _____	40
<b>Tabelas</b> _____	42
<b>Figuras</b> _____	48
<b>Discussão</b>	
1. Ocorrência de ITUs comunitárias causadas por <i>S. saprophyticus</i> e espécies de <i>Enterococcus</i> _____	59
2. Identificação das amostras e diversidade de perfis bioquímicos _____	61
3. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos _____	62
4. Avaliação da diversidade genética através de RAPD-PCR e PFGE _____	65
<b>Conclusões</b> _____	67
<b>Referências Bibliográficas</b> _____	68

## INTRODUÇÃO

---

---

### 1. Infecções no Trato Urinário

As infecções no trato urinário (ITUs) estão entre as infecções mais comumente descritas em pacientes ambulatoriais e também em pacientes com infecções agudas ou crônicas em hospitais, apresentando uma incidência global estimada em 250 milhões de casos por ano (Foxman *et al* 2000; Ronald *et al*, 2001; Farrel *et al*, 2003).

Por definição, a ITU consiste na invasão microbiana de qualquer tecido do trato urinário, desde a uretra até os rins. As infecções da próstata e epidídimo também são, freqüentemente, incluídas nesta definição. As ITUs podem acometer somente o trato urinário inferior (uretra e bexiga) ou, simultaneamente, o trato urinário inferior e superior (rins) (Marangoni, Soares & Moreira, 2001; Lopes & Tavares, 2005).

Para fins terapêuticos, as ITUs podem ser classificadas como complicadas ou não-complicadas, com base na presença ou ausência de anormalidades no trato urinário. As complicadas consistem em infecções em pacientes que apresentam anormalidades estruturais no trato urinário, como cálculos e obstruções ou estejam fazendo uso de cateteres. As infecções em pacientes que não apresentam tais alterações são consideradas não-complicadas (Barza, 2002).

Na maioria das vezes, a bactéria atinge a bexiga, ureteres e rins por via ascendente, a partir da região perineal. Após a penetração da bactéria no trato urinário, poderá ocorrer infecção ou não, dependendo de fatores do microrganismo, tais como, a capacidade de aderir e invadir as células uroepiteliais e o tamanho do inóculo, assim como de mecanismos de defesa do hospedeiro, como as propriedades antibacterianas da urina e da mucosa do

trato urinário, do efeito mecânico da micção, da integridade anatômica e funcional das vias urinárias e da presença de cateter vesical (Marangoni, Soares & Moreira, 2001).

As ITUs representadas por bacteriúrias assintomáticas são caracterizadas pela ausência de sinais e sintomas urinários ou sistêmicos e não precisam ser tratadas, na maioria dos casos (Marangoni, Soares & Moreira, 2001; Barza, 2002). O tratamento é indicado apenas para gestantes, crianças em idade pré-escolar e para pacientes com anormalidade estrutural no trato urinário ou que serão submetidos à instrumentação do trato urinário. Nas infecções sintomáticas do trato urinário inferior (ITUIs), representadas por cistites agudas e síndromes uretrais, o principal sintoma é a disúria, mas outros sintomas podem ocorrer, tais como a urgência para urinar, o aumento da frequência, micção de pequenos volumes, incontinência, e dor suprapúbica ou pélvica. Nas mulheres, as ITUIs, freqüentemente, evoluem para pielonefrite e, no homem, podem provocar prostatite, epididimite e infecções seminais ou nos testículos. As infecções sintomáticas do trato urinário superior são representadas por pielonefrites, cujas manifestações clínicas clássicas são: febre, calafrios, dor abdominal ou lombar, mal-estar, mialgia e cefaléia. Alguns casos de pielonefrite aguda podem evoluir para formação de abscessos renais e sepse (Marangoni, Soares & Moreira, 2001; Barza, 2002).

As ITUs acometem, principalmente, mulheres, fato atribuído à menor distância percorrida pelo microrganismo invasor entre a uretra e a bexiga no sexo feminino, em relação ao sexo masculino. Além de apresentarem maior comprimento da uretra, os homens estão menos sujeitos às ITUs por apresentarem substâncias antimicrobianas no líquido prostático (Barza, 2002; Lopes & Tavares, 2005).

Dentre os principais fatores predisponentes para ITUs em mulheres adultas, destacam-se: o uso de diafragma como método contraceptivo, uso de espermicida, doenças

que dificultam o esvaziamento normal da bexiga, obstrução e instrumentação das vias urinárias, gravidez e condições higiênico-sanitárias precárias. Os fatores predisponentes para ITUs em homens adultos são, principalmente, a instrumentação das vias urinárias e a hiperplasia prostática (Schaeffer *et al*, 2001).

A recorrência das ITUs é comum em mulheres jovens, saudáveis, que normalmente apresentam trato urinário sem alterações fisiológicas e anatômicas. Os episódios de recorrência se devem, na maioria dos casos, à reinfecções, mas ocasionalmente podem ocorrer devido a um foco persistente de infecção (recidiva). Clinicamente, a recorrência é considerada reinfecção se for causada por uma cepa diferente daquela que causou o primeiro episódio de ITU e se ocorrer mais de duas semanas após o tratamento do mesmo, e é considerada recidiva se for causada pela mesma cepa do microrganismo que causou a ITU original e se ocorrer em até duas semanas após o tratamento (Hooton, 2001). Tem sido descrito que o principal fator de risco para ITU recorrente em mulheres na fase pré-menopausa é a relação sexual, além de outros fatores, como o uso de espermicida e o fato do primeiro episódio de ITU ter ocorrido antes dos 15 anos de idade (Scholes *et al*, 2000). Em mulheres na fase pós-menopausa, também é fator de risco a redução dos níveis de estrógeno, hormônio importante para preservar a função urinária intacta, através do estímulo à proliferação de lactobacilos no epitélio vaginal, redução do pH e prevenção da colonização por patógenos (Raz, 2001).

A etiologia microbiana das ITUs pode variar de acordo com o sexo, a idade, o uso prévio de antibióticos e aquisição dentro ou fora de hospital, porém, *Escherichia coli* tem sido relatada como principal patógeno causador de ITU, seguido por *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp, *Enterobacter* spp. e *Enterococcus* spp. Cerca de 80 % das ITUs comunitárias são causadas por *E. coli*, porém, este percentual diminui

quando as infecções são hospitalares, dependendo das condições clínicas dos pacientes internados, do uso de antibióticos e da presença de ITU recorrente. Nestes casos aumenta a ocorrência de infecções por outras bactérias entéricas, como *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Enterococcus faecalis* (Marangoni, Soares & Moreira, 2001; Ronald, 2002).

O desenvolvimento de resistência contra agentes antimicrobianos entre patógenos bacterianos representa uma preocupação em todo o mundo. A prevalência da resistência antimicrobiana das amostras de pacientes que apresentam ITU adquirida na comunidade tem aumentado, o que tem sido atribuído ao fato de que, na maioria dos casos, a terapia antimicrobiana é iniciada empiricamente, antes que o resultado da cultura de urina ou do teste de susceptibilidade estejam disponíveis (Farrel *et al*, 2003).

Em todo o mundo têm sido realizados estudos de avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos em amostras de pacientes com ITU adquirida na comunidade. Por exemplo, em um estudo realizado na Suécia que consiste em um levantamento da susceptibilidade aos antimicrobianos de patógenos isolados de mulheres com ITU não-complicada, provenientes de 16 países da Europa e do Canadá, foi observado que, dentre as 3278 amostras com resultado de urinocultura positiva, os patógenos mais isolados foram *E. coli* (77,0%), *P. mirabilis* (6,3%), *Klebsiella spp.* (3,1%), outras enterobactérias (3,9%), *S. saprophyticus* (3,6%) e outros patógenos (6,1%). Foram feitas comparações entre as taxas de resistência encontradas para cada antimicrobiano em cada país e concluiu-se que seria necessário reconsiderar o uso de alguns antimicrobianos como tratamento empírico para alguns países, uma vez que foram encontradas altas taxas de resistência (Kahlmeter, 2003).

No Brasil, existem poucos trabalhos publicados sobre ocorrência e prevalência de resistência aos antimicrobianos em pacientes com ITU. Gales e colaboradores, em 2000,

realizaram um estudo de vigilância da resistência de patógenos isolados de pacientes hospitalizados com ITU a 22 agentes antimicrobianos, durante três anos, em seis países da América Latina. Em 2001, Sader e colaboradores publicaram um resumo dos resultados obtidos neste programa de vigilância antimicrobiana em amostras de ITU hospitalar no Brasil. Apenas um estudo recente foi encontrado sobre ITU comunitária no Brasil. Este foi realizado com uma população de Salvador, para a qual foi descrita a resistência aos antimicrobianos em amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com ITU adquirida na comunidade. A prevalência da resistência encontrada entre as amostras foi de 51% para ampicilina, 43% para trimetoprim-sulfametoxazol, 41% para tetraciclina, 22% ao cloranfenicol e 12% para ciprofloxacina (Moreira *et al*, 2006).

Mais estudos sobre a frequência de patógenos e o monitoramento das taxas de resistência aos antimicrobianos são necessários para orientar o tratamento de ITUs comunitárias no Brasil.

## **2. *Staphylococcus sp.***

O gênero *Staphylococcus* é constituído por, pelo menos, 35 espécies e 17 subespécies. Os membros deste gênero são cocos Gram-positivos, arranjados em grupos que lembram “cachos de uva”, também podendo ser encontrados isolados ou aos pares, são imóveis, não-formadores de esporos, anaeróbios facultativos (com exceções) e normalmente produtores de catalase. Algumas espécies são produtoras de coagulase, o que divide os estafilococos em dois grupos: os coagulase-positivos e os coagulase-negativos (Bannerman, 2003).

Os estafilococos coagulase-negativos fazem parte da microbiota da pele e da mucosa urogenital e, por isso, até a década de 60, seu isolamento era considerado



contaminação (Ishihara *et al*, 2001). Em 1962, Pereira descreveu o isolamento de estafilococos coagulase-negativos resistentes à novobiocina de pacientes com bacteriúria. Mitchell, em 1968, isolou estes estafilococos coagulase-negativos resistentes à novobiocina de mulheres com ITU sintomática e os identificou como *Micrococcus* subgrupo 3. Estes microrganismos foram subseqüentemente reclassificados e renomeados como *Staphylococcus saprophyticus* em 1974 (Buchanan & Gibson, 1974).

### **2.1. *Staphylococcus saprophyticus***

*S. saprophyticus* são microrganismos catalase-positivos, coagulase negativos que apresentam diâmetro compreendido entre 0,5 a 1µm, são anaeróbios facultativos, produtores de urease e resistentes à novobiocina (Murray *et al*, 2004).

Vários testes podem ser realizados para a identificação de *S. saprophyticus*, diferenciando esta espécie dos outros estafilococos coagulase-negativos. De Paulis e colaboradores, em 2003, propuseram um esquema simplificado para a identificação das espécies de estafilococos coagulase-negativos clinicamente significantes (Tabela 1). Foi realizada uma comparação entre o esquema proposto e o método de referência de Kloos & Schleifer (1975) na identificação de 201 estafilococos coagulase-negativos. O esquema simplificado mostrou ótima correlação com o método de referência, demonstrando ser útil na identificação das espécies de estafilococos coagulase-negativos.

O trato gastrointestinal é o maior reservatório de *S. saprophyticus*, o qual pode ser facilmente introduzido na vagina e meato uretral e, então, colonizar o trato urogenital através da sua aderência às células epiteliais, mediada por hemaglutininas (Aas) (Gatermann, 1986). As Aas são proteínas de superfície, multifuncionais, capazes de

aglutinar hemácias de carneiro, que propiciam a colonização de *S.saprophyticus* devido à sua propriedade de adesina, favorecendo sua ligação à fibronectina das células uroepiteliais e por terem propriedades de autolisinas, que permitem a liberação de componentes de parede celular imunologicamente ativos e de toxinas (Hell, Meyer & Gatermann, 1998). A proteína de superfície Ssp, recentemente identificada como uma lipase, está presente em cerca de 98% das amostras clínicas de *S. saprophyticus* e parece estar envolvida na aderência bacteriana às células uroepiteliais, porém, os estudos realizados até o momento foram inconclusivos (Gatermann *et al*, 1992; Sakinc *et al*, 2005). Além disso, foi descrita recentemente a proteína SdrI, ancorada à parede celular, que tem propriedade de ligação ao colágeno e propriedades adesivas (Von Eiff, Peters & Heilmann, 2002; Sakinc, Kleine & Gatermann, 2006). A produção de urease também consiste em um importante fator de virulência de *S. saprophyticus*, uma vez que promove a hidrólise da uréia presente na urina, o que leva à liberação de amônia e CO<sub>2</sub>, aumentando o pH da urina, podendo levar à formação de cálculos na bexiga e nos rins (Fowler, 1985; Ronald, 2002). Kuroda e colaboradores, em 2005, fizeram o sequenciamento do genoma completo de *S. saprophyticus* (amostra padrão ATCC 15305) e uma análise comparativa com o genoma de outras duas espécies, *Staphylococcus aureus* (N315) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Os autores observaram que *S. saprophyticus* não possui nenhum dos fatores de virulência encontrados em *S. aureus*, tais como coagulase, exoenzimas, enterotoxinas e proteínas de ligação à matriz extracelular, porém apresenta um grande número de sistemas de transporte capazes de permitir sua adaptação no ambiente da urina, onde as concentrações iônicas são muito variáveis. Além disso, foi demonstrada a presença das hemaglutininas nas amostras de *S. saprophyticus* através de ensaios de aderência e hemaglutinação.

*S. saprophyticus* é o segundo agente causador mais freqüente de ITUs não complicadas em mulheres. As complicações mais graves incluem a pielonefrite aguda, septicemia, nefrolitíase e endocardite. A maioria das infecções por este microrganismo ocorre em mulheres jovens, sexualmente ativas, entretanto, podem ocasionar, não somente ITUs em homens de todas as idades, como também, uretrites, epididimites, prostatites e nefrolitíase (Raz, Colodner & Kunin, 2005).

As amostras de *S. saprophyticus* são, geralmente, sensíveis à maioria dos antimicrobianos ativos contra os cocos Gram-positivos (Stratton *et al*, 1990; Karlowsky *et al*, 2001).

Poucos estudos de avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados para amostras de *S. saprophyticus*. Dentre os já realizados, a maioria é do final da década de 70 e início da década de 80. Como exemplo, um estudo realizado na Suécia demonstrou que as 172 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de mulheres com ITU adquirida na comunidade foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados, apresentando apenas 2% das amostras resistentes à sulfonamida (Wallmark, Arremark & Telander, 1978). Em outro estudo realizado no Canadá, foi avaliada a susceptibilidade aos antimicrobianos em 115 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de mulheres com sintoma de ITU. As 115 amostras foram sensíveis à ampicilina, cefalexina e trimetoprim-sulfametoxazol e resistentes ao ácido nalidíxico e à novobiocina. A maioria das amostras foi resistente à nitrofurantoína e 13% foram resistentes à eritromicina (Marrie & Kwan, 1982). No mesmo ano, também no Canadá, foi realizado um outro estudo de avaliação da susceptibilidade de 34 amostras de *S. saprophyticus* a 15 antimicrobianos, comumente utilizados. Todas as amostras foram sensíveis ao trimetoprim, cefalotina, clindamicina, rifampicina e gentamicina e foram resistentes ao ácido nalidíxico; uma amostra foi

resistente à penicilina, cinco amostras apresentaram resistência à eritromicina, duas foram resistentes ao sulfametoxazol e duas foram resistentes à tetraciclina (Nicolle & Harding, 1982).

Os estudos mais recentes de avaliação da resistência aos antimicrobianos em amostras de *S. saprophyticus* incluem vários outros patógenos isolados de amostras de urina de pacientes com ITU ou são estudos sobre amostras de estafilococos coagulase-negativos, isoladas de diferentes espécimes clínicos. Como exemplo, a suscetibilidade antimicrobiana foi avaliada em um estudo com amostras bacterianas isoladas de ITU de mulheres atendidas no serviço de pronto atendimento de 202 diferentes hospitais nos Estados Unidos e verificou-se que 524 (9,1%) dentre as 5739 amostras isoladas foram identificadas como *S. saprophyticus*. Aproximadamente 3% dentre estas amostras apresentou resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol, 1% de resistência à cefalotina e 0,4% de resistência à ciprofloxacina (Karlowsky *et al*, 2001). Já em um outro estudo, mais recente, realizado em Gaza, foi observado que dentre 480 amostras isoladas de pacientes com ITU, apenas 18 (3,8%) foram identificadas como *S. saprophyticus*. Dentre as 18 amostras, 100% foram resistentes ao ácido nalidíxico, 75% apresentaram resistência à amoxicilina, 50% à gentamicina e amicacina e 25% à ciprofloxacina e nitrofurantoína (El Astal, 2005).

