



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ENTEROCOCCUS RESISTENTE AOS GLICOPETIDEOS EM
HUMANOS, AVES E AMBIENTE, UBERLÂNDIA, MG.**

Carlos Roberto Menezes da Silva

Paulo Pinto Gontijo Filho
(Orientador)

UBERLÂNDIA – MG

2000

SISBI/UFU



1000200416



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

*MON
34.832
SERP
TES/MEM*

***ENTEROCOCCUS RESISTENTE AOS GLICOPETIDEOS EM
HUMANOS, AVES E AMBIENTE, UBERLÂNDIA, MG.***

Carlos Roberto Menezes da Silva

Dissertação apresentada à Universidade Federal De Uberlândia, com parte das exigências do Curso De Pós-Graduação Em Genética e Bioquímica, para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

**UBERLÂNDIA-MG
MAIO/2000**

"Não dê ouvidos às intrigas e calúnias; só a árvore que produz frutos é que se vê apedrejada, para deixá-los cair".

À árvore estéril ninguém dá importância.

A calúnia, muitas vezes, é uma honra para quem a recebe.

Não pare seu serviço por causa da calúnia.

Se pára de fazer o que estava fazendo, dá razão ao caluniador.

Siga à frente, e todos acabarão calando-se e no fim ainda baterão palmas ao seu trabalho."

(Minutos de Sabedoria, n.º 144).

OFERECIMENTOS

A DEUS

O Senhor é o meu pastor; nada me faltará. Deitar-me faz em pastos verdejantes; guia-me mansamente a águas tranqüilas. Refrigera a minha alma; guia-me nas veredas da justiça por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos; ungues com óleo a minha cabeça, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida, e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

(SALMO 23)

A MINHA FAMÍLIA

*A vocês que compartilharam, que sofreram com minha ausência quando o dever e os estudos me chamou. Que me receberam muitas vezes com silenciosa mágoa ou muda revolta, seja pela minha ausência, ou mesmo pelas saudades. Talvez o mérito deste feito não pertença somente a mim, mas a vocês que ao meu lado, mesmo que na maioria das vezes de longe, participaram do meu crescer, enquanto a vida passava. Obrigado pela vida, educação, compreensão, oportunidade, amor, carinho e **principalmente por me darem uma família.***

AGRADECIMENTOS

Dr. Paulo, por me mostrar que o verdadeiro educador não é aquele que transmite o conhecimento e sim aquele que mostra a seu aluno que ele é capaz de aprender.

Dr.^a Ana M. Bonetti, por tanto ter acrescentado em meu trabalho, e em minha vida, sempre disposta a ensinar.

Dr.^a Brasiliina por ter me proporcionado o estágio em seu laboratório e principalmente por ter aceitado o convite de participar da banca examinadora.

Dr. Malcon e *Dr. Miguel Tanús* por aceitarem participar como membros suplentes da banca examinadora, onde muito acrescentaram.

Marcela, quando você surgiu em minha vida de maneira tão sutil nunca imaginei o quanto você se tornaria importante pra mim. Agora não é mais possível falar de mim sem lembrar você.

Rodrigo e *Fabiana* pelos grandes momentos de companheirismo e descontração, onde pequenos gestos substituíram grandes palavras.

José Domingos e *Marcelo Alcântara* pela confiança, credibilidade, indicação, incentivo, pelas dicas, resolução das dúvidas e pela grande amizade.

Geraldo Sodoyama pelas dicas, resoluções de dúvidas, incentivo, apoio, indicação, ajuda na elaboração do manuscrito e também pelas risadas e momentos de descontração.

Adriana e *Kátia* pela completa correção do português.

Marcelo Hayashi pela colaboração na coleta, caracterização e identificação, bem como pelos risos e jogos de fliperama.

Rose, por ceder amostras de *Enterococcus* que muito enriqueceram meu trabalho, pela resolução de dúvidas e ajudas na confecção do manuscrito.

Claudete o meu agradecimento todo especial, por todos os meios preparados, técnicas realizadas, consultorias, companheirismo, atenção, pelas músicas, risos, etc... etc... etc..., pelo programa do ratinho. Sem você este trabalho não haveria sido realizado

Ricardo, Ângela e Geraldo Melo, Denise, Eliete, Renata, Dayane, Helisângela, Wilson, Rutnêia, Hugo, Henrique, e toda a turma da medicina.

Dircelina e Eduardo por abrir as portas do Laboratório BIOVIDA, para que eu pudesse realizar as coletas dos pacientes sintomáticos

Gilberto, Maria José, Lorena, Graziela, Rendel pela grande ajuda nos momentos em que tive de mudar horários e pelos grandes favores prestados.

Profissionais e pacientes do HC-UFU que tornaram possível a

realização desse trabalho

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	vi
Introdução.....	01
Objetivos.....	14
Materiais e Métodos.....	15
Resultados.....	31
Discussão.....	40
Conclusões.....	57
Resumo.....	59
Summary.....	61
Referências Bibliográficas.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: <i>Enterococcus</i> resistente ou não a vancomicina em humanos, quando do cultivo primário em meio seletivo...	32
Tabela 02: <i>Enterococcus</i> resistente ou não a vancomicina em frangos, quando do cultivo primário em meio seletivo.....	33
Tabela 03: <i>Enterococcus</i> resistente ou não a vancomicina em fontes ambientais, quando do cultivo primário em meio seletivo.....	34
Tabela 04: Identificação dos isolados de <i>Enterococcus</i> obtidos de amostras de humanos, aves e fontes ambientais.....	35
Tabela 05: Espectro de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de <i>Enterococcus</i> pelo método de difusão em gel.....	36
Tabela 06: Resistência de alto nível a aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina) de isolados de <i>Enterococcus</i> em humanos, aves e fontes ambientais....	37
Tabela 07: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para vancomicina e teicoplanina das amostras de <i>Enterococcus</i> provenientes de humanos, aves e fontes ambientais.....	38

Tabela 08: Fenótipos de resistência dos isolados *Enterococcus* em
humanos, aves e fontes ambientais..... 39

I - INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares estão entre os maiores problemas de saúde pública em todo o mundo. Além da sua importância humana, social e econômica, estão relacionadas entre as principais causas de morbidade, mortalidade e custos elevados (French, 1989; Brasil, 1992; Bennett, Brachman, 1992; Brachman, 1993). As taxas de pacientes com estas infecções oscilam entre 5,0 e 10,0% nos países desenvolvidos (Moro *et al.*, 1986; Ayliffe, 1986; Wenzel, 1993). No Brasil, existem poucos dados que incluem taxas de incidência de 5,0% em alguns hospitais particulares na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (Prade *et al.*, 1995) e prevalência de 13,0% em 103 hospitais terciários públicos ou particulares localizados em capitais (Starling *et al.*, 1995). A taxa total

de mortalidade associada às infecções hospitalares foi de 4,0% nos Estados Unidos, sendo que, em 25,0% destas (19.000 mortes) foi diretamente atribuída a estas infecções; Elas estão entre as dez principais causas de óbito no país (Haley et al., 1985). Embora haja muita discussão em relação as avaliações referentes aos custos das infecções, as estimativas nos Estados Unidos são da ordem de US\$ 4,5 bilhões/ano (Haley, 1980).

Os principais agentes de infecções hospitalares têm mudado periodicamente em função da prática médica, incluindo, sobretudo o uso de antibióticos. Nesta última década, o intervalo entre estas mudanças diminuiu e o número de diferentes microrganismos causadores destas infecções aumentou. A partir dos anos quarenta, com o advento da penicilina, o *Staphylococcus aureus* substituiu *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* como o patógeno hospitalar mais importante. Já nos anos setenta os bacilos Gram-negativos aeróbicos ultrapassaram os *Staphylococcus aureus*. No final dos anos setenta e início dos anos oitenta, os microrganismos Gram-positivos tornaram-se as bactérias mais frequentes, incluindo aqueles que, tradicionalmente, até então, considerados como não virulentos, tais como: *Staphylococcus coagulase negativa* e *Enterococcus*, ao lado dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (Herwaldt, Wenzel, 1995).

Os Enterococos estão, entre os três principais patógenos hospitalares, associados, principalmente, a etiologia de infecções urinárias (16,0%) e bacteremias (8,0%) (Pearce *et al.*, 1998; Netz, 1998; Couto *et al.*, 1999). Embora, sejam considerados de baixa virulência, esta participação deve-se a fatores pré disponentes, presentes em pacientes hospitalizados. Entre estas infecções, as bacteremias, incluindo aquelas associadas a endocardites, apresentam-se como as mais graves. (Moellering, 1990; Banerjee *et al.*, 1991).

A multiresistência aos antimicrobianos apresenta-se como uma das características mais expressivas destes patógenos (Jacoby, 1996; Gold, Moellering, 1996). Os genes responsáveis pela resistência estão localizados em cromossomos, plasmídios ou transposons e podem ser transferidos horizontalmente e verticalmente entre os microrganismos, sobretudo por meio do fenômeno de conjugação (Tanimoto *et al.*, 1993; Simjee, Gill, 1997).

Entre os fatores que tem sido associados ao aparecimento de microrganismos resistentes e multiresistentes incluem: o uso de antimicrobianos, uso de promotor de crescimento em rações animais e deficiências nas práticas de controle de infecção (Aymes, Gemmell, 1997).

A aquisição e a disseminação de resistência bacteriana aos antibióticos mais frequentemente utilizados é um problema rotineiro.

(Wood, 1996). Nos países em desenvolvimento, a utilização de antibióticos é, tradicionalmente, muito frequente e pouco judicosa (Nettleman, 1993; Panutti, Grinbaum, 1995). Em hospitais terciários brasileiros, cerca de cinquenta por cento dos pacientes fazem uso empírico destes fármacos (Prade et al., 1995; Couto, 1999) em condições rotineiramente empírica e em parte como resultado da falta de um suporte laboratorial adequado (Panutti, Grinbaum, 1995). Adicionalmente em função da carência de recursos financeiros e humanos, programas de controle e prevenção de infecção hospitalar inexistem em mais de oitenta por cento dos hospitais do país, segundo o Ministério da Saúde (Ayliffe, 1986).

Os patógenos hospitalares multiresistentes, mais importantes incluem, entre as bactérias Gram-negativas, as *Enterobacteriaceae* produtores de β-lactamase de espectro estendido e as não fermentadoras, com destaque para *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*, *Stafilococos coagulase negativa* e *Enterococcus* entre os Gram-positivos (Gold, Moellering, 1996).

Embora, as infecções enterocócicas estejam entre as poucas as quais está preconizado a associação de antimicrobianos (penicilinas e aminoglicosídeos), a resistência a níveis altos dos mesmos vem acarretando dificuldade no seu tratamento (Swartz, 1994; Marcus et al.,

1997). Esse tipo de resistência, além de exigir a substituição de um destes antimicrobianos por um glicopeptídio, tem implicações epidemiológicas, pois pode ser transferido de um microrganismo para outro (Murray, 1990; Newmann *et al.*, 1991; Gray, Pedler, 1992) A resistência aos aminoglicosídeos pode ser classificada como de baixo e nível alto, sendo que, a resistência de nível baixo está associada a um transporte inadequado através da parede enquanto na de nível alto, enzimas codificadas a nível de genes cromossomiais inativam esses antibióticos. (Simjee, Gill, 1997). O mecanismo de resistência às penicilinas e outros β -lactâmicos envolvem alterações em uma ou mais PBPs ("penicilín-binding proteins"), que são importantes na síntese da parede celular bacteriana e que se ligam aos antibióticos β - lactâmicos. (Gray , Pedler, 1992; Gordts *et al.*, 1995; Wood, 1996). Outro importante mecanismo é a produção de β - lactamases, enzimas capazes de hidrolizar os β - lactâmicos. Estas alterações provocam uma menor afinidade às penicilinas e antibióticos relacionados (Wood, 1996).

