

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Perfil epidemiológico de infecção por Enterococos Resistentes à Vancomicina  
em hospital universitário com alta prevalência de pacientes colonizados

Paola Amaral de Campos

Uberlândia – MG  
Julho - 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

Perfil epidemiológico de infecção por Enterococos Resistentes à Vancomicina  
em hospital universitário com alta prevalência de pacientes colonizados

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em Imunologia  
e Parasitologia Aplicadas como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora:  
Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas.

Paola Amaral de Campos

Uberlândia – MG  
Julho - 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C198p Campos, Paola Amaral de, 1989-  
2013 Perfil epidemiológico de infecção por enterococos resistentes à  
vancomicina em hospital universitário com alta prevalência de pacientes  
colonizados / Paola Amaral de Campos. – 2013.  
73 f. : il.

Orientadora: Rosineide Marques Ribas.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Parasitologia - Teses. 2. Enterococcus - Teses. 3. Vancomicina –  
Teses. 4. Infecção hospitalar – Teses. I. Ribas, Rosineide Marques. II.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 576.8



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: www.imunoparasito.ufu.br (034)3218-2333  
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



**Paola Amaral de Campos**

“Perfil epidemiológico de infecção por Enterococos Resistentes à Vancomicina em hospital universitário com alta prevalência de pacientes colonizados”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 15 de julho de 2013.

Profa. Dra. Cristina da Cunha Hueb Barata de Oliveira – UFTM

Profa. Dra. Helisângela de Almeida Silva – ICBIM/UFU

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas (orientadora) – ICBIM/UFU

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
por acreditarem nas minhas escolhas de vida,  
pela preocupação conjunta em cada desafio,  
pela alegria a cada conquista, e, sobretudo,  
por todo amor recebido.*

*“Que Deus permita que eu não perca a vontade de ser grande;  
mesmo sabendo que o mundo é pequeno.*

*E acima de tudo... permita que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente,  
e que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de  
mudar e transformar qualquer coisa,  
pois a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.”*

*[Chico Xavier]*

## **AGRADECIMENTOS**

### **Agradeço...**

Primeiramente a **Deus**, fonte inesgotável de esperança, por me fazer forte e perseverante. Agradeço pela proteção ininterrupta e por sempre iluminar meu caminho com oportunidades, desafios e amigos preciosos.

Aos meus pais, **Paulo e Milene**, minha origem e bem mais precioso, pela dedicação e amor com que me criaram, sempre investindo na minha formação e acreditando no meu potencial. Obrigada por me incentivarem a buscar meu próprio espaço.

Valorizo também o apoio e afeto da minha irmã **Larissa**, dos meus familiares e amigos de longa data, que sempre torceram para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu namorado **Rodolpho**, pela parceria, companheirismo e horas de incentivo. Obrigada por ser meu melhor amigo e confidente.

À Profª. Dra. **Rosineide Marques Ribas**, por ter acreditado em mim e caminhado comigo passo a passo, transmitindo os segredos desta caminhada. Por ter sido um exemplo de dedicação e doação à pesquisa científica e à docência. Meu respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. **Paulo P. Gontijo Filho**, pelo exemplo profissional e pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos meus colegas de profissão e de vida, a todos do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU), **Deivid, Raquel, Sabrina, Ana Luiza, Juliana, Melina, Nayara, Iara, Daiane**, pelo apoio moral e prático durante toda essa jornada, pelas sugestões e recomendações para as apresentações deste trabalho, e principalmente, por se tornarem a minha família em Uberlândia.

Aos técnicos do laboratório **Claudete, Ricardo e Samuel** por todo auxílio e colaboração.

Às secretárias da coordenação do PPIPA, **Lucélia** e **Lucileide** pelo esclarecimento de todas as dúvidas, pela atenção e paciência.

Agradeço às integrantes da minha banca Dra. **Cristina da Cunha Hueb Barata de Oliveira**, Dra. **Helisângela de Almeida Silva** e Dra. **Lizandra Ferreira de Almeida e Borges** por aceitarem participar da minha defesa e pelo muito que vão acrescentar ao meu trabalho e colaborar com o meu desenvolvimento.

