ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DE ANTIBIÓTICOS DE ORIGEM NATURAL E SEMISSINTÉTICA DA FAMÍLIA DAS PENICILINAS EM ENTEROCOCCUS FAECALIS E E. FAECIUM

COMPARATIVE STUDY OF NATURAL AND SEMISYNTHETIC PENICILLINS ANTIBIOTICS IN ENTEROCOCCUS FAECALIS AND E. FAECIUM

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE ANTIBIÓTICOS DE ORIGEN NATURAL Y SEMISINTÉTICA DE LA FAMILIA DE LAS PENICILINAS EN ENTEROCOCCUS FAECALIS Y E. FAECIUM

João Pedro Afonso Rodrigues (pafonso25@ipb.pt) *

Maria Helena Pimentel Professora (hpimentel@ipb.pt)**

Leonel São Romão Preto (leoenlpreto@ipb.pt).***

Maria José Lopes Montanha ****

Madalena Maria Pereira Alves *****

RESUMO

O estudo teve como objetivo estudar o efeito antibacteriano de um antibiótico natural e outro semissintético, de forma a aferir se a origem pode ter alguma influência nos mecanismos de resistência ou sensibilidade ao mesmo, uma vez que estes diferem nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e nos mecanismos de ação. O efeito antibacteriano foi analisado em bactérias Gram positivo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, de acordo com o género, em 314 utentes (162 do género masculino: $68,49 \pm 21,59$ anos e 152 do feminino: $61,15 \pm 23,04$ anos) de uma Unidade Hospitalar. As bactérias foram isoladas em urina, pus, líquido biológico, hemoculturas, expetoração e cateter. Para averiguar o efeito antibacteriano foi determinada a Concentração Mínima Inibitória dos antibióticos em estudo. A maioria dos *Enterococcus* isolados foram da espécie *faecalis* (82%) vs 18% da espécie *faecium*. Observámos um efeito significativo da bactéria por diferenças entre a sensibilidade e resistência entre as duas espécies. Ambos os antibióticos mostraram maior resistência à espécie *faecium* (penicilina G: 91,2%; ampicilina: 89,5%) comparativamente à *faecalis* (penicilina G: 33,5%; ampicilina: 33,5%). Em relação à sensibilidade registou-se o inverso. Os dois antibióticos mostraram-se mais sensíveis à espécie *faecalis* (penicilina G: 66,5%; ampicilina: 66,5%) comparativamente à *faecium* (penicilina G: 91,2%; ampicilina: 89,5%). Não observámos diferenças estatisticamente significativas no efeito antibacteriano entre a penicilina G e a ampicilina nas duas espécies estudadas. Igual tendência se constatou em relação ao género.

Palavras-chave: efeito antibacteriano, Enterococcus, concentração mínima inibitória, penicilina G, ampicilina.

ABSTRACT

This study aimed to compare the antibacterial effect of a natural antibiotic and other semisynthetics, in order to assess whether the source may have some influence on bacterial resistance and sensitivity mechanisms. Since they have different physical, chemical and pharmacological properties, the antibacterial spectrum and action mechanism are also divergent. The antibacterial effect was analyzed in Gram positive bacteria *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, according to gender, in 314 users (162 males:

68,49±21,59 years and 152 females: 61,15±23,04) of a Hospital Unit. Bacteria were isolated from the urine; pus; biological liquid; blood cultures; sputum and catheter. To assess the antibacterial effect we determined the Antibiotics Minimum Inhibitory Concentration under study, which showed that most of the isolates were of the *Enterococcus faecalis* specie (82%) vs the *faecium* species (18%). We observed a significant effect of the bacterium in differences between sensitivity and resistance between the two species. With respect to resistance, both antibiotics were more resistant to the species *faecium* (penicillin G: 91,2%, ampicillin: 89,5%) compared to *faecalis* (penicillin G: 33,5%, ampicillin: 33,5 %). Regarding sensitivity, the reverse happened: Both antibiotics were more sensitive to *faecalis* (penicillin G, 66,5%; ampicillin: 66,5%) compared to the *faecium* species (penicillin G: 91,2%, ampicillin: 89,5%). We observed statistically significant differences in the antibacterial effect of penicillin G and ampicillin following the two species studied. We found the same trend in relation to gender.

Keywords: antibacterial effect; *Enterococcus*; inhibitory minimum concentration, penicillin G, ampicillin.

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo estudiar el efecto antibacteriano de um antibiótico natural y otro semisintético, de forma a contrastar si el origen puede tener alguna influencia en los mecanismos de resistencia o sensibilidad al mismo. Una vez que, estos difieren en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, en espectro antibacteriano y en los mecanismos de acción. El efecto antibacteriano fue analizado en bacterias Gram positivo *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, de acuerdo con el género, en 314 pacientes (162 del género masculino: 68,49 ± 21,59 años y 152 del femenino: 61,15 ± 23,04 años) de una Unidad Hospitalar. Las bacterias se aislaron en orina; pus; líquido biológico; hemoculturas; expectoración y cateter. Para averiguar el efecto antibacteriano se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de los antibióticos en estudio. La mayoría de los *Enterococcus* aislados fueron de la especie *faecalis* (82%) vs (18%) de la especie *faecium*. Observamos un efecto significativo de la bacteria por diferencias entre la sensibilidad y resistencia entre las dos especies. Ambos los antibióticos mostraron mayor resistencia a la especie *faecium* (penicilina G: 91,2%; ampicilina: 89,5%) comparativamente a la *faecalis* (penicilina G: 33,5%; ampicilina: 33,5%). En relación a la sensibilidad se registró lo inverso. Los dos antibióticos se mostraron más sensibles a la especie *faecalis* (penicilina G: 66,5%; ampicilina: 66,5%) comparativamente a la *faecium* (penicilina G: 91,2%; ampicilina: 89,5%). No observamos diferencias estadísticamente significativas en el efecto antibacteriano entre la penicilina G y la ampicilina en las dos especies estudiadas. Igual tendencia en relación al género.