As Taxas de resistência aos β -lactâmicos são inferiores a 10% nos hospitais dos Estados Unidos e Reino Unido (Sapico *et al.*, 1989; Gray, Pedler, 1992). Os dados publicados por Ribas e Gontijo-Filho (1999) bem como os de Netz (1998) também apontam que essa resistência ainda não é comum no Brasil. Em relação aos aminoglicosídios a resistência tem sido detectada mais freqüentemente (Patterson, Zervos, 1990) sendo

evidenciada inicialmente na França para gentamicina (Horodniceanu et al., 1979) e a seguir em vários países do hemisfério norte em freqüências variando de 4,5% a 15,0% (Murray, 1990; Newmann, Sahm, Thomsberry, 1991; Gray; Pedler, 1992; Woodford et al., 1995; Simjee, Gill, 1997). No Brasil, os dados disponíveis são de Cereda et al.. (1997), demonstrando que 26,4% e 24,8% das amostras foram resistentes à gentamicina e estreptomicina respectivamente e de Ribas e Gontijo-Filho (1999) que evidenciaram freqüências de resistência de 20,0% para gentamicina e 15,5% para estreptomicina.

Os glicopeptídeos inibem a síntese de peptideoglicano na parede bacteriana, combinando com a porção D-alanil-D-alanina do precursor na parede, prevenindo as reações de transglicosilação e transpeptidação (Simjee; Gill, 1997). A presença de Enterococos com graus variáveis de resistência aos glicopeptídeos foi, primeiramente, documentada em 1988, seguindo o seu isolamento na Europa e nos Estados Unidos. Atualmente, a resistência à vancomicina em Enterococos pode ser dividida em quatro fenótipos principais: VanA, VanB, VanC e VanD, baseado na resistência para vancomicina (VA) e teicoplanina (TE) e se o mecanismo é induzido ou constitutivo (Gray, Pedler, 1992; Boyce, 1995; Gold , Moellering, 1996; Bates, 1997; Netz, 1998).

As amostras que apresentam o fenótipo VanA possuem um nível alto de resistência, induzida à vancomicina ($MIC = 64$ a $>1000 \mu\text{g/mL}$) e

teicoplanina (MIC= 16 a 512 µg/mL), mediada por plasmídios e transferível a outras bactérias Gram-positivas (Courvalin, 1990). O gene responsável pelo nível alto de resistência codifica uma proteína da membrana citoplasmática com um peso molecular de aproximadamente 39 kDa. Este nível alto de resistência é encontrado, principalmente, em *Enterococcus faecium*, mas também pode ocorrer em *Enterococcus faecalis* (Gray, Pedler, 1992; Lundstrom et al., 1995; Gold and Moellering, 1996). As amostras do fenótipo VanB mostram resistência moderada (MIC= 4 a 1024 µg/mL), induzida à vancomicina, mas permanecem suscetíveis (MIC= 0,5 µg/mL) à teicoplanina. Devido ao fato de apenas a vancomicina agir como indutor nessa classe de antimicrobianos, sendo que essa resistência intermediária também é transferível e o gene é, provavelmente, cromossomial. Essa resistência foi relatada em *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (Gray, Pedler, 1992; Lundstrom et al., 1995; Gold, Moellering, 1996). As amostras do fenótipo VanC apresentam níveis baixos de resistência à vancomicina (MIC= 2 a 32 µg/mL), mas são suscetíveis à teicoplanina (MIC= 0,5 µg/mL), propriedade esta que é intrínseca na maioria dos isolados de *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavesiensis* (Neumann et al., 1991; Gray , Pedler, 1992; Gray , Pedler, 1992; Woodford et al., 1995; Mounthon et al., 1996; van Horn et al., 1996; Devriese et al., 1996; Gold , Moellering, 1996; Bates, 1997). O fenótipo VanD, recentemente, descrito na espécie

E. faecium (Perichon et al., 1997) expressa resistência constitutiva à vancomicina ($\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g/mL}$) e em níveis baixos à teicoplanina ($\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/mL}$).

Os fenótipos VanA e VanB são, usualmente, associados com *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (Bates, 1997). A presença de isolados de *E. faecium* do fenótipo VanA foi detectada em espécimes clínicos provenientes de humanos e de animais e de amostras de água coletadas em estação de tratamento de esgoto em regiões da Alemanha e outros países da Europa (Klare et al. 1995-b; Bates, 1997). Muitos isolados de humanos e animais na Europa são *E. faecium* do genótipo vanA. A situação atual na América do Norte é, ligeiramente, diferente, pois embora o *E. faecium* VanA seja mais comum, o fenótipo VanB é responsável por um número significante de surtos nosocomiais (Wiley, 1996).

Entre os fatores de risco que estão associados com colonização e/ou infecção por *Enterococcus* Resistente á Vancomicina (VRE) incluem: infecção hospitalar, presença em UTI, hospitalização prolongada, doença de base grave, insuficiência renal, procedimentos invasivos, terapêutica prévia com antimicrobianos, especialmente vancomicina e cefalosporinas de segunda e terceira geração, descontaminação seletiva do trato digestivo, proximidade de casos conhecidos de infecções por VRE (Arthur et al., 1994; Jacoby, 1996).

Os *Enterococcus* podem ser encontrados no solo, água, pássaros, insetos e animais (Devriese LA et al., 1992a; Devriese LA et al., 1992b), fazendo parte da flora normal do trato intestinal de aves, animais e humanos (Bates, 1997). Nos humanos fazem parte da flora normal das mucosas do intestino e vagina. (Murray BE, 1990; Facklam, Sahm, 1995).

Relatos de VRE começaram a aparecer em meados dos anos 80 na Europa e agora são um problema importante nos hospitais dos Estados Unidos (Weber, Rutala 1997). O “Hospital Infection Control Practice Advisory Committee” (HICPAC) do “Center for Disease Control and Prevention” (CDC) elaborou normas sobre a prevenção de sua transmissão nosocomial (CDC, 1995). A presença de VRE foi descrita nas fezes de pacientes hospitalizados, bem como de indivíduos na comunidade, sintomáticos (com diarréia), ou assintomáticos (Bates, 1997). As taxas de portadores destes microrganismos variam com a localidade e com as características do hospital (Woodford et al., 1995).

Nos Estados Unidos, as taxas de colonização oscilam entre 8,0% - 17,0% em pacientes graves mantidos em UTIs. (Weber, Rutala 1997.). Em um inquérito realizado por Bontem et al. (1996), 4,0% de indivíduos assintomáticos carreavam VRE no intestino quando da admissão hospitalar, sendo que não utilizaram antibióticos no período de dois meses. Nos hospitais da Europa, o problema parece menos importante, mas Jordens et al. (1994) encontraram uma frequência de 15,0% de

portadores, quando de um surto por VRE. Gordts *et al.* (1995) e Endtz *et al.* (1996) relataram uma menor proporção de pacientes colonizados por VRE (3,5% e 1,5%, respectivamente), sendo que o primeiro estudo foi realizado na Bélgica em condições endêmicas e o segundo na Holanda em condições de alto risco.

Estudos realizados no Reino Unido (Jordens *et al.*, 1994), Alemanha (Klare *et al.*, 1995-a) e Bélgica (Van der Auwera *et al.*, 1996) apontam taxas de 2,0%, 12,0% e 28,0%, respectivamente, de pacientes comunitários assintomáticos colonizados com VRE no trato intestinal. Por outro lado as infecções adquiridas na comunidade por VRE são extremamente raras (Bates, 1997).

A presença de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina foi detectada também nas fezes de porcos, aves domésticas e animais de estimação na Europa, onde o uso de um glicopeptídio (avoparcina) em rações animais está bem disseminada em alguns países, ao contrário do que é observado nos Estados Unidos (Bates, 1997). Bates *et al.* (1994) observaram uma correlação significativa entre o uso deste glicopeptídeo e a presença de VRE em fezes e carcaças de frango. Em estudo realizado na Dinamarca, observou-se que cinco de oito fazendas que usavam este antibiótico apresentaram VRE nos frangos, ao contrário do observado em seis fazendas onde ele não foi utilizado como promotor de crescimento. Na mesma investigação, os autores encontraram relação

entre o uso deste glicopeptídio e a presença de VRE em suínos (Bates, 1997). Devriese *et al.* (1996) verificaram que além de frangos e porcos, 8,0% de cavalos e cães eram positivos para VRE, ao contrário de animais silvestres mantidos em jardins zoológicos. Há ainda relatos da sua presença nas fezes de cães e gatos na Holanda (van Belkum, 1996) e nos Estados Unidos (Dunne, 1996), onde esses autores sugerem que este microrganismo em animais de estimação pode ter sido adquirido por meio de ingestão de rações contendo carne proveniente de animais que utilizaram avoparcina.

No Brasil, os antibióticos mais comumente utilizados como promotores de crescimento são: olaquindox, colistina, neomicina, lincomicina, espiramicina, flavomicina, avoparcina, avilamicina, bacitracina, virginiamicina, nitrovin, eramicina, halquinol, tilosina, eritromicina (Benício, 1996), sendo vedado o uso de tetraciclinas, penicilinas, cloranfenicol e sulfonamidas (Motta, 1996) e mais recentemente a vancomicina.

Outras fontes que vêm merecendo atenção especial é o esgoto (Klare *et al.*, 1993; Bates *et al.*, 1994) e as superfícies hospitalares (Weber, Rutala 1997). A quantidade de VRE detectada no esgoto variou entre 1,4 e 20 microrganismos/mL, o que representa mais precisamente uma porcentagem de 0,1% na Alemanha (Klare *et al.*, 1993) e 0,4% na Espanha (Torres *et al.*, 1994), de todos os *Enterococcus* encontrados.

Torres *et al.*, (1994) encontraram VRE em esgoto que recebia efluente de um hospital, do qual casos de infecções por VRE não foram descritos. Gordts *et al.*, (1995) descreveram situação semelhante na Bélgica. Bates, (1997), com base nestes dados, admite que estes microrganismos não são unicamente hospitalares, mas podendo ser encontrados na comunidade e no ambiente.

A participação de superfícies de enfermarias ou quartos ocupados por pacientes com infecções por VRE são motivos de preocupação, entretanto não há evidências diretas destes itens na cadeia epidemiológica de infecções por VRE (Boyce *et al.*, 1994). Embora, a transmissão deste microrganismo entre pacientes ocorra, principalmente, pelas mãos de profissionais de saúde, ela também pode ocorrer por meio do contato indireto com superfícies inanimadas, tais como fomites, instrumentos médicos, superfícies ambientais e veículo comum (água e alimentos contaminados) (Weber, Rutala 1997).

Há um risco potencial de transferência de genes de resistência presentes no VRE “*in vivo*” para outros microrganismos como o *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Staphylococcus coagulase negativo* e *Corynebacterium jeikeium* para as quais a vancomicina é frequentemente a única opção no tratamento (Noskin, *et al.*, 1995; Evans , Kortas, 1996; Bates, 1997, Leclercq , Courvalin, 1997). Noble e colaboradores (1992) demonstraram que a resistência (VanA)

pode ser transferida “*in vitro*” de *Enterococcus faecalis* para MRSA. Esta possibilidade tornou o controle de infecções por VRE uma alta prioridade, pois a falta de tratamento antimicrobiano para infecções por MRSA, microrganismo mais virulento, resultaria em um problema muito grave (Monteclaro et al., 1995). Simjee e Gill (1997) demonstraram que a transmissão do gene VanA, responsável pela resistência dos *Enterococcus* a glicopeptídeos, entre humanos e animais expostos a avoparcina, podem ocorrer pela transferência direta entre amostras de VRE, bem como a disseminação horizontal de genes de resistência entre amostras.

II - OBJETIVOS

- Avaliar a presença de *Enterococcus*, particularmente *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, resistentes ou não aos antimicrobianos em diferentes fontes (humanos, aves e ambiente);
- Avaliar as taxas de resistência à penicilina e aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina);
- Definir os fenótipos de resistência aos glicopeptídeos entre os isolados de *Enterococcus*.