Aos profissionais de saúde do Hospital de Clínicas; à equipe do Laboratório de Microbiologia do HC-UFU; aos funcionários do Setor de Registros Médicos e aos farmacêuticos por toda ajuda prestada.

Agradeço também aos **pacientes**... sem eles o trabalho não seria possível!

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais** (FAPEMIG), pela concessão de uma bolsa de estudos com a qual foi possível dedicação exclusiva ao mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, permitiram que este sonho se concretizasse.

**Muito obrigada !!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>22</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1    OBJETIVOS GERAIS.....	23
3.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1    Hospital .....	24
4.2    Desenho do estudo e amostras bacterianas .....	24
4.3    Coleta e Identificação das espécies .....	25
4.4    Testes de sensibilidade aos antimicrobianos.....	26
4.4.1    Disco difusão.....	26
4.5    Avaliação dos fatores de risco .....	27
4.6    Definições e indicadores epidemiológicos .....	27
4.7    Técnicas Moleculares .....	29
4.7.1    Extração do DNA .....	29
4.7.2    Identificação das espécies <i>E.faecium</i> e <i>E. faecalis</i> por Multiplex PCR .....	30
4.7.3    Detecção do genótipo de resistência <i>vanA</i> .....	31
4.7.4    Detecção dos genes de virulência <i>asa1</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i> e <i>hyl</i> por PCR multiplex...	31
4.8    Tipagem molecular pelo PFGE ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ).....	32
4.9    Análise Estatística .....	34
4.10    Aprovação pelo Comitê de Ética.....	34
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>
ANEXO I.....	68
ANEXO II.....	70
ANEXO III.....	71
APÊNDICE I.....	72
APÊNDICE II.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
>	Maior
<	Menor
$\leq$	Maior ou igual
$\geq$	Menor ou igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\text{mL}$	Millilitro
$\chi^2$	Qui-quadrado
<b>AE</b>	<i>Elution buffer</i> - Tampão de Eluição
<b>AL</b>	<i>Lysis Buffer</i> - Tampão de Lise
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>AW1</b>	<i>Wash Buffer 1</i> – Tampão de lavagem 1
<b>AW2</b>	<i>Wash Buffer 2</i> – Tampão de lavagem 2
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>CC17</b>	Complexo Clonal 17
<b>CIR</b>	Clínicas Cirúrgicas
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CM</b>	Clínica Médica
<b>D-Ala-D-Ala</b>	D-alanil-D-alanina
<b>D-Ala-D-Lac</b>	D-alanil-D-lactato
<b>D-Ala-D-Ser</b>	D-alanil-D-serina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b>DDD</b>	Dose Diária Definida

<b>et al</b>	E colaboradores
<b>HC-UFU</b>	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
<b>HLR</b>	<i>High-level Resistant</i> – Elevados níveis de resistência
<b>HLAR</b>	<i>High-level Aminoglycoside Resistant</i> – Elevados níveis de resistência aos aminoglicosídeos
<b>HLGR</b>	<i>High-level Gentamicin Resistant</i> – Elevados níveis de resistência à gentamicina
<b>HLSR</b>	<i>High-level Streptomycin Resistant</i> – Elevados níveis de resistência à estreptomicina
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>IrAS</b>	Infecção relacionada à Assistência à Saúde
<b>MIC</b>	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> – Concentração Inibitória Mínima
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i> - Tipagem de Sequência Multilocus
<b>NHSN</b>	<i>National Healthcare Safety Network</i>
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i> – Razão de possibilidades
<b>P</b>	Valor de <i>P</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBPs</b>	Proteínas ligadoras de penicilina
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> Eletroforese em Campo Pulsado
<b>r</b>	Correlação de Pearson
<b>rs</b>	Correlação de Spearman
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> – Desvio Padrão
<b>U</b>	Unidades
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva

