

Estudo do perfil de susceptibilidade antimicrobiana e avaliação molecular de amostras de *Enterococcus* spp isoladas de pacientes hospitalizados

João Bedendo^{1*}, Vera Lucia Dias Siqueira², Celso Luis Cardoso² e Sueli Donizete Borelli²

¹Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: jbedendo@maringa.com.br

RESUMO. Neste estudo foi investigado o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e avaliação molecular de amostras de *Enterococcus* spp, isoladas de urina, secreção purulenta, sangue e ferida cirúrgica de pacientes do Hospital Universitário de Maringá, estado do Paraná, no período entre 1998 e 2000. As amostras foram avaliadas quanto à susceptibilidade a drogas, tipificadas através de JB1-PCR e investigadas quanto à presença de gene Van A e Van B. Das 58 amostras, 98,3% foram classificadas como *Enterococcus faecalis*. Todas as amostras foram sensíveis à nitrofurantoína e vancomicina, 96,6% sensíveis à ampicilina, 32,8% foram resistentes à estreptomicina, 10,3% resistentes à gentamicina e ciprofloxacina e 6,9% resistentes a norfloxacina. Por meio do teste de CIM, para vancomicina, observou-se crescimento bacteriano até a concentração de 4µg/ml. Não foi detectada a presença de gene Van A e Van B. A amplificação por JB1-PCR proporcionou padrões de bandas com até 7 fragmentos sendo as amostras divididas em 6 grupos distintos. Não houve prevalência de algum padrão de bandamento que denotasse a presença de um clone e não foi possível estabelecer correlação entre genótipo com resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: *Enterococcus* spp, PCR, Antibiograma, resistência bacteriana.

ABSTRACT. Study of drugs susceptibility and molecular samples evaluation of *Enterococcus* spp isolated in hospitalized patients. The aim of this study was to investigate the prevalency of *Enterococcus* spp, isolated from different clinical materials. The strains were evaluated for drugs susceptibility, typing by JB1-PCR and screened to the presence of Van A and Van B gene. From the 58 strains, 98.3% were classified as *Enterococcus faecalis*. All strains were sensible to nitrofurantoin and vancomycin, 96.6% were sensible to ampicilin, 32.8% were resistant to streptomycin, 10.3% were resistant to gentamicin and ciprofloxacin and 6.9% were resistant to norfloxacin. Using CIM test to check vancomycin susceptibility was observed bacterial growth until 4µg/ml. The presence of Van A e Van B gene was not detected. The amplification by JB1-PCR provided band patterns with up to 7 fragments and the samples were classified into 6 distinct groups. The band patterns did not point out prevalence of any clone disseminated among strains. It was not possible to correlate genotype with antimicrobial resistance.

Key words: *Enterococcus* spp, PCR, antibiogram, bacterial resistance.

Introdução

Enterococos não são particularmente virulentos quando comparados com outros microrganismos da microbiota intestinal (Goldmann, 1992; Gordts *et al.*, 1995). Entretanto, sua capacidade de causar doenças em pacientes imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos hospitalizados tem levado ao reconhecimento de sua importância na etiologia de

infecções hospitalares, entre as quais urinárias, bacteremias, endocardites e septicemias neonatais (Willey *et al.*, 1992; Morrison *et al.*, 1997). A identificação de enterococos, em nível de espécie, envolve a realização de vários testes laboratoriais para se determinar características bioquímicas inerentes a cada espécie. Eles são tolerantes a altas temperaturas, desinfetantes e antimicrobianos, o que os tornam

difíceis de serem erradicados do ambiente hospitalar (Chenoweth e Schaberg, 1990; Scott, 2000).

Os enterococos geralmente são intrinsicamente multirresistentes a antimicrobianos e a emergência destas cepas tem diminuído as opções terapêuticas, levando ao surgimento de infecções graves (Goldmann, 1992; Willey et al., 1992; Pasquarella et al., 1997; Chiew e Hall, 1998; Scott, 2000).