III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 - Humanos

3.1.1.1 - Hospitalizados

Foram utilizadas amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, (hospital terciário, de ensino, e possui 400 leitos). Elas foram provenientes de pacientes infectados ($N=70$) e/ou colonizados ($N=60$) detectados por meio de vigilância ativa, realizadas no laboratório e na farmácia do hospital (pacientes em uso de vancomicina) respectivamente, no período de abril a setembro de 1996.

3.1.1.2 - Não hospitalizados

Foram coletadas espécimes clínicos de indivíduos:

- Sintomáticos (diarréia): atendidos no laboratório de análises clínicas “BIOVIDA” (N=50)
- Assintomáticos: voluntários hígidos da comunidade (N=50)

3.1.2 - Aves

3.1.2.1 - Fezes

Foram utilizadas fezes de frango provenientes de duas granjas, a saber:

- Granja A (com boas condições sanitárias) (N = 10)
- Granja B (com más condições sanitárias) (N=10).

3.1.2.2 - Carcaças

Foram utilizadas carcaças de frangos provenientes de dois abatedouros:

- Abatedouro A (com boas condições sanitárias) (N = 10)
- Abatedouro B (com más condições sanitárias) (N = 10).

3.1.3 - Ambiente

3.1.3.1 - Piso

Foram coletadas materiais de pisos em:

- Centros Cirúrgicos: nos oito hospitais da cidade de Uberlândia, próximo a mesa de cirurgia (N = 86) ;
- Enfermarias: no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, próximo aos leitos de pacientes internados, que estavam em uso de vancomicina (N=20)

3.1.3.2 - Esgoto

Foram coletados materiais de esgoto, incluindo:

- Hospitalar (Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia) (N =5) ;
- Municipal (Rio Uberabinha) (N = 5) ;
- Residencial (N =5).

3.1.3.3- Água

As amostras de água foram provenientes de:

- Sistema de distribuição do município ($N = 81$) ;
- Consumo humano sem tratamento ($N = 5$) ;
- Água Mineral ($N = 4$) ;
- Consumo Animal ($N = 10$) .

3.2 - Coleta

3.2.1 - Humanos

3.2.1.1 - Hospitalizados

As amostras de *Enterococcus* foram isoladas a partir de diferentes espécimes clínicos, pela rotina do laboratório do Hospital de Clínicas da UFU. Em seguida, foram transportadas para o laboratório de microbiologia do Departamento de Patologia.

3.2.1.1.2 - Colonizados

Foram realizadas coletas de fezes, por meio de swab anal em pacientes em uso de vancomicina monitorados quanto a presença de *Enterococcus* resistente a vancomicina.

3.2.1.2 - Não-hospitalizados

As fezes foram coletadas com swab anal e este introduzido em tubo de KAA “Kanamycin Aesculin Azide”, contendo 20 μ g/mL de vancomicina, 16 μ g/mL de ceftazidima e 300 U/ml de polimixina (2 mL por tubo) (Bates et al., 1994).

3.2.2 – Aves

3.2.2.1 - Fezes

As coletas foram feitas com uma espátula estéril e o material transportado para o laboratório em tubos estéreis.

3.2.2.2 - Carcaças

O material foi coletado com swab a partir da região interna da carcaça e transportados para o laboratório em tubo estéril contendo 2 mL de KAA + Antibióticos

3.2.3 - Ambiente

3.2.3.1 - Piso

Os materiais foram coletados com swabs estéreis e introduzidos em tubos contendo KAA + Antibióticos sendo em seguida transportadas para o laboratório de Microbiologia da UFU.

3.2.3.2 - Esgoto

Foram coletados volume de 10 mL de cada tipo de esgoto com auxílio de um erlenmeyer estéril e transportados rapidamente para o laboratório de Microbiologia da UFU.

3.2.3.3- Água

Volumes de 300 mL de cada uma das amostras de água foram coletados em frascos previamente esterelizados contendo 0,3 mL de solução tiossulfato de sódio 1,8%.

3.3 - Cultivo Primário

3.3.1 - Humanos

3.3.1.1 - Hospitalizados

3.3.1.1.1 - Infectados

As amostras foram isoladas nos meios de rotina utilizados no laboratório do HC-UFG e cultivadas em Ágar Bile Esculina contendo 20 µg/mL de vancomicina no laboratório de Microbiologia da UFU.

3.3.1.1.2 - Colonizados

Os espécimes foram cultivados em Ágar Bile Esculina contendo 20 µg/mL de vancomicina.

3.3.1.2 - Não Hospitalizados

Os espécimes foram cultivados em meio KAA contendo antibióticos incubados por 48 horas à 35 °C e as culturas esculino positivas (escuras) foram subcultivadas em placas de ágar bile esculina com 20µg/mL de vancomicina (BATES et al., 1994) pela técnica de esgotamento.

3.3.2 - Aves

3.3.2.1 - Fezes

3.3.2.1.1 - Sem enriquecimento prévio

As fezes foram suspensas (1,0%) em água destilada estéril. Volumes de 0,1mL foram cultivados na superfície de placas de ágar bile esculina com e sem vancomicina (20 μ g/ml). Sendo incubadas a 35°C por um período de 24 a 48 horas, quando foi avaliado quantitativamente o número de colônias (UFC/mL).

3.3.2.2.1 - Com enriquecimento prévio

As amostras de fezes foram suspensas (1,0%) em água destilada estéril, inoculadas em tubos contendo antibióticos, com auxílio de Swab estéril. Elas foram incubadas por 48 horas à 35 °C e subcultivadas, quando esculino positivas para placas de ágar bile esculina com e sem vancomicina (20 μ g/ml), pela técnica de esgotamento.

3.3.2.2 - Carcaças

3.3.2.2.1 - Sem enriquecimento prévio

Foram semeadas na superfície de placas de Ágar Bile Esculina com e sem vancomicina ($20\mu\text{g}/\text{mL}$). Essas foram incubadas a 35°C por um período de 24 a 48 horas, quando foram avaliadas quantitativamente o número de colônias por mL (UFC/mL).

3.3.2.2.2 - Com enriquecimento prévio

Os tubos de KAA contendo antibióticos foram incubados por 48 horas à 35°C e a suspensão resultante quando esculinó positivas semeadas em placas de ágar bile esculina com e sem vancomicina ($20\mu\text{g}/\text{mL}$), pela técnica de esgotamento.

3.3.3 - Ambiente

3.3.3.1 - Piso

A suspensão em TSB foi subcultivada em Ágar Bile Esculina contendo 20 µg/mL de vancomicina.

3.3.3.2 - Esgoto

Volumes de 0,1mL de diluições decimais (1:10¹, 1:10², 1:10³), foram cultivados em placas contendo ágar bile esculina com e sem 50µg/mL de vancomicina. Estas foram incubadas a 35°C por um período de 24 a 48 horas, quando foram avaliados o número de colônias por mL (UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônia por mililitro).

3.3.3.3- Água

A água coletada foi filtrada em membrana de Millipore, utilizando-se a bomba de vácuo, e equipamento para filtração. Em seguida, a membrana de Millipore foi cultivada em placas de Ágar Bile Esculina. As colônias esculino positivas foram estocadas até o momento de sua caracterização

3.4 - Conservação das amostras

As amostras provenientes dos diferentes materiais foram cultivadas em “Brain Heart Infusion” (BHI) contendo 10% de glicerol e após a obtenção do crescimento mantidas em freezer a -20 ° C.

3.5 - Caracterização do gênero *Enterococcus*

As colônias suspeitas (esculino positivas) foram, inicialmente, identificadas como bactérias Gram-positivas por meio da coloração de Gram. Os seguintes testes foram utilizados para caracterização do gênero *Enterococcus*: catalase, tolerância à 6,5% de NaCl em meio de “Tripiticase Soy Broth” (TSB) e hidrólise “ α -Pyroglutamic Acid β -Naphthylamide” (PYR)

3.6 - Identificação de espécies de *Enterococcus*

A caracterização a nível de espécie foi realizada pela redução do telurito de potássio (0,03%) em meio “Trypticase Soy Agar” (TSA), fermentação de carboidratos, utilização de piruvato, detecção de motilidade, produção de pigmento e produção de arginina-descarboxilase (Facklam & Collins, 1989).

A determinação da fermentação à partir de carboidratos foi efetuada utilizando-se os seguintes açucares: α-arabinose, lactose, manitol, D-rafinose, ribose, sacarose, D-sorbitol e D-sorbose. O meio utilizado foi o BHI acrescido de 1% do respectivo carboidrato e a leitura foi feita após 24 horas em até 7 dias de incubação à 37º C.

3.6 - Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

3.6.1 - Técnica de difusão em gel

Os isolados foram submetidos à avaliação frente os seguintes antimicrobianos: ampicilina, gentamicina, penicilina, teicoplanina e vancomicina, seguindo-se a metodologia do "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS, 1997-a).

A padronização do inóculo foi feita pela escala 0,5 de McFarland, que corresponde a uma concentração de 10^6 UFC/mL. Foram utilizadas como controle amostras de *Enterococcus faecalis* ("American Type Culture Collection" ATCC-29212), *Enterococcus faecium* (SS-1274).

3.6.2 - Técnica de diluição em gel

Os testes foram realizados em ágar Muller Hinton e o inóculo foi preparado como descrito no item anterior, e aplicado com aplicador de Steers na superfície do meio de cultura contendo gentamicina e estreptomicina nas concentrações de 500 µg/mL e 2000 µg/mL, respectivamente (Neuman, 1991). Como controle foram utilizados os

microrganismos *Enterococcus faecalis* (CL-445), *Enterococcus faecium* (CL-240).

3.6.3 - Teste de concentração inibitória mínima

Os testes foram realizados seguindo-se a metodologia do "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS, 1997-b), em meio Muller Hinton, adicionando-se diferentes concentrações de :

- Vancomicina: (1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 8 μ g/mL, 16 μ g/mL, 32 μ g/mL, 64 μ g/mL, 128 μ g/mL, 256 μ g/mL, 512 μ g/mL e 1024 μ g/mL) ; e,
- Teicoplanina: (0,125 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 8 μ g/mL, 16 μ g/mL, 32 μ g/mL, 64 μ g/mL, 128 μ g/mL, 256 μ g/mL e 512 μ g/mL) (Murray, 1990).

Como controle foram utilizados os microrganismos referidos no item "3.6.1" e placas sem os antimicrobianos.

3.7 - Determinação dos fenótipos

Os isolados foram classificados nos fenótipos VanA, VanB e VanC, segundo a tabela abaixo. (Gold, Mollerling, 1996).

Característica	Fenótipos		
	VanA	VanB	VanC
Vancomicina CMI ($\mu\text{g/mL}$)	64 a >1000	<4 a 1024	2 a 32
Teicoplanina CMI ($\mu\text{g/mL}$)	16 a 512	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$
Espécies mais frequentes	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>
Determinante gênico	Adquirido	Adquirido	Intrínseco
Transferência	Sim	Sim	Não

IV - RESULTADOS

Neste estudo foram obtidos 71 isolados de *Enterococcus* provenientes de fontes humana (62), aviária (01) e ambiental (08), com uma predominância daquelas suscetíveis (93.0%) à vancomicina, sendo que apenas cinco (7.0%) foram resistentes a este antimicrobiano quando do cultivo primário.

Os resultados referentes a pesquisa de VRE em pacientes hospitalizados ou não e indivíduos sintomáticos ou assintomáticos estão representados na tabela 1. No grupo dos hospitalizados foi detectado um isolado (1.43%) entre os 70 pacientes com infecções hospitalares enterocócicas e dois (3.33%) em 60 pacientes pesquisados quanto a colonização por este microrganismo. Neste grupo de pacientes, bem

como naquele de pacientes não-hospitalizados não foi utilizado meio de Ágar Bile Esculina sem vancomicina.

No grupo dos 100 indivíduos não hospitalizados a presença de VRE só foi documentada em 4% (n=2) dos indivíduos sintomáticos com diarréia.

Tabela 01: Pesquisa de *Enterococcus* resistente ou não a vancomicina em humanos, quando do cultivo primário em meio seletivo.