Palabras-llave: efecto antibacteriano, *Enterococcus*, concentración mínima inhibitoria, penicilina G, ampicilina.

* Mestre em Farmácia e Química dos Produtos Naturais. Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública da Unidade Local de Saúde do Nordeste Transmontano, EPE.

**Professora Coordenadora da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança. Doutora pela Universidade do Minho.

*** Professor Coordenador da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança. Doutor pela Universidade da Extremadura

**** Patologista Clínica da Unidade Local de Saúde do Nordeste Transmontano, EPE.

***** Farmacêutica da Unidade local de Saúde do Nordeste Transmontano, EPE.

Submitted: 15th May 2015

Accepted: 9th June 2015

INTRODUÇÃO

As infecções nosocomiais são um problema de Saúde Pública e encontram-se associadas a uma alta taxa de morbidade e mortalidade. Com o aumento do uso em grande escala de antibióticos o padrão das infecções nosocomiais tem mudado, adquirindo novas resistências aos antibióticos. Entre as bactérias causadoras de doenças nosocomiais encontra-se o Gênero *Enterococcus*.

Os *Enterococcus* são responsáveis por infecções nosocomiais graves, sendo a terceira causa nos Estados Unidos da América (EUA) e a quarta na Europa (Liu, 2011). Sendo patogênicos emergentes são considerados a segunda causa de infecções urinárias tanto nos EUA como na Europa e são responsáveis por 5 a 20% de endocardites. A taxa de mortalidade de infecções por *Enterococcus* ronda os 20 a 30% (Ogier *et al.*, 2008)

Infecções humanas causadas por *Enterococcus* fora do ambiente hospitalar são raras e consistem em: endocardite; infecções do trato urinário ou infecções abdominais e/ou pélvica resultantes de contaminação pela microbiota fecal (Dunny *et al.*, 1978). Os *Enterococcus* surgem associados a infecções hospitalares (principalmente *E. faecalis*) e também ao uso de cefalosporinas de amplo espectro (a que os *Enterococcus* são resistentes). Os *Enterococcus* estão presentes muitas vezes no trato intestinal de pacientes hospitalizados. A presença de cateteres, imunossupressão ou mucosite de quimioterapia alteram o equilíbrio da flora gastro intestinal e facilitam a infecção (Dunny *et al.*, 1978; Franke, *et al.*, 1981).

1. GÊNERO ENTEROCOCCUS E SUA RESISTÊNCIA BACTERIANA

A aceitação do gênero *Enterococcus* deu-se em 1984, através de técnicas de biologia molecular como a hibridação de ácido desoxirribonucleico (DNA) e sequenciamento do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) 16S (Kohler, 2007; Murray, 1990; Moellering, 1992; Ogier *et al.*, 2008). São conhecidas várias espécies de *Enterococcus* sendo as *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* as de maior significado clínico. Estes cocos fazem parte da microflora intestinal humana, porém, também foram descritos como fazendo parte da mucosa oral e vaginal. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são as espécies mais comuns em humanos (Murray, 1990; Ogier *et al.*, 2008). Podem ainda ser encontrados na microflora de outros animais, alimentos (em produtos láteos e carnes) e plantas. Quando são encontrados no solo ou na água resultam de contaminação fecal por tolerância natural a condições adversas (Murray, 1990; Devriese *et al.*, 1991; Facklam *et al.*, 2002; Giraffa, 2002).

Consideram-se duas fontes principais desta infecção: a causada por *Enterococcus* presentes no trato gastrointestinal do próprio paciente; a adquirida por transmissão no ambiente hospitalar

(Murray, 1990; Huycke *et al.*, 1998). A espécie *E. faecalis* desperta especial interesse pelo facto de possuir vários plasmídeos, podendo alguns ser transferidos por conjugação a outras bactérias. Nos *E. faecalis* os transposões conjugativos e plasmídeos respondem a feromonas sexuais (Franke, *et al.*, 1981; Murray, 2000). A existência de plasmídeos conjugativos não só em *E. faecalis* mas também em *E. faecium*, levou a que estas espécies fossem consideradas como reservatórios de plasmídeos para outros géneros de bactérias (*Enterococcus*).

Por sua vez a resistência adquirida pelos *Enterococcus* às penicilinas foi descrita em 1983, nos EUA, devendo-se à produção de β -lactamases mediadas por plasmídios transferíveis em amostras de *E. faecalis* (Dunny *et al.*, 1978). As β -lactamases dos *Enterococcus* são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico das penicilinas e demais β -lactâmicos inativando todos os representantes desta classe de antimicrobianos. Esse mecanismo de resistência é raro entre os *Enterococcus*, sendo mais comum em amostras da espécie *E. faecalis*, porém, pode ocorrer em *E. faecium* (Dunny *et al.*, 1978; Franke, 1981).

O principal mecanismo de resistência dos *Enterococcus* aos β -lactâmicos deve-se a alterações nas Proteínas de ligação à penicilina (PBPs). As PBPs dos *Enterococcus* resistentes aos β -lactâmicos apresentam afinidade diminuída a vários antimicrobianos dessa classe. Essa forma de resistência é observada principalmente em *E. faecium*, contudo, amostras de *E. faecalis* mostraram-se de igual forma resistentes aos β -lactâmicos, por esse mecanismo (Murray, 2000).

1.1. ANTIBIOTERAPIA

Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos que inibem o crescimento de bactérias, originando a sua destruição (antibióticos naturais), podem também ser produzidos unicamente através de processos de síntese química (antibióticos sintéticos), ou através de culturas de microrganismos posteriormente modificadas quimicamente (antibióticos semissintéticos). Diferem nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e nos mecanismos de ação. Os mecanismos moleculares de replicação das bactérias facilitou o desenvolvimento de compostos capazes de interferir nos ciclos vitais dos microrganismos (Chabner *et al.*, 2012).