O estudo da susceptibilidade bacteriana às drogas antimicrobianas tem sido tradicionalmente feito a partir do teste de difusão em ágar pelo sistema de disco. Essa técnica, entretanto, pode apresentar falhas quando se trata de identificar resistência à vancomicina em isolados de enterococos (Tenover et al., 1995). O *National Committee for Clinical Laboratory Standards - M2-A5 (NCCLS/2000)* recomenda que o estudo de susceptibilidade aos antimicrobianos, particularmente à vancomicina, deve ser realizado através de técnicas que envolvem a incorporação da droga em meio nutritivo.

Entre as técnicas genotípicas que possibilitam a detecção dos genes de resistência às drogas antimicrobianas, têm sido destacada a “reação em cadeia da polimerase” (PCR). Nessa metodologia, primers específicos são empregados para amplificar segmentos da molécula de DNA do gene de resistência presente no genoma bacteriano (Free e Sahn, 1996; Sader et al., 1994; Tenover et al., 1995; Gordts, 1995; Sahn e Gilmore, 1995; Swenson et al., 1995; Coque et al., 1996).

A vigilância epidemiológica das enterococcias inclui o emprego de métodos de tipagem bacteriana. Métodos fenotípicos tradicionais, tais como: antibiograma, biotipagem, fagotipagem e sorotipagem, freqüentemente não apresentam suficiente poder discriminatório (Pfaller, 1993; Issack et al., 1996) e são dependentes de condições ambientais (Moura, 2000). Os métodos genotípicos, por sua vez, são menos limitados e podem ser aplicados para o estudo de uma ampla variedade de espécies de microrganismos sem que haja necessidade de grandes variações nos equipamentos (Mercier et al., 1996; Pasquarella et al., 1997; Chenoweth e Schaberg, 1990; Morrison et al., 1997).

A presença de polimorfismo na molécula de DNA genômico é um marcador importante na distinção de estirpes de uma mesma espécie bacteriana (Hall, 1994). A detecção desse polimorfismo pode ser feita entre outros métodos com o emprego da técnica de PCR, utilizando-se seqüências repetitivas (Mercier et al., 1996). Essas seqüências, também denominadas de seqüências repetitivas palindrômicas, foram inicialmente descobertas em bactérias entéricas e recentemente

foram encontradas também no genoma de outros gêneros e espécies bacterianas (Versalovic et al., 1991; Tyler et al., 1997). Este estudo teve como objetivo estudar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, usualmente empregados na prática clínica para o gênero *Enterococcus spp.*, isolados de pacientes hospitalizados, além de pesquisar a presença dos genes Van A e Van B no genoma bacteriano por meio da técnica de PCR conforme metodologia proposta por Free e Sahn (1996). As amostras de enterococos foram também tipificadas por meio da técnica de PCR, empregando-se o oligonucleotídeo JB1 (Bedendo e Pignatari, 2000).

Material e métodos

Amostras bacterianas. Neste estudo foram analisadas 58 cepas de *Enterococcus spp.* isoladas de urina, secreção purulenta, sangue, ferida cirúrgica de pacientes internados no Hospital Universitário de Maringá, estado do Paraná, no período entre 1998 e 2000. As amostras foram inicialmente semeadas em meios de cultivo e, a seguir, caracterizadas pela coloração de Gram e identificadas bioquimicamente conforme sistema de identificação proposto por Murray et al., (1999), sendo realizadas as provas de produção de catalase; hidrólise da bile esculina; tolerância ao NaCl à 6,5%, crescimento a 45°C e a 10°C; resistência à vancomicina (30µg); produção de hemólise em ágar sangue de carneiro; utilização dos açúcares manitol, sacarose, sorbitol, rafinose, arabinose e adonitol; hidrólise da arginina; produção de pigmento; motilidade; utilização de piruvato e crescimento em 0,04% de telurito de potássio.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. A susceptibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos, usualmente empregados na rotina clínica, foi feita pelo teste de difusão em ágar pelo sistema de discos (Bauer et al., 1966), utilizando-se discos impregnados com ampicilina (10µg), vancomicina (30µg), nitrofurantoína (300µg), norfloxacin (10µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (120µg), estreptomicina (300µg). Os antimicrobianos norfloxacin, ciprofloxacina e nitrofurantoína foram testados apenas para as amostras obtidas de urina. A escolha dos antimicrobianos foi feita de acordo com os critérios estabelecidos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards M2-A5 (NCCLS/2000)*. Para a vancomicina realizou-se também o teste de “determinação da concentração inibitória mínima (CIM)” em meio sólido, conforme proposto por Willey et al. (1992). A identificação dos genes de resistência Van A e Van B foi realizada por meio da

técnica de PCR, conforme metodologia proposta por Free e Sahm (1996).