		Pacientes n.º	<i>Enterococcus</i>							
			Pacientes n.º	Suscetível		Resistente		Total		
				%	n.º	%	n.º	%	n.º	
Hospitalizados	Infectados	70	57	24.8	01	0.4	58	25.2		
	Colonizados	60	- *	0.0	02	0.9	02	0.9		
Não	Sintomáticos	50	- *	0.0	02	0.9	02	0.9		
Hospitalizados	Assintomáticos	50	- *	0.0	00	0.0	00	0.0		
TOTAL		230	57	24.8	05	2.2	62	27.0		

* Não foi utilizado o meio Ágar Bile Esculina sem vancomicina

Em relação aos materiais provenientes de aves, além do cultivo em Ágar Bile Esculina com e sem vancomicina, utilizou-se também o enriquecimento prévio em KAA. No entanto foi obtido apenas o crescimento de uma amostra de *Enterococcus* suscetível à vancomicina, a partir de fezes de frango (Tabela 2).

Tabela 02: Pesquisa de *Enterococcus* resistente ou não a vancomicina em frangos, quando do cultivo primário em meio seletivo.

Materiais de aves	n. ^o Amostras	<i>Enterococcus</i>			
		Suscetível		Resistente	
		n. ^o	%	n. ^o	%
Fezes	20	01	2.5	00	0.0
Carcaças	20	00	0.0	00	0.0
TOTAL	40	01	2.5	00	0.0

Os materiais provenientes de ambiente foram obtidos das seguintes fontes: piso hospitalar de centros cirúrgicos e enfermarias; esgoto hospitalar, residencial e municipal; água de consumo. Os resultados estão na tabela 3 e mostram a presença de oito isolados de *Enterococcus*, todos suscetíveis à vancomicina. Cerca de dois terços (62,5%) foram provenientes de esgoto hospitalar, entretanto, não foi constatada a presença deste microrganismo em 106 amostras coletadas de piso hospitalar. Com relação à água foram analisadas 86 amostras tratadas com cloro e 14 não cloradas, na quais foram obtidos três isolados, sendo dois provenientes de água de consumo animal tratada.

Tabela 03: Pesquisa de *Enterococcus* resistente ou não a vancomicina em fontes ambientais, quando do cultivo primário em meio seletivo.

Materiais	n.º Amostras	<i>Enterococcus</i>			
		Suscetível	Resistente	n.º	%
Piso hospitalar	106	00	00,0	00	00,0
Esgoto	15	05	02,3	00	00,0
Água *	100	03	01,4	00	00,0
TOTAL	221	08	03,7	00	00,0

* Para análise das amostras de água foi utilizado apenas Ágar Bile Esculina sem vancomicina.

Houve predominância de *Enterococcus faecalis* (86,0%) entre os isolados obtidos, seguindo-se de *Enterococcus faecium* (11,2%) e *Enterococcus raffinosus* (02,8%). Estes resultados bem como as respectivas fontes de onde os *Enterococcus* foram obtidos estão na tabela 4. A maioria de *Enterococcus faecalis* foi oriunda de pacientes hospitalizados, sendo 93,5% de infectados e 1,6% de colonizados. Entre os isolados de *Enterococcus faecium*, 50,0%, 25,0% e 25,0% foram de esgoto hospitalar, indivíduos sintomáticos e pacientes hospitalizados, respectivamente. A metade dos isolados de *Enterococcus raffinosus* foi obtida de esgoto hospitalar e as restantes (50,0%) de água de consumo animal.

Tabela 04: Identificação dos isolados de *Enterococcus* obtidos de amostras de humanos, aves e fontes ambientais.

Origem	n.º isolados		<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. raffinosus</i>	
	n.º	%	n.º	%	n.º	%	n.º	%
Hospitalizados ¹	60	84,6	02	02,8	58	81,8	00	00,0
Não – hospitalizados ²	02	02,8	02	02,8	00	00,0	00	00,0
Fezes de Frango	01	01,4	00	00,0	01	01,4	00	00,0
Esgoto Hospitalar	05	07,0	04	05,6	00	00,0	01	01,4
Água	03	04,2	00	00,0	02	02,8	01	01,4
TOTAL	71	100,0	08	11,2	61	86,0	02	02,8

1 Pacientes Colonizados e Infectados

2 Pacientes Sintomáticos

Na tabela 5 estão apresentadas as freqüências de resistência dos isolados de *Enterococcus* verificadas por meio da técnica de difusão em gel, onde os microrganismos que apresentaram resistência intermediária foram agrupados junto aos resistentes. As freqüências de resistência foram altas para gentamicina (64,79%) e vancomicina (45,07%), contrastando com o glicopeptídeo teicoplanina que apresentou uma alta susceptibilidade (92,96%). Em relação aos β-lactâmicos, cerca de um quarto dos isolados foram resistentes à penicilina e ampicilina.

Tabela 05: Espectro de suscetibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Enterococcus* pelo método de difusão em gel.

Antimicrobianos	n.º amostras Testadas	Susceptível		Resistente	
		n.º	%	n.º	%
Ampicilina	71	52	73,24	19	26,76
Gentamicina	71	25	35,21	46	64,79
Penicilina	71	52	73,24	19	26,76
Vancomicina	71	39	54,93	32	45,07
Teicoplanina	71	66	92,96	05	07,04

Os setenta e um isolados caracterizados como *Enterococcus* foram avaliados em relação à resistência de nível alto a aminoglicosídeos (Tabela 6). No total as taxas de resistência foram de 12,67% e 16,90% para estreptomicina e gentamicina, respectivamente. Os dois isolados de *Enterococcus raffinosus* foram suscetíveis aos aminoglicosídios testados enquanto um isolado (12,50%) e *Enterococcus faecium* apresentou-se resistente à alta concentração de gentamicina.

Tabela 06: Resistência de nível alto à aminoglicosídeos (estreptomicina e gentamicina) de isolados de *Enterococcus* em humanos, aves e fontes ambientais

Espécies	n.º amostras	Estreptomicina		Gentamicina	
		n.º	%	n.º	%
<i>E. faecalis</i>	61	09	14,75	11	18,03
<i>E. faecium</i>	08	00	00,00	01	12,50
<i>E. raffinosus</i>	02	00	00,00	00	0,00
TOTAL	71	09	12,67	12	16,90

As MICs₅₀ e MICs₉₀ são referidas na tabela 7 e correspondem a valores compatíveis com susceptibilidades à vancomicina (<8µg/mL) e teicoplanina ($\leq 2\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabela 07: Concentração Inibitória Mínima (MIC) para vancomicina e teicoplanina das amostras de *Enterococcus* provenientes de humanos, aves e fontes ambientais.

Antimicrobianos	MIC ¹ (µg/mL)	
	MIC ₅₀ ²	MIC ₉₀ ³
Vancomicina	0,5	4,0
Teicoplanina	<0,5	2,0

¹ MIC, Concentração Inibitória Mínima

² Valores que inibiram 50,0%

³ Valores que inibiram 90,0%

Como demonstrado na Tabela 8 foram encontrados isolados resistentes aos glicopeptídeos, entre aqueles provenientes de pacientes hospitalizados, sendo detectados dois (1,5%) isolados correspondentes a casos de infecção e colonização respectivamente, onde o primeiro caracterizado como do fenótipo VanB e o outro a uma amostra de *Enterococcus faecium* que apresentou resistência à vancomicina ($8\mu\text{g/mL}$). Foi detectado também um isolado de fezes de frango, sendo caracterizado como fenótipo indeterminado, uma vez que apresentou resistência apenas à vancomicina ($\leq 0,25\mu\text{g/mL}$)

Tabela 08: Fenótipos de resistência dos isolados *Enterococcus* em humanos, aves e fontes ambientais.

Origem	Espécies	MIC ¹ ($\mu\text{g/mL}$)		Fenótipo
		VA ²	TE ³	
Fezes de frango	<i>E. faecalis</i>	00	≤ 0.25	ND ⁴
Pacientes colonizados	<i>E. faecium</i>	08	08	ND ⁴
Pacientes infectados	<i>E. faecium</i>	08	< 0.5	VanB

¹MIC, Concentração Mínima Inibitória;

²VA, Vancomicina;

³TE, Telcoplanina;

⁴ND, Não Definido;

V - DISCUSSÃO

Não foi evidenciada a presença de amostras de *Enterococcus* resistentes a altas concentrações (Van A) de vancomicina neste estudo apesar de se tratar de uma pesquisa abrangente que incluiu humanos, aves e fontes ambientais, além das condições epidemiológicas extremamente favoráveis a emergência destes microrganismos, tais como: uso não controlado de vancomicina nos hospitais, predominância de uso empírico quando da prescrição terapêutica, pouca tradição em práticas de controle de infecção hospitalar e o possível uso de antimicrobianos do grupo dos glicopeptídeos em rações de aves. Entretanto, deve-se ressaltar que se tratou de uma investigação muito limitada quanto ao número de materiais avaliados.

A aquisição e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos que são mais comumente usados é um problema crescente em hospitais, particularmente a partir dos anos oitenta (Wood, 1996). Entre os patógenos hospitalares resistentes que apresentam uma participação expressiva na etiologia de infecções hospitalares destacam-se: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina/oxacilina; bacilos Gram-negativos produtores de β-lactamases do tipo I, cromossomiais e aquelas de espectro estendido, plasmidiais; e *Enterococcus* resistente a vancomicina. Os relatos de VRE em hospitais começaram a aparecer em meados dos anos oitenta na Europa e agora são um problema importante em vários hospitais dos Estados Unidos. Dados publicados pelo "National Nosocomial Infection Surveillance" (NNIS) do "Centers for Disease Control" (CDC) mostraram um aumento de 20 vezes entre os anos de 1989 e 1993 (CDC, 1993) e de 35 (de 0,3% para 10,4%) vezes entre 1989 e 1995 na incidência deste microrganismo entre os isolados hospitalares de *Enterococcus* (Gaynes, Edwards, NNIS, 1996). As taxas da presença (infecção/colonização) de VRE nos Estados Unidos são de aproximadamente 8,0% em pacientes de alto risco (Wells, Juni, Cameron, et al. 1995) e 17,0% naqueles admitidos nas Unidades de Terapias Intensivas (Bates, 1997). O aumento de VRE nos Estados Unidos foi associado com a crescente prescrição de vancomicina nos hospitais, em casos de gastroenterite por *Clostridium difficile* e sobretudo

nas infecções estafilocócicas por MRSA (French, Cheng, Ling, Donnan 1990). Devido a grande importância desse microrganismo como patógeno hospitalar o “Hospital Infection Control Practices Advisory Committee” (HICPAC) do CDC publicou recentemente normas para prevenir a sua transmissão hospitalar (CDC,1995), sugerindo entre outras medidas a realização de programas de vigilância através do levantamento rotineiro de taxas de prevalência de VRE em pacientes críticos. (CDC,1994). Ao contrário, a prevalência de infecções por VRE é muito mais baixa nos países da Europa com valores inferiores a 1,0%, exceto no Reino Unido, Israel e Eslovênia, nos quais as taxas são superiores a 3,0% (Schowten, 1999). Há relatos de frequências de 5,0% no Reino Unido (Jordens, Bates, Griffiths, 1994) e de 3,5% na Bélgica (Gordts, Van Landuyt, Ieven, Vandamme, Goossens, 1995). Isto é atribuído ao uso menos frequente de glicopeptídeos em pacientes hospitalizados neste continente (Bates, 1997). Ao contrário do que se observa no Canadá e Estados Unidos (Bates, 1997) a maioria dos países da comunidade européia é mais permissiva no uso de avoparcina, antibiótico utilizado como promotor de crescimento acrescido a rações de aves, suínos e bovinos, estando associado com uma maior probabilidade de colonização por VRE nesses animais (Miranda, Singh, Murray, 1991). No entanto, em investigação realizada por Leme, Ferreira, Pignatari, (1998) em São Paulo, onde compararam frangos que usavam avoparcina

em doses subterapêuticas e um grupo controle sem avoparcina, não foi encontrado nenhum *Enterococcus* resistente a vancomicina. Embora os *Enterococcus faecium* (52,8%) predominassem em relação ao grupo controle (11,9%).