Desde a introdução da meticilina e de outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos resistentes à penicilinase na prática médica, em 1961, têm sido identificadas amostras de *Staphylococcus sp.* resistentes à meticilina. Os primeiros casos de resistência ocorreram em amostras de *S. aureus* em hospitais da Europa e, desde então, foram identificados em todo o mundo

amostras de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina (Chambers, 1997).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos atuam inibindo a atividade das proteínas de ligação à penicilina (PBPs), enzimas (transpeptidases) que catalisam as reações de ligação cruzada durante a síntese da parede celular bacteriana, ou seja, sua ligação às PBPs impede a síntese da parede celular (Hackbarth & Chambers, 1989). O mecanismo de resistência à meticilina em *S. saprophyticus*, assim como nas outras espécies de *Staphylococcus*, ocorre através da produção de uma PBP 2' ou PBP 2a, que possui baixa afinidade de ligação aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, possibilitando a síntese da parede celular, mesmo na presença de concentrações inibitórias do antimicrobiano (Stratton *et al*, 1990; Katayama, Ito & Hiramatsu, 2000). Estas PBPs 2' são codificadas pelo gene *mecA*, que está localizado em um elemento genético móvel, denominado SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome). O SCC*mec* se integra no cromossomo bacteriano através da atuação de recombinases, codificadas por dois genes presentes no cassete (*ccrA* e *ccrB*). Além destes genes, o SCC*mec* apresenta os genes *mecI* e *mecRI*, que regulam a transcrição do *mecA* (Hiramatsu, 1995; Chambers, 1997; Ito, Katayama & Hiramatsu, 1999).

Estudos realizados a fim de verificar a correlação entre a detecção da resistência de amostras de *S. saprophyticus* à oxacilina através de testes de suscetibilidade por diferentes métodos (disco-difusão, triagem e diluição em ágar) e a presença do gene *mecA*, detectada através de PCR, demonstraram que em muitas amostras consideradas como resistentes através dos testes de disco difusão e diluição em ágar, não foi detectada a presença do gene *mecA*. Somente o teste de triagem em ágar Mueller-Hinton contendo 6  $\mu\text{g/mL}$  de oxacilina

demonstrou ter uma boa correlação com a presença ou ausência do *mecA* (York *et al*, 1996; Hussain *et al*, 2000; Ramotar, Woods & Toye, 2001; Ferreira *et al*, 2003).

Recentemente, o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) modificou a recomendação de realização de teste de disco-difusão utilizando discos de 1 µg de oxacilina para detectar a resistência à oxacilina mediada por *mecA* para os estafilococos coagulase-negativos, passando a recomendar o teste de disco-difusão com discos de 30 µg de cefoxitina (CLSI, 2005). Segundo o CLSI (2005), os critérios interpretativos para a oxacilina estariam superestimando a resistência para alguns estafilococos coagulase-negativos, como os *S. saprophyticus*, e o teste de susceptibilidade à oxacilina utilizando disco de cefoxitina possui especificidade maior e sensibilidade equivalente ao teste realizado com disco de oxacilina. Em um estudo realizado no Japão, 101 amostras de *S. saprophyticus* foram avaliadas quanto à susceptibilidade à oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg) através da técnica de disco-difusão e da diluição em ágar e submetidas à hibridização (dot-blot) e à PCR para a detecção de amostras *mecA* positivas. Dentre as 101 amostras, 8 foram *mecA* positivas e 93 *mecA* negativas, sendo que todas as amostras, inclusive as 93 *mecA* negativas, foram resistentes à oxacilina segundo os critérios de interpretação do CLSI, tanto no teste de disco difusão (diâmetro  $\leq 16$  mm) quanto no teste de diluição em ágar (CMI  $\geq 0,5$  µg/mL). Já no teste de disco-difusão com a cefoxitina, apenas 4 amostras *mecA* negativas foram falso-positivas na detecção da resistência à oxacilina. Concluiu-se, então, que o uso da cefoxitina é uma alternativa adequada para a detecção de resistência mediada por *mecA* (Higashide *et al*, 2006).

A diversidade genética entre amostras de estafilococos coagulase-negativos isoladas de diferentes fontes de infecção tem sido avaliada através da técnica de eletroforese de

campo pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE) (Snopkova *et al*, 1994; Lang *et al*, 1999; Shittu *et al*, 2006).

Um exemplo da aplicação desta técnica pode ser demonstrado em um estudo no Brasil. A técnica de PFGE foi utilizada para avaliar a diversidade genética entre amostras de *S.epidermidis* resistentes à mupirocina. Entre as 21 amostras analisadas, foram observados 6 diferentes perfis (A, B, C, D, E e F) e 80,9% destas amostras pertenciam a 1 dentre 2 perfis (A ou B), que mostraram, através de outros estudos, ser prevalentes em hospitais da região onde foi realizado o estudo (Ferreira *et al*, 2002).

Curiosamente, alguns estudos demonstraram que a colonização e a infecção por amostras de estafilococos coagulase-positivos e coagulase-negativos podem ser policlonais. Nestes estudos, foi avaliada a clonalidade através da PFGE, não somente entre as diferentes amostras, mas também entre diferentes colônias isoladas da placa de isolamento primário de um determinado espécime clínico de um mesmo indivíduo e, foi demonstrada a coexistência de múltiplas cepas envolvidas na colonização ou infecção de um indivíduo, observada através da variação genotípica entre as diferentes colônias isoladas de um indivíduo. Alguns destes estudos fizeram correlação entre esta variação genotípica e a variação fenotípica encontrada entre as diferentes colônias nos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. (Rijnders *et al*, 2001; Sharma *et al*, 2001; Cespedes *et al*, 2005). Por exemplo, em um estudo com 15 amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemocultura de um paciente com endocardite, foram examinadas três colônias de cada placa de isolamento primário. Após testes para identificação bioquímica, foram realizados testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e análises da variação genotípica através das técnicas macrorestrição do DNA e da AFLP (Amplified Fragment-Lenght Polymorphism) para cada colônia. Foi observada pouca variação nos resultados do teste de susceptibilidade, porém,

através das técnicas moleculares, foram encontrados 4 diferentes perfis de bandas, representando 4 diferentes clones. A observação de similaridade > 90% sugere que estes clones provavelmente se originaram a partir de uma amostra ancestral comum, causadora de infecção. Concluiu-se, então, que podem ocorrer mudanças genéticas no decorrer de um processo infeccioso, que podem eventualmente ocasionar variações fenotípicas entre as amostras (Van Eldere *et al*, 2000).

### **3. *Enterococcus* sp.**

Os enterococos foram, por muitos anos, pertencentes ao gênero *Streptococcus* e eram classificados como estreptococos do grupo D por apresentarem o antígeno de parede celular do grupo D, segundo o sistema de grupagem sorológica de Lancefield (Lancefield, 1933). Os estreptococos do grupo D eram divididos em dois grupos: os enterococos (que incluíam as espécies *S. faecalis* e *S. faecium*) e os não-enterococos, representados pela espécie *S. bovis* (Kaye, 1982). Em 1970, Kalina propôs a transferência das espécies do grupo enterococos para um novo gênero, *Enterococcus*, porém, a proposta não foi amplamente aceita. Em 1984, baseando-se em experimentos de hibridização DNA-DNA e DNA-RNA, Schleifer e Kilpper-Baltz demonstraram que as espécies *S. faecalis* e *S. faecium* apresentavam graus de homologia muito baixos com a espécie *S. bovis* e com outras espécies de estreptococos, sendo novamente proposta a transferência destas espécies para o gênero *Enterococcus*. A partir de então, outras espécies foram transferidas para este gênero. Atualmente, o gênero *Enterococcus* é constituído por 21 espécies (Teixeira & Facklam, 2003).



Os enterococos são cocos Gram-positivos, normalmente arranados aos pares ou formando pequenas cadeias, catalase-negativos, não-formadores de esporos, anaeróbios facultativos, podendo ser móveis ou imóveis. São capazes de crescer na presença de alta concentração de NaCl (6,5%) e são capazes de hidrolisar a esculina na presença de 40% de sais biliares. Além de testes como a prova da catalase, da bile esculina e do crescimento em 6,5% de NaCl, os testes para a verificação da produção das enzimas pirrolidonil arilamidase (PYRase) e leucina aminopeptidase (LAPase) também são úteis para a identificação do gênero *Enterococcus* (Teixeira & Facklam, 2003).

As espécies de enterococos são separadas em 5 diferentes grupos fisiológicos com base na produção de ácido a partir da utilização do manitol e sorbose e na hidrólise da arginina. Para a diferenciação entre as espécies de cada grupo, é necessária a realização de testes fenotípicos adicionais, tais como utilização de outros açúcares, utilização do piruvato, motilidade e produção de pigmentos, como mostrado na Tabela 2 (Teixeira e Facklam, 2003).

Os enterococos podem ser encontrados em diferentes ambientes, como, solo, água, alimentos, plantas e animais. Nos seres humanos, assim como nos outros animais, o trato gastrointestinal é o principal reservatório dos enterococos, porém, estes microrganismos também podem ser encontrados, no trato geniturinário e cavidade oral (Morrison, Woodford & Cookson, 1997).

A distribuição das diferentes espécies de enterococos varia de acordo com o hospedeiro, podendo ser influenciada pela idade, dieta e outros fatores relacionados a mudanças nas condições fisiológicas, como a utilização de antimicrobianos. A espécie *E. faecalis* é a mais comumente isolada a partir de espécimes clínicos, sendo responsável por 80 a 90% das infecções causadas pelos enterococos, seguida por outras espécies, tais como,

*E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. raffinosus*, variando sua incidência de acordo com a região geográfica em que as amostras são isoladas (Murray, 1990; Teixeira & Facklam, 2003).

Os enterococos apresentam um potencial limitado para produzir doença, devido aos raros fatores de virulência expressos por estes microrganismos. Apesar disto, são capazes de causar sérias doenças, através de uma combinação entre os fatores de sobrevivência que apresentam e que aumentam seu potencial de agressão (Murray *et al*, 2004). Dentre os fatores reconhecidos, a produção de citolisina é um dos mais estudados. Esta toxina é capaz de lisar eritrócitos de seres humanos e de outros animais, além de apresentar atividade de bacteriocina, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas, o que facilita sua colonização. Um estudo recente demonstrou que a citolisina, produzida por amostras citolíticas de *E. faecalis* contribui para a virulência em modelo de endoftalmite em coelhos (Engelbert *et al*, 2004), confirmando os achados de estudos prévios (Chow *et al*, 1993; Garsin *et al*, 2001). Outros fatores que podem ser encontrados em *Enterococcus* sp., tais como substâncias de agregação, cuja produção é estimulada pela liberação de feromônios de uma célula receptora para uma doadora, o que facilita a troca de plasmídeos entre células; as adesinas glicídicas, que medeiam a ligação às células do hospedeiro e a gelatinase, que hidrolisa gelatina, colágeno e outros peptídeos pequenos, também têm sido associados ao potencial de agressão destes microrganismos (Murray, 1998; Murray *et al*, 2004).

Dentre as principais infecções causadas por *Enterococcus* sp., destacam-se as ITUs, bacteremias, infecções intra-abdominais e endocardites (Hancock & Gilmore, 2000). As ITUs são as infecções mais comumente associadas a estes microrganismos, que estão envolvidos em cerca de 10% de todas as ITUs, incluindo as hospitalares e as adquiridas na comunidade (Felmingham *et al*, 1992).

Os enterococos apresentam uma característica importante de resistência intrínseca a vários antimicrobianos comumente utilizados, como as cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol, além de exibirem uma grande capacidade de adquirir resistência por mutação ou por aquisição de material genético através de plasmídeos ou transposons (Clevel, 1990; Cetinkaya, Falk & Mayhall, 2000).

Grande parte das infecções causadas por *Enterococcus* sp. pode ser tratada com penicilina ou ampicilina, com atividade bacteriostática, porém, o tratamento de infecções graves exige a utilização de um esquema antimicrobiano bactericida, através da combinação de um beta-lactâmico ou glicopeptídeo com um aminoglicosídeo. O aumento observado na resistência a altos níveis de aminoglicosídeos tem ocasionado a perda da sinergia e atividade bactericida entre estes agentes antimicrobianos, além da resistência adicional a antibióticos não- $\beta$ -lactâmicos, como ciprofloxacina, tetraciclina e cloranfenicol. Isto tem se tornado um sério problema relacionado ao tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (Murray, 1999).

A resistência adquirida aos aminoglicosídeos pode ocorrer por dois mecanismos: alteração no alvo ribossomal, decorrente de mutações cromossômicas, ou por inativação enzimática realizada por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, mediada por genes localizados em plasmídeos e transposons (Leclercq, 1997).

Dados alarmantes foram revelados em um estudo realizado no Brasil, no qual a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi determinada em 601 amostras de *Enterococcus* isoladas de diferentes fontes clínicas e amostras intestinais de pacientes ambulatoriais e internados em dois hospitais. Foi observada uma alta taxa de resistência a

altos níveis de aminoglicosídeos (high-level resistance to aminoglycosides – HLR-A). A prevalência de HLR – A foi de 52,2% dentre as 253 amostras clínicas, e de 40,5% dentre as 348 amostras intestinais (Mondino *et al*, 2003).

Os primeiros relatos de resistência à vancomicina em amostras de enterococos ocorreram no final da década de 80, após 35 anos da sua utilização. A partir de então, foram descritos vários relatos de amostras de enterococos resistentes à vancomicina em diferentes países (Sahm *et al*, 1989; Bingen *et al*, 1991; Boyce *et al*, 1994; Dunne & Wang, 1997; Pegues *et al*, 1997; Bruinsna *et al*, 2002; Freitas *et al*, 2006).

Na Espanha, em 2004, Aznar e colaboradores fizeram o relato de um caso de infecção no trato urinário adquirida na comunidade causada por uma amostra de *E. faecalis* resistente à vancomicina. A avaliação da susceptibilidade da amostra à vancomicina foi realizada através das técnicas de disco-difusão, E-teste e microdiluição em caldo, confirmando a resistência da amostra a este antimicrobiano. Entretanto, ainda há poucos trabalhos publicados no mundo com relatos de infecções adquiridas na comunidade causadas por enterococos resistentes à vancomicina.

Daza, Gutiérrez & Piérdola, em 2001, avaliaram a susceptibilidade de amostras isoladas de pacientes com ITU adquirida na comunidade e dentre as 2798 urinoculturas positivas, 185 (6,6%) foram identificadas como *E. faecalis*. Dentre as 185 amostras, 4% apresentaram resistência à vancomicina e teicoplanina, 13% à penicilina e 24% a altos níveis de estreptomicina.

Vários estudos têm sido realizados, com a utilização de diferentes metodologias, a fim de avaliar a diversidade genética entre amostras de enterococos. Uma das técnicas que tem sido realizada é a “Random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction” (RAPD-PCR), que consiste no uso de um ou mais iniciadores pequenos (~10-

15pb) escolhidos arbitrariamente para amplificar o DNA genômico sob baixas condições de estringência. Esta técnica é considerada uma boa ferramenta para a tipagem molecular devido à sua simplicidade, sensibilidade e custo relativamente baixo (Welsh & McClelland, 1990). Issack, Power e French, em 1996, realizaram a tipagem de 122 amostras de *E. faecium* causadoras de um surto, através da RAPD-PCR e como resultado, obtiveram nove diferentes tipos através da utilização de um único iniciador e, portanto, concluíram que a RAPD-PCR foi útil na investigação da epidemiologia das amostras. Outras técnicas, como o “Multilocus Sequence Typing” (MLST) e o PFGE, também têm sido utilizadas em muitos estudos recentes de tipagem de enterococos. Em um destes estudos foi realizada uma comparação entre estas duas metodologias, quanto ao seu poder discriminatório, com 22 amostras de *E. faecalis*. Foi observado que o MLST gerou tipos (“sequence types”) comparáveis aos tipos encontrados através do PFGE e foi demonstrado que tanto uma técnica quanto outra foram úteis na diferenciação dos *E. faecalis* (Nallapareddy *et al*, 2002).

Desta forma, o presente estudo foi desenhado para descrever aspectos fisiológicos, da susceptibilidade aos antimicrobianos e da diversidade genética entre amostras obtidas de casos de ITU em pacientes da cidade do Rio de Janeiro.

## **OBJETIVOS**

---

---

- ✓ Determinar a incidência de *S. saprophyticus* e *Enterococcus* causadores de ITU adquiridas na comunidade em pacientes na cidade do Rio de Janeiro.

- ✓ Verificar a variabilidade fenotípica entre as amostras de *S. saprophyticus* e *Enterococcus* e entre cinco colônias isoladas de cada uma das espécies isoladas de cada espécime clínico.
- ✓ Avaliar o perfil de susceptibilidade das amostras bacterianas aos agentes antimicrobianos.
- ✓ Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) da oxacilina para as amostras de *S. saprophyticus*.
- ✓ Verificar a diversidade genotípica entre as amostras de *S. saprophyticus* e entre as amostras de *Enterococcus*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

### **1. Coleta do Espécime Clínico**

Foram coletadas amostras de urina de 311 pacientes atendidos nos serviços de pronto atendimento do Hospital Municipal Miguel Couto e Hospital São Lucas com

suspeita de infecção do trato urinário de origem comunitária, no período de março a novembro de 2005, como parte de uma linha de pesquisa dos Laboratórios de Patogênese e Resistência em Cocos Gram-positivos e de Epidemiologia Molecular de Infecções Bacterianas. O presente estudo se restringiu à análise das amostras de cocos Gram-positivos obtidos nessa linha.