Preparação do DNA. As 58 amostras de *Enterococcus* spp foram inicialmente suspensas em Trypticase Soy Broth (TSB), incubadas a 37°C por 18 horas e, a seguir, plaqueadas em ágar sangue, ficando incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, 2 a 5 colônias isoladas foram transferidas para Broth Heart Infusion (BHI) e após 18 horas de incubação a 37°C, alíquotas foram semeadas, com auxílio de alça, em ágar sangue e incubadas novamente a 37°C por 48 horas. Em tubos Eppendorf, contendo 500µL de água deionizada estéril foram adicionadas 5 colônias de cada amostra as quais foram, a seguir, fervidas por 10 minutos, submetidas a banho de gelo por 15 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos. Aproximadamente 100µL do sobrenadante obtido foi transferido para tubos Eppendorf e estocado a -20°C.

Análise molecular. A tipagem das amostras de *Enterococcus* spp foi realizada por meio da técnica de PCR, empregando-se como iniciador o oligonucleotídeo JB1 5' GATTTTATGGCGTCCGC 3' (Bedendo e Pignatari, 2000). Na quantidade de 5 microlitros, de sobrenadante da cultura obtida por fervura e centrifugação, contendo o DNA molde, foi adicionado aos demais reagentes necessários à reação de amplificação, a qual foi desenvolvida conforme descrito em Bedendo e Pignatari (2000). A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose; 1,5% (Sigma), os produtos foram corados com brometo de etídio (10mg / mL) e submetidos a 100 volts por 3,5 horas.

Critérios usados para análise de similaridade entre as cepas

Considerou-se que dois ou mais padrões de bandas foram idênticos quando apresentaram o mesmo número de fragmentos de idênticos pesos moleculares. O agrupamento das amostras, de acordo com a similaridade nos padrões de bandas, foi realizado empregando-se o método de UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetical averages*). O coeficiente de similaridade simples obtido por meio do programa NTSYS (*Numerical taxonomy system of multivariate programs*), foi utilizado para se obter um dendrograma a partir dos dados de similaridade.

Resultados e discussão

As 58 amostras de *Enterococcus* spp. isoladas foram provenientes de urina (32), de secreção purulenta (18), de hemocultura (4) e de feridas cirúrgicas (4). A maioria dos isolados, 98,3% (57/58), foi representada por *Enterococcus faecalis*, havendo o isolamento de apenas uma amostra (n. 152) de *Enterococcus avium* (1/58). Esses resultados corroboram as citados pela literatura, que identifica os *enterococcus* spp como importantes patógenos relacionados à etiologia das infecções urinárias e os *Enterococcus faecalis* a espécie mais comumente isolada neste tipo de infecção (Stern *et al.*, 1994; Cereda, 1996; Scott, 2000). Os resultados do teste de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, realizados pelo teste de difusão em ágar pelo sistema de disco, mostraram que 96,6% (56/58) das amostras foram sensíveis à ampicilina e todas aquelas isoladas de urina apresentaram sensibilidade à nitrofurantoína. Das 32 amostras isoladas da urina, 12,5% foram resistentes à ciprofloxacina e 9,3% à norfloxacina. Os testes de triagem para resistência aos aminoglicosídeos mostraram 32,8% (19/58) e 10,3%(6/58) de cepas resistentes a níveis elevados de estreptomicina e gentamicina, respectivamente. A resistência a essas duas drogas concomitantemente foi encontrada em duas cepas (3,4%). Esses dados demonstraram que no hospital, alvo deste estudo, foram encontradas estirpes de *Enterococcus* spp resistentes aos antimicrobianos usualmente empregados na prática clínica, contribuindo para o agravamento do quadro clínico do paciente e aumentando os custos dos serviços de saúde na instituição.