Os antibióticos podem ser classificados como bacteriostáticos e bactericidas dependendo se a ação é inibitória do crescimento bacteriano ou se resulta na destruição ou lise bacteriana, respetivamente (Calderwood e Moellering, 1990; Sande *et al.*, 1993). A classe de antibióticos bactericidas contempla o grupo dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, glicopéptidos e rifampicinas. Podem incluir-se nos antibióticos bacteriostáticos os macrólidos, as sulfamidas, tetraciclínas, entre outros (Brugueras e Garcia, 1998).

Outro método de classificação dos antibióticos é através do seu mecanismo de ação, ou seja, como atuam nas bactérias alvo de forma a neutralizá-las ou eliminá-las. Dividem-se em 5 grupos (Frisby, 1995; Sande *et al.*, 2013). Inibidores da síntese da parede celular bacteriana, atuando a

nível da biossíntese do peptídeo glicano (penicilinas); Antibióticos que alteram a síntese das proteínas a nível ribossomal (Macrolídeos, aminoglicosídeos); Antibióticos que alteram o metabolismo dos ácidos nucleicos (Quinolonas); Antibióticos antagonistas do metabolismo da síntese do ácido fólico (Sulfonamidas); Antibióticos que atuam diretamente na membrana celular bacteriana (Colistina).

Segundo a estrutura química, os antibióticos podem ser classificados em: Derivados de monopectídios (e.g. cicloserina, azaserina); Derivados do ácido 6-aminopenicilânico e análogos (e.g. penicilinas, cefalosporinas); Derivados de 2-amino-1,3-propanodiol (e.g. cloranfenicol); Derivados de hidrocarbonetos aromáticos (e.g. tetraciclina, rifamicina); Derivados de macrolídeos (e.g. estreptomicina, neomicina, vancomicina); Antibióticos poliênicos (e.g. anfotericina, nistatina); Antibióticos polipeptídios (e.g. bacitracina, polimixina).

Este tipo de classificação é pouco usual na prática clínica, sendo mais adotada uma classificação em classes: penicilinas, cefalosporinas, monobactams, anfenicóis, tetraciclina, polipeptídios, poliênicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, ansamicinas, antraciclina, lincomicina, nucleosídeos, glutarimidas, ionóforos (Fontana *et al.*, 1994).

1.2. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO – CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

A resistência bacteriana representa um potencial risco à saúde pública (Bongers *et al.*, 1995; Baccaro *et al.*, 2002). A atividade antimicrobiana é avaliada através da determinação da quantidade mínima de antibiótico necessário para inibir o crescimento de um determinado microrganismo, esse valor é definido como Concentração Mínima Inibitória (CMI) (Pinto *et al.*, 2003; Fennel *et al.*, 2004).

Existem diferentes métodos para avaliar a atividade antimicrobiana de um determinado antibiótico entre os quais o método de micro diluição em que são efetuadas as micro diluições a fim de se determinar a CMI; o método de difusão por disco em que é colocado em contato um disco impregnado do antibiótico, com um meio de cultura sólido e posteriormente avaliado o poder antimicrobiano analisando o halo de inibição do disco (Alves *et al.*, 2012).

O Despacho nº14 319/2005, de 29 de junho, refere que a quantificação das CMI permite a escolha da melhor terapêutica assim como a sua adaptação à patologia. As CMI podem ser obtidas por vários métodos sendo o método de diluição o de referência proposta pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Consiste na preparação de meios líquidos ou sólidos aos quais são adicionadas concentrações crescentes de antibióticos, onde é semeada a mesma quantidade de inóculo e após incubação, verifica-se a existência ou não de crescimento havendo determinação da CMI. Os testes de diagnóstico têm um papel essencial para reduzir a propagação de bactérias multirresistentes, ajudando a decidir sobre a escolha do antibiótico mais apropriado. Estes testes são efetuados pelos laboratórios de microbiologia, que participam nos programas de vigilância e

de controlo de antibioterapia através de testes de rastreio, de análises de diagnóstico rápidas, de testes de resistência, da tipagem de estirpes e da vigilância epidemiológica (BioMérieux, 2010).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo retrospectivo e correlacional.

Objetivo do estudo: verificar se existem diferenças significativas entre o efeito do antibiótico natural (Penicilina G) e semissintético (Ampicilina) tendo em consideração as espécies *faecium* e *faecalis* e o género.

Amostra não probabilística visto que as amostras foram processadas por ordem de chegada ao setor de Microbiologia, durante outubro de 2000 e dezembro de 2012. Fizeram parte da amostra total 314 utentes (162 do género masculino: $68,49 \pm 21,59$ anos de idade; 152 do género feminino: $61,15 \pm 23,04$ anos de idade) de uma Unidade Hospitalar. 70% encontravam-se hospitalizados em diversos serviços dessa Unidade e 30% eram utentes externos (exames laboratoriais de rotina).

Os dados foram recolhidos e processados entre outubro de 2009 e dezembro de 2012.

2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Os produtos biológicos deram entrada no Serviço de Patologia Clínica no setor de Microbiologia da Unidade Hospitalar: urina, expetoração, cateter, pús, hemoculturas e outros líquidos biológicos que incluem o líquido ascítico, líquido pleural e o líquido cefalorraquidiano. Foram processados de acordo com a metodologia implementada no Serviço (quadro 1), utilizados meios de cultura sólidos: Gelose de Sangue (GS), Gelose de chocolate (GC), Manitol, MacConkey, Saboround, Cystine Lactose Eletrolyte Deficien (CLED), Uricult®Plus (combinação de uma placa com três meios: Cled, MacConkey, meio de *Enterococcus*) e um meio de cultura líquido: Brain Heart (BH).