## **2. Processamento das Amostras**

As amostras de urina foram semeadas com a utilização de alça bacteriológica estéril (10µL) em meio CLED (Merck) e incubadas à 37°C por 48h. Após o período de incubação foi observada a morfologia das colônias e, a seguir, realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). A cultura foi considerada positiva quando apresentou um número maior que  $10^3$  UFC/mL de urina (Hooton, 2003). Uma colônia de cada cultura positiva foi semeada em uma placa de TSA para a realização da identificação presuntiva das amostras (Figura 1). A partir das placas das amostras que foram identificadas presuntivamente como *S. saprophyticus* e *Enterococcus* sp., foram selecionadas cinco colônias, as quais foram semeadas, separadamente, em uma placa de ágar sangue para a posterior confirmação da identificação.

## **3. Identificação bacteriana**

As amostras bacterianas, incluindo cada uma das cinco colônias de cada amostra, foram submetidas à coloração de Gram e os cocos Gram positivos foram submetidos à



prova da catalase. Os cocos Gram positivos catalase-positivos foram submetidos às provas da coagulase livre, resistência à novobiocina, produção de urease, hidrólise do L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR), utilização dos carboidratos manose e trealose e descarboxilação da ornitina. Já os cocos Gram positivos catalase-negativos foram submetidos aos testes de hidrólise do PYR e da L-leucina- $\beta$ -naftilamida (LAP), crescimento em 6,5% de NaCl, hidrólise da esculina na presença de bile, hidrólise da arginina, utilização do piruvato de sódio, utilização dos carboidratos arabinose, manitol, metil-glicopiranosídeo, sacarose, sorbitol, sorbose e rafinose, e aos testes de motilidade e pigmentação (Figura 2).

Após a identificação, as amostras foram estocadas em tubos contendo leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% (p/v) adicionado de glicerol a 10% (v/v), em freezer à – 20°C.

### **3.1 *Staphylococcus saprophyticus***

A identificação de *S. saprophyticus* foi realizada seguindo o esquema proposto por De Paulis e colaboradores (2003) como mostrado na Tabela 1. A metodologia foi realizada segundo Bannerman (2003).

#### **3.1.1 Identificação ao Nível de Gênero**

##### **3.1.1.1 Prova da catalase**

A produção da enzima catalase foi verificada através da aplicação de uma gota de peróxido de hidrogênio à 3% (v/v), a qual foi adicionada de uma colônia bacteriana sobre uma lâmina de microscopia. A formação de bolhas sobre a lâmina indicou as amostras

produtoras da enzima. Foi utilizada como controle positivo a amostra *S. aureus* ATCC 25923 e, como controle negativo, a amostra de *E. faecalis* 29212 .

### 3.1.1.2 Prova da coagulase livre

Algumas colônias isoladas foram repicadas para tubos contendo 0,5 mL de plasma de coelho. Após o período de incubação de 4 horas à 35°C a leitura foi realizada. A observação da formação de um coágulo indicou a produção da enzima. Os tubos que não apresentaram formação de coágulo no período de 4 horas foram incubados por mais 20 horas e, após este período, os tubos que não apresentaram formação do coágulo foram considerados negativos. Como controle positivo foi utilizada a amostra *S. aureus* ATCC 25923 e como controle negativo a amostra *S. epidermidis* ATCC 12228.

### 3.1.2 Identificação ao Nível de Espécie

#### 3.1.2.1 Resistência à novobiocina

As amostras bacterianas foram suspensas em salina (0,85% p/v) e, com a utilização de um “swab” estéril, foram inoculadas em uma placa de ágar Müller-Hinton em três direções diferentes, a fim de se obter um crescimento bacteriano confluyente. A seguir, um disco de novobiocina (5µg) foi colocado na placa. Após um período de incubação de 24 horas à 35°C a leitura foi realizada através da medida do halo de inibição do crescimento bacteriano. As amostras que apresentaram halo de inibição  $\leq 16$ mm foram consideradas resistentes à novobiocina. Como controle positivo foi utilizada a amostra de *S.*

*saprophyticus* ATCC 15305 e, como controle negativo a amostra de *S. aureus* ATCC 29213.

#### 3.1.2.2 Produção de urease

As amostras foram suspensas em salina (0,85% p/v) e, em seguida, foram inoculadas duas gotas da suspensão em 3 mL de caldo uréia. Após o período de incubação de 48 horas à 35°C a leitura foi realizada. A observação de uma mudança na coloração do meio, de amarelo para rosa, indicou a presença da enzima. Como controle positivo foi utilizada a amostra de *S. saprophyticus* ATCC 15305 e como controle negativo a amostra de *S. aureus* ATCC 29213.

#### 3.1.2.3 Hidrólise do PYR

As amostras foram suspensas em 0,2 mL de caldo Tood-Hewitt Broth (THB, Difco Laboratories-USA) contendo 0,01% de L-pirroglutamil- $\beta$ -naftilamina e, a seguir, incubadas por 4 horas à 35°C. Após a adição da solução reveladora contendo dimetilaminocinamaldeído a 1% (p/v) em HCl a 10% (v/v), o aparecimento da coloração rosa ou púrpura no meio em até 10 minutos foi indicativo de reação positiva. Como controle positivo foi utilizada a amostra de *Staphylococcus simulans* ATCC 27851 e como controle negativo a amostra de *S. saprophyticus* ATCC 15305.

#### 3.1.2.4 Utilização de carboidratos

As amostras foram inoculadas em caldo vermelho de fenol (Isofar) (pH 7,4) contendo 1% de cada um dos açúcares manose e trealose. O período de incubação foi de 72 horas à 35°C e as leituras realizadas com 24, 48 e 72 horas. A mudança na coloração do

meio de vermelho para amarelo indicou produção de ácido pela utilização do açúcar. Para a utilização da manose, foi utilizada como controle positivo a amostra de *S. aureus* ATCC 29213 e como controle negativo a amostra de *S. saprophyticus* ATCC 15305 e para a utilização da trealose foi utilizada como controle positivo a amostra de *S. saprophyticus* ATCC 15305 e como controle negativo uma amostra de coleção de *Morganella morganni*.

#### 3.1.2.5 Descarboxilação da ornitina

A atividade da enzima ornitina descarboxilase foi verificada em meio Descarboxylase Base Möeller (Difco) acrescido de 1% (p/v) de L-ornitina. Em seguida, o meio foi ajustado para pH 6,0 com a utilização de hidróxido de sódio 1N, antes da esterilização. Após o preparo de suspensão densa da amostra, foram inoculadas duas gotas da suspensão no meio e, a seguir, foram adicionadas ao tubo algumas gotas de óleo mineral estéril e, então, a amostra foi incubada durante 7 dias à 37°C. O aparecimento de coloração púrpura no meio, após o período de incubação, indicou reação positiva demonstrando a alcalinização do meio devido à descarboxilação da ornitina com formação de produtos básicos. O aparecimento de cor amarela indicou reação negativa devido à acidificação do meio pelo consumo de glicose. Como controle positivo foi utilizada uma amostra de coleção de *Morganella morganni* e como controle negativo, uma amostra de *S. saprophyticus* ATCC 15305.

### **3.2 *Enterococcus* sp.**

A identificação de enterococos foi realizada, tanto ao nível de gênero quanto ao nível de espécie, segundo Facklam & Collins (1989) e Teixeira & Facklam (2003).

### 3.2.1 Identificação ao Nível de Gênero

Para as provas de identificação ao nível de gênero foi utilizada como controle positivo a amostra *E. faecalis* ATCC 29212 e como controle negativo a amostra de *S. aureus* ATCC 29213.

#### 3.2.1.1 Prova da catalase

Idem ao item 3.1.1.1.

#### 3.2.1.2 Hidrólise da esculina na presença de bile

Após semear as amostras em Ágar Bile Esculina (Difco) inclinado em tubo, as mesmas foram incubadas por 18-24 horas à 37°C. O escurecimento do meio indicou a hidrólise da esculina em esculetina na presença de alta concentração de bile (40%).

#### 3.2.1.3 Crescimento em 6,5% de cloreto de sódio

A capacidade de tolerância a altas concentrações de sal foi verificada pelo crescimento bacteriano em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid-England) acrescido de 6,5% (p/v) de cloreto de sódio e o indicador de pH púrpura de bromocresol a 1,6% (p/v). Foi aplicada no meio uma gota de uma suspensão pouco densa da amostra, sendo realizada uma incubação por um período de 7 dias. A turvação do meio acompanhada ou não da mudança na coloração do meio de púrpura para amarelo indicou reação positiva.

#### 3.2.1.4 Hidrólise do PYR e do LAP

Foi preparada uma suspensão densa das amostras em salina (0,85% p/v) e, a seguir, foram adicionadas duas gotas da suspensão no caldo THB contendo 0,01% de PYR ou 0,02% de LAP. A leitura foi realizada após 4 horas de incubação à 37°C com a adição de

uma gota de solução reveladora constituída por dimetilaminocinamaldeído a 1% (p/v) em HCl a 10% (v/v). O aparecimento de uma coloração púrpura ou rosa em até 10 minutos indicou resultado positivo.

### 3.2.2 Identificação ao Nível de Espécie

Para a identificação ao nível de espécie foram utilizadas como controles as amostras de *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 6569 e duas amostras de coleção de *E. gallinarum* e *Raoultella planticola*

#### 3.2.1.4 Hidrólise da arginina

Foi realizada uma suspensão densa das amostras e em seguida foram inoculadas duas gotas da suspensão em meio Descarboxylase Base Möeller (Difco) acrescido de 1% de L-arginina. Foram adicionadas ao tubo algumas gotas de óleo mineral estéril e, a seguir, as amostras foram incubadas durante 7 dias à 37°C. O aparecimento de coloração púrpura no meio, após o período de incubação, indicou reação positiva demonstrando a alcalinização do meio devido à hidrólise da arginina e liberação dos grupos NH<sub>2</sub>. O aparecimento de cor amarela indicou reação negativa devido à acidificação do meio pelo consumo de glicose.

#### 3.2.1.5 Utilização do piruvato de sódio

A utilização do piruvato de sódio foi verificada através da inoculação de uma gota de suspensão densa das amostras em meio constituído por triptona (Difco) a 1% (p/v), extrato de levedura (Difco) a 0,5% (p/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Isotar) a 0,5% (p/v), NaCl a 0,5% e azul de bromotimol (Vetec) a 0,01% e distribuído (2,5mL) em tubos 13 x 100mm.. Após o

período de incubação de 7 dias à 37°C, a observação de uma mudança na coloração do meio para amarela indicou reação positiva.

#### 3.2.1.6 Utilização de carboidratos

A utilização de carboidratos foi verificada pela inoculação de duas gotas de uma suspensão densa das amostras em meio constituído por caldo Heart Infusion Broth (HIB), um dos açúcares a 1% e o indicador de pH púrpura de bromocresol em solução alcoólica a 1,6%. As leituras foram realizadas diariamente, por um período de 7 dias de incubação à 37°C. A mudança na coloração do meio para amarela indicou reação positiva.

#### 3.2.1.7 Teste de motilidade

Para o teste de motilidade foi utilizado o meio semi-sólido “Motility Medium” (Difco) distribuído (3 mL) em tubos 13 x 100. O inóculo das amostras foi realizado através de uma picada no meio com a utilização de uma agulha de níquel-cromo. As amostras foram incubadas à 30°C e a leitura foi realizada diariamente durante 7 dias . A observação de crescimento bacteriano ao redor da picada indicou que a bactéria era móvel, enquanto a observação de crescimento localizado no local da picada indicou que a bactéria era imóvel.

#### 3.2.1.8 Produção de pigmento

A produção de pigmento foi verificada pela inoculação das amostras em uma placa de ágar sangue e incubada por 18-24 horas à 37°C. Após este período foi raspada uma parte do crescimento com a utilização de um “swab” de algodão. A observação de uma coloração amarelada indicou que houve produção de pigmento.

### **4. Teste de Suscetibilidade aos Agentes Antimicrobianos**

A avaliação da suscetibilidade das amostras foi realizada através do método de difusão de disco, segundo as recomendações do CLSI (2005).

A partir do crescimento das amostras obtido durante 18-24 horas de incubação à 35°C, em meio Trypticase Soy Agar (TSA, Difco) (amostras de *S. saprophyticus*) e em TSA adicionado de 5% de sangue de carneiro (amostras de *Enterococcus* sp.), foram preparadas suspensões das mesmas em solução salina estéril (0,85% p/v) com turvação correspondente ao grau 0,5 na escala Mc Farland. A seguir, as amostras foram semeadas com a utilização de um “swab” de algodão estéril em uma placa (150 mm) de ágar Müeller-Hinton (Difco) em três direções diferentes, a fim de se obter um crescimento confluyente e, então, os discos dos antimicrobianos a serem testados foram aplicados na placa, com uma distância aproximada de 24 mm entre eles, com a utilização de uma pinça. As placas foram incubadas por um período de 16-18 horas à 35°C.

Para as amostras de *S. saprophyticus* foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gatifloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), levofloxacina (5 µg), linezolida (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacina (10 µg), oxacilina (1 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) e vancomicina (30 µg). Para as amostras de *Enterococcus* sp. foram testados: ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), estreptomicina (300 µg), gatifloxacina (5 µg), gentamicina (120 µg), levofloxacina (5 µg), linezolida (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacina (10 µg) e vancomicina (30 µg). Todos os discos foram obtidos da CECON (Petrópolis, RJ-Brasil), exceto os de linezolida, obtidos da Oxoid.

Após o período de incubação, foi realizada a leitura do teste através da medição do halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos e a interpretação dos resultados foi feita com base nos critérios do CLSI (2005).



Como controles foram utilizadas as cepas padrão *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212 para estafilococos e para enterococos, respectivamente.

## **5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de oxacilina para *S. saprophyticus*.**

A determinação da CMI foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI (2005). O inóculo foi preparado através da suspensão de colônias isoladas em placa de ágar sangue, com crescimento de 18-24 horas, em salina (0,85%). A suspensão foi ajustada para obter uma turvação correspondente ao grau 0,5 na escala Mc Farland e, a seguir, diluída 1:10 e inoculada em placas de ágar Müeller Hinton adicionado de NaCl (2% p/v), com a utilização de um replicador que inoculou aproximadamente  $10^4$  UFCs em cada “spot”. Cada placa continha uma diluição da solução de oxacilina, feita através de diluições seriadas duplas, de forma que as placas tiveram concentrações de oxacilina variando entre 0,031 e 8 µg/mL. Como controle foi utilizada em cada teste a amostra *S. aureus* ATCC 29213 (sensível à oxacilina). Os resultados foram interpretados segundo os critérios do CLSI (2005).

## **6. Avaliação da Diversidade Genética**

A avaliação da diversidade genética entre as amostras de *Enterococcus* foi realizada através da RAPD-PCR e do PFGE e, entre as amostras de *S. saprophyticus*, somente através do PFGE.

### **6.1 *Enterococcus***

### 6.1.2 RAPD-PCR

A extração do DNA bacteriano das diferentes colônias e a RAPD-PCR foram realizadas pela metodologia descrita por Pacheco e colaboradores (1997), com modificações.

As amostras foram semeadas em meio ágar sangue e incubadas à 37°C por 24 horas. A suspensão de cada amostra foi realizada em 3 mL de tampão TE [ Tris HCl 10mM e EDTA 1mM (pH 8,0)] e, a seguir, uma alíquota de cada suspensão foi diluída a 1:10 em água destilada para a verificação da densidade óptica (DO) no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm. Para a DO de 0,16, um volume de 500 µL da suspensão original foi centrifugada à 12.000 x g por 2 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 200 µL de tampão TE e, a seguir, foi submetido à fervura por 10 minutos. Após a fervura, as suspensões foram centrifugadas e o sobrenadante separado e utilizado como fonte de DNA nas reações de amplificação.

A reação de PCR consistiu de um volume final de 30 µL, constituído por 50 mM de cloreto de potássio, 10mM de Tris-HCl (pH 8,3), 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de cada nucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 30 pmol de iniciador, 3 µL de DNA e 1,5 U de *Taq* polimerase (Invitrogen do Brasil, São Paulo, Brazil). Foi utilizado o iniciador 1254 (5' –CCGCAGCCAA- 3'). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador programado para as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, 4 ciclos de 94°C por 5 minutos, 37°C por 5 minutos e 72°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 37°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,8%) em tampão TBE 0,5X (Tris 0,05mM, EDTA 1,25 mM, ácido bórico 0,05M), à 100V por 3 horas. A seguir o gel foi corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta. Foi utilizado um marcador para tamanho de fragmento (100 Base-Pair Ladder, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) para estimar o tamanho dos produtos da amplificação.