Todas as cepas apresentaram-se sensíveis à vancomicina pelo método de difusão em ágar pelo sistema de discos empregado como triagem. Esse método, entretanto, pode apresentar falhas na pesquisa da sensibilidade a este antimicrobiano (Tenover *et al.*, 1995). Para o estudo da resistência à vancomicina, um teste seriado, utilizando-se diferentes concentrações desse antimicrobiano, denominadas de determinação da "Concentração Inibitória Mínima" (CIM), tem sido empregado (Chow *et al.*, 1993; Stern *et al.*, 1994; Gordts *et al.*, 1995). O valor máximo encontrado com a utilização desse teste, neste estudo, foi de 4 µg/ml, dos quais a maioria das amostras foi inibida a 2 µg/ml. A sensibilidade das amostras à vancomicina, verificada através dos testes fenotípicos, foi confirmada pelos resultados obtidos com o emprego da técnica de PCR, com os primers Van A1 e Van B1, para a detecção dos genes de resistência à vancomicina e à vancomicina/teicoplanina respectivamente, que

proporcionaram resultados negativos. Esses resultados demonstraram que, até o presente, não se detectou no Hospital Universitário de Maringá a presença de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina. A detecção precoce de cepas *Van A* e *Van B* é um instrumental importante na epidemiologia das enterococcias, auxiliando nos cuidados com os pacientes e evitando a disseminação dessa resistência para outros microorganismos da microbiota hospitalar. A vancomicina é uma das últimas opções de tratamento de infecções enterocócicas e deve ser preservada para uso em casos de extrema gravidade (Chiew e Hall, 1998; Scott, 2000). A Tabela 1 mostra os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo sistema de disco de 57 amostras de *Enterococcus faecalis* e 1 amostra de *Enterococcus avium* isoladas de diferentes materiais clínicos de pacientes do Hospital Universitário de Maringá, estado do Paraná.

A Figura 1 mostra os resultados da eletroforese dos produtos amplificados com o oligonucleotídeo JB1 para 57 amostras de *Enterococcus faecalis* e 1 de *Enterococcus avium* (amostra n. 152). Observou-se a presença de até 7 fragmentos com peso molecular, variando entre aproximadamente 250 bp e 1,2 kb. As amostras de números 5, 23, 191, 193, 202, 213 e 18 foram desconsideradas na análise, pois não se observou presença de produtos amplificados. A amostra 152 não foi incluída no agrupamento, pois trata-se de *Enterococcus avium*. De acordo com o perfil de bandeamento, a análise de similaridade, realizada por meio do programa NTSYS, reuniu 50 amostras restantes em 6 grupos, conforme apresentado na Figura 2. Não foi possível detectar prevalência de um perfil de bandeamento que denotasse a existência de um único clone, como também não foi possível identificar correlação entre genótipo e tipo de espécime e/ou genótipo e resistência antimicrobiana. O emprego de DNA com impurezas, obtido a partir de lisado bacteriano, pode ter influenciado negativamente no processo de amplificação, levando ao aparecimento de bandas de fraca intensidade e de baixa nitidez.

Conclusão

A maioria das estirpes isoladas (98,3%) pertencia à espécie *Enterococcus faecalis*.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos realizado pelo método de difusão em ágar pelo sistema de disco demonstrou que todas as estirpes foram sensíveis à nitrofurantoína e cerca de 96,6% foram sensíveis à ampicilina.

Observou-se maior porcentual de cepas resistentes à ciprofloxacina, estreptomicina e gentamicina.

Tabela 1. Resultados de teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo sistema de disco de 57 amostras de *Enterococcus faecalis* e 1 amostra de *Enterococcus avium*, isoladas de diferentes materiais clínicos de pacientes do Hospital Universitário de Maringá, estado do Paraná.