**UTI-A** Unidade de Terapia Intensiva de Adultos

**VRE** Enterococos resistentes à vancomicina

**VRE<sub>fc</sub>** *E. faecalis* resistentes à vancomicina

**VRE<sub>fm</sub>** *E. faecium* resistentes à vancomicina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Organograma da população estudada quanto à colonização e infecção por VRE.....	<b>24</b>
<b>Figura 2:</b> Distribuição por clínicas dos pacientes colonizados e infectados pelo VRE no HC-UFU.....	<b>37</b>
<b>Figura 3:</b> Nível endêmico de colonização e infecção pelo VRE por 1000 pacientes-dia de janeiro de 2010 a junho de 2012.....	<b>38</b>
<b>Figura 4:</b> Relação espacial/temporal nas diferentes clínicas do HC-UFU de março de 2010 a junho de 2011.....	<b>39</b>
<b>Figura 5:</b> Duração em dias entre a admissão do paciente e o desenvolvimento de colonização e desde a colonização até o desenvolvimento de infecção pelo VRE.....	<b>40</b>
<b>Figura 6:</b> Pressão de colonização e densidade de incidência do VRE/1000 pacientes-dia de 2010 a 2012.....	<b>42</b>
<b>Figura 7:</b> Relação entre a dose diária definida dos antimicrobianos por 1000 pacientes-dia e o número de pacientes colonizados/infectados por VRE por 1000 pacientes-dia no HC-UFU, no período de janeiro de 2010 a junho de 2012.....	<b>43</b>
<b>Figura 8:</b> Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>vanA</i> nas amostras de VRE <sub>fm</sub> recuperadas de pacientes colonizados e infectados.....	<b>48</b>
<b>Figura 9:</b> Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>esp</i> em amostras de VRE <sub>fm</sub> recuperadas de pacientes infectados.....	<b>48</b>
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>esp</i> em amostras de VRE <sub>fm</sub> recuperadas de pacientes colonizados.....	<b>49</b>
<b>Figura 11:</b> Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes <i>asaI</i> , <i>gelE</i> e <i>hyl</i> ....	<b>49</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Amostras controle que foram utilizadas em cada experimento.....	<b>25</b>
<b>Tabela 2:</b> <i>Primers</i> utilizados na realização das reações de PCR para confirmação das espécies.....	<b>30</b>
<b>Tabela 3:</b> <i>Primers</i> utilizados na realização das reações de PCR para detecção dos genes de resistência.....	<b>31</b>
<b>Tabela 4:</b> <i>Primers</i> utilizados na realização das reações de PCR para detecção dos genes de virulência.....	<b>32</b>
<b>Tabela 5:</b> Recuperação de VRE a partir de vigilância de pacientes colonizados e infectados incluídos no estudo.....	<b>35</b>
<b>Tabela 6:</b> Características clínicas e demográficas dos pacientes com VRE incluídos na pesquisa.....	<b>36</b>
<b>Tabela 7:</b> Taxas e indicadores epidemiológicos de infecção relacionada à assistência à saúde e colonização por Enterococos Resistentes à Vancomicina no HC-UFG.....	<b>41</b>
<b>Tabela 8:</b> Média do consumo de antibióticos em DDD por 1000 pacientes-dia de glicopeptídeos, cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> e 4 <sup>a</sup> gerações, aminoglicosídeos e metronidazol no HC-UFG, entre janeiro de 2010 a junho de 2012.....	<b>43</b>
<b>Tabela 9:</b> Análise univariada e regressão logística multivariada identificando variáveis associadas com o desenvolvimento de infecção pelo VRE em pacientes colonizados....	<b>45</b>
<b>Tabela 10:</b> Características demográficas e clínicas dos pacientes colonizados e infectados por VRE <sub>fc</sub> no HC-UFG.....	<b>46</b>
<b>Tabela 11:</b> Perfil de resistência aos β-lactâmicos e aminoglicosídeos em amostras de infecção por VRE <sub>fm</sub> e colonização por VRE <sub>fc</sub> .....	<b>47</b>
<b>Tabela 12:</b> Características e genes de virulência e resistência de amostras de VRE <sub>fm</sub> recuperadas de diferentes sítios de pacientes internados no HC-UFG.....	<b>50</b>