A análise dos perfis obtidos foi realizada visualmente e através do programa Gel Compar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os cálculos da matriz de similaridade dos perfis encontrados foram realizados pelo coeficiente de Dice e o dendrograma, com tolerância de 1,0%, foi gerado pelo método de “Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages” (UPGMA).

### 6.1.3 Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA genômico

A análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico foi realizada através do PFGE, após a análise inicial da diversidade genética através da RAPD-PCR. O PFGE foi realizado segundo a metodologia descrita por Teixeira *et al* (1997), com modificações. A partir do crescimento das amostras em meio TSA por 18 horas à 37°C, foram realizadas suspensões em 0,5 mL de tampão PIV (NaCl 1 M e Tris HCl 10 mM [pH 7,6]), de modo a obter uma turvação equivalente à escala 5 de Mc Farland. Este volume foi adicionado a um volume igual de agarose de baixa temperatura de fusão à 2% (p/v) em PIV e distribuídos em moldes para a formação de blocos. Após a solidificação, os blocos foram colocados em 2 mL de uma solução de lise [Tris HCl 6mM, NaCl 1M, EDTA 100mM, Brij 58 à 0,5%, lauril sarcosinato de sódio à 0,5%, 1 mg/mL de lisozima e 5 U/mL de mutanolisina] por 18-24 horas à 37°C, sob agitação suave. Em seguida, a solução de lise foi retirada e substituída

por 2mL de solução ESP (EDTA 0,5 M, lauril sarcosinato de sódio à 1% e proteinase K em concentração final de 0,1 mg/mL). Esta solução foi incubada por 18-24 horas à 50°C. A seguir, a solução ESP foi trocada por uma nova solução de mesma composição e foi novamente incubada. Os blocos foram colocados em uma solução ESP sem a proteinase K e foram feitas lavagens dos blocos em tampão TE (Tris HCl 10 mM [pH 7,6] e EDTA 0,1 mM) por cinco vezes (três por 1 hora e duas por 2 horas) à 37°C, sob agitação suave. Posteriormente, dois blocos de cada amostra foram colocados em uma solução contendo 180 µL de água milliQ estéril e 20 µL de tampão específico para a enzima *SmaI* e incubadas por 1 hora à 25° C. Em seguida, a solução foi retirada e trocada por uma nova solução contendo 179 µL de água milliQ, 20 µL de tampão e 1 µL da enzima *SmaI* (20 U/µL) por 18-24 horas à 25°C. Após este período, os blocos foram fundidos à 72°C e aplicados no gel de agarose à 1,2% (p/v) em tampão TBE 0,5X (Tris 0,05 mM, EDTA 1,25 mM e ácido bórico 0,05 M).

A eletroforese de campo pulsado foi realizada em um equipamento CHEF DR III (Bio Rad, Hercules, EUA) e os parâmetros utilizados na corrida foram: 6 V/cm à temperatura de 13°C, com pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 35 segundos, por 25 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídio por 20 minutos, descorado em água destilada por 1 hora, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado para análise posterior. Um marcador para tamanho de fragmento foi utilizado (50-1000 Kb Pulse-Marker, Sigma) para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA.

A análise dos perfis obtidos foi realizada visualmente e através do programa Gel Compar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os cálculos da matriz de similaridade dos perfis encontrados foram realizados pelo coeficiente de Dice e o dendrograma, com

tolerância de 1,0%, foi gerado pelo método de “Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages” (UPGMA).

## **6.2. *S. saprophyticus***

### 6.2.1 Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Genômico

A análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico, através do PFGE, foi realizada segundo a metodologia descrita por Teixeira *et al* (1997), com modificações. A partir do crescimento das amostras em meio TSA por 18 horas à 37°C, foram realizadas suspensões em 0,5 mL de tampão PIV (NaCl 1 M e Tris HCl 10 mM [pH 7,6]). Uma alíquota de cada suspensão foi diluída a 1:10 em água destilada para a verificação da densidade óptica (DO) no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm, de modo a obter uma DO de 1,5. Este volume foi adicionado a um volume igual de agarose de baixa temperatura de fusão à 2% (p/v) em PIV e distribuídos em moldes para a formação de blocos. Após a solidificação, os blocos foram colocados em 2 mL de uma solução de lise (Tris HCl 6mM [pH 7,6], NaCl 1M, EDTA 100mM [pH 7,5], Brij 58 à 0,5%, lauril sarcosinato de sódio à 0,5%, 0,5 mg/mL de lisozima e 0,05 mg/mL de lisostafina) por 18-24 horas à 37°C, sob agitação suave. Em seguida, a solução de lise foi retirada e substituída por 2mL de solução ESP (EDTA 0,5 M, lauril sarcosinato de sódio à 1% e proteinase K em concentração final de 0,1 mg/mL). Esta solução foi incubada por 18-24 horas à 50°C. A seguir, a solução ESP foi trocada por uma nova solução de mesma composição e foi novamente incubada 18-24 horas à 50°C. Os blocos foram colocados em uma solução ESP sem a proteinase K e foram feitas lavagens dos blocos em tampão TE (Tris HCl 10 mM [pH 7,6] e EDTA 0,1 mM) por cinco vezes (três por 1 hora e duas por 2 horas) à 37°C, sob

agitação suave. Posteriormente, dois blocos de cada amostra foram colocados em uma solução contendo 180  $\mu\text{L}$  de água milliQ estéril e 20  $\mu\text{L}$  de tampão 10X específico para a enzima *Sma*I e incubadas por 1 hora à 25° C. Em seguida, a solução foi retirada e trocada por uma nova solução contendo 179  $\mu\text{L}$  de água milliQ, 20  $\mu\text{L}$  de tampão 10X e 1  $\mu\text{L}$  da enzima *Sma*I (20 U/ $\mu\text{L}$ ) por 18-24 horas à 25°C. Após este período, os blocos foram fundidos à 72°C e aplicados no gel de agarose à 1,3% (p/v) em tampão TBE 0,5X (Tris 0,05 M, EDTA 1,25 M e ácido bórico 0,05 M).

A eletroforese de campo pulsado foi realizada em um equipamento CHEF DR III (Bio Rad, Hercules, EUA) e os parâmetros utilizados na corrida foram: 200 V (6 V/cm) à temperatura de 13°C, com pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 35 segundos, por 25 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 30 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado para análise posterior. Foi utilizado um marcador padrão para a observação do tamanho dos fragmentos de DNA obtidos (50-1000 Kb Pulse-Marker, Sigma).

A análise dos perfis obtidos foi realizada visualmente e através do programa Gel Compar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os cálculos da matriz de similaridade dos perfis encontrados foram realizados pelo coeficiente de Dice e o dendrograma, com tolerância de 1,0%, foi gerado pelo método de “Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages” (UPGMA).

## RESULTADOS

---

---

### 1. Amostras Bacterianas

Foram coletadas 311 amostras de urina, sendo 276 provenientes de pacientes atendidos no serviço de pronto atendimento do Hospital Municipal Miguel Couto e 35 do Hospital São Lucas. Dentre o total de amostras, 163 apresentaram resultado de urinocultura positiva e 148 apresentaram resultado de cultura negativa (Tabela 3).

A realização dos testes de identificação presuntiva das 163 amostras bacterianas isoladas a partir das culturas positivas permitiu a classificação de 101 amostras de *E. coli*, 37 amostras de *S. saprophyticus*, 17 amostras de *Enterococcus* e 8 amostras de outras enterobactérias (Figura 3). Para a identificação presuntiva de *S. saprophyticus* e *Enterococcus* sp., uma colônia isolada de cada amostra foi submetida à coloração de Gram e à prova da catalase. Os cocos Gram-positivos catalase-positivos, foram submetidos aos testes da coagulase, resistência à novobiocina e bacitracina e os cocos Gram-positivos catalase-negativos foram submetidos ao teste da hidrólise do PYR e hidrólise da esculina na presença de sais biliares.

A partir de cada placa de CLED cuja amostra foi identificada presuntivamente como *S.saprophyticus* ou como *Enterococcus* sp., foram selecionadas cinco colônias ou menos e

estas foram cultivadas em placas de ágar sangue. As 37 amostras de *S. saprophyticus* foram representadas por um total de 178 colônias e as 17 amostras de *Enterococcus* foram representadas por 81 colônias. A Tabela 4 mostra o número de colônias isoladas de cada amostra identificada presuntivamente como *S. saprophyticus* e *Enterococcus* sp.

## **2. Identificação Bacteriana**

Após a realização do esquema de identificação bioquímica para as 37 amostras (178 colônias) identificadas presuntivamente como *S. saprophyticus*, observou-se que apenas 27 dentre estas (135 colônias) apresentaram o perfil bioquímico correspondente ao de *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, que é caracterizado por um resultado positivo nos testes de resistência à novobiocina, produção da enzima urease e produção de ácido a partir da utilização dos carboidratos manose e trealose, e por um resultado negativo nos testes de hidrólise do PYR e descarboxilação da ornitina. As outras 10 amostras (43 colônias), todas resistentes à novobiocina, apresentaram perfil diferente de *S. saprophyticus* nos outros testes realizados, porém, no presente estudo, não foi realizada a identificação confirmatória para estas amostras. A Tabela 5 mostra os diferentes perfis fisiológicos encontrados para estas amostras não identificadas de estafilococos coagulase negativos. Todas as colônias de cada amostra de *Staphylococcus* sp. avaliada apresentaram o mesmo perfil fisiológico.

A realização dos testes bioquímicos e fenotípicos para as 17 amostras previamente identificadas como *Enterococcus* sp. confirmou a identificação ao nível de gênero para todas as amostras, caracterizada pelo resultado positivo para os testes da hidrólise da esculina em presença de bile, da hidrólise do PYR e do LAP e para o crescimento



bacteriano em alta concentração (6,5%) de NaCl. A realização dos testes de identificação ao nível de espécie possibilitaram a identificação de 16 amostras (76 colônias) como *E. faecalis*, dentre as quais, 15 apresentaram o perfil fisiológico característico da espécie, caracterizado por um resultado positivo para a utilização dos carboidratos sacarose, sorbitol e manitol e negativo para a utilização de sorbose, MGP, arabinose e rafinose, um resultado positivo para os testes de hidrólise da arginina e utilização do piruvato, e negativo para os testes da motilidade e da pigmentação e uma amostra (5 colônias) dentre as 16 apresentou atipia no teste da hidrólise da arginina, apresentando um resultado negativo, porém, nos outros testes apresentou o perfil característico da espécie. Uma única amostra apresentou variação nos testes entre as colônias, apresentando 4 colônias com perfil semelhante ao da espécie *E. casseliflavus*, exceto pelo teste da motilidade, e uma colônia de *Enterococcus* não identificada ao nível de espécie, caracterizando uma infecção polimicrobiana. A Tabela 6 mostra os diferentes perfis fisiológicos, típicos e atípicos, encontrados para as amostras de *Enterococcus*.

### **3. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos**

No teste de disco difusão não foram observadas variações na susceptibilidade frente aos antimicrobianos entre as diferentes colônias isoladas de um mesmo espécime clínico.

#### **3.1 *S. saprophyticus***

Dentre as 27 amostras de *S. saprophyticus*, 26 (96,3%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Dentre estas, 6 (22,2%) foram resistentes a apenas um antimicrobiano e 20 (74,1%) apresentaram resistência a dois ou mais

antimicrobianos. Os percentuais de resistência mais elevados foram observados em relação à oxacilina (96,3%) e à cefoxitina (74%) e uma menor porcentagem de amostras apresentou resistência à ampicilina (22,2%), trimetoprim-sulfametoxazol (37%), gentamicina (3,7%), norfloxacina (3,7%) e ciprofloxacina (3,7%) (Figura 4). Nenhuma amostra apresentou resistência aos antimicrobianos levofloxacina, gatifloxacina, linezolida, vancomicina e nitrofurantoína. Os principais perfis de resistência encontrados entre as amostras foram: resistência concomitante à oxacilina e cefoxitina (74%), resistência concomitante à oxacilina, cefoxitina e trimetoprim-sulfametoxazol (33,3%) e resistência concomitante à ampicilina, oxacilina e cefoxitina (22,2%) (Figura 5).

### **3.2 *Enterococcus sp.***

Apenas uma entre as 17 amostras de *Enterococcus* estudadas apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. A maioria das amostras apresentou resistência às quinolonas ciprofloxacina (88,2%) e norfloxacina (52,9%), sendo que dentre as resistentes à ciprofloxacina, 64,7% apresentaram resistência intermediária, e dentre as resistentes à norfloxacina, 29,4% apresentaram resistência intermediária. Um menor percentual de resistência entre as amostras foi observado para as quinolonas gatifloxacina e levofloxacina, com taxas de 5,9% e 17,6%, respectivamente (Figura 6).

Todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos ampicilina, linezolida e vancomicina e apenas uma amostra apresentou resistência intermediária à nitrofurantoína.

Os percentuais de resistência aos altos níveis de aminoglicosídeos foram de 29,4% para a estreptomicina e de 11,7% para a gentamicina. Todas as amostras resistentes à níveis

elevados de aminoglicosídeos apresentaram resistência concomitante a pelo menos uma das quinolonas gatifloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina ou norfloxacina.

#### **4. Determinação da CMI da oxacilina para amostras de *S. saprophyticus***

A Figura 7 mostra os valores de concentrações da oxacilina (em µg/mL) em função do número de amostras. As amostras para as quais a CMI da oxacilina foi maior ou igual a 0,5 µg/mL foram consideradas resistentes e as que apresentaram CMI menores ou iguais a 0,25 µg/mL foram consideradas sensíveis. O teste de diluição da oxacilina em ágar confirmou os resultados do teste de disco-difusão, sendo 26 dentre as 27 amostras resistentes à oxacilina, ou seja, 26 amostras apresentaram valores de CMI maiores ou iguais a 0,5 µg/mL.

#### **5. RAPD-PCR para as amostras de *Enterococcus***

As 81 colônias isoladas a partir de 17 espécimes clínicos foram submetidas ao método de RAPD-PCR para verificar possíveis variações genotípicas entre as colônias de cada amostra. Na figura 8 pode-se observar que dentre as 17 amostras, apenas 2 apresentaram variação genotípica entre as colônias (amostras 13b e 95). Uma destas amostras foi aquela que apresentou uma das colônias com identificação fenotípica ao nível de espécie diferente das outras colônias e foi identificada como *E. faecalis* (colônia 13b-4) enquanto as outras quatro colônias apresentaram um perfil fisiológico semelhante ao de *E. casseliflavus* (colônias 13b-1, 2, 3 e 5). Já a segunda amostra para qual foi observada variação no perfil de bandas entre as diferentes colônias teve o perfil fenotípico igual para as cinco colônias, porém, uma das colônias (colônia 95-1) apresentou um perfil genotípico

diferente das outras quatro (colônias 95-2 a 5). Assim, através do RAPD-PCR realizado para todas as colônias das 17 amostras de enterococos foi possível identificar 19 diferentes perfis genotípicos, sendo 18 de *E. faecalis* e um do microrganismo com o perfil fisiológico semelhante a *E. casseliflavus*. A seguir, foi realizado um RAPD-PCR para uma colônia de cada amostra de *E. faecalis*, exceto a amostra que teve dois perfis de bandas diferentes entre as cinco colônias, que teve duas diferentes colônias submetidas ao RAPD-PCR.

As análises visual e automatizada do gel de RAPD (tolerância máxima de 1%) com as 18 diferentes colônias permitiram a observação de 17 diferentes perfis de fragmentação distintos, já que duas amostras apresentaram perfis de bandas indistinguíveis (67-1 e 260-1). Os perfis apresentaram de 10 a 17 bandas consideradas. Desessete dentre as 18 amostras apresentaram um percentual de similaridade entre si que variou de 75% a 100%. Somente uma amostra (48-1) apresentou percentual de similaridade de 65% com as demais (Figura 9).

## **6. PFGE para as amostras de *Enterococcus faecalis***

A análise visual e computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA genômico dos *Enterococcus*, com tolerância máxima de 1% e considerando 100% de similaridade, permitiu a observação de 17 perfis de fragmentação distintos. Tais perfis levaram em consideração a ausência ou presença de bandas formadas por fragmentos de DNA genômico do mesmo tamanho. Os perfis apresentaram de 9 a 14 bandas. As duas amostras que apresentaram perfis de bandas indistinguíveis através do RAPD-PCR (67-1 e 260-1), também apresentaram perfis de bandas indistinguíveis segundo o perfil de fragmentação obtido através do corte com a enzima *SmaI*, através do PFGE . O percentual de similaridade

entre 17 amostras variou de 68% a 100% e apenas uma amostra (95-1) apresentou um percentual de similaridade de 45% com as demais amostras (Figura 10).

### **7. PFGE para as amostras de *S. saprophyticus***

A análise visual e computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA genômico das 27 amostras de *S. saprophyticus*, com tolerância máxima de 1% e considerando 100% de similaridade permitiu a observação de 25 perfis de fragmentação distintos. Dentre as 27 amostras, 3 apresentaram perfis de fragmentação indistinguíveis entre si (80-1, 104-1 e 133-1). Os perfis apresentaram de 9 a 12 bandas. O percentual de similaridade de 26 dentre as 27 amostras variou de 69% a 100% e somente uma amostra apresentou percentual de similaridade de 50% com as demais amostras (278-1) (Figura 11).