Os antibióticos avoparcina e virginiamicina têm em comum a capacidade de não serem absorvidos pelo trato digestivo e atuarem contra a microflora das bactérias Gram-positivas, melhorando a conversão alimentar e aumentando a eficiência de utilização da ração (Jong, Leboute, Ciocca, Penz Jr, 1998). No Brasil, é vedado o uso de tetraciclinas, penicilinas, cloranfenicol e sulfonamidas como promotores de crescimento e mais recentemente de avoparcina.

Os antimicrobianos estão entre as drogas mais prescritas nos hospitais do país, principalmente nos universitários. Essa frequente utilização ocorre mesmo em relação àqueles de maior espectro de ação como as cefalosporinas de terceira geração, carbapenemas, fluorquinolonas e de maior toxicidade como os glicopeptídeos (Pereira, 1998). Nos países em desenvolvimento como o Brasil a utilização de antimicrobianos é da ordem de 40,0% a 50,0% entre os pacientes internados (Marangoni, Vieira, 1987) sendo que, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, essa proporção é de aproximadamente 50,0%. (Rabelo, Gontijo Filho, 1996; Couto, Lima, Leles, Assunção, Ribas, Gontijo-Filho, 1999). A indicação terapêutica de

antimicrobianos de forma empírica, ou seja, sem microrganismo isolado é comum no país pela falta de laboratórios na maioria dos hospitais, assim como pela formação inadequada de profissionais quanto a prescrição destes fármacos (Nettleman, 1993). Couto, et al. (1999) descreveram que, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, em apenas um terço (35,5%) dos casos classificados como infecção hospitalar foram utilizados critérios microbiológicos.

O primeiro caso conhecido de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina no Brasil foi descrito no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná em 1998, tratando-se de uma criança de nove anos de idade, com o diagnóstico de anemia aplástica. Essa paciente tinha uma história de várias hospitalizações e tratamento antimicrobiano prévio com cefalosporinas (Costa et al., 1998). Posteriormente, foi descrito um surto em São Paulo compreendendo pacientes infectados (10 por *E. faecium* e 53 *E. faecalis*) e colonizados (45 *E. faecium* e 47 *E. faecalis*) (Zanella et al., 1998). Nesta série entre os 62 isolados de *Enterococcus* de pacientes hospitalizados, apenas dois (3%) foram provenientes de pacientes colonizados em uso de vancomicina e corresponderam a um isolado de *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*, respectivamente. Entre os microrganismos provenientes de humanos houve uma presença marcante de *Enterococcus faecalis* (93,0%). Apesar do uso permissivo de vancomicina no hospital, onde

predomina o uso empírico (Couto, Lima, Leles, Assunção, Ribas, Gontijo-Filho, 1999), das três amostras que se comportaram como resistentes quando do cultivo em meio seletivo, apenas duas (3,3%) obtidas à partir de pacientes hospitalizados, comportaram-se como VRE.

Os Enterococos tornaram-se um dos patógenos hospitalares mais importantes, consequência sobretudo da sua resistência aos diferentes agentes antimicrobianos tradicionalmente utilizados na terapêutica médica. (Murray, 1990; Gordts et al., 1995; Jones et al., 1996; Melhus, Tjernberg, 1996; Weinstein et al., 1996). O tratamento de infecções graves por estes microrganismos, inclui a utilização simultânea de pelo menos dois dos seguintes antimicrobianos: penicilinas, aminoglicosídeos e glicopeptídeos. (Murray, 1990; Gray, Pedler, 1992; Newmann, Sahm, Thornsberry, 1991; Swartz, 1994; Marcus, Peled, Yagupsky, 1997).

O aparecimento de *Enterococcus* resistentes às penicilinas não é incomum. Do ponto de vista clínico interessa a resistência a altas concentrações de penicilinas ($MIC > 100\mu g/mL$) por anularem a possibilidade do uso destes antibióticos. Esse mecanismo de resistência está relacionado a β -lactâmases codificadas por genes plasmidiais, portanto passíveis de uma transmissão horizontal e resultando numa disseminação mais rápida (Gray , Pedler, 1992; Gordts et al., 1995; Wood, 1996). Adicionalmente, essas enzimas podem ser codificadas por genes cromossomiais (Murray et al., 1991); há ainda a possibilidade de

resistência resultante de alterações nas proteínas que ligam penicilinas (PBPs), principalmente PBP5 (Newmann, Sahm, Thornsberry, 1991) A freqüência de isolados com níveis altos de resistência as penicilinas continua baixa, inferior a 10,0% nos hospitais dos Estados Unidos e Reino Unido (Sapico *et al.*, 1989; Gray, Pedler, 1992; Ribas, Gontijo-Filho, 1999). Os dados obtidos por Ribas *et al.* (1999) (1,6%) em Uberlândia, bem como os de Netz (1998) no Rio de Janeiro também apontam que esse tipo de resistência ainda não é comum no Brasil. Nesse estudo foi investigado apenas a resistência de nível baixo, através da técnica de difusão em gel, verificando-se a presença de um quarto do total de amostras de *Enterococcus* resistentes as penicilinas (penicilina e/ou ampicilina).

A resistência de nível alto para gentamicina foi evidenciada inicialmente na França (Horodniceanu *et al.*, 1979) e a seguir em vários países do hemisfério norte, em freqüências que variam de 4,5% a 15,0% (Murray, 1990; Newmann, Sahm, Thornsberry, 1991; Gray; Pedler, 1992; Woodford *et al.*, 1995; Mendonça *et al.*, 1997; Simjee; Gill, 1997). No Brasil, os dados disponíveis são do Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, mostrando que 26,4% e 24,8% das amostras foram resistentes à gentamicina e estreptomicina, respectivamente (Cereda *et al.*, 1997) e do Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (55,0%) (Netz 1998). Os resultados obtidos por Ribas

et al.. (1999) em Uberlândia evidenciaram freqüências de resistência de 20,0% para gentamicina e 15,5% para estreptomicina. Entre os 21 isolados com essas características, apenas um foi de *Enterococcus faecium*, resistente à gentamicina. Em estudo realizado com aves em São Paulo ficou constatado níveis altos de resistência aos aminoglicosídeos, gentamicina e estreptomicina, nos isolados de *Enterococcus faecium*, tais amostras foram isoladas de aves que não usaram aminoglicosídeos previamente até onde se conhece (Leme, Ferreira, Pignatari, 1998). Na mesma investigação, esse tipo de resistência foi constatado apenas nos isolados de origem hospitalar, com valores de 14,75% para estreptomicina e 18,03% para gentamicina. Nesta investigação, as oito amostras provenientes de outras fontes, incluindo *Enterococcus faecium* (02) de pacientes não hospitalizados foram suscetíveis aos aminoglicosídeos.

O mecanismo de ação dos glicopeptídeos envolve a inibição da síntese da parede celular em bactérias Gram-positivas (Leclercq, Courvalin, 1997). Há formação de complexos com o grupo terminal peptidil-D-alanina presente lateralmente ao ácido N-acetil-murâmico, componente do dissacarídeo, precursor da molécula de peptidioglicana (Joklik, 1992; Woodford, 1995). Essa interação bloqueia a sua transferência para a parede celular em formação, interferindo com as reações de transglicosilação e transpeptilação, necessárias para a

polimerização desta macromolécula. (Woodford et al., 1995; Ledereq, Courvalin, 1997).

Entre as espécies de bactérias Gram-positivas que apresentam resistência intrínseca aos glicopeptídeos, destacam-se: *Lactobacillus spp*, *Leuconostoc spp*, *Pediococcus spp* e *Erysipelotrix rhusiopathias* (Murray, Baron, Pfaller, Tenover, Yolken, 1999; Woodford, 1995). Embora sejam microrganismos pouco associados a infecções humanas, a maioria é encontrada na microbiota da boca e trato intestinal, estando ocasionalmente associadas a resultados falsos positivos, como VRE, fornecidos por laboratórios de Microbiologia (Woodford, 1995). A utilização de técnicas de DNA *fingerprint* em estudos de epidemiologia molecular mostraram que nem todas as infecções por *Enterococcus* são endógenas como originalmente se acreditava. Entre os principais reservatórios de VRE estão incluídos: os pacientes infectados e os colonizados no intestino (Wells, Juni, Cameron, et al. 1995). A colonização pode persistir por longos períodos (Henning, et al., 1996; Monteclaro, et al., 1995) e foi descrita inclusive em indivíduos sadios não hospitalizados na Europa (Jordens, Bates, Griffiths, 1994; Klare, et al., 1995-a) Taylor et al. (1999) relataram taxas de pacientes hospitalizados e não-hospitalizados, incluindo manipuladores de alimentos, de 32,0% e 2,3%, respectivamente, em investigação realizada no Reino Unido. Os nossos resultados evidenciaram a presença de apenas dois pacientes

com VRE entre os hospitalizados (3,0%) bem como entre os não hospitalizados (2,0%). Entretanto, outras fontes ambientais, tais como: esgotos (Bates, Jordens, Griffiths, 1994; Klare, et al. 1995-b) e sobretudo superfícies inanimadas em hospitais também tem merecido atenção como reservatório/fonte de infecção desse microrganismo (Devriese, et al.. 1996). As superfícies mais frequentemente contaminadas são o piso, cabeceira da cama e mesas. (Boyce, et al., 1997; Blythe, et al., 1998) As roupas dos pacientes, os travesseiros e o colchão também podem apresentar um risco na cadeia epidemiológica. . (Boyce, et al., 1997; Blythe, et al., 1998) Nesse estudo, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, não foi detectado a presença de VRE em 106 amostras coletadas em pisos de enfermarias, próximo ao leito de pacientes em uso de vancomicina. É importante ressaltar que não foi comum (3,0%) a existência de pacientes hospitalizados e colonizados por este microrganismo. Adicionalmente sua presença não foi detectada no esgoto e água coletadas em diferentes pontos da cidade, incluindo aqueles materiais coletados no hospital.

A principal via de transmissão do microrganismo é através das mãos contaminadas de profissionais de saúde (Boyce, et al., 1994) , mas a disseminação por contato indireto através de equipamentos médicos tal como estetoscópio, não pode ser esquecida (Weber, Rutala, 1997) Enfermarias com pacientes infectados por VRE e com diarréia, são mais

passíveis de contaminação, (Boyce, 1995) sendo que 8,0% das culturas de pisos permaneceram positivos para VRE, mesmo após as práticas de desinfecção. (Weber, Rutala, 1997). O ambiente nas proximidades de pacientes infectados pode se apresentar em algumas oportunidades muito contaminado por esta bactéria (Boyce, et al., 1994; Boyce, et al., 1995). Este microrganismo pode sobreviver em superfícies ambientais por longos períodos (Weber, Rutala, 1997) Noskin et al.. (1995) demonstraram a viabilidade do VRE de 30 minutos a 24 horas, por outro lado Bonilla et al. (1996) demonstraram a sua permanência por mais de 3 dias nas superfícies testadas. Em superfícies secas, amostras de *E. faecium* e *E. faecalis* permanecem viáveis por 7 e 5 dias respectivamente. (Noskin, Stosorv, Cooper, Peterson, 1995)

Além das formas de transmissão referidas no parágrafo anterior, foi levantada a possibilidade daquela envolvendo veículo comum, com destaque para carne de frango resultante de aves que utilizavam avoparcina como promotor de crescimento. (Klare, et al., 1995-b; Klare, et al., 1993). Nessas condições, apesar do trabalho de Leme e colaboradores (1998) negando a relação, o VRE pode aparecer nas fezes de suínos, bovinos ou aves (Phillips, 1999), resultando na contaminação da carcaça destes animais, e podem sobreviver ao processamento e distribuição (Bates, Jordens, Griffiths, 1994; Chadwick, Woodford, Kaczmarski, Gray, Barrell, Oppenheim, 1996), e atingir inclusive

alimentos consumidos em hospitais (Delmee, Kersbergen, Janssens, Tollenaere, Avessani, 1999). Berchieri (1999) sugere que a ingestão de um inóculo de *Enterococcus faecium* resistente a glicopeptídeo de origem animal pode resultar na colonização transitória de humanos. A emergência de VRE em pacientes hospitalizados pode refletir a seleção destes microrganismos no ambiente pelo uso de glicopeptídeos (Bates, Jordens, Griffiths, 1994). Por outro lado nos Estados Unidos verifica-se uma aparente ausência de VRE na cadeia alimentar (Coque, Tomayoko, Ricke, Okhyusen, Murray, 1996) contrariando esta hipótese (Bates, 1997). Como foi referido anteriormente, as taxas de infecção por VRE estão associadas com uso exagerado de vancomicina nos hospitais americanos (Kirst, Thompson, Nicas, 1998; Phillips, 1999).