## RESUMO

Globalmente o Enterococo Resistente à Vancomicina (VRE) continua sendo uma causa importante de infecção relacionada à assistência à saúde. O trabalho teve como objetivo caracterizar amostras de VRE isoladas de pacientes hospitalizados durante os períodos epidêmico e endêmico, determinando o risco de pacientes colonizados desenvolver infecção, sua relação com o consumo de antibióticos e o papel da pressão de colonização. Adicionalmente, foi investigada a presença de determinantes de virulência em amostras recuperadas de colonização e infecção. Foi realizado estudo longitudinal de coorte de pacientes colonizados e infectados por *Enterococcus faecium* (VRE<sub>fm</sub>) e *E. faecalis* (VRE<sub>fc</sub>) resistentes à vancomicina, por busca ativa no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2012. A identificação e a resistência aos antimicrobianos foram determinadas pelo sistema automatizado Vitek®2. Uma ficha seguindo o modelo do NHSN (“National Healthcare Safety Network”) foi preenchida para cada paciente, considerando fatores demográficos, clínicos e epidemiológicos. Os fatores de risco foram avaliados por análise univariada e regressão logística multivariada, e os testes de Pearson e Spearman foram utilizados para correlacionar duas variáveis, DDD do antimicrobiano por 1000 pacientes-dia e o número de VRE por 1000 pacientes-dia. Os genes de virulência *asa1*, *gelE*, *esp* e *hyl*, e resistência *vanA* foram detectados por reação em cadeia da polimerase. Entre os 171 pacientes avaliados, VRE<sub>fm</sub> foi o micro-organismo mais frequente (92%). Vinte e dois pacientes (12,9%) desenvolveram infecção pelo VRE, em média 14 dias após a colonização com a predominância das infecções urinárias (72%). Entre os pacientes infectados a maioria usou sonda vesical como procedimento invasivo mais frequente (86%). A taxa de aquisição do VRE<sub>fm</sub> foi 1,92/1000 pacientes-dia no início de agosto de 2010 e no final de janeiro de 2011 não houve o isolamento de VRE<sub>fm</sub>, quando foi observado o término do surto de VRE<sub>fm</sub> e início da endemicidade no hospital (0,555 VRE/1000 pacientes-dia). Houve relação temporal e espacial entre os pacientes infectados com evidência de transmissão cruzada principalmente na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos. Somente o uso prévio de aminoglicosídeos foi considerado fator de risco independente para infecção pelo VRE ( $P=0,0013$ ); no entanto, o consumo de glicopeptídeos foi correlacionado com a presença desse micro-organismo no hospital ( $rs=0,717$ ,  $P=0,03$ ). Apesar da pressão de colonização por VRE ter sido elevada com variações de 0,004 a 1,32% durante os 30 meses de estudo, não foi relacionada estatisticamente com o desenvolvimento de infecção pelo VRE. Foi observada associação entre as amostras com alto nível de resistência à estreptomicina e resistência à penicilina e ampicilina nas amostras de VRE<sub>fm</sub>, entretanto, para as amostras de VRE<sub>fc</sub>, o elevado nível de resistência à gentamicina foi mais frequente (77%) associado somente com a resistência à penicilina. Todas as amostras de VRE<sub>fm</sub> carregavam o gene *vanA* e foram resistentes a teicoplanina, expressando elevados níveis de resistência à vancomicina ( $MIC \geq 256 \mu\text{g/ml}$ ). O gene *esp* foi o mais frequente, detectado em 82,4% das amostras de colonização e em 76,5% das amostras clínicas. Mostramos alta prevalência de VRE<sub>fm</sub> em um hospital terciário, independentemente associado com o uso prévio de aminoglicosídeos e o consumo de glicopeptídeos.