**Tabela 1. Esquema de identificação de estafilococos coagulase-negativos clinicamente importantes.** <sup>a</sup>

Espécies	Novobiocina (5mg)	Urease	Utilização da manose	PYR	Ornitina descarboxilase
<b>Mais frequentemente isoladas</b>					
Grupo <i>S. epidermidis</i> <sup>b</sup>	S	+	+	-	d
Grupo <i>S. haemolyticus</i> <sup>c</sup>	S	-	-	+	-
Grupo <i>S. saprophyticus</i> <sup>d</sup>	R	+	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	S	d	+	+	+
Grupo <i>S. warneri</i> <sup>e</sup>	S	+	-	-	-
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	S	-	+	+	-
<b>Menos frequentemente isoladas</b>					
<i>S. simulans</i>	S	+	d	+	-
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	S	-	+	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	R	-	d	-	-
Grupo <i>S. cohnii</i> <sup>f</sup>	R	+	+	d	-

<sup>a</sup> +, resultado positivo; -, resultado negativo; d, resultado positivo ou negativo R, resistente, S, susceptível.

<sup>b</sup> Quando a ornitina descarboxilase é negativa: trealose negativa e manitol negativo, é confirmado

*S. epidermidis*; trealose positiva, manitol negativo, suspeita-se de *S. caprae*; trealose negativa, manitol positivo, suspeita-se de *S. capitis* subsp. *urealyticus*.

<sup>c</sup> produção de acetoina positiva, é confirmado *S. haemolyticus*; produção de acetoina negativa, lactose negativa, suspeita-se de *S. auricularis*; produção de acetoina negativa, lactose positiva, suspeita-se de *S. casseolyticus*.

<sup>d</sup> Trealose positiva, é confirmado *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*; trealose negativa, suspeita-se de *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*.

<sup>e</sup> β-glicosidase positiva, crescimento anaeróbico positivo, é confirmado *S. warneri*; β-glicosidase negativa, crescimento anaeróbico negativo, suspeita-se de *S. hominis* subsp. *hominis*.

<sup>f</sup> Xilose positiva, suspeita-se de *S. xylosus*; xilose negativa, suspeita-se de *S. cohnii* subsp. *urealyticum*.

Extraída de De Paulis e colaboradores, 2003, com modificações.

**Tabela 2. Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e de outros microrganismos relacionados.**

Espécies	Característica fenotípica											
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SAC	PIR	MGP
<b>Grupo I</b>												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<b>Grupo II</b>												
<i>E. faecalis</i>	+ <sup>d</sup>	-	+ <sup>d</sup>	-	+	-	+	-	-	+ <sup>d</sup>	+	-
<i>Lactococcus</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
<i>E. faecium</i>	+ <sup>d</sup>	-	+	+	V	V	-	-	-	+ <sup>d</sup>	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+ <sup>d</sup>	+	V	+	+ <sup>d</sup>	+ <sup>d</sup>	+ <sup>d</sup>	+	V	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+ <sup>d</sup>	+	-	+	-	+ <sup>d</sup>	-	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<b>Grupo III</b>												
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. porcinus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo IV</b>												
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<b>Grupo V</b>												
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Vagococcus</i> sp.	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

Abreviações e símbolos: MAN, manitol; SOR, sorbose; ARG, arginina; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; TEL, telurito 0,04%; MOT, motilidade; PIG, pigmento; SAC, sacarose; PIR, piruvato; MGP, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo; +, 90% (ou +) das amostras são positivas; -, 10% (ou -) das amostras são positivas; V, variável (11 a 89% das amostras são positivas); d, exceções ocasionais (< 3% das amostras apresentam reações atípicas).

Extraída de Teixeira & Facklam, 2003, com modificações.

**Tabela 3. Número de urinoculturas positivas e negativas provenientes de pacientes atendidos no Hospital Municipal Miguel Couto (HMMC) e no Hospital São Lucas (HSL) na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**

	HMMC	HSL	Total
Cultura positiva	141 (51,1%)	22 (62,9%)	163 (52,4%)
Cultura negativa	135 (48,9%)	13 (37,1%)	148 (47,6%)
Total	276 (100%)	35 (100%)	311 (100%)



**Tabela 4. Numero de colônias por amostras de *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus* isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**

Espécie	Nº de amostras	Nº de colônias					Total de colônias isoladas
		1	2	3	4	5	
<i>S. saprophyticus</i>	37	01	01			35	178
<i>Enterococcus</i>	17		01		01	15	81

\* Durante a contagem das UFCs, as culturas que apresentaram um número de UFC para cada 10µL de urina menor que 10 ( $10^2$  UFC/mL) foram consideradas positivas quando eram provenientes de mulheres grávidas.

**Tabela 5. Perfis fenotípicos das amostras de *S. saprophyticus* e de outros estafilococos coagulase-negativos resistentes à novobiocina não identificados em espécies, isolados de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**

Teste	PERFIL FENOTÍPICO			
	<i>S. saprophyticus</i> *	ECNs resistentes à novobiocina		
	1	2	3	4
Urease	+	-	-	+
Manose	-	+	+	+
Trealose	+	+	+	+
Hidrólise do PYR	-	-	+	+
Descarboxilação da ornitina	-	-	-	-
Novobiocina	R	R	R	R
Total de amostras	27	7	1	2
Total de colônias	135	28	5	10

R, resistente

\* Todas as amostras identificadas como *S. saprophyticus* apresentaram o mesmo perfil.

ECNs, Estafilococos Coagulase Negativos

**Tabela 6. Perfis fenotípicos das amostras de *Enterococcus* isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**

Testes	PERFIL FENOTÍPICO			
	<i>E. faecalis</i>		<i>Enterococcus</i> (não-faecalis)	
	1 <sup>t</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>n</sup>	4 <sup>n</sup>
Manitol	+	+	+	+
Sorbose	-	-	-	-
Hidrólise da arginina	+	- *	+	+
Arabinose	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	-
Rafinose	-	-	-	+
Motilidade	-	-	-	-
Produção de pigmento	-	-	-	+
Sacarose	+	+	+	+
Utilização do piruvato	+	+	+	-
MGP	-	-	+	+
Total de amostras	15	1	1	
Total de colônias	71	5	1	4

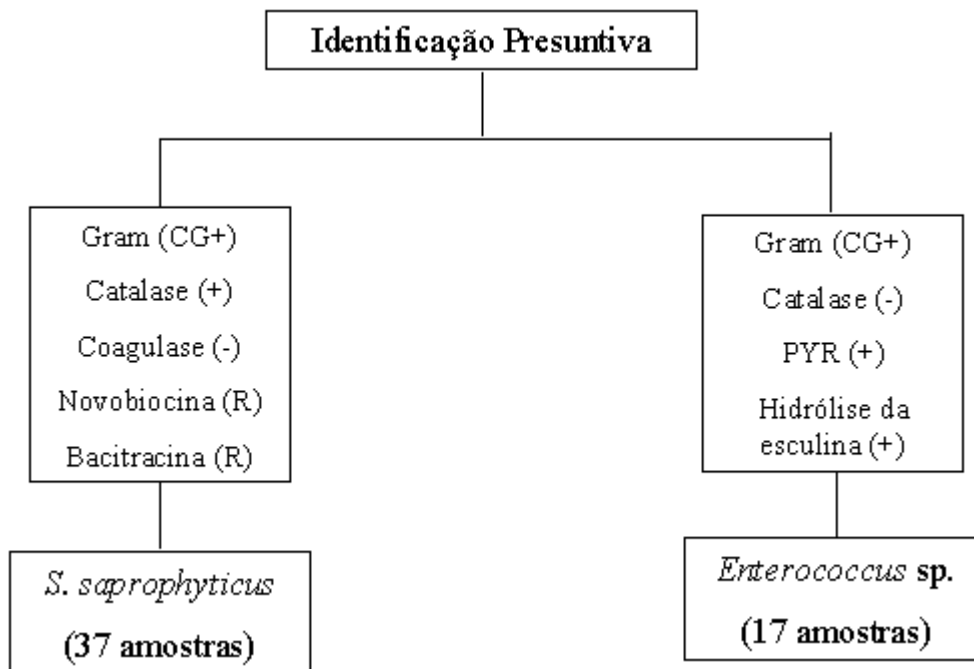
t, perfil típico

a, perfis atípicos

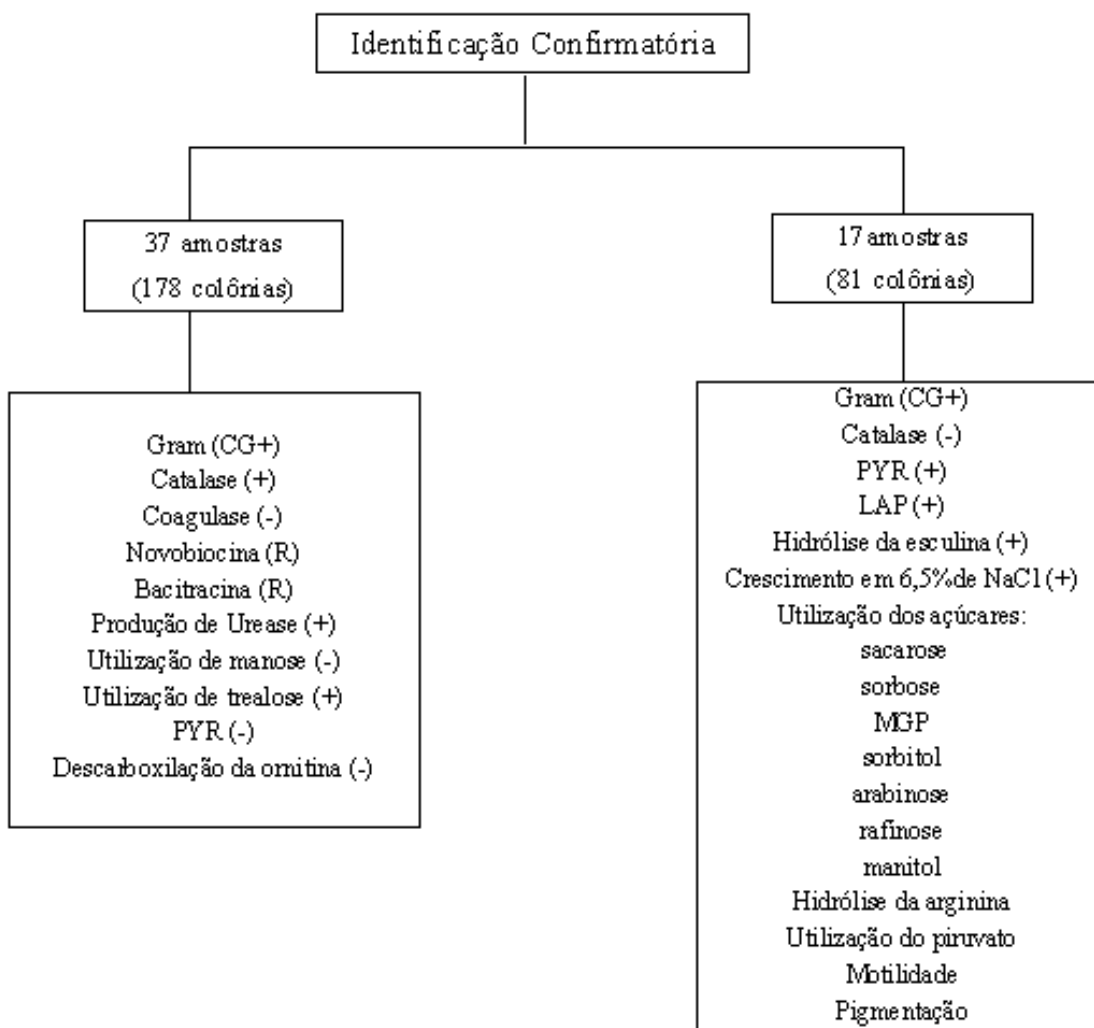
n, perfis de amostras não identificadas

\* Perfil atípico na hidrólise da arginina

**Figura 1. Esquema de identificação presuntiva realizado para uma colônia de cada amostra de Cocos Gram-positivos.**

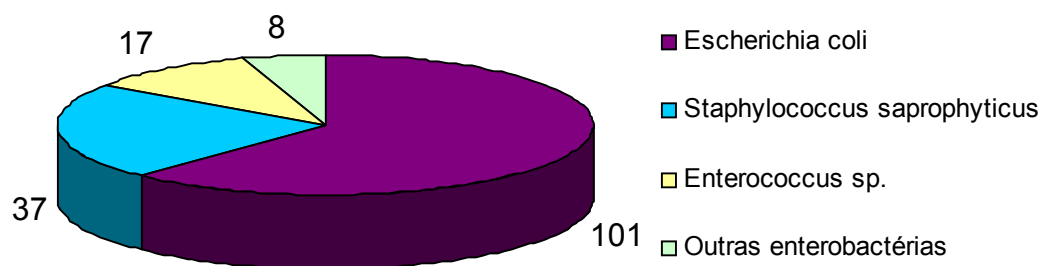


**Figura 2. Esquema de identificação confirmatória das 37 amostras identificadas presuntivamente como *S. saprophyticus* e para as 17 amostras identificadas como *Enterococcus* sp isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**

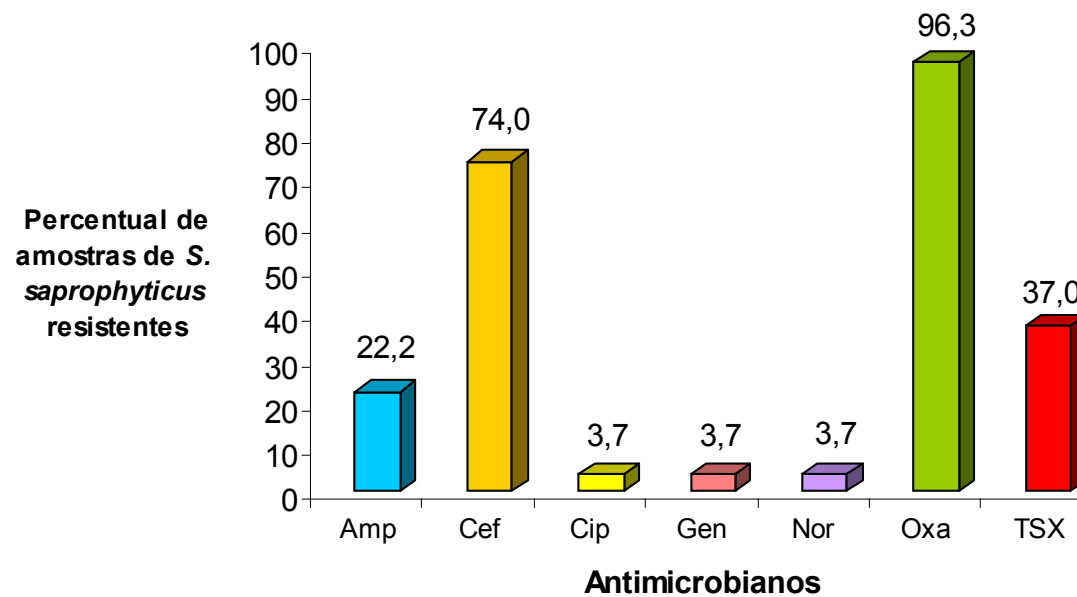


CG+, cocos Gram-positivos  
 MGP, metil  $\alpha$ -D- glicopiranosídeo  
 R, resistência  
 +, reação positiva  
 -, reação negativa

**Figura 3. Identificação presuntiva das 163 amostras bacterianas isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**



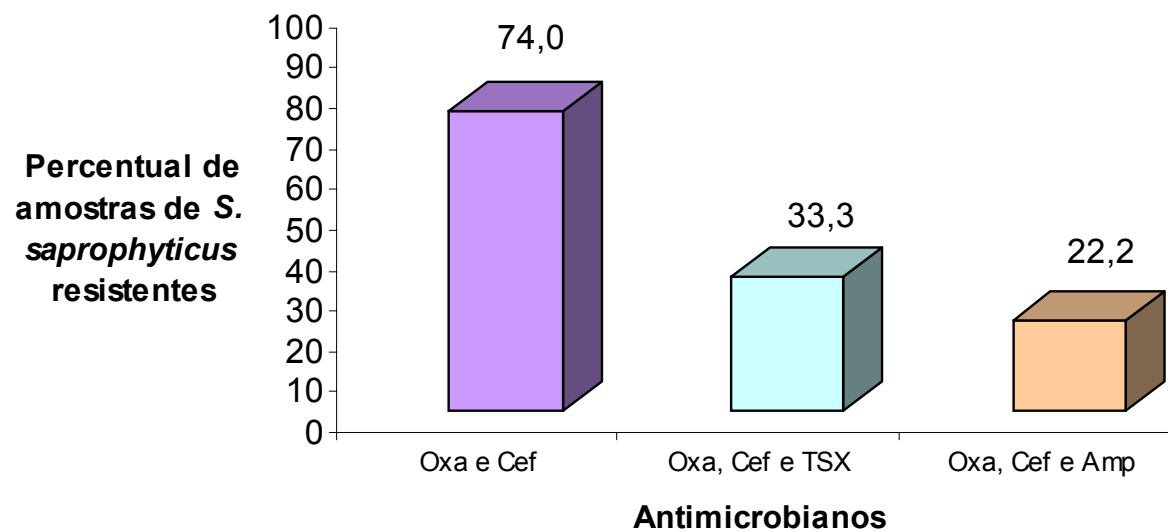
**Figura 4. Resistência aos antimicrobianos entre as 27 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**



Amp, ampicilina; Cef, cefoxitina; Cip, ciprofloxacina; Gen, gentamicina; Nor, norfloxacina; Oxa, oxacilina; TSX, trimetoprim-sulfametoxazol

\* Todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos levofloxacina, gatifloxacina, linezolid, vancomicina e nitrofurantoína.