Quadro 1 - Procedimento para o tratamento de produtos biológicos

Produto biológico	Meios de cultura	Método de sementeira	Exame direto	Tempo/Temperatura de incubação
Urina	CLED,	Estria Central,	Gram, exame microscópico a fresco do	18-24 horas/37°C

	Uricult@Plus	Imersão	sedimento	
Expetoração	GS, GC Manitol, MacConkey, Saboround.	Quatro quadrantes (Esgotamento)	Gram	18-24 horas/37°C
Líquido Biológico (i.e. Líquido Pleural, LC.R, Líquido Ascítico)	GS, GC, Manitol, MacConkey, BH.	Quatro quadrantes (Esgotamento) Meio líquido: inoculação por agitação	Gram	18-24 horas/37°C
Catéter	GS, GC, Manitol, MacConkey, BH.	Quatro quadrantes (Esgotamento) Meio líquido: inoculação por agitação	Gram	18-24 horas/37°C
Pús	GS, GC, Manitol, MacConkey, BH.	Quatro quadrantes (Esgotamento) Meio líquido: inoculação por agitação	Gram	18-24 horas/37°C
Hemocultura	GS, GC, Manitol, MacConkey	Quatro quadrantes (Esgotamento)	Gram	18-24 horas/37°C

Após incubação a 37°C de 24 horas, nos meios em que se verificou crescimento bacteriano considerável, realizou-se uma coloração de Gram das colônias alvo. Esta coloração visou determinar a reação das bactérias aos corantes e por conseguinte diferenciar os Gram positivo e Gram negativo. Foi simultaneamente avaliada a morfologia bacteriana para distinção entre cocos, diplococos ou bacilos. Para diferenciação entre espécies de Gram positivo foi efetuada a prova da catalas e a fim de distinguir o género *Enterococcus* do género *Staphylococcus*. As espécies identificadas como Gram positivo do género *Enterococcus* foram testadas quanto à sua sensibilidade e resistência bacteriana. A identificação definitiva foi efetuada por carta de identificação de Gram Positivo (GP) em que é obtido o género e a espécie da bactéria, a determinação da CMI foi efetuada por carta de antibiograma AST-586, que determina as suscetibilidades bacterianas aos antibióticos, a identificação definitiva e a determinação da CMI foram efetuadas pelo sistema automatizado VITEK-2 (Bio-Merieux, Lyon, France).

2.3. TESTES DE SENSIBILIDADE

Foram efetuados testes de sensibilidade às bactérias anteriormente isoladas e identificadas (*E. faecalis* e *E. faecium*) tendo sido posteriormente determinado a CMI de cada um dos antibióticos testados (penicilina G e ampicilina). A determinação da CMI foi efetuada usando concentrações de antibióticos derivadas de duplas diluições sucessivas (BioMérieux, 2010). A CMI é então determinada a partir da adição da concentração mais baixa de antibiótico em que ocorre inibição do crescimento bacteriano, sendo utilizado o método de diluição em caldo “Broth Dilution”. A obtenção de CMI em bactérias do Género *Enterococcus* a partir do método de Broth Dilution foi estudada por Hashimoto *et al.* (2012) que compararam as CMI a partir dos métodos de Broth Dilution e Agar Dilution em bactérias do Género *Enterococcus*. As CMI obtidas com o método de Broth Dilution são concordantes com as CMI obtidas com o método de Agar dilution em 73% dos casos. Este método é pois adequado para a determinação da CMI em *Enterococcus*. Foi utilizada carta de antibiograma específica para a determinação *in vitro* da sensibilidade do género *Enterococcus* a agentes antimicrobianos, baseada na técnica de CMI descrita por MacLowry e Marsh (1968) e Gerlach (1974). Cada carta possui 64 micropoços contendo meios de cultura Cation-adjusted Muller-Hinton broth (CAMHB), Muller-Hinton agar (MHA) misturados com concentrações conhecidas do antibiótico a testar (quadro 2) e um micropoço que contém unicamente meio de cultura sendo este o micro poço de controlo (Wikler *et al.*, 2007).

O seu preenchimento efetuou-se com uma suspensão de bactérias obtidas por inoculação de colónias alvo, em 3 ml de solução salina entre 0,5 e 0,63 padrão de MacFarland²⁸. Posteriormente realiza-se uma diluição transferindo 280 µl da suspensão inicial para uma solução salina de 0,45% de 3 ml. A suspensão final foi inoculada na carta de antibiograma e incubada entre 35°C e 37°C, em condições de aerobiose durante 18 a 24 horas. Após a incubação o sistema automático avaliou o padrão de crescimento dos microrganismos na presença de antibióticos, em relação ao crescimento no poço de controlo, sendo determinado o valor da CMI para os antibióticos testados. Os resultados são expressos qualitativamente como sensível ou resistente podendo ser expresso quantitativamente em µg/ml, estes valores encontram-se descritos no quadro 2 (Wikler *et al.*, 2007). O método de Broth Dilution é descrito como facilmente adaptável a sistemas automatizados, sendo o mais utilizado em laboratórios de microbiologia nos Estados Unidos, sendo uma das vantagens deste método é permitir a identificação, testes de sensibilidade antimicrobiana e simultaneamente reduzir o tempo de resposta na atuação contra a infeção (Jorgensen, 1993).

Quadro 2 - Antibióticos em estudo da CMI (Wikler *et al.*, 2007).

Antibiótico	Concentração adicionada em µg/ml	Intervalo de Concentração	Sensível (µg/ml)	Resistente (µg/ml)
Ampicilina	0,5; 4; 8; 32	0,5-32	≤ 8	≥ 16

Penicilina G	0,125; 0,25; 1; 2; 8; 64	0,12-64	≤ 8	≥ 16
---------------------	--------------------------	---------	-----	------

A interpretação da CMI obtida nas cartas de antibiograma estão de acordo com as interpretações definidas pela Food And Drug Administration (FDA), Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI®) ou Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) e do European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (BioMérieux, 2010).

2.4 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Análise exploratória; descritiva e inferencial dos dados. Na análise exploratória foram realizados gráficos (histogramas, *high-low*, *box-and-whisker plots*) de forma a maximizar a percepção ou visualização do conjunto de dados, descortinando estruturas subjacentes e detetando valores atípicos (*outliers*), bem como a deteção e possível extração de variáveis importantes para o estudo. A análise de simetria (*skewness*) e de achatamento (*kurtosis*) das curvas e aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov permitiu averiguar se os valores registados apresentam distribuição normal.