Não há nenhuma recomendação quanto a meios bacteriológicos, seletivos ou não, para o isolamento de VRE (Nelson, 1999). O meio ideal para ser utilizado na triagem de *Enterococcus* a partir não só de espécimes clínicos, mas também de fontes ambientais, é aquele que permita a detecção de um número baixo destas bactérias e inibe o crescimento de outros microrganismos, tais como *Pediococcus* e *Lactobacillus* (Nelson, 1999). Várias formulações de meios são usados em estudos epidemiológicos com uma enorme variedade de agentes seletivos empregados, incluindo particularmente grandes variações nas concentrações de vancomicina (Taylor, Oppenheim, Chadwick, Weston,

Palepo, Woodford, Bellis, 1999). A concentração de vancomicina usualmente incorporada varia de 4-64 μ g/mL (Taylor, Oppenheim, Chadwick, Weston, Palepo, Woodford, Bellis, 1999), sendo usualmente mais baixa quando de meios destinados a microbiologia clínica (NCCLS, 1993) e mais alta quando do cultivo de fontes ambientais mais contaminadas (Klare, Heier, Claus, Witte, 1993; Torres, Reguera, Sanmartin, Pérez-Díaz, Baquero, 1994; Bates, Jordens, Griffiths, 1994). O NCCLS recomenda a concentração de 6 μ g/mL deste glicopeptídeo para as culturas de vigilância de VRE em pacientes hospitalares (NCCLS, 1993). Além da adição rotineira desse glicopeptídeo, alguns meios seletivos ainda apresentam antibióticos com atividade contra bactérias contaminantes Gram-negativas, tais como: polimixicina, estreptomicina, aztreonam e ceftazidima. (Chadwick, Oppenheim, Fox, Woodford, Morgenstern, Scarffe, 1996). Vários pesquisadores consideram ainda a utilização adicional de meios de enriquecimento contendo vancomicina e outros antibióticos, tanto a partir de espécimes clínicos de humanos e animais quanto de fontes ambientais (Bates, Jordens, Griffiths, 1994; Ford, Perry, Gould, Orr, 1996; Taylor, Oppenheim, Chadwick, Weston, Palepo, Woodford, Bellis, 1999). Em estudo realizado por Taylor, et al., (1999) esse tipo de meio permitiu um acréscimo de 27,0% no numero de pacientes colonizados com este microrganismo, quando da detecção de VRE em fezes de pacientes hospitalizados ou não. Ford e colaboradores

(1996) relataram uma quantidade de VRE bem menor (80,0%) quando não se utilizou meio de enriquecimento na triagem de VRE.

Atualmente a resistência aos glicopeptídeos em Enterococos é classificada em quatro fenótipos: VanA, VanB, VanC e VanD, com bases na resistência para vancomicina (VA) e teicoplanina (TE) e se o mecanismo é induzido ou constitutivo (Gray, Pedler, 1992; Boyce, 1995; Gold, Moellering, 1996; Bates, 1997; Netz, 1998). O fenótipo de resistência a glicopeptídeos mais comumente descrito na literatura é o VanA, usualmente associado a espécie *Enterococcus faecium* (Edmond et al., 1995; Moreno et al., 1995; Leclercq e Courvalin, 1997) mas que inclui também isolados de *Enterococcus faecalis* e se caracteriza por uma resistência induzida à níveis altos de vancomicina e teicoplanina, resistência esta geralmente transferida por conjugação (Leclercq, Courvalin, 1991). Os genes responsáveis pela expressão destes fenótipos são carreados pelo tranposon Tn 1546, de 11 Kb, que codifica nove polipeptídeos associados a quatro grupos funcionais: transposição (ORF1 e ORF2), regulação dos genes de resistência à vancomicina (VanR e VanS), resistência aos glicopeptídeos pela produção de depsipeptídeos (VanH, VanA e VanX) e proteínas acessórias (VanY e VanZ) que não são essenciais para a expressão da resistência aos glicopeptídeos. (Leclercq, Courvalin, 1997; Quintiliani, Sahm, Courvalin, 1999)

Ao contrário das ligases cromossomáticas fisiológicas que convertem duas moléculas de D-Alanina em um dipeptídeo D-Ala-D-Ala subsequentemente incorporado no dissacarídeo-pentapeptídeo precursor da parede celular, a ligase VanA sintetiza preferencialmente o depsipeptídeo D-Ala-D-Lac, resultando numa diminuição de mil vezes na afinidade por vancomicina (Leclercq, Courvalin, 1997; Quintiliani, Sahm, Courvalin, 1999)

O fenótipo Van B também inclui amostras de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, com resistência de nível variável à vancomicina (MICs = 4 a >0,24µg/mL) e susceptibilidade a teicoplanina, sendo a resistência transferida por conjugação. Estas amostras também contém precursores de peptidioglicanas, com D-Lactato na cadeia peptídica, mas em contraste com gene *vanA* o cluster do gene *vanB* está localizado no cromossomo bacteriano, como parte de elementos conjugativos com 90 a 250 kb. (Moellering, 1984) Os resultados deste trabalho, a exemplo de Cereda *et al.* (1997) na UFSP forneceram apenas isolados de resistência intermediária a partir de pacientes com infecção enterocócica de natureza hospitalar, identificando-a com *Enterococcus faecalis* e classificados como do fenótipo Van B. No Brasil, Zanelo *et al.* (1998) relataram pela primeira vez um surto associado simultaneamente por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* do fenótipo VanA, na Casa de Saúde Santa Marcelina, em São Paulo. Foram utilizadas técnicas de

epidemiologia molecular (“DNA fingerprinting”) para a tipagem dos isolados, bem como análise molecular dos genes de resistência, e os resultados mostraram que 17 amostras de *Enterococcus faecium* e 07 *Enterococcus faecalis* apresentavam diversidade genética quando da análise clonal mas evidenciavam o mesmo perfil quanto aos elementos VanA de resistência à vancomicina, idêntico ao encontrado no Tn1546, caracterizando uma única linhagem de transpon.

O fenótipo Van C, está associado as espécies de *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavesiensis* que são intrinsecamente resistentes aos glicopeptídeos. Esta característica é expressa constitutivamente apenas a níveis baixos de vancomicina. (Moellering, 1984).

Em relação a resistência adquirida, os *Enterococcus* e outros Gram-positivos tais como: *Bacillus thuringiensis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus aureus*, não apresentam barreiras em relação a expressão de genes de resistência para os glicopeptídeos. (Quintiliani, Sahm, Courvalin, 1999). A resistência a níveis altos de vancomicina foi transferida de *Enterococcus faecalis* para *Staphylococcus aureus* por conjugação em condições laboratoriais (Quintiliani, Sahm, Courvalin, 1999). Isolados dínicos de *Staphylococcus*, incluindo *Staphylococcus aureus* com nível intermediário de resistência à vancomicina foram descritos no Japão (Hiramatsu, 1998). Estados Unidos (Finland, Bach, Garner, Gold, 1974). e Brasil. Embora o

mecanismo preciso de resistência destes estafilococos, denominados "Glicopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus*" (GISA) ou "Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*" (VISA) ainda não está elucidado, ele não está relacionado com os genes que conferem resistência a estes antibióticos em *Enterococcus*. (Hiramatsu, 1998).

Além da participação importante como causa de infecções esporádicas em pacientes hospitalizados, como foi referido anteriormente, foram descritos surtos associados a um ou vários clones de *Enterococcus faecalis* bem com de *Enterococcus faecium* resistentes aos glicopeptídeos. A ocorrência destes "clusters" evidencia que certas amostras, não só são capazes de disseminar entre os pacientes, mas também tem potencialidade de transferir genes de resistência aos glicopeptídeos para outros microrganismos. (Woodford, 1995). Os surtos por *Enterococcus faecium* ou *Enterococcus faecalis* da classe VanA foram descritos em Nova York, Londres e Filadelfia (Boyce et al., 1994). Embora mais raros, surtos por *Enterococcus faecium* com fenótipo VanB foram descritos nos EUA (Boyce et al., 1994; Monteclaro et al., 1995; Edmond et al., 1995) e Inglaterra (Chadwick, Oppenheim, Fox, Woodford, Morgenstern, Scarffe, 1996), não foram encontradas diferenças epidemiológicas entre os dois fenótipos.

VI - Conclusões

Não foram encontradas amostras de *Enterococcus* apresentando resistência de níveis altos aos glicopeptídeos entre aqueles provenientes de pacientes com infecção/colonização por esse microrganismo, entre voluntários não hospitalizados, sintomáticos e assintomáticos, bem como nas carcaças de aves em fontes ambientais incluindo água, piso hospitalar e esgoto.

As taxas de resistência a níveis altos de aminoglicosídeos foram de 12,67% e 16,90% para estreptomicina e gentamicina, respectivamente, e as de níveis baixos foram de 26,76% para as penicilinas (penicilina e/ou ampicilina).

Foram caracterizadas três amostras de resistência intermediária, sendo apenas uma caracterizada como do fenótipo VanB e as outras duas caracterizadas como fenótipo indeterminado, uma vez que apresentaram resistência apenas à vancomicina.

RESUMO

O objetivo desta investigação foi avaliar a presença de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) em espécimes clínicos de pacientes hospitalizados e não hospitalizados (Hospital de Clínicas da UFU), carcaças e fezes de frango, e em fontes ambientais (piso hospitalar, água e esgoto) na cidade de Uberlândia. Os materiais provenientes de frangos e pacientes não hospitalizados foram cultivados em meios de enriquecimento e seletivo para VRE e os demais em meio seletivo contendo 20 µg/ml de vancomicina. As colônias suspeitas foram caracterizadas quanto ao gênero *Enterococcus* mediante a coloração de Gram e os testes de: catalase, tolerância a 6,5% de NaCl em meio de "Trypticase Soy Broth"(TSB) e " α -Pyroglutamic Acid β -Naphthylamide" (PYR). A identificação a nível de espécie foi realizada pelos testes tradicionais, apesar da presença marcante de *Enterococcus faecalis* (96.6%) predominasse entre as culturas de espécimes clínicos, dos 60 isolados de pacientes hospitalizados, apenas dois foram de *Enterococcus faecium* (3%) sendo uma com resistência intermediária (08µg/ml) proveniente de paciente colonizado em uso de vancomicina e outra de paciente infectado. No total, um quarto das amostras de *Enterococcus* apresentaram resistência de nível baixo as penicilinas (penicilina e/ou ampicilina). Foram identificados 21 isolados de *Enterococcus* com níveis