Número da amostra	Antimicrobianos							Material clínico
	AMP	EST	GEN	VAN	CIP	NIT	NOR	
1	S	S	S	S	S	S	S	URINA
2	S	S	R	S	2	3	4	S.PURULENTA
3	S	S	S	S	R	S	R	URINA
4	S	R	S	S	S	S	S	URINA
5	S	R	S	S	S	S	S	URINA
6	S	R	S	S	PS	S	S	URINA
7	S	S	S	S	S	S	S	URINA
8	S	S	S	S	S	S	S	URINA
9	S	S	S	S				SANGUE
10	S	S	R	S				S.PURULENTA
11	S	S	S	S	S	S	S	URINA
12	S	R	S	S				F.CIRURGICA
13	S	S	S	S	S	S	S	URINA
15	S	R	S	S				S.PURULENTA
16	S	R	S	S	S	S	S	URINA
17	S	S	S	S	S	S	S	URINA
20	S	S	S	S	S	S	S	URINA
21	S	S	S	S				S.PURULENTA
22	S	S	S	S	S	S	S	URINA
23	S	S	S	S				S.PURULENTA
24	S	R	S	S				S.PURULENTA
64	S	R	S	S				S.PURULENTA
66	S	S	S	S	S	S	S	URINA
67	S	S	S	S				S.PURULENTA
77	S	R	S	S	PS	S	S	URINA
79	S	S	S	S				S.PURULENTA
85	S	S	S	S	S	S	S	URINA
87	S	R	S	S	S	S	S	URINA
90	S	S	S	S				S.PURULENTA
96	S	S	S	S	PS	S	S	URINA
101	S	S	S	S	PS	S	S	URINA
104	S	R	S	S	PS	S	S	URINA
105	S	R	S	S	PS	S	S	URINA
123	S	R	S	S				SANGUE
121	S	S	S	S	R	S	PS	URINA
131	S	S	S	S				F.CIRURGICA
133	S	S	S	S				S.PURULENTA
144	S	R	S	S				S.PURULENTA
145	S	R	S	S				S.PURULENTA
152 ¹	S	S	S	S				S.PURULENTA
153	S	S	S	S	R	S	S	URINA
156	S	R	R	S	PS	S	S	URINA
158	S	S	S	S				F.CIRURGICA
172	S	S	R	S	R	S	R	URINA
173	R	S	R	S	R	S	R	URINA
183	R	S	S	S				SANGUE
190	S	S	S	S	S	S	S	S.PURULENTA
191	S	S	S	S				S.PURULENTA
193	S	R	R	S				S.PURULENTA
199	S	S	S	S	S	S	S	URINA
201	S	S	S	S				SANGUE
202	S	S	S	S	PS	PS	S	URINA
203	S	S	S	S	S	S	S	URINA
204	S	R	S	S				S.PURULENTA
206	S	R	S	S	S	S	S	URINA
208	S	S	S	S	S	S	S	URINA
213	S	S	S	S				F.CIRURGICA
18	S	S	S	S	R	S	R	URINA

1= *Enterococcus avium*; 2-3-4= Antimicrobianos testados somente para amostras procedentes de urina.

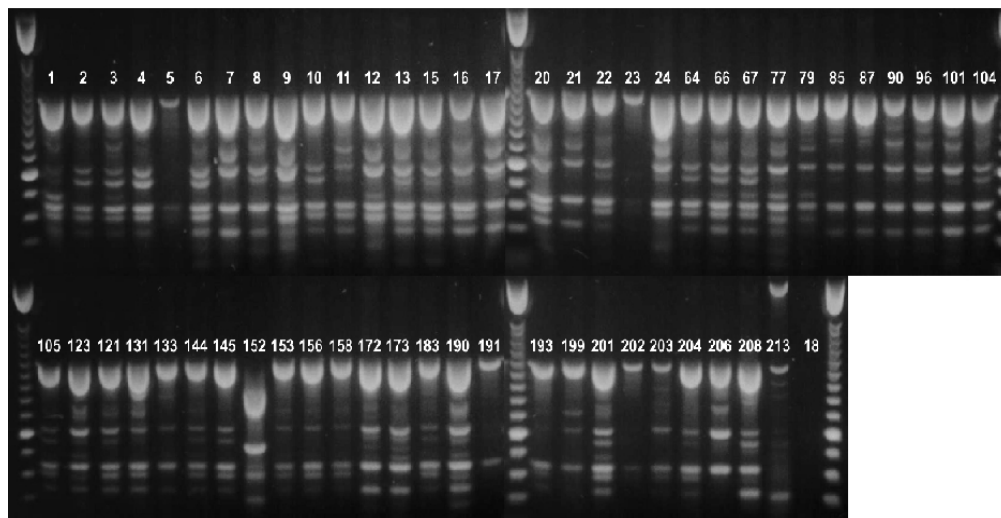


Figura 1. Resultados da amplificação por JB1-PCR de DNA de 58 amostras de *Enterococcus* spp isolados dos pacientes hospitalizados no Hospital Universitário de Maringá, estado do Paraná.