Na análise descritiva foi calculada a percentagem de distribuição dos produtos orgânicos utilizados e da resposta dos antibióticos: por bactéria e por género.

Na inferencial foi utilizada a ANOVA para analisar a variância de cada um dos antibióticos (i.e. ampicilina e penicilina), de acordo com a bactéria e o género. O Teste-t *student* emparelhado foi utilizado na análise das diferenças entre a ampicilina e penicilina por bactéria e por género. O nível de significância foi colocado em $p < 0,05$.

O estudo obteve aprovação pela Comissão de Ética da unidade hospitalar de acordo com a declaração de Helsínquia.

3. RESULTADOS

A figura 1 apresenta a caracterização dos produtos orgânicos e os utentes infetados com a bactéria *E.Faecalis* e *E.Faecium*, na amostra em estudo. A urina foi o produto com maior percentagem de recolha (62%) seguido do pús (21%). A maioria dos utentes (82%) estava infetada com a bactéria *E.faecalis*.

Figura 1 - Caraterização dos produtos orgânicos e utentes infetados por bactéria.

A figura 2 apresenta a sensibilidade e resistência de cada uma das bactérias (*E. faecium* e *E. faecalis*) à administração da ampicilina e da penicilina. Ainda as comparações emparelhadas entre os antibióticos, por bactéria.

A bactéria *E. faecium* foi maioritariamente resistente tanto para a ampicilina (89,5%) como para a penicilina (91,2%). Já a bactéria *E. faecalis* foi maioritariamente sensível a ambos os antibióticos. As comparações emparelhadas dos dois antibióticos para as duas bactérias permitiram constatar a não existência de diferenças significativas (figura 2).

Figura 2 - Sensibilidade e resistência das bactérias em relação aos antibióticos e comparações emparelhadas entre os antibióticos, por bactéria.

Para ambos os antibióticos verificámos uma diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de resposta possíveis (sensível ou resistente). Para a ampicilina ($F_{1,313} = 330,71$; $p < 0,001$) e para a penicilina ($F_{1,313} = 342,62$; $p < 0,001$). O quadro 3 apresenta a análise de variância à resposta

da ampicilina e penicilina. A bactéria teve um efeito estatisticamente significativo na administração da ampicilina ($F_{1,313} = 68,82$; $p < 0,001$). No entanto, em relação ao género não ocorreu efeito significativo ($F_{1,313} = 0,009$; $p < 0,92$), assim como a interação bactéria X género ($F_{1,313} = 0,11$; $p < 0,74$), na ampicilina. A tendência foi semelhante para a administração da penicilina. A bactéria teve um efeito estatisticamente significativo na administração da penicilina ($F_{1,313} = 73,21$; $p < 0,001$), o género ($F_{1,313} = 0,09$; $p < 0,76$) e a interação bactéria X género ($F_{1,313} = 0,01$; $p < 0,90$) não registaram significância.

Quadro 3 - Anova 2 fatores para ampicilina e penicilina.

	Efeito Bactéria		Efeito Género		Interação Bactéria X Género	
	F	p	F	p	F	p
Ampicilina	68,82	<0,001	0,009	0,92	0,11	0,74
Penicilina	73,21	<0,001	0,09	0,76	0,01	0,90

F – valor do teste de F; p – valor de significância.

4. DISCUSSÃO

Verificámos que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre a atuação (sensibilidade e resistência) da penicilina G e da ampicilina nos *Enterococcus faecium* e *faecalis*. Ocorreu um efeito significativo da bactéria em que o *E. faecium* foi mais resistente tanto à ampicilina como à penicilina.

As amostras biológicas urina e pús foram os produtos com maior representatividade. O tratamento das amostras foi efetuado de acordo com as normas standardizadas para a prática clínica. A identificação da bactéria foi feita numa primeira fase através de procedimentos manuais (avaliação visual da morfologia bacteriana, prova da catalase e observação do Gram) sendo posteriormente efetuada a identificação confirmatória quanto ao género e espécie da bactéria em estudo. O rácio de infeções causadas por *E. faecalis* em relação a infeções causadas por outras espécies de *Enterococcus* é aproximadamente de 10 para 1. Apesar do aumento da percentagem de infeções causadas por *E. faecium*, a literatura relata diferenças entre as infeções, sendo que a causada pelo *E. faecalis* é mais prevalente²⁹. Estudos recentes^{30,31} em amostras biológicas provenientes de unidades hospitalares identificando bactérias do género *Enterococcus* verificaram igualmente a maior percentagem de *E. faecalis*. Desta forma, e tal como o estado da arte tem vindo a constatar, também neste estudo o *E. faecalis* (82%) foi manifestamente superior.

A CMI pode ser obtida a partir de vários métodos: E Test, Agar Dilution, Broth Dilution e Disk Diffusion (Baker *et al.*, 1991). Os autores efetuaram um estudo de comparação entre os quatro métodos de obtenção da CMI concluindo por resultados similares entre eles. Os resultados da CMI do presente estudo foram obtidos pelo método de Broth Dilution, numa carta de antibiograma direcionada para a obtenção das CMI em Gram positivos do género *Enterococcus*. A carta de antibiograma utilizada (AST-P586) possui vários micropoços impregnados de diferentes tipos de antibióticos inoculados e testados contra as bactérias em estudo no sistema automatizado (Vitek®2, Lyon, France).