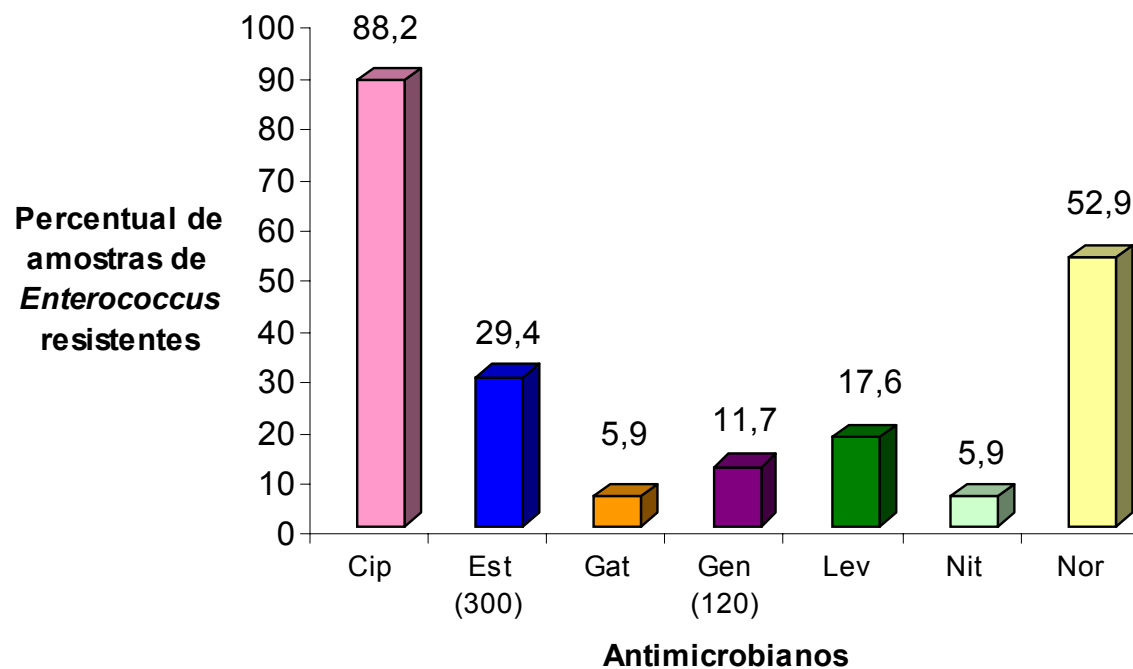
**Figura 5. Perfis de resistência predominantes entre as 27 amostras de *S. saprophyticus* isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**



Amp, ampicilina; Cef, cefoxitina; Oxa, oxacilina; TSX, trimetoprim-sulfametoxazol



**Figura 6. Resistência aos antimicrobianos entre as 17 amostras *Enterococcus* isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**

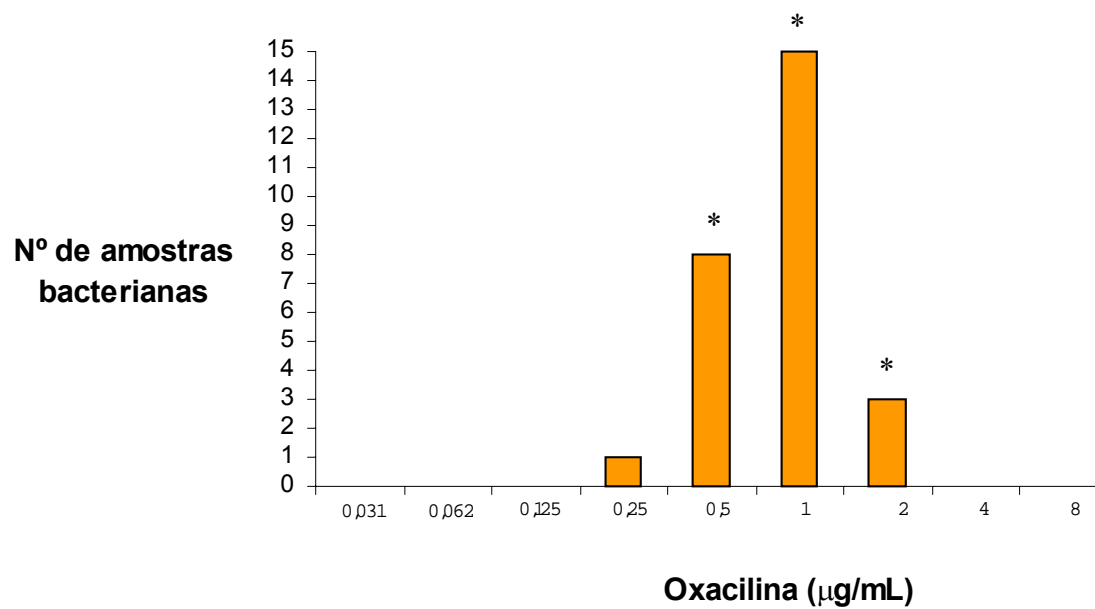


Cip, ciprofloxacina; Est, estreptomicina (300 µg); Gat, gatifloxacina; Gen, gentamicina (120 µg)

Lev, levofloxacina; Nit, nitrofurantoína; Nor, norfloxacina

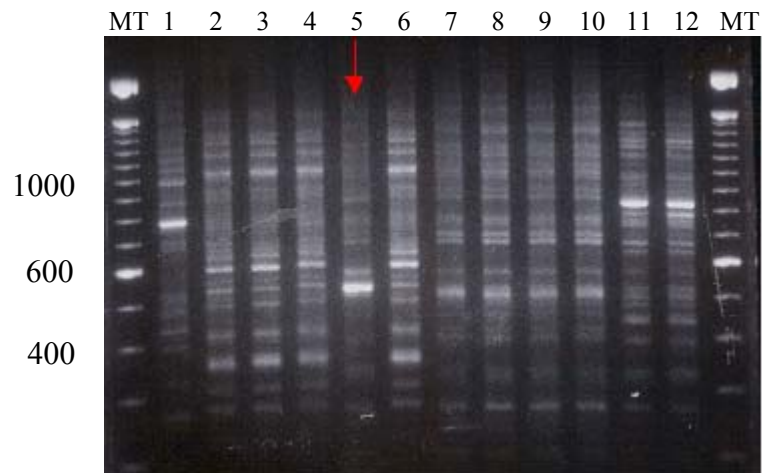
\* Todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos ampicilina, linezolida e vancomicina e apenas uma amostra apresentou resistência intermediária à nitrofurantoína.

**Figura 7. Concentração mínima inibitória da oxacilina para as amostras de *S. saprophyticus* isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**



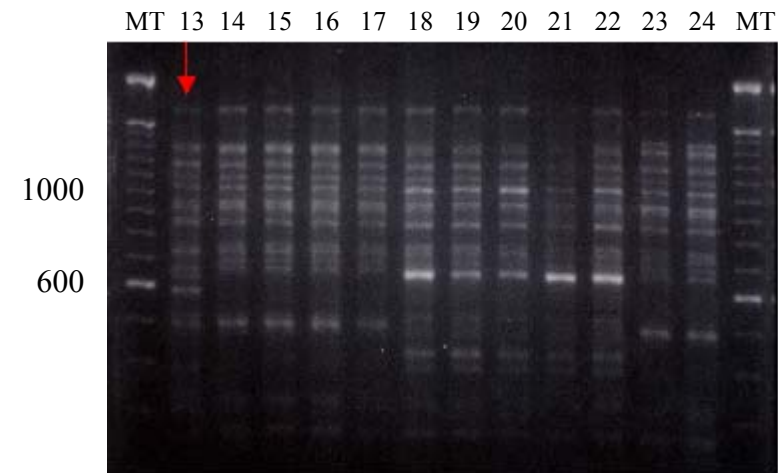
\* Amostras resistentes (CMI  $\geq$  0,5µg/mL)

**Figura 8. Perfis de RAPD-PCR representativos de algumas das diferentes colônias de cada amostra de *Enterococcus* isoladas de ITUs comunitárias na cidade do Rio de Janeiro no período de março a novembro de 2005.**



MT- Marcador de tamanho de DNA (pb)

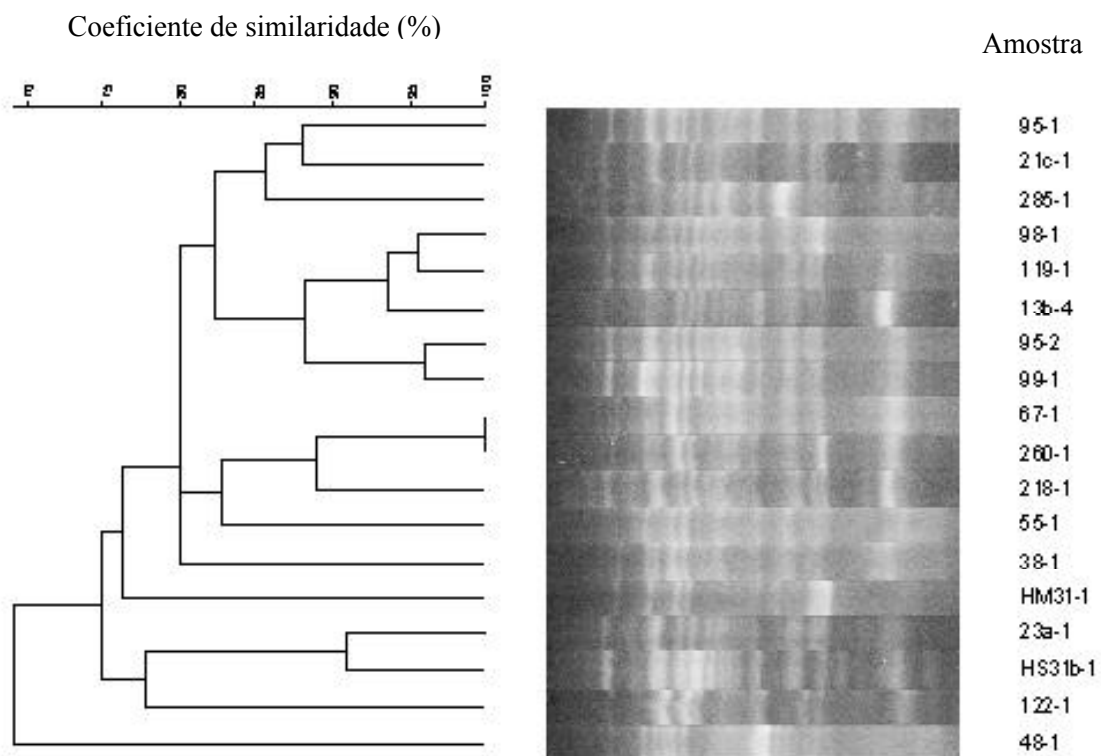
- 1- amostra *E. faecalis* 285-5
- 2- amostra *Enterococcus* sp. 13b-1
- 3- amostra *Enterococcus* sp. 13b-2
- 4- amostra *Enterococcus* sp. 13b-3
- 5- amostra *E. faecalis* 13b-4
- 6- amostra *Enterococcus* sp. 13b-5
- 7- amostra *E. faecalis* 21c-1
- 8- amostra *E. faecalis* 21c-2
- 9- amostra *E. faecalis* 21c-3
- 10- amostra *E. faecalis* 21c-4
- 11- amostra *E. faecalis* 48-1
- 12- amostra *E. faecalis* 48-3



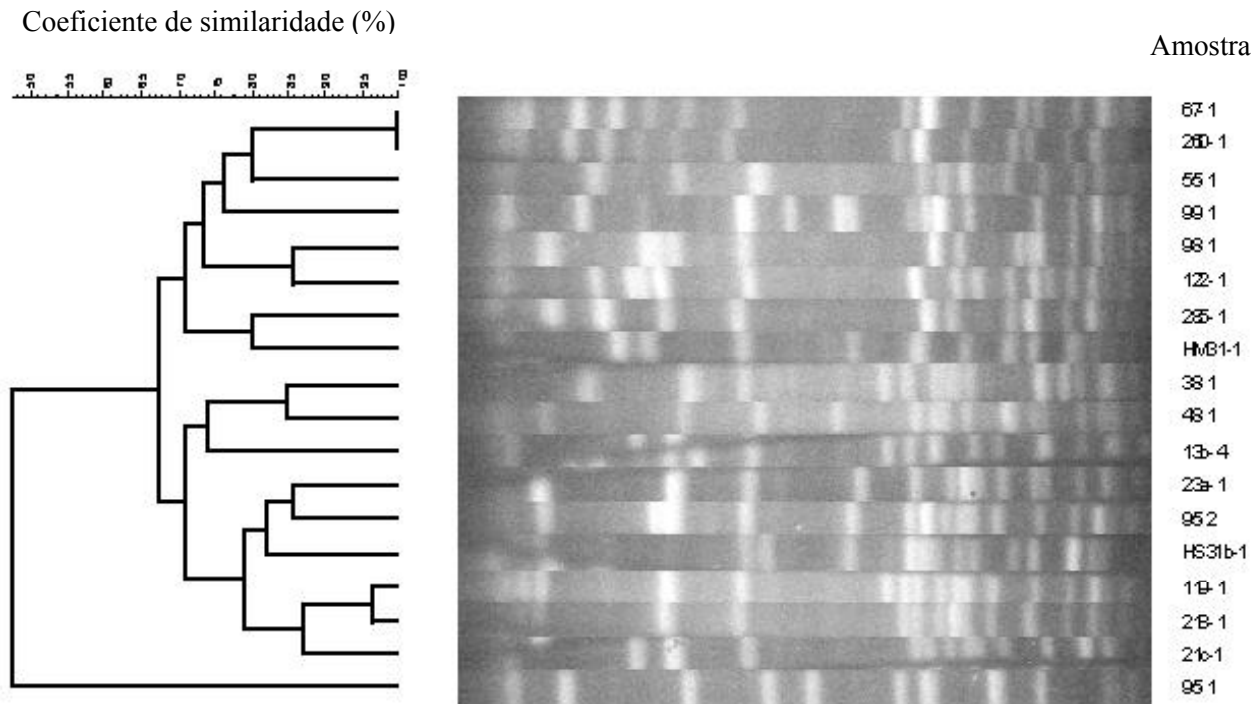
MT- Marcador de tamanho de DNA (pb)

- 13- amostra *E. faecalis* 95-1
- 14- amostra *E. faecalis* 95-2
- 15- amostra *E. faecalis* 95-3
- 16- amostra *E. faecalis* 95-4
- 17- amostra *E. faecalis* 95-5
- 18- amostra *E. faecalis* 98-1
- 19- amostra *E. faecalis* 98-2
- 20- amostra *E. faecalis* 98-3
- 21- amostra *E. faecalis* 98-4
- 22- amostra *E. faecalis* 98-5
- 23- amostra *E. faecalis* 99-1
- 24- amostra *E. faecalis* 99-2

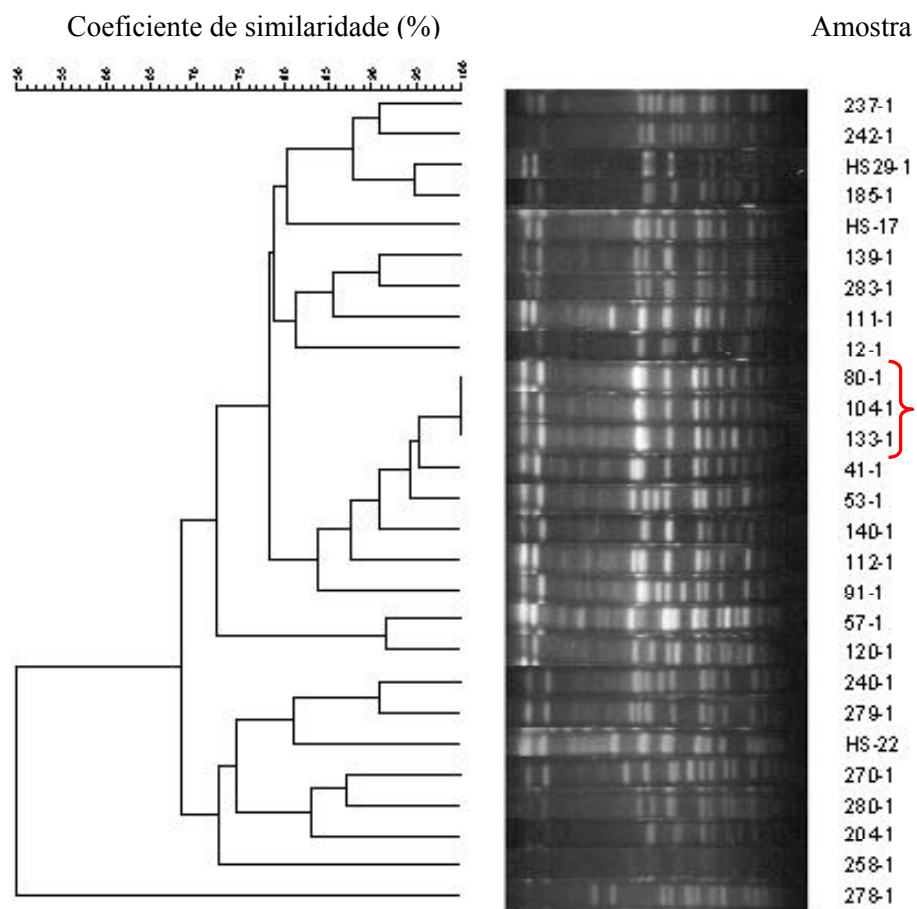
**Figura 9. Dendrograma obtido após a análise dos perfis de RAPD-PCR para as amostras *Enterococcus* sp. isoladas de ITUs na cidade do Rio de Janeiro, no período de março a novembro de 2005.**



**Figura 10. Dendrograma gerado após análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *Enterococcus faecalis* após digestão com a enzima de restrição *Sma*I.**



**Figura 11. Dendrograma gerado após análise computadorizada dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *Staphylococcus saprophyticus* após digestão com a enzima de restrição *Sma*I.**



## DISCUSSÃO

---

---

### 1. Ocorrência de ITUs comunitárias causadas por *S. saprophyticus* e espécies de *Enterococcus*

As infecções no trato urinário estão entre as infecções bacterianas mais comuns que acometem os seres humanos, contribuindo com uma alta taxa de morbidade e gerando altos custos associados à saúde (Foxman *et al*, 2000).