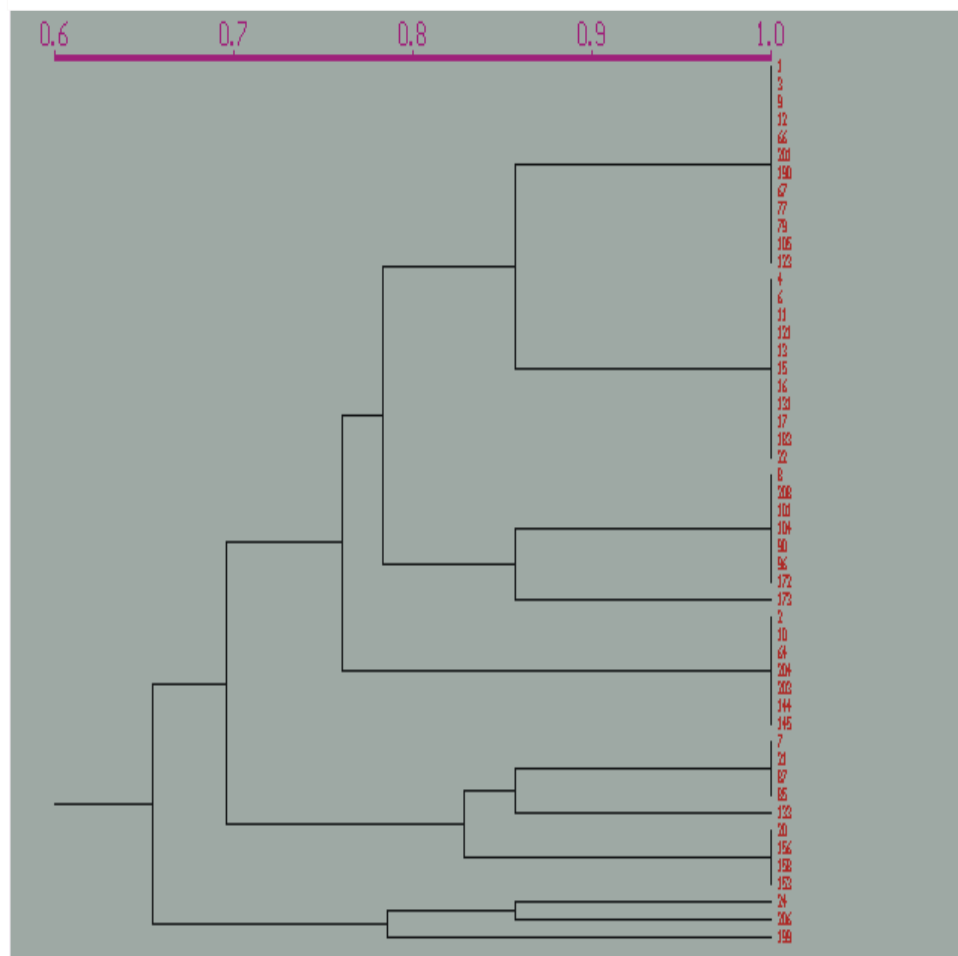


Figura 2. Agrupamento de amostras de *Enterococcus* spp empregando-se o coeficiente de coincidência simples do programa “Numerical taxonomy system of multivariate programs”.

Não foi constatada a presença de estirpes resistentes à vancomicina pelo método de difusão em ágar pelo sistema de disco; não se detectou a presença dos genes Van A e Van B nas amostras estudadas, e não se observou a existência de um clone específico prevalente entre as amostras estudadas.