A literatura reconhece a resistência de *Enterococcus* a vários antibióticos tais como vancomicina, aminoglicosídeos e antibióticos β -lactâmicos, tornando-se assim um género de bactérias multirresistentes e um importante agente nosocomial (Murray 1990; Grayson *et al.*, 1991; Gray *et al.*, 1991). Os *Enterococcus* possuem um grande potencial para produzir genes resistentes a novas formas de antibioterapia, causando sérias dificuldades na forma como é dirigida a terapêutica. Espécies produtoras de β -lactamase resistentes à penicilina são sensíveis à gentamicina, à ampicilina-sulbactam, à ampicilina- ácido clavulânico ou à vancomicina. Espécies resistentes a antibióticos β -lactâmicos não produtoras de β -lactamases respondem bem à terapêutica com vancomicina e gentamicina (Marothi *et al.* 2005). A penicilina G e a ampicilina são antibióticos de referência no tratamento de infeções por *Enterococcus*, embora a ampicilina tenha uma CMI mais baixa, a penicilina G foi a preferida no tratamento devido ao seu baixo custo e menores efeitos secundários (Herman *et al.*, 1991). Existem, na atualidade, diversos antibióticos eficazes na atuação contra os *Enterococos*, quer em associação quer em formas simples. Apesar deste género de bactérias se tornarem cada vez mais resistentes, a escolha do antibiótico não deve depender apenas da CMI, também ter em conta o tipo de infeção, a gravidade e a resposta aos antibióticos (Marothi *et al.* 2005).

A literatura parece não ser concordante no que diz respeito à resistência da penicilina, nomeadamente para as bactérias *E.faecium* e *E.faecalis* em amostras semelhantes. Numa população de 128 *Enterococcus* os autores Sreeja *et al* (2012) e Doddamani *et al.* (2013) verificaram resistência à penicilina na ordem de 47%. A taxa de resistência dos *E. faecalis* (48,6%) foi superior à taxa de resistência dos *E. faecium* (41,6%). Por sua vez, Garcia-Vázquez *et al.* (2013) realizaram um estudo com bacteriémias por *Enterococcus* e analisada a suscetibilidade antibacteriana a vários antibióticos entre os quais a penicilina. Verificaram que a taxa de resistência à penicilina do *E. faecium* (76,9%) foi superior à taxa de resistência do *E.faecalis* (2,2%). Os dois estudos referidos apresentam algumas diferenças relativamente aos produtos biológicos utilizados e também na metodologia do estudo da sensibilidade antimicrobiana. Garcia-Vázquez *et al.* (2013) utilizaram como produtos biológicos unicamente hemoculturas testando a sensibilidade antimicrobiana através da metodologia de Broth Dilution. Já no estudo de Sreeja *et al* (2012) foram utilizados produtos biológicos diferentes entre os quais urina, pús, hemoculturas e líquidos biológicos testados a partir da metodologia de Disk Diffusion. Desta forma, especula-se se a utilização de distintas metodologias de teste de sensibilidade antimicrobiana pode ser responsável pelos diferentes resultados obtidos. No nosso estudo, tal como indicado na Figura 2, os resultados indicam que o *E. faecalis* apresentou uma taxa de resistência de 33,5% e o *E.*

faecium, uma taxa de resistência de 91,2% à penicilina G. Apesar de terem sido utilizados produtos biológicos diferentes na sua globalidade, estes resultados são semelhantes aos apresentados no estudo de Garcia-Vázquez *et al.* (2013) com uma metodologia de teste de sensibilidade antimicrobiana semelhante (i.e. Broth Dilution). Já em relação à sensibilidade o *E. faecalis* apresentou uma taxa de 66,5% e o *E. faecium* de 8,8%. A ampicilina é uma das terapias de escolha para o tratamento de infeções por *Enterococcus*, podendo existir resistências antibacterianas por parte de alguma espécie de *Enterococcus*. A resistência antibacteriana dos *Enterococcus* a baixas concentrações de ampicilina é derivada à produção de PBP's de baixa afinidade e também à produção de β -lactamases por algumas espécies de *Enterococcus* (Rice, 2001). A literatura sugere que os *E. faecium* apresentam maior taxa de resistência à ampicilina do que os *E. faecalis* e a percentagem de sensibilidade à ampicilina é alta nestes últimos. No estudo de Hällgren *et al.* (2001) verificaram que num total de 322 isolamentos de *Enterococcus* (244 *E. faecalis*, 74 *E. faecium* e 4 *Enterococcus* de outras espécies), 100% de *E. faecalis* foram sensíveis à ampicilina ao contrário dos *E. faecium* que apresentaram uma taxa de resistência de 74,3%, sendo sensíveis 25,7%. Os autores constataram que os *E. faecium* apresentaram uma taxa de resistência à ampicilina muito superior às *E. faecalis*. Garcia-Vázquez *et al.* (2013) também concluíram que os *E. faecium* são mais resistentes à ampicilina do que os *E. faecalis*, numa relação de 1,1% para 76,9%. No presente estudo os resultados indicam que o *E. faecalis* apresenta uma taxa de resistência de 33,5%, e o *E. faecium* uma taxa de resistência de 89,5% à ampicilina. Já em relação à sensibilidade o *E. faecalis* apresenta uma taxa de 66,5% e o *E. faecium* de 10,5%. Para o género masculino e feminino os resultados de resistência e sensibilidade foram semelhantes, com maior taxa de resistência para o *E. faecium* e maior taxa de sensibilidade para o *E. faecalis*.

O *E. faecium* apresenta um nível de resistência mais elevado à ampicilina e à penicilina G comparativamente ao *E. faecalis*. Os *Enterococcus* possuem resistências intrínsecas contra a maioria dos antibióticos β -lactâmicos devido à baixa afinidade das PBP's (Murray 1990). Enquanto a maioria do *E. faecalis* são inibidos por baixas concentrações de antibióticos β -lactâmicos, os *E. faecium* apresentam altos níveis de resistência devido ao excesso de produção de PBP's de baixa afinidade, o que inibe a atuação dos antibióticos β -lactâmicos (Deslile e Perl, 2003).