No presente estudo, *S. saprophyticus* foi o segundo agente etiológico mais isolado a partir das ITUs comunitárias, depois de *E. coli*. A taxa de incidência foi de 16,5%, maior do que a taxa encontrada em outros trabalhos. Por exemplo, em um estudo realizado nos Estados Unidos, a incidência de *S. saprophyticus* foi de 7% em uma clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis e 8% em um Serviço de Saúde Estudantil (Gupta *et al*, 1999). Em outro estudo realizado pela Aliança Colaborativa Norte-Americana de Infecção no Trato Urinário (NAUTICA), com amostras isoladas dos Estados Unidos e do Canadá, a frequência de isolamento de *S. saprophyticus* foi de apenas 1,2% dentre as 1990 amostras. Ainda assim, vários outros estudos mostram que este microrganismo é a segunda causa mais frequente de infecções no trato urinário em mulheres jovens, com taxas de isolamento entre 5 e 25% do total de amostras (Nicolle & Harding, 1982; Pead, Maskell & Morris, 1985; Schneider & Riley, 1996; Gupta, 2003; Raz, Colodner & Kunin, 2005).

O trato gastrointestinal é o maior reservatório de *S. saprophyticus*. Um estudo antigo demonstrou que a colonização de *S. saprophyticus* no reto, vagina e uretra estavam associados à ITU causada por este microrganismo (Latham, Running & Stamm, 1983).

Dentre as infecções causadas por enterococos, as ITUs são as infecções mais freqüentes, sendo a maioria destas de aquisição hospitalar. Entretanto, vários estudos têm demonstrado a presença de enterococos como agente etiológico em ITUs adquiridas na comunidade. Um dentre esses trabalhos, realizado na Grécia, relatou uma taxa de incidência de 5,1% de *E. faecalis* dentre o total das ITUs comunitárias (Bistori *et al*, 2005). Farrel e colaboradores, em um outro estudo realizado no Reino Unido em 2003, observaram que dentre as 397 amostras isoladas de pacientes com menos de 65 anos de idade, 3,8% foram identificadas como *E. faecalis*. Já entre as 392 amostras de pacientes com mais de 65 anos, a taxa de isolamento de *E. faecalis* foi de 5,9% nas ITUs adquiridas na comunidade. Uma taxa similar foi encontrada na Palestina em 2005, em que 5,2% das amostras causadoras das ITUs comunitárias foram representadas por *E. faecalis* (El Astal, 2005). A freqüência de isolamento de enterococos encontrada no presente estudo foi de 10,4%, maior do que as taxas encontradas em outros estudos, sendo de 9,8% para *E. faecalis* e de 0,6% para *Enterococcus* com o perfil fisiológico semelhante a *E. casseliflavus*. A ocorrência de *E. casseliflavus* em ITUs é pouco comum, porém, um trabalho realizado na Índia, em 2004, por Taneja e colaboradores, encontrou uma amostra (0,7%) de *E. casseliflavus* entre 144 amostras isoladas de ITU hospitalar e no presente estudo também foi encontrada apenas uma amostra com o perfil fisiológico semelhante a *E. casseliflavus* (0,6%) mas que não teve sua identificação confirmada (0,6%), contudo, isolada de ITU comunitária.



## 2. Identificação das amostras e diversidade de perfis bioquímicos

Apenas 27 (73,0%) dentre as 37 amostras de estafilococos coagulase negativos resistentes à novobiocina encontradas neste estudo foram confirmadas como *S. saprophyticus*, após a realização dos testes de identificação da espécie. Este resultado demonstra que outras espécies de estafilococos resistentes à novobiocina, além de *S. saprophyticus*, podem causar ITU e, como a maioria dos laboratórios de análises clínicas que não utilizam sistemas automatizados realiza apenas os testes fenotípicos de identificação presuntiva (catalase, coagulase e resistência à novobiocina) para cocos Gram-positivos causadores de ITU, talvez as taxas de ITUs causadas por *S. saprophyticus* sejam menores que as taxas que têm sido relatadas em vários estudos, e outros estafilococos coagulase-negativos tenham frequência maior.

O esquema de identificação realizado no presente estudo demonstrou ser eficaz na classificação de *S. saprophyticus*, além de ser relativamente simples, de fácil execução e de baixo custo para sua realização. Porém, para a identificação dos outros estafilococos coagulase-negativos resistentes à novobiocina, é insuficiente. De acordo com o esquema, estes últimos poderiam ser classificados como *S. cohnii subsp. cohnii*, *S. cohnii subsp. urealyticum* ou *S. xylosus*, mas ainda assim, seria necessária a realização de outros testes para a sua confirmação.

Todas as 17 amostras previamente identificadas como *Enterococcus* sp. tiveram a sua identificação confirmada ao nível de gênero. As duas espécies isoladas neste trabalho, *E. faecalis* e *Enterococcus* sp. com perfil semelhante a *E. casseliflavus*, pertencem ao mesmo grupo fisiológico (Grupo II). Uma dentre as 16 amostras identificadas como *E. faecalis* apresentou atipia no teste da hidrólise da arginina, o que já foi descrito em outros

trabalhos. Segundo Teixeira e Facklam (2003), amostras atípicas de qualquer uma das espécies do Grupo II (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. mundtii*) podem falhar na hidrólise da arginina e na produção de ácido a partir da utilização do manitol. Uma amostra de enterococos teve quatro colônias não definitivamente classificadas e uma colônia classificada como *E. faecalis*, isoladas a partir de uma mesma placa de CLED e, portanto, de um mesmo espécime clínico. Esta colônia de *E. faecalis* demonstrou atipia no teste de utilização do MGP, apresentando um resultado positivo. As colônias do *Enterococcus* não-faecalis, portanto, se fossem classificadas como *E. casseliflavus* seriam atípicas no teste da motilidade, o que ocorre em menos de 3% das amostras desta espécie (Carvalho, Teixeira & Facklam, 1998).

A metodologia utilizada para a realização dos testes propostos para a identificação das espécies de enterococos é trabalhosa e requer incubação de alguns testes por até uma semana, sendo necessária grande disponibilidade de tempo para sua realização, dependendo do número de amostras. Apesar disto, o esquema proposto demonstrou ser eficaz e adequado para a identificação dos enterococos.

### **3. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos**

Os dados deste estudo demonstraram que apenas uma amostra (3,7%) de *S. saprophyticus* foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Dentre as amostras resistentes (96,3%), 74,1% apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos e 22,2% foram resistentes a apenas um antimicrobiano. Assim como em outros trabalhos de avaliação da susceptibilidade de amostras de *S. saprophyticus* aos antimicrobianos, neste estudo, as taxas de resistência foram baixas para a maioria dos antimicrobianos testados,

com exceção da oxacilina, cefoxitina, trimetoprim-sulfametoxazol e ampicilina cujas taxas foram de 96,3%, 74%, 37% e 22,2%, respectivamente. Para os antimicrobianos gentamicina, norfloxacin e ciprofloxacina, apenas 3,7% das amostras apresentaram resistência.

Gupta e colaboradores (1999), em um trabalho de prevalência da resistência antimicrobiana entre uropatógenos isolados de mulheres jovens de duas diferentes instituições de saúde, encontraram entre 82 amostras de *S. saprophyticus*, 13,4% de resistência à ampicilina, 23,4% de resistência à tetraciclina, 1,5% de resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol e 1% de resistência à cefalotina, porém, nenhuma amostra foi resistente à nitrofurantoína e à fluoroquinolona. Em um trabalho realizado com amostras de ITU de países da Europa e Canadá, todas as 116 amostras de *S. saprophyticus* analisadas apresentaram resistência aos antimicrobianos mecilinam, ácido nalidíxico e fosfomicina, para os quais tem sido relatada a resistência intrínseca de *S. saprophyticus*, 1,7% de amostras resistentes à ampicilina, 4,3% à gentamicina e 100% das amostras sensíveis ao trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina e nitrofurantoína (Kahlmeter, 2003).

Os resultados obtidos através da realização da técnica de diluição em ágar para a determinação da concentração mínima inibitória da oxacilina para as amostras de *S. saprophyticus* confirmou os resultados obtidos através da disco-difusão, com 26 amostras resistentes à oxacilina.

Uma amostra de enterococos foi sensível a todos os antimicrobianos testados e, as outras 16 amostras apresentaram resistência a pelo menos um dentre os seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, norfloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, gentamicina e estreptomicina de altos níveis e nitrofurantoína.

Para os aminoglicosídeos foram encontradas 29,4% das amostras resistentes a altos níveis de estreptomicina e 11,7% resistentes a altos níveis de gentamicina. Essas taxas foram baixas, se comparadas com aquelas encontradas em outros estudos, como em um estudo realizado na Espanha com 558 amostras de *Enterococcus faecalis* isolados de ITU comunitária, foram relatadas taxas de 58% de amostras resistentes à estreptomicina e 81% resistentes à gentamicina (Causse *et al*, 2006).

A resistência à ciprofloxacina, assim como às outras fluoroquinolonas tem aumentado, desde a sua introdução como terapia empírica para o tratamento de ITUs. Tem sido relatado em vários estudos o aumento da resistência de amostras de *Enterococcus* sp. à ciprofloxacina, como demonstrado por El Astal (2005), em um estudo realizado com amostras isoladas de ITUs, uma taxa de 9,1% de amostras de *E. faecalis* resistentes a este antimicrobiano. No presente estudo, a taxa de resistência à ciprofloxacina foi de 88,2% para as amostras de *Enterococcus* sp., sendo 82,3% para *E. faecalis*, similar à taxa encontrada em um estudo realizado na China em que 61,5% das amostras de *Enterococcus* sp. apresentou resistência a este antimicrobiano (Shao *et al*, 2003). Diante dessa resistência tão elevada, deve-se restringir o uso de ciprofloxacina para o tratamento empírico de ITUs comunitárias causadas por amostras de *Enterococcus* sp. na cidade do Rio de Janeiro. Contudo, novos estudos de avaliação da susceptibilidade, não só dos enterococos, como das outras espécies principais causadoras de ITU aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento destas infecções são necessários, a fim de se ter um conhecimento mais amplo e real sobre a resistência de tais amostras, não só no Rio de Janeiro, como em todo o Brasil, para conduzir o tratamento das ITUs.

#### 4. Avaliação da diversidade genética através de RAPD-PCR e PFGE

Através das técnicas de RAPD-PCR e de PFGE foi possível observar uma grande diversidade genética entre as amostras de *Enterococcus* incluídas neste estudo. No RAPD-PCR realizado para as 81 colônias de *Enterococcus* foi possível observar que duas amostras apresentaram variação genotípica entre as colônias. Uma delas apresentou duas espécies diferentes de *Enterococcus*, *E. faecalis* e *Enterococcus* com perfil semelhante a *E. casseliflavus*, a partir de um mesmo espécime clínico e a outra amostra teve as cinco colônias com o mesmo perfil fenotípico, mas uma das colônias apresentou perfil de bandas diferente das outras. Esse resultado foi comparável ao encontrado em um estudo de avaliação da policlonalidade de bacteremias causadas por amostras de estafilococos coagulase-negativos, em que nove colônias de cada amostra que teve hemocultura positiva foram selecionadas e isoladas. Através da tipagem por PFGE foram encontradas algumas variações nos perfis de bandas entre as colônias e concluiu-se que, na maioria dos casos, as variações representaram contaminação e em poucos casos ocorreu bacteremia policlonal (Sharma *et al*, 2001).

Através do RAPD-PCR e PFGE realizados para as 18 colônias de *E. faecalis* que apresentaram perfis de bandas diferentes no RAPD-PCR para as 81 colônias, observou-se que duas colônias, isoladas de diferentes pacientes, apresentaram perfis de bandas idênticos, demonstrando a ocorrência de ITU comunitária em dois pacientes causadas pelo mesmo clone.

Similar ao observado para os *Enterococcus*, a análise do PFGE realizado para as 27 amostras de *S. saprophyticus* possibilitou a observação de três amostras com perfis de bandas idênticos, demonstrando serem o mesmo clone.

Não há dados no Brasil nem no mundo, sobre ocorrência de ITUs comunitárias causadas por um mesmo clone entre amostras de *S. saprophyticus* e de *Enterococcus* sp., portanto, é necessária a realização de mais estudos, com um número maior de amostras a fim de verificar a clonalidade entre as ITUs comunitárias causadas por estes microrganismos.

## CONCLUSÕES

---

---

- ✓ Os dados deste estudo confirmaram que *S. saprophyticus* é o segundo agente etiológico mais freqüente de ITU comunitária e que os *Enterococcus*, apesar de menos freqüentes, são importantes agentes etiológicos de ITU comunitária;
- ✓ As altas taxas de resistência à ciprofloxacina entre as amostras de *Enterococcus* encontradas neste estudo sugerem que deve-se restringir o uso deste antimicrobiano para o tratamento empírico de infecções urinárias de origem comunitária causadas por estes microrganismos na cidade do Rio de Janeiro;
- ✓ As variações genótípicas encontradas entre as colônias isoladas de cada amostra de *Enterococcus* sugerem que mais de um clone pode estar envolvido em uma ITU comunitária;
- ✓ O RAPD-PCR e PFGE são técnicas eficazes para a tipagem de amostras de *Enterococcus* sp.;
- ✓ Foi encontrada uma grande diversidade de genótipos, tanto entre as amostras de *S. saprophyticus* quanto entre as amostras de *E. faecalis*. Entretanto, algumas amostras, tanto uma espécie quanto de outra, isoladas de diferentes pacientes em diferentes regiões geográficas, apresentaram 100% de similaridade entre os genótipos, demonstrando a possibilidade de existência de uma fonte comum para amostras destas espécies que causam ITU na comunidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- Aznar, E., Buendía, B., García-Peñuela, E., Escudero, E., Alarcón, T. & López-Brea, M. 2004. Community-acquired urinary tract infection caused by vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate. *Rev. Esp. Quimioterap.* **17 (3)**: 263-265.
- Bannerman, T. L. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically*. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C. & Tenover, R. H. *Manual of Clinical Microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. ASM Press. p. 384-404.
- Barza, M. Trato Urinário. 2002. In: *Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas*. Schaechter, M., Engleberg, N. C., Eisenstein, B. I. & Medoff, G. 3<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 505-512.
- Bingen, E. H., Denamur, E., Lambert-Zechovsky, N. Y. & Elion, J. 1991. Evidence for the genetic unrelatedness of nosocomial vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains in a pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* **29 (9)**: 1888-1892.
- Bistori, M., Maraki, S., Raissaki, M., Bakantaki, A. & Galanakis, E. 2005. Community-acquired enterococcal urinary tract infections. *Pediatr. Nephrol.* **20 (11)**: 1583-1586.
- Boyce, J. M., Opal, S. M., Chow, J. W., Zervos, M. J., Potter-Bynoe, G., Sherman, C. B., Romulo, R. L., Fortna, S. & Medeiros, A. A. 1994. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **32 (5)**: 1148-1153.