**Palavras-chave:** VRE; surto; *vanA*; colonização; infecção; fatores de risco

## ABSTRACT

Globally the vancomycin-resistant enterococci (VRE) remains an important cause of infection related to health care. The study aimed to characterize samples of VRE isolated from patients hospitalized during the epidemic and endemic periods, determining the risk of colonized patients developing infection, its relationship with consumption antibiotics and the role of colonization pressure. Additionally, we investigated the presence of virulence determinants in samples recovered from colonization and infection. We conducted longitudinal cohort study of patients colonized and infected by *Enterococcus faecium* (VRE<sub>fm</sub>) and *E. faecalis* (VRE<sub>fc</sub>) resistant to vancomycin, by active search for the Microbiology Laboratory of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia, during the period of January 2010 to June 2012. The identification and antimicrobial resistance were determined by automated system Vitek®2. A record following the model of NHSN ("National Healthcare Safety Network") was completed for each patient, considering clinical, demographic and epidemiological factors. The risk factors were evaluated by univariate analysis and multivariate logistic regression, and Pearson and Spearman tests were used to correlate two variables, the antimicrobial DDD per 1000 patient-days and the number of VRE per 1000 patient-days. Virulence genes *asa1*, *gelE*, *esp* and *hyl*, and *vanA* resistance were detected by polymerase chain reaction. Among the 171 patients evaluated, VRE was the most frequent micro-organism (92%). Twenty-two patients (12.9%) developed infection by VRE on average 14 days after colonization with the prevalence of urinary tract infections (72%). Among patients infected most used urinary catheter as the most frequent device (86%). The acquisition rate of VRE was 1.92/1000 patient-days in early August 2010 and the end of January 2011 there were no cases of VRE<sub>fm</sub>, when it was observed the end of the outbreak and the begin of VRE<sub>fm</sub> endemicity in the hospital (0.555 VRE/1000 patient-days). There was a relationship between the temporal and spatial infected patients with evidence of cross-transmission mainly in the Intensive Care Unit for Adults. Only the use of aminoglycosides has been previously considered an independent risk factor for VRE infection ( $P=0.0013$ ), however, the use of glycopeptides was correlated with the presence of that micro-organism in a hospital ( $r=0.717$ ,  $P=0.03$ ). Although the colonization pressure with VRE was high with variations from 0.004 to 1.32% during the 30-month study was not statistically associated with the development of VRE infection. An association was observed between samples with high-level resistance to streptomycin and penicillin and ampicillin resistance in samples VRE<sub>fm</sub>, however, for samples of VRE<sub>fc</sub>, the high level of resistance to gentamicin was more frequently (77%) associated only with penicillin resistance. All samples VRE<sub>fm</sub> carried the *vanA* gene and were resistant to teicoplanin, expressing high levels of resistance to vancomycin (MIC  $\geq$  256 µg/ml). The *esp* gene was the most frequent detected in 82.4% of samples colonization and 76.5% of the clinical samples. We showed high prevalence of VRE<sub>fm</sub> in a tertiary hospital, independently associated with the previous use of aminoglycosides and glycopeptides consumption.

**Keywords:** VRE; outbreak; *vanA*, colonization, infection, risk factors

## 1 INTRODUÇÃO

Enterococos são cocos gram-positivos que fazem parte da microbiota do intestino, e apesar de pouco virulentos, a sua incidência como micro-organismo hospitalar aumentou significativamente nos últimos 10 anos em várias partes do mundo (NEVES et al., 2009; MAHONY et al., 2010), sendo considerado o segundo patógeno de infecções do trato urinário e sítio cirúrgico e o terceiro em infecções de corrente sanguínea nos Estados Unidos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; MUTNICK et al., 2003). Entre as amostras do Brasil, *Enterococcus* sp. aparece em oitavo lugar representando 3% dos patógenos isolados, sendo o quarto patógeno (5%) mais isolado em infecções de corrente sanguínea, em estudo realizado de 2005 a 2008 (SADER et al., 2004; GALES et al., 2009). Especificamente, *E. faecalis* resistente à vancomicina apresentou aumento na incidência de 4,4% em 2005 para 12,2% em 2008, de acordo com dados do programa de vigilância SENTRY, e fica claro que no Brasil o problema com *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE) ainda é crescente (GALES et al., 2009).