Os resultados indicam, ainda, que o *E. faecalis* apresenta uma taxa de sensibilidade de 66,5% para a ampicilina e também para a penicilina G. Por conseguinte, uma taxa de resistência de 33,5% para a ampicilina e para a penicilina G. Em relação ao *E. faecium*, apresenta uma taxa de sensibilidade de 10,5% para a ampicilina e de 8,8% para a penicilina G, sendo resistentes 89,5% à ampicilina e 91,2% à penicilina G.

Estes dados demonstram a semelhança no efeito de resistência e sensibilidade dos dois antibióticos em estudo, para ambos os *Enterococcus*. Para o género os resultados foram semelhantes constatando pela não influência no efeito dos antibióticos. Através da comparação dos resultados de suscetibilidades antimicrobianas, em ambas as bactérias, parece não existir diferença entre os dois antibióticos em estudo. A literatura (Sreeja *et al.* 2012; Garcia-Vázquez *et al.*, 2013) é concordante com os resultados por nós obtidos.

5. CONCLUSÕES

Os antibióticos estudados apresentaram um efeito antimicrobiano idêntico quando colocados em contato com as bactérias *E. faecalis* e *E. faecium*. No entanto, o *E. faecalis* apresentou maior sensibilidade e *E. faecium* maior resistente, para ambos os antibióticos. A resistência e sensibilidade seguiram a mesma tendência em relação ao gênero, sem significância estatística. Futuramente poder-se-á testar um leque mais vasto de antibióticos na bactéria estudada, uma vez que a resistência aos antibióticos tem vindo a aumentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES MJ, FERREIRA ICFR, DIAS J, TEIXEIRA V, MARTINS A, PINTADO M. A REVIEW ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MUSHROOM. PLANTA MÉDICA. 2012; 78(16): 1707-1718.
- BACCARO MR, MORENO AM, CORRÊA A, FERREIRA AJP, CALDERARO FF. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “IN VITRO” E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE RÍTO CONSTITUINTES E PRODUTOS SINTÉTICOS SOBRE BACTÉRIAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES. ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO. 2002; 69(2): 15-18.
- BAKER CN, STOCKER SA, CULVER DH, THORNSBERRY C. COMPARISON OF THE E TEST TO AGAR DILUTION, BROTH MICRODILUTION, AND AGAR DIFFUSION SUSCEPTIBILITY TESTING TECHNIQUES BY USING A SPECIAL CHALLENGE SET OF BACTERIA. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1991; 29(3): 533-538.
- BIOMÉRIEUX. FIRST-HALF. BUSINESS REVIEW; 2010.
- BONGERS JH, FRANSSSEN F, ELBERS ARW, TIELEN, MJM. ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ESCHERICHIA COLI ISOLATES FROM THE FAECAL FLORA OF VETERINARIANS WITH DIFFERENT PROFESSIONAL SPECIALITIES. VETERINARY QUARTERLY. 1995; 17(4): 146-149.
- BRUGUERAS MC, GARCIA MM. ANTIBACTERIANOS DE ACCIÓN SISTÉMICA. PARTE I. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS. REVISTA CUBANA DE MEDICINA GENERAL INTEGRAL. 1998; 14(4): 347-361.
- CALDERWOOD SB, MOELLERING RC JR. PRINCIPLES OF ANTI-INFECTIVE THERAPY. IN: STEIN JH, EDITORS. INTERNAL MEDICINE. BOSTON: LITTLE BROWN AND CO; 1990:1202-1218.
- CHABNER BA, BRUNTON LL, KNOLLMANN BC. AS BASES FARMACOLÓGICAS DA TERAPÊUTICA DE GOODMAN E GILLMAN. (12ª EDIÇÃO). RIO DE JANEIRO: MCGRAW-HILL; 2012.
- DESLILE S, PERL TM. VANCOMYCIN RESISTANT ENTEROCOCCI. A ROAD MAP ON HOW TO PREVENT THE EMERGENCE AND TRANSMISSION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE. CHEST. 2003; (5 SUPPL):504S-18S.
- DEVRIESE LA, COLLINS MD, WIRTH R. THE GENUS ENTEROCOCCUS. (2ªED.). NEW YORK: SPRINGER-VERLAG; 1991.
- DODDAMANI PK, SRIKANTH, NANDINI T, RAJAGOPALAN R. PREVALENCE AND ANTIBIOGRAM OF ENTEROCOCCUS SPECIES IN A TERTIARY CARE HOSPITAL. WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES. 2013; 2 (5): 2689-2698.