Referências

- BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, Chicago, v. 45, n. 4, p. 493-6, 1966.
- BEDENDO, J.; PIGNATARI, A. C. C. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Braz. J. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 33, p.1269-1274, 2000.
- CEREDA, R. F. *Aspectos microbiológicos de amostras clínicas de enterococos isolados no Hospital São Paulo*. 1996. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.
- CHENOWETH, C.; SCHABERG, D. The epidemiology of enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, Ann Arbor, v. 9, n. 2, p. 80-89, 1990.
- CHIEW, Y. F.; HALL, M. C. Comparison of three methods for the molecular typing of Singapore isolates of enterococci with high-level aminoglycosides resistances. *J. Hosp. Infect.*, London, v. 38, p. 223-230, 1998.
- CHOW, J. W. *et al.* Clonal spread of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. *J. Clin. Microbiol.*, Detroit, v. 31, n. 6, p. 1609-1611, 1993.
- COQUE, T. M. *et al.* Vancomycin resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Houston, v. 40, n. 11, p. 2605-2609, 1996.
- FREE, L.; SAHM, D. F. Detection of enterococcal vancomycin resistance by multiplex PCR. In: PERSING, D. H. (Ed). *PCR Protocols for emerging infectious diseases: a supplement to diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: Ed Library of Congress, American Society for Microbiology, p. 150-155, 1996.
- GOLDMANN, D. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*: Headline News. *Infection control and Hospital Epidemiology*, Boston, v. 13, n. 12, p. 695-699, 1992.
- GORDTS, B. *et al.* Vancomycin resistant *Enterococci* colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.*, Brugge, v. 33, n. 11, p. 2842-2846, 1995.
- HALL, L. M. M. Are point mutations or DNA rearrangements responsible for the restriction fragment length polymorphisms that are used to type bacteria. *Microbiology*, London, v. 140, p. 97-204, 1994.
- ISSACK, M. I. *et al.* Investigation of an outbreak of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *J. Hosp. Infect.*, London, v. 33, p. 191-200, 1996.
- MERCIER, *et al.* Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *J. Clin. Microbiol.*, Nimes, v. 34, n. 5, p. 1290-1302, 1996.
- MORRISON, D. *et al.* PCR typing of *Enterococcus faecium*. *Advance Exp. Med. Biol.*, New York, v. 418, p. 387- 391, 1997.
- MOURA, A. C. *Variabilidade genética de amostras de E.coli Aviária avaliada por ERIC-PCR E REP-PCR*. 2000. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.
- MURRAY, P. R. *Manual of Clinical Microbiology*. 7. ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1999.
- NATIONAL COMMITTEE CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) – Approved standard M2-A7: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Seventh edition. Wayne, PA, 2000.
- PASQUARELLA, C. *et al.* Dynamics of *Enterococcus faecalis* colonization of bone marrow transplant patients. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 418, p. 275-279, 1997.
- PFALLER, M. A. *Molecular epidemiologic typing of nosocomial pathogens*. ASCP Spring, Teleconference Série, 1993.
- SADER, H. D. *et al.* Evaluation and characterization of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from 12 U.S. Medical Centers. *J. Clin. Microbiol.*, Iowa City, v. 32, n. 11, p. 2840-2842, 1994.
- SAHN, D. F. GILMORE, M. S. High level gentamicin resistance among enterococci. *Dev. Biol. Stand.*, St Louis, v. 85, p. 99-105, 1995.
- SCOTT, G. M. S. *Combating vancomycin resistance in enterococci: Modern Management Strategies*, Synergy Medical Education, Synergy House, Lindley Place Station Approach, Kew, Surrey, UK, 2000.
- STERN, C. S. *et al.* Characterization of enterococci isolated from human and nonhuman sources in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 61-7, 1994.
- SWENSON, J. M. *et al.* National Committee for Clinical Laboratory Standards Study Group on Enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, Atlanta, v. 33, n. 11, p. 3008-3018, 1995.
- TENOVER, F. C. *et al.* Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in Enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, Atlanta, v. 33, n. 6, p. 1524-7, 1995.
- TYLER, K. D. *et al.* Complementary factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, Atlanta, v. 35, n. 2, p. 339-346, 1997.
- VERSALOVIC, J. *et al.* Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, Houston, v. 19, p. 6823-6831, 1991.
- WILLEY, B. M. *et al.* Detection of vancomycin resistance in enterococcus species. *J. Clin. Microbiol.*, New York, v. 30, n. 7, p. 1621-4, jun. 1992.

Received on February 17, 2003.

Accepted on June 26, 2003.