A importância desses micro-organismos no hospital pode ser justificada em parte pela resistência intrínseca a muitos antibióticos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, clindamicina e fluoroquinolonas e pela resistência adquirida à aminoglicosídeos e glicopeptídeos (CLEVEL, 1990; CHANG et al., 2003; GOLDRICK, 2004).

Em relação a resistência à vancomicina são descritos nove fenótipos até o momento: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM e VanN, sendo VanA e VanB os mais frequentemente encontrados e mais importantes, devido à possibilidade de transferência dos genes de resistência via plasmídeo e transposons por conjugação (WOODFORD, 1998).

- **Fenótipo VanA:** caracteriza-se pela alta resistência à vancomicina ( $MIC \geq 64 \mu\text{g/mL}$ ) e moderada ou elevada resistência à teicoplanina ( $MIC \geq 16 \mu\text{g/mL}$ ), mediada pelo transpon Tn1546 que contém os grupamentos gênicos (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* e *vanZ*) (LU et al., 2001; TACCONELLI; CATALDO, 2007).
- **Fenótipo VanB:** níveis altos de resistência induzida à vancomicina ( $MIC 32$  a  $64 \mu\text{g/mL}$ ) e suscetibilidade à teicoplanina. A resistência é conferida pelo transpon Tn1547 que apresenta uma associação de genes (*vanRB*, *vanSB*; *vanW*, *vanHB*, *vanB* e *vanXB*) (LU et al., 2001; TACCONELLI; CATALDO, 2007).

- **Fenótipo VanC:** resistência intrínseca de baixo nível à vancomicina (MIC 4 a 32 µg/mL) e suscetibilidade a teicoplanina, presente nas espécies *E. gallinarum*, codificada pelos genes espécie-específicos *vanC-1* e *vanC-2* e em *E. casseliflavus* pelo gene *vanC-3* (WOODFORD, 1998; NEVES et al., 2009).
- **Fenótipo VanD:** caracterizado por resistência constitutiva à vancomicina (MIC ≥ 64 µg/mL) e suscetibilidade para teicoplanina (MIC = 4 µg/mL), é indistinguível do VanB pelos testes de suscetibilidade. Foi relatado em quatro amostras de *E. faecium*, sendo duas isoladas nos Estados Unidos (OSTROWSKY et al., 1999), uma no Canadá (BOYD et al., 2000) e uma no Brasil (COSTA et al., 2000).
- **Fenótipo VanE:** relatado em uma cepa de *E. faecalis* com MIC de 16 µg/mL para vancomicina e 0,5 µg/mL para teicoplanina, o gene *vanE*, não é transferível e pode ser induzido pela presença de vancomicina (FINES et al., 1999).
- **Fenótipo VanG:** descrito em *E. faecalis* com nível moderado de resistência a vancomicina (MIC 16 µg/mL) e sensibilidade a teicoplanina (MCKESSAR et al., 2000; BOYD et al., 2006).
- **Fenótipo VanL:** descrito em uma cepa de *E. faecalis* com baixo nível de resistência à vancomicina (MIC 8 µg/mL) e sensibilidade a teicoplanina (BOYD et al., 2008).
- **Fenótipo VanM:** descrito recentemente em uma cepa clínica de *E. faecium*, apresenta resistência à maioria dos antimicrobianos, inclusive à vancomicina (MIC > 256 µg/mL) e teicoplanina (MIC 96 µg/mL) (XU et al., 2010).
- **Fenótipo VanN:** recentemente descrito em uma cepa clínica de *E. faecium* isolada da corrente sanguínea, apresenta baixo nível de resistência à vancomicina (MIC 16 µg/mL) e suscetibilidade a teicoplanina (0,5 µg/mL) (LEBRETON et al., 2011).

O mecanismo de ação da vancomicina é a ligação a D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) dos precursores do peptideoglicano impedindo a formação desse polímero e, por consequência, inibindo a síntese da parede celular bacteriana. A resistência à vancomicina em níveis elevados é determinada pela presença dos genes *vanA*, *vanB*, *vanD* e *vanM* que codificam ligases que catalisam a formação de precursores alterados formados de D-alanil-D-