- DUNNY GM, BROWN BL, CLEWELL DB. INDUCED CELL AGGREGATION AND MATING IN *STREPTOCOCCUS FAECALIS*: EVIDENCE FOR A BACTERIAL SEX PHEROMONE. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. 1978; 75(7): 3479-3483.
- FACKLAM RR, CARVALHO MGS, TEIXEIRA LM. HISTORY, BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS, AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING OF ENTEROCOCCI. WASHINGTON DC: AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY; 2002.
- FENNEL CW, LINDSEY KL, MC GAW LJ, SPARG SG, STAFFORD GI, ELGORASHI, EE, GRACE OM, VAN STADEN J. ASSESSING AFRICAN MEDICINAL PLANTS FOR EFFICACY AND SAFETY: PHARMACOLOGICAL SCREENING AND TOXICOLOGY. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY. 2004; 94(2-3): 205-217.
- FONTANA R, ALDEGHERI M, LIGOZZI M, LOPEZ A, SATTÀ G. OVERPRODUCTION OF A LOW-AFFINITY PENICILLIN-BINDING PROTEIN AND HIGH-LEVEL AMPICILLIN RESISTANCE IN *ENTEROCOCCUS FAECIUM*. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 1994; 38(9): 1980-1983.
- FRANKE AE, CLEWELL DB (1981). EVIDENCE FOR A CHROMOSOME-BORNE RESISTANCE TRANSPOSON (Tn916) IN *STREPTOCOCCUS FAECALIS* THAT IS CAPABLE OF "CONJUGAL" TRANSFER IN THE ABSENCE OF A CONJUGATIVE PLASMID. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 1981; 145(1): 494-502.
- FRISBY AJ. INTRODUCTION ON THE USE OF THE ANTIBIOTICS. GUIDELINE. THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY. 1995. EM [HTTP://JEFFLINE.TJU.EDU/CWIS/OAC/ANTIBIOTICS-GUIDE/](http://jeffline.tju.edu/cwis/oac/antibiotics-guide/) /INTRO.HTML.
- GARCIA-VÁZQUEZ EG, ALBENDIN H, HERNÁNDEZ-TORRES A, CANTERAS M, YAGUE G, RUIZ J, GÓMEZ J. ESTUDIO DE UNA CHORTE DE PACIENTES COM BACTERIEMIAS POR *ENTEROCOCCUS* SPP. FACTORES DE RIESGO PARA RESISTÊNCIA DE ALTO NÍVEL A AMINOGLICÓSIDOS. REVISTA ESPAÑOLA QUIMIOTERAPIA 2013; 26(3): 203-213.
- GERLACH EH. MICRODILUTION 1: A COMPARATIVE STUDY. IN: BALOWS A. EDITOR. CURRENT TECHNIQUES FOR ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING. SPRINGFIELD, ILL: CHARLES C. THOMAS PUBLISHER; 1974:63-76.
- GERLACH, G. ENTEROCOCCI FROM FOODS. FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS. 2002; 26(2):163-171.
- GRAY JW, STWEART D, PEDLER SJ. SPECIES IDENTIFICATION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM HOSPITALIZED PATIENTS. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 1991; 35:1943-5.
- GRAYSON ML, ELIOPOULOS GM, WENNERSTEN CB, RUOFF KL, DE GIROLAMI PC, FERRARO MJ ET AL. INCREASING RESISTANCE TO BET-LACTAM ANTIBIOTICS AMONG CLINICAL ISOLATES OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM*: A 22- YEAR REVIEW AT ONE INSTITUTION. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 1991; 35: 2180-4.
- HÄLLGREN A, ABEDNAZARI H, EKDAHL C, HANBERGER H, NILSON M, SAMUELSSON A ET AL. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF ENTEROCOCCI IN INTENSIVE CARE UNITS IN SWEDEN EVALUATED BY DIFFERENT MIC BREAKPOINT SYSTEMS. JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. 2001; 48(1): 53-62.
- HASHIMOTO T, HASHIMOTO S, MATSUZAKI M, SEKIGUCHI Y, HASHIMOTO Y, ASAO M, TAKAGI M. INVESTIGATION OF WHETHER CLSI BROTH MICRODILUTION METHOD IS APPLICABLE FOR MICs DETERMINATION OF *ENTEROCOCCUS* SPP. SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI. 2012; 53(5): 225-32.
- HERMAN DJ, GERDING DN. SCREENING AND TREATMENT OF INFECTIONS CAUSED BY RESISTANT ENTEROCOCCI. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 1991; 35(2): 215-219.
- HUYCKE MM, SAHM DF, GILMORE MS. MULTIPLE-DRUG RESISTANT ENTEROCOCCI: THE NATURE OF THE PROBLEM AND AN AGENDA FOR THE FUTURE. EMERGING INFECTIOUS DISEASE JOURNAL. 1998; 4(2):239-249.
- JORGENSEN JH. SELECTION CRITERIA FOR AN ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING SYSTEM. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1993; 31(11): 2841-2844.
- KOHLER W. THE PRESENT STATE OF SPECIES WITHIN THE GENERA *STREPTOCOCCUS* AND *ENTEROCOCCUS*. INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY. 2007; 297(3): 133-150.
- LIU D. MOLECULAR DETECTION OF HUMAN BACTERIAL PATHOGENS. AUSTRALIA: HARBURD; 2011.
- MACLOWRY JD, MARSH HH. SEMI-AUTOMATIC MICROTÉCHNIQUE FOR SERIAL DILUTION ANTIBIOTIC SENSITIVITY TESTING IN THE CLINICAL LABORATORY. THE JOURNAL OF LABORATORY AND CLINICAL MEDICINE. 1968; 72: 685-687.

MAROTHI YA, AGNIHOTRI H, DUBEY D. ENTEROCOCCAL RESISTANCE-AN OVERVIEW. INDIAN JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY. 2005; 23(4): 214-9.

MOELLERING RC JR. EMERGENCE OF ENTEROCOCCUS AS A SIGNIFICANT PATHOGEN. CLINICAL INFECTIOUS DISEASES. 1992; 14(6): 1173-1176.

MURRAY BE. VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCAL INFECTIONS. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 2000; 342(10): 710-721.

OGIER JC, SERROR P. SAFETY ASSESSMENT OF DAIRY MICROORGANISMS: THE ENTEROCOCCUS GENUS. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY. 2008; 126(3):291-301.

PINTO TJA, KANEKO TM, OHARA MT. CONTROLE BIOLÓGICO DE QUALIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS, CORRELATOS E COSMÉTICOS (2ª EDIÇÃO). SÃO PAULO: ATHENEU EDITORA; 2003.

RICE LB. EMERGENCE OF VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI. EMERGING INFECTIOUS DISEASES. 2001; 7 (2): 183-187.

SANDE MA, KAPUSNIK-UNER JE, MANDELL GL. AGENTES ANTIMICROBIANOS. CONSIDERACIONES GENERALES. IN: GOODMAN A, RALL TW, NIES AS, TAYLOR P. EDITORS. LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA. MÉXICO: EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA; 1993:991-1017.

SREEJA S, BABU PRS, PRATHAB AG. THE PREVALENCE AND THE CHARACTERIZATION OF THE ENTEROCOCCUS SPECIES FROM VARIOUS CLINICAL SAMPLES IN A TERTIARY CARE HOSPITAL. JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTICAL RESEARCH. 2012; 6(9): 1486-1488.

WIKLER MA. PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. NINETEENTH INFORMATIONAL SUPPLEMENT. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; 2009:149.