altos de resistência a gentamicina e/ou estreptomicina, sendo apenas um *Enterococcus faecium* que apresentou resistência à gentamicina. Adicionalmente a presença de VRE não foi detectada no esgoto e água coletadas em diferentes pontos da cidade, incluindo os materiais coletados no hospital. Entre os quatro isolados de humanos caracterizados como VRE quando do cultivo primário, apenas um foi caracterizada como do fenótipo Van B. Apesar de se tratar de uma pesquisa abrangente e das condições epidemiológicas existentes serem favoráveis a emergência destes microrganismos, não foi evidenciada a presença de *Enterococcus* resistentes a altas concentrações de vancomicina. Entretanto, o achado de amostras com resistência intermediária em pacientes hospitalizados, onde a força pressora seletiva dos glicopeptídeos é mais evidente, deve servir de alerta/sinal quanto a presença de VRE no futuro próximo.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to evaluate the presence of resistant Enterococci to the vancomycin (VRE) in hospitalized patients' clinical specimens and not hospitalized (Hospital of Clinics of UFU), carcasses and chicken feces, and in environmental sources (hospital flor, water and sewer) in the city of Uberlândia. The coming materials of chickens and patients not hospitalized they were cultivated in enrichment means and selective for VRE, and the others in half selective containing 20 vancomycin mg/ml. The suspicious colonies were characterized with relationship to the gender Enterococci by the Gram coloration, and the tests of: catalase, tolerance to the 6,5% of NaCl in middle of " Trypticase Soy Broth"(TSB) and " to-Pyroglutamic Acid b-Naphthylamide " (PYR). the identification at species level was accomplished by the traditional tests. In spite of the outstanding presence of *Enterococcus faecalis* (96.6%) they prevailed among the cultures of clinical specimens, of the isolated of hospitalized patients 60, two were only of *Enterococcus faecium* (3%) being one with intermediate resistance (08 µg/ml) originating from patient colonized in vancomycin use and another of infected patient. In the total, a fourth of the samples of Enterococci presented resistance of low level the penicillins (penicillin e/ou ampicilin). they were identified 21 isolated of Enterococci with high resistance levels the gentamicin e/ou estreptomicin,

and just an *Enterococcus faecium*, presented resistance to the gentamicin. The presence of VRE was not detected in the sewer and water collected in different points of the city, including the materials collected at the hospital. Among the isolated of humans four characterized like VRE when of the primary cultivation, just one was characterized as of the phenotype Van B. in spite of treating of an including research and of the existent epidemic conditions they be favorable the emergency of these microorganisms, the presence was not evidenced from resistant Enterococci to discharges vancomycin concentrations. However, to discovery of samples with intermediate resistance in hospitalized patients, where the force selective pressure of the glicopeptide is more evident, it should serve as sign as the presence of VRE in the close future.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTHUR M, DEPADIEU F, MOLINAS C, REYNOLDS P, COURVALIN P.
Contribuition of Van Y D, D-carboxypeptidase to glycopeptide
resitance in Enterococcus faecalis by hidrolysis ofpeptidoglycan
precursors. *Antimicrobial Agentes Chemoterapy* 1994; 38:1899-
1903.
- AYLIFFE GAJ. Nosocomial Infeccion - The irreducible minimum. *Infect
Control* 1986; 7(Suppl2): 92-95.
- AYMES SGB, GEMMELL CG. Antibiotic resistance. *Journal Med.
Microbiology* 1997; 46:436-470

BANERJEE SN, EMORI TG, CULVER DH, GAYNES RP, JARWIS WR,
HORANT *et al.*. Second trends in nosocomial primary bloodstream
infection in the United States, 1980-1989. *American Journal
Medicine* 1991; **91**(Suppl 3B): 86S-86S.

BATES J. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the
community and the relevance of farm animals to human infection.
Journal of Hospital Infection 1997; **37**: 89-101.

BATES J, JORDENS JZ, GRIFFITHS DT. Farm animals as a putative
reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man.
Journal Antimicrobial Chemother 1994; **34**:507-516.

BENÍCIO LAS. Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento)
em rações de aves: visão do ministério. In: *Conferencia APINCO de
ciência e tecnologia avícola.*, Curitiba. 1996 17-26.

BENNETT JV, BRACHMANN PS (eds.). *Hospital infections*. Boston,
Little & Brown, 1992. 640p

BERCHIERI A. Intestinal colonization of a human subject by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Clinical Microbiology Infectious** 1999; **5**: 97-100.

BLYTHE D, KEENLYSIDE D, DAWSON SJ, et al.. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Infection Control Hospital Epidemiology**. 1998; **38**: 67-70.

BONTEM M, SLAUGHTER S, HAYDEN M, et al.. Patients' endogenous flora as a source of "nosocomial" vancomycin-resistant enterococci (VRE) (Abstract) **36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, New Orleans, 1996; J5: 219.

BOYCE JM, OPAL SM, CHOW JW, et al.. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistant. **Journal Clinical Microbiology** 1994; **32**:1148-1153.

BOYCE JM, MERMEL LA, ZERVOS JM, et al.. Controlling vancomycin-resistant enterococci. **Infection Control Hospital Epidemiology** 1995; **16**: 634-637.

BOYCE JM, POTTER-BYNOE G, CHENEVERT C, et al.. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): possible infection control. *Infection Control Hospital Epidemiology* 1997; 18: 622-627.

BRASIL, Portaria nº 930, de 27 de agosto de 1992. Expede, na forma dos Anexos, normas para o controle das infecções hospitalares, Revoga a Portaria 196, de 24.06.83 e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 04set, 1992; 130(171): p12279. Sec. I.

BRACHMAN PS. Nosocomial Infections Surveillance (editorial), *Infection Control Hospital Epidemiology* 1993; 14(4): 194-196.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.
Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR* 1995; 44(RR-12):1-13.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.
Recommendations for preventing the spread of vancomycin

resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). **MMWR** 1994; **44**(RR-12):1-13.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin - United States 1989-1993. **MMWR** 1993; **42**: 597-600.

CEREDA R et al.. "In Vitro" Antimicrobial activity against enterococci isolated in a university hospital in São Paulo, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** 1997, **1**(2): 83-90.

CHADWICK PR, OPPENHEIM BA, FOX A, WOODFORD N, MORGESTERN GR, SCARFFE JH. Epidemiology outbreak due to glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* on a leukemia unit. **Journal Hospital Infection** 1996; **34**:171-182.

CHADWICK PR, WOODFORD N, KACCZMARSKI EB, GRAY S, BARREL RA, OPPENHEIM BA. Glycopeptide-resistant enterococci isolated from uncooked meat. **Journal Antimicrobial Chemother** 1996; **38**: 908-909.

COSTA LMD, SOUZA DC, MARTINS LTF, ZANELLA RC, SADER HS,
SOUZA HPHM. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first
case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** 1998; 2(3):
160-163

COQUE TM, TOMAYOKO JF, RICKE SC, OKHYUSEN PC, MURRAY
BE. Vancomycin-resistant Enterococci from nosocomial, community,
and animal sources in the United States. **Antimicrob Agents
Chemother** 1996; 40: 2605-2609.

COUTO HG, LELES CCV, LIMA HV, ASSUNÇÃO VF, RIBAS RM,
DIOGO FILHO A, GONTIJO-FILHO PP. Vancomycin use in a
brazilian university hospital: comparasion with hospital Infection
Control Practices Advisory Committee Guidelines. **The Brazilian
Journal of Infectious Diseases** 1999; 03:139-143.

COUTO HG, LIMA HV, LELES CCV, ASSUNÇÃO VF, RIBAS RM,
GONTIJO-FILHO PP. Critérios microbiológicos no diagnóstico de
infecções hospitalares e de prescrições de antimicrobianos no
hospital das clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-
UFU) **XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Salvador-BA
1999; MH40 p.60

COURVALIN P. Resistance of enterococci to glycopeptides.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1990; 34: 2291-2296.

DELMEE M, KERSBERGEN J, JANSSENS M, TOLLENAERE J, AVESSANI V. Glycopeptide-resistant enterococci (GRE) in hospital food. Abstracts, 9th International Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1999; 5(Suppl 3): abs p144.

DEVRIESE LA, IEVEN M, GOOSSENS H, et al.. Acidification of methyl-a-D-glucopyranoside: a useful test to differentiate *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus faecium* species group and from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34: 2607-2608.

DEVRIESE LA, CRUZ CLOQUE JI et al.. Identification and composition of the tonsilar and anal enterococci and streptococcal flora of dogs and cats. *Journal Appl Bacteriology* 1992a; 73: 421-425.

DEVRIESE LA, LAURIER L, et al.. Enterococcal and streptococcal speciesisolate from faeces of calves, young cattle and dairy cows. **Journal Appl Bacteriology** 1992 b; **72**: 29-31.

DUNNE WM, DUNNE BS. Watch out where the huskies go. **ASM News** 1996; **62**: p283.

EDMOND MB, et al.. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risks factors for infection. **Clinical Infectious Diseases** 1995; **20**: 1126-1133.

ENDTZ H, VAN BELKUM A, VAN DER BRAK N, et al.. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in hospital and community based patients. **36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, New Orleans, 1996; C17:37 Abstract.

EVANS ME, KORTAS KJ. Vancomycin use in a university medical center: comparasion with hospital infection contro pratices advisory committe guidelines. **Infection Control and Hospital Epidemiology** 1996; **27**: 731-734.

FACKLAM RR, COLLINS MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a convection test scheme. *Journal Clinical Microbiology* 1989; 27: 731-734.

FACKLAM RR, SAHM DF. *Enterococcus* In: Murray PR et al. (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. 6^a ed., Washington DC, American Society for Microbiology. 1995; 308-314.

FINLAND M, BACH MC, GARNER C, GOLD O. Sinergistic action of ampicillin and erytromycin against *Nocardia asteroides*: effect of time incubation. *Antimicrobial Agents Chemother* 1974; 5: 344-353.

FRENCH GL, CHENG AF, LING JML, Po M, DONNAN S. Hong Kong strains of meticillin-sensitivity *Staphylococcus aureus* have similar virulence. *Journal Hospital Infection* 1990; 15: 117-125.

FRENCH GL, CHENG AF, WONG SL, DONNAN S. Repeated Prevalence Surveys for monitoring effectiveness of hospital infection control. *Lancet* 1989; 2(8670): 1021-1023.

FOORD MD, PERRY JD, GOULD FK, ORR KE. Neomycin blood agar as a selective medium for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal Clinical Pathology* 1996; 49: p437.

GAYNES R, EDWARDS J, NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION SURVIELENCE (NNIS) Nosocomial vancomycin-resistant enterococci (VRE) in the United States, 1989-1995: the first 1000 isolates. In: The sixth Annual Meeting of The Society for Healthcare Epidemiology of America, April1996; Washington DC. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1996; 17: P18. Abstract.

GRAY JW, PEDLER SJ. Antibiotic resistant enterococci. *Journal of Hospital Infection* 1992, 21: 1-14.

GOLD HS, MOELLERING JR, RC. Antimicrobial drug resistance. *The New England Journal of Medicine* 1996; 335:1445-1453.

GORDTS B, VAN LANDUYT, IEVEN M, VANDAMME P, GOOSSENS H Vacomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *Journal Clinical Microbiology* 1995; 33:2842-2846.

HALEY RW, QUADE DH, FREEMAN HE, CDC SENIC Planning Committee. Study on the efficacy of nosocomial infection control (SENIC Project): summary of study design. *American Journal Epidemiology* 1980; 111-472.

HALEY RW, et al.. The Nation-wide nosocomial infection rate: a new need for vital statistics. *American Journal Epidemiology* 1985; 121-159.

HENNING KJ, DELENCASTRE H, EAGAN J, et al.. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium on a pediatric oncologyward: duration of stool shedding and incidence of clinical infection. *Pediatric Infection Diseases Journal* 1996; 15: 848-854.

HERWALDT LA, WENZEL RP. Dynamics of hospital-acquired infection. In: Murray, PR; Baron, EJ; Pfaller, MA; Tenover, FC; Yolken, RH (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 6ed, Washington DC, 1995. 168-171

HIRAMATSU K. Vancomycin resistance in Staphylococci. *Drug Resistance Updates* 1998; 1:135-150.

HORODNICEANU T, et al.. High-level, plasmid-born resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* (subsp. *Zymogenes*). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1979; **16**: 686-689.

JACOBY GA. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. **Annual Review of Medicine** 1996; **47**:169-179.

JONES RN, et al.. Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** 1995; **21**:85-93.