- Bruinsma, N., Willems, R. J. L., Van den Bogaard, A. E., Van Santen-Verheuevel, M., London, N. Driessen, C. & Stobberingh, E. E. 2002. Different levels of genetic homogeneity in vancomycin-resistant and -susceptible *Enterococcus faecium* isolates from different human and animal sources analyzed by amplified-fragment length polymorphism. antimicrob agents chemother. **46 (9)**: 2779-2783.
- Buchanan, R. E. & Gibson, N. E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore, Williams & Wilkins. p. 478-489.
- Carvalho, M. G. S., Teixeira, L. M. & Facklam, R. R. 1998. Use of tests for acidification of methyl- $\alpha$ -d-glucopyranoside and susceptibility to efrotomycin for differentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera. J. Clin. Microbiol. **36 (6)**: 1584-1587.
- Causse, M., De Luna, F. F. A., García-Mayorgas, A. D., Rodríguez, F. C. & Casal, M. 2006. Sensibilidad a los antimicrobianos de *Enterococcus faecalis* aislados de pacientes en la provincia de Córdoba (España). Rev. Esp. Quimioterap. **19 (2)**: 140-143.
- Cespedes, C., Saïd-Salim, B., Miller, M., Lo, S., Kreiswirth, B. N., Gordon, R. J., Vavagiakis, P., Klein, R. S. & Lowy, F. D. 2005. The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. J. Infect. Dis. **191**: 444-452.
- Cetinkaya, Y., Falk, P. & Mayhall, C. G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. Clin. Microbiol. Rev. **13 (4)**: 686-707.
- Chambers, H. F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. **10**: 781-791.
- Chow, J. W., Thal, L. A., Perri, M. B., Vazquez, J. A., Donabedian, S. M., Clewell, D. B. & Zervos, M. J. 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation

substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 2474-247.

- Clevel, D. B. 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**: 90-102.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fifteenth Information Supplement. CLSI, **25 (1)**.
- Daza, R., Gutiérrez, J. & Piérdola, G. 2001. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **18**:211-215.
- De Paulis, A. N., Predari, S.C., Chazarreta, C. D. & Santoianni, J. E. 2003. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **41 (3)**: 1219-1224.
- Dunne, W. M. & Wang, W. 1997. Clonal dissemination and colony morphotype variation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in metropolitan Detroit, Michigan. *J. Clin. Microbiol.* **35 (2)**: 388-392.
- El Astal, Z. 2005. Increasing Ciprofloxacin Resistance Among Prevalent Urinary Tract Bacterial Isolates in Gaza Strip, Palestine. *J. Biomed. Biotech.* **2005 (3)**: 238-241.
- Engelbert, M., Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Calderwood, S. B. & Gilmore, M. S. 2004. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* **72 (6)**: 3628-3633.

- Facklam, R. R. & Collins, M. D. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* **27** (4): 731-734.
- Farrel, D. J., Morrissey, I., De Rubeis, D, Robbins, M. & Felmingham, D. 2003. A UK multicentre study of the antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. *Journal of Infection.* **46**: 94-100.
- Felmingham, D., Wilson, A. P. R., Quintana, A. I. & Gruneberg, R. N. 1992. *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 295-301.
- Ferreira, R. B. R., Iorio, N. L. P., Malvar, K. L., Nunes, A. F., Fonseca, L. S., Bastos, C. C. R. & Santos, K. R. N. 2003. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility testes and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *J. Clin. Microbiol.* **41** (8): 3609-3614.
- Ferreira, R. B. R., Nunes, A. P. F., Kokis, V. M., Krepsky, N., Fonseca, L. S., Bastos, M. C. F., Giambiagi-deMarval, M. & Santos, K., R. N. 2002. Simultaneous detection of the *mecA* and *ileS-2* genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian hospitals by multiplex PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **42**: 205-212.
- Fowler, J. E. 1985. *Staphylococcus saprophyticus* as the cause of infected urinary calculus. *Ann. Intern. Med.* **102**: 342-343.
- Foxman, B., Barlow, R., Darcy, H., Gillespie, B. & Sobel, J. D. 2000. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann. Epidemiol.* **10** (8): 509-515.

- Freitas, M. C. S., Silva, A. P., Barbosa, D., Silbert, S., Sader, H., Sesso, R. & Camargo, L. F. A. 2006. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization among kidney transplant patients. *BMC Infect Dis.* **6**: 133-139.
- Gales, A. C., Jones, R. N., Gordon, K. A., Sader, H. S., Wilke, W. W., Beach, M. L., Pfaller, M. A., Doern, G. V. & the SENTRY Study Group (Latin America). 2000. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in latin america: report from the second year of the sentry antimicrobial surveillance program (1998). *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 295-303.
- Garsin, D. A., C. D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K. V. Singh, B. E. Murray, S. B. Calderwood, & F. M. Ausubel. 2001. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:10892-10897.
- Gatermann, S. G. 1986. Virulence factors of *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, and enterococci. In: Mobley, H. L. T., Warren, J. W. eds. *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. Washington, DC: ASM Press. p. 313-340.
- Gatermann, S. G., Kreft, B. Marre, R. & Wanner, G. 1992. Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect. Immun.* **60**: 1055-1060.
- Gupta, K., Hooton, T. M., Wobbe, C. L. & Stamm, W. E. 1999. The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **11**: 305-308.
- Gupta, K. 2003. Addressing antibiotic resistance. *Dis. Mon.* **49 (2)**: 99-110.
- Hackbarth, C. J. & Chambers, H. F. 1989. Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33 (7)**: 991-994.

- Hangcock, L. E. & Gilmore, M. S. 2000. Pathogenicity of enterococci. In Fischetti, V., Novick, R., Ferretti, J., Portnoy, D. & Rood, J. (eds) Gram-Positive Pathogens. ASM Press. p. 251-258.
- Hell, W., Meyer, H. W. and Gatermann, S. G. 1998. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. Molec. Microbiol. **29 (3)**: 871-881.
- Higashide, M., Kuroda, M., Ohkawa, S. & Ohta, T. 2006. Evaluation of a ceftioxin disk diffusion test for the detection of *mecA*-positive methicillin *Staphylococcus saprophyticus*. Int. J. Antimicrobial Agents. **27**: 500-504.
- Hiramatsu, K. 1995. Molecular evolution of MRSA. Microbiol. Immunol. **39**: 531-543.
- Hooton, T. M. 2001. Recurrent urinary tract infection in women. Int. J. Antimicrobial Agents. **17**: 259-268.
- Hooton, T. M. 2003. The current management strategies for community-acquired urinary tract infection. Infect. Dis. Clin. North Amer. **17**: 303-332.
- Hussain, Z., Stoakes, L, Massey, V. Diagre, D., Fitzgerald, V., El Sayed, S. & Lannigan, R. 2000. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. **38 (2)**: 752-754.
- Ishihara, S., Yokoi, S., Ito, M., Kobayashi, S. & Deguchi, T. 2001. Pathologic significance of *Staphylococcus saprophyticus* in complicated urinary tract infections. Urology **57 (1)**: 17-20.

- Issack, M. I., Power, E. G. M. & French, G. L. 1996. Investigation of an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *J. Hosp. Infect.* **33 (3)**: 191-200.
- Ito, T., Katayama, Y. & Hiramatsu, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1449-1458.
- Kahlmeter, G. 2003. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *J. Antimicrobial Chem.* **51**: 69-76.
- Kalina, A. P. 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 185-189.
- Karlowsky, J. A, Jones, M. E., Thornsberry, C., Critchley, I., Kelly, L. J. & Sahm, D. F. 2001. Prevalence of antimicrobial resistance among urinary tract pathogens isolated from female outpatients across the US in 1999. *Int. J. Antimicrobial Agents.* **18**: 121-127.
- Katayama, Y., Ito, T. & Hiramatsu, K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44 (6)**: 1549-1555.
- Kaye, 1982. Enterococci: biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Arch. Intern. Med.* **142**: 2006-2009.
- Kloos, W. E. & Schleifer, K. H. 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **1 (1)**: 82-88.

- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H., Kuhara, S., Hattori, M. & Ohta, T. 2005. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS). **102 (37)**: 13272-13277.
- Lancefield, R. C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med. **57**: 571-595.
- Lang, S., Livesley, M. A., Lambert, P. A., Elliott, J. & Elliott, T. S. 1999. The genomic diversity of coagulase-negative staphylococci associated with nosocomial infections. J. Hosp. Infect. **43 (3)**: 187-193.
- Latham, R. H., Running, K. & Stamm, W. E. 1983. Urinary tract infections in young adult women caused by *Staphylococcus saprophyticus*. J. Am. Med. Assoc. **250 (22)**: 3063-3066
- Lecqlerc, R. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. Clin. Infect. Dis. **24 (Suppl.1)**: S80-S84.
- Lopes, H. V. & Tavares, W. 2005. Diagnóstico das infecções do trato urinário. Ver. Assoc. Med. Bras. **51 (6)**: 301-12.
- Marangoni, D. V., Soares, C. R. & Moreira, B. M. 2001. Infecções do Trato Urinário. In: Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. Schechter, M. & Marangoni, D. V. 2<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. cap. 15.
- Marrie, T. J. & Kwan, C. 1982. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus saprophyticus* and urethral staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. **22 (3)**: 395-397.

- Mitchell, R. G. 1968. Classification of *Staphylococcus albus* strains isolated from the urinary tract. J. Clin. Pathol. **21**: 93-96.
- Mondino, S. S., Castro, A. C., Mondino, P. J., Carvalho, M. G., Silva, K. M. & Teixeira, L. M. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals. Microb Drug Resist. **9 (2)**: 167-174.
- Moreira, E. D., Siqueira, I. C., Alcântara, A. P., Guereiro, M. C. G., Carvalho, W. A. & Riley, L. 2006. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains causing community-acquired urinary tract infections among insured and uninsured population in a large urban center. J. Chemother. **18 (3)**: 255-260.
- Morrison, D., Woodford, W. & Cookson, B. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. J. appl. Microbiol. Symp. Suppl. **83**: S89-S99.
- Murray, B. E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. **3 (1)**: 46-65.
- Murray, B. E. 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerg. Infect. Dis. **4 (1)**: 37-47.
- Murray, B. E. 1999. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N. Engl. J. Med. **342**: 710-721.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S. & Pfaller, M. A. 2004. Microbiologia Médica. 4<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 188.



- Nallapareddy, S. R., Duh, R. W., Singh, K. V. & Murray, B. E. 2002. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **40** (3): 868-876.
- Nicolle, L. E. & Harding, G. K. M. 1982. Susceptibility of clinical isolates of *Staphylococcus saprophyticus* to fifteen commonly used antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22** (5): 895-896.
- Pacheco, A. B. F., Guth, B. E. C., Soares, K. C. C., Nishimura, L., De Almeida, D. F. & Ferreira, L. C. S. 1997. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1521-1525.
- Pegues, D., Pegues, C. F., Hibberd, P. L., Ford, D. S. & Hooper, D. C. 1997. Emergence and dissemination of a highly vancomycin-resistant vanA strain of *Enterococcus faecium* at a large teaching hospital. *J Clin Microbiol.* **35** (6): 1565-1570.
- Pead, L., Maskell, R. & Morris, J. 1985. *Staphylococcus saprophyticus* as a urinary pathogen: a six year prospective survey. *British Medical Journal.* **291**: 1157-1159.
- Pereira, A. T. 1962. Coagulase negative strains of *Staphylococcus* possessing antigen 51 as agents of urinary infection. *J. Clin. Pathol.* **15**: 252-253.
- Ramotar, K., Woods, W. & Toye, B. 2001. Oxacillin susceptibility testing of *Staphylococcus saprophyticus* using disk diffusion, agar dilution, broth microdilution, and the Vitek GPS-105 card. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **40** : 203-205.
- Raz, R. 2001. Postmenopausal women with recurrent UTI. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **17**: 269-271.

- Raz, R., Colodner, R & Kunin, C. M. 2005. Who Are You – *Staphylococcus saprophyticus*? -Brief report. Clin. Infect. Dis. **40**: 896-898.
- Rijnders, B. J. A., Van Wijngaerden, E., Van Eldere, J. & Peetermans, W. E. 2001. Polyclonal *Staphylococcus epidermidis* intravascular catéter-related infections. Clin. Microbiol. Infect. **7**: 388.
- Ronald, A. M. D. 2002. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. The American Journal of Medicine. **113 (1A)**: 14S-19S.
- Ronald, A. R., Nicolle, L. E., Stamm, E., Krieger, J., Warren, J., Schaeffer, A., Naber, K. G., Hooton, T. M., Johnson, J., Chambers, S. & Andriole, V. 2001. Urinary tract infection in adults: research priorities and strategies. Int. J. Antimicrobial Agents. **17**: 343-348.
- Sader, H. C., Gales, A. C., Pfaller, M. A., Mendes, R. E., Zoccoli, C., Barth, A. & Jones, R. N. 2001. Pathogen frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from tree years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. braz. J. Infect. Dis. **5**: 200-214.
- Sahm, D. F., Kissinger, J., Gilmore, M. S., Murray, P. R., Mulder, R., Solliday, J & Clarke, B. 1989. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. **33 (9)**: 1588-1591.
- Sakinc, T., Woznowski, M., Ebsen, M. & Gatermann, S. G. 2005. The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. Infect. Immun. **73 (10)**: 6419-6428.
- Sakinc, T., Kleine, B. & Gatermann, S. G. 2006. Sdr I, a serine-aspartate repeat protein identified in *Staphylococcus saprophyticus* strain 7108, is a collagen-binding protein. Infect. Immun. **74 (8)**: 4615-4623.

- Schaeffer, A. J., Rajan, N., Cao, Q., Anderson, B.E., Pruden, D. L., Sensibar, J. & Duncan, J. L. 2001. Host pathogenesis in urinary tract infections. *Int. J. Antimicrobial Agents*. **17**: 245-251.
  
- Schleifer, K. H. & Kilpper-Baltz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 31-34.
  
- Schneider, P. F. & Riley, T. V. 1996. *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections: epidemiological data from Western Australia. *Eur. J. Epidemiol.* **12 (1)**: 51-54.
  
- Scholes, D., Hooton, T. M., Roberts, P. L., Stapleton, A. E., Gupta, K & Stamm, W. E. 2000. Risk factors for recurrent UTI in young women. *J. Infect. Dis.* **182**: 1177-1182.
  
- Shao, H. F., Wang, W. P., Zhang, X. W. & Li, Z. D. 2003. Distribution and resistance trends of pathogens from urinary tract infections and impact on management. *Zhonghua Nan Ke Xue.* **9 (9)**: 690-692.
  
- Sharma, M., Riederer, K., Johnson, L. B. & Khatib, R. 2001. Molecular analysis of coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from blood cultures: prevalence of genotypic variation and polyclonal bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 1317-1323.
  
- Shittu, A., Lin, J., Morrison, D. & Kolawole, D. 2006. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. *J. Med. Microbiol.* **55**: 317-324.

- Snopkova, S., Gotz, F., Doskar, J. & Rosypal, S. 1994. Pulsed-field gel electrophoresis of the genomic restriction fragments of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **124 (2)**: 131-139.
- Stratton, C. W., Gelfand, M. S., Gerberding, J. L. & Chambers, H. F. 1990. Characterization of mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus saprophyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34 (9)**: 1780-1782.
- Taneja, N., Rani, P., Emmanuel, R. & Sharma, M. 2004. Significance of vancomycin resistant enterococci from urinary specimens at a tertiary care centre in northern India. *Indian. J. Med. Res.* **119 (2)**: 72-74.
- Teixeira, L. M., Carvalho, M. G. S., Merquior, V. L. C., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. & Facklam, R. R. 1997. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2778-2781.
- Teixeira, L. M. & Facklam, R. R. 2003. Enterococcus. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A. & Tenover, R. C. *Manual of Clinical Microbiology*. 8<sup>th</sup> ed. ASM Press. p. 422-433.
- Van Eldere, J., Peetermans, W. E., Struelens, M., Deplano, A. & Bobbaers, H. 2000. Polyclonal staphylococcal endocarditis caused by genetic variability. *Clin. Infect. Dis.* **31**: 24-30.
- Von Eiff, C., Peters, G. and Heilmann, C. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *The Lancet Infect. Dis.* **2**: 677-685.

- Wallmark, G., Arremark, I. & Telander, B. 1978. *Staphylococcus saprophyticus* : A frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. J. Infect. Dis. **138 (6)**: 791-797.
- Welsh. J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. **18(24)**: 7213–7218.
- York, M. K., Gibbs, L., Cheahab, F. & Brooks, G. F. 1996. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. **34 (2)**: 249-253.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)