JONG EV, LEBOUTE EM, CIOCCA MLS, PENZ JR AM. Uso de avoparcina e virgamicina como promotores de crescimento em rações para frango de corte. Efeito sobre desempenho produtivo e utilização da energia da ração. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia** 1998; **14**(5): 529-535.

JOKLIK WK. Antimicrobial agents. In: WILLET, HP., AMOS, DB., W.C.M. (Eds). **Zinsser Microbiology**. 20 ed. London: Appleton & Lange. 1992. p. 153-186.

JORDENS JZ, BATES J, GRIFFITHS DT. Faecal carriage nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal Antimicrobial Chemother* 1994; 34:515-528.

KIRST HA, THOMPSON DG, NICAS TI. Historical yearly usage of ancomycin. *Antimicrobial Agents Chemother* 1998; 42:1303-4.

KLARE I, HEIER H, CLAUS H, et al.. *Enterococcus faecium* strains with van-A-mediated High-level glycopeptide resistance isolated from animal food stuffs and fecal samples of humam in the community. *Microbial Drug Resistant* 1995-a; 1: 226-272.

KLARE I, HEIER H, CLAUS H, REISSBRODT R, WITTE H. VanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiology Letter* 1995-b; 125:165-172

KLARE I, HEIER H, CLAUS H, WITTE H. Environmental strains of *Enterococcus faecium* With inducible high-level resistance to glycopeptides. *FEMS Microbiology Letter* 1993; 106:23-30.

LECLEREQ R, COURVALIN P. Resistance to glicopeptides in Enterococci. **Clinical Infection Diseases** 1997; **24**: 545-556.

LECLEREQ R, COURVALIN P. Bacterial resistance to microlide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrobial Agents Chemother** 1991; **35**: 1267-1272.

LEME IL, FERREIRA AJP, PIGNATARI ACC. Avaliação do perfil de resistência a glicopeptídeos aminoglicosídeos de uso humano e veterinário em amostras de *Enterococcus* Spp de origem aviária. **VI Congresso Brasileiro de Controle Infecção e Epidemiologia Hospitalar**. Campos do Jordão – SP. 1998.

LUNDSTROM TS *et al.*. Vancomycin, Trimethoprim-sulfamethoxazole, and rinfampin. **Infection Disease Clinics Of North America** 1995; **9**:747-767.

MARANGONI DV, VIEIRA W. Auditoria em antibióticos. In: ZANON, U., NEVES, J. (Eds). **Infecções hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Médica e Científica. 1987. p. 939-952

MARCUS N, PELED N, YAGUSPSKY P. Rapid increase in the prevalence of antimicrobial drug resistance among Enterococcal blood isolates in Southern Israel. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** 1997; **16**: 913-915.

MELHUS A, TJERNBERG I. First documented isolation of vancomycin - resistant *Enterococcus faecium* in Sweden. **Scandinavian Journal Infection Diseases**, 1996; **28**:191-193.

MIRANDA AG, SINGH KV, MURRAY BE. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. **Journal Clinical Microbiology** 1991; **29**: 2752-2557.

MOELLERING Jr. RC. Pharmacokinetics of vancomycin. **Journal Antimicrobial Chemother** 1984; **14**(Suppl. D): 43-52.

MOELLERING Jr. RC. The enterococci: an enigma and a continuing therapeutic challenge. **European Journal Microbiology Infectious Diseases** 1990; **9**:73-74.

MONTECLAVO MA, et al.. Natural history of colonization with vancomycin - resistant *Enterococcus faecium*. **Infection Control and Hospital Epidemiology** 1995; **16**: 680-685.

MORENO FP, et al.. Clinical and molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a city in Southern Texas. **Clinical Infection Diseases** 1995; **21**:1234-1237.

MORO ML, STAZI MA, MARASCA G, GRECO D, ZAMPIERI A. National Prevalence Survey of hospital - acquired infections in Italy, 1983. **Journal Hospital Infection** 1986; **8**(1): 72-85.

MOTTA EG. Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em rações de aves: visão do ministério. In: **Conferencia APINCO de ciência e tecnologia avícola**. Curitiba. 1996. 51-57.

MOUTHON et al.. Vancomycin-resistant Enterocci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The Gram positive challenges. **Clinical Infection Diseases** 1996; **9**:256-260.

MURRAY BE, BARON Ejo, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th Ed. 1999. 1773p.

MURRAY BE. Vancomycin-resistant *Enterococci*. *American Journal Medicine* 1997; 102: 284-293.

MURRAY BE. New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic-dilemmas. *Journal Infection Diseases* 1991; 163:1185-1194.

MURRAY BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 1990; 3(11): 46-65.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial sensitivity tests for bacteria that grow aerobically. *Approved Standard M7-A4*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1993.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (1997-a) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. *Approved Standard M2-A5*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY

STANDARDS(1997-b) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved Standard M7-A4.**

National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

NELSON RRS. Selective isolation of vancomycin-resistant enterococci.

Journal of Hospital Infection 1999; 39: 13-18.

NETZ DJA. Estudo de virulência e de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Enterococcus* obtidas de infecções hospitalares e comunitárias. **Dissertação de Mestrado.** UFRJ. Rio de Janeiro. 1998. 109p.

NETTLEMAN MD. Global aspects of infection control. **Infection Control And Hospital Epidemiology 1993; 14(11): 646-648**

NEUMANN MA, SAHM DF, THORNSBERRY C. New developments in antimicrobial agent susceptibility testing: a practical guide. **Cumitech 6A. American Society for Microbiology.** Washington, D. C. 1991.

NOBLE WC, et al.. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters** 1992; **72**: 195-198.

NOSKIN GA, STOSOR V, COOPER I, PETERSON LR. Recovery vancomycin resistant Enterococci on fingerprints and environmental surfaces. **Infection Control and Hospital Epidemiology** 1995; **16**: 577-581.

PANUTTI C, GRINBAUM R. One Overview of Nosocomial Infection In Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology** 1995; **16**: 170-174.

PATTERSON JE, ZERVOS MJ. High-level gentamicin-resistance in *Enterococcus* microbiology, genetic basis and epidemiology. **Reviews of Infectious Diseases** 1990; **23**: 644-652.

PEARCE CL, EVANS MK, PETERS SM, COLE MF. Clonal diversity of vancomycin-resistant enterococci from an outbreak in a tertiary care university hospital. **American Journal Infection Control** 1998; **26**: 536-538.

PEREIRA C, TAIKI M, JUKEMURA E, CAPPELIANO P, ALMEIDA MC,
CORRÊA L. Alterações no uso de cefalosporinas de terceira
geração, carbapenens e glicopeptídeos no período de 10 anos
em hospital universitário. **Brazilian Journal of Infectious
Diseases.** 1999; 3(S2): p49.

PERICHON B, REYNOLDS P, COURVALIN P. VanD type glycopeptide-
resistant *Enterococcus faecium* BM4339. **Antimicrobial Agents and
Chemotherapy** 1997; 41:2016-2018.

PHILLIPS I. Assessing the evidence that antibiotic growth promoters
influence human infections. **Journal of Hospital Infection** 1999;
43:173-178.

PIGNATARI AC. Analise molecular de Enterococcus e dos elementos
Van a que median resitênci a vancomicina, isolados na casa de
saúde Santa Marcelina – SP, em 1988. **XX Congresso Brasileiro
de Microbiologia.** Salvador – Ba. 1988; MH123 p81.

PRADE SS, OLIVEIRA ST, RODRIGUEZ R, et al.. Estudo Brasileiro da
Magnitude das Infecções Hospitalares em hospitais terciários.
Revista do Controle de Infecção Hospitalar 1995; 2(2):11-24.

QUINTILIANI JR R, SAHM DF, COURVALIN P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: MURRAY, BE; BARON, E JO; PFALLER, MA; TENOVER, FC; YOLKEN, RH (Eds). **Manual of Clinical Microbiology.** 7th Ed. 1999. 1773p.

RIBAS RM, GONTIJO-FILHO PP. Avaliação da presença de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) em pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia. **Dissertação de Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.** Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia -MG, XIII; 1999. 64p.

SAPICO FL, et al.. Enterococci highly resistant to penicillin and ampicillin; an emerging clinical problem? **Journal of Clinical Microbiology** 1989; **27:**2091-095.

SCHOWTEN MA, HOOGKAMP-KORSTANJE JAA, KRAAK WAG, BARTELS CJM, ROELOFS-WILLEMS HJM; VOSS A. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) prevalence in Europe. Abstracts, 9th European Congress of Chemotherapy and Infectious

diseases, 1999. **Clinical Microbiology Infectious Diseases.**
1999 **5(suppl 3): p136.** Abstract.

STARLING CEF, PINHEIRO SMC, ALMEIDA FF, COUTO BRGM. NNISS
Metodology in Brazilian Hospitals. Five Years of Experience.
Associação Brasileira de Infectologia. 1995

SIMJEE S, GILL MJ. Gene transfer, gentamicin resistance and
enterococci. **Journal of Hospital Infection** 1997; **30:** 249-259.

SWARTZ MN. Hospital-acquired infections: diseases with increasingly
limited therapies. **Proceeding of the National Academy of Sciences**
1994; **91:** 2420-2427.

TANIMOTO K, AN FY, CLEWELL DB. Characterization of the *traC*
determinant of the *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacterisin
plasmid pADI: binding of sex pheromone. **Journal Bacteriology**
1993; **175:** 5260-5264.

TAYLOR ME, OPPENHEIM BA, CHADWICK PR, WESTON D, PALEPO
M, WOODFORD N, BELLIS M. Detection of glycopeptide-resistant

enterococci in routine diagnostic faeces specimens. **Jorunal of Hospital Infection** 1999; **43**: 25-32.

TORRES C, REGUERA JA, SANMARTIN MJ, PÉREZ-DIAZ JC, BAQUERO F. Van A-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp in sewage. **Journal Antimicrobial Chemother** 1994; **33**: 553-561.

Van BELKUM A, Van der BRAAK N, THOMASSEN R, VERBRUGH H, ENDTZ H. Vacomicyn-resistant enterococci in cats and dogs. **Lancet** 1996, **348**: p1038.

Van der AUWERA P, PENSART N, KORTEN V, MURRAY BE, LECLERCQ R. Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide -resistant enterococci. **Journal Infectious Diseases** 1996; **173**:1129-1136.

VAN HORN KG, et al.. Evaluation of commercial vancomycin agar screen plates for detection of vancomycin-resistant Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology** 1996, **34**(8): 2042-2044.

WEBER DJ, RUTALA WA. Role of environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant Enterococci. **Infection Control and Hospital Infection** 1997; **18**:306-309.

WEINSTEIN RA, HAYDEN MK. Multiplay drug-resistant pathogens: epidemiology and control. In: BENNETT, J.V., BRACHMAN, P.S. (Eds). **Hospital Infections**. 4 ed., 1998, p. 215-236.

WELLS CL, JUNI BA, CAMERON SB, et al.. Stool carriage, clinical isolation and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. **Clinical Infectious Diseases** 1995; **21**:45-50.

WENZEL RP. Managent Principles and the Infection-Control Committee In: WENZEL, R.P. (eds.). **Prevention and Control of Nosocomial Infections** 2ed., Baltimore, Williams and Wilkins: 1993. 207-213.

WILEY BM, BLACKLOCK A, MCGEER A, LOW DE. Molecular epidemiology of the emergence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in Ontario, Canada (Abstract). **36th Interscience Conference**

on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, 1996;
C16:37. Abstract.

WOODFORD N, et al. Current perspectives on glycopeptide resistance.

Clinical Microbiology Reviews 1995; 8:585-615.

WOOD AJJ. Antimicrobial-drug resistance. **New England Journal Medicine** 1996; 335:1445-1453.

ZANELLA RC, et al. Analise molecular de Enterococcus e dos elementos Van A que median resistência a vancomicina, isolados na Casa de Saúde Santa Marcelina – SP, em 1998. **XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Salvador – BA. 1998; MH123 p81.

FU-00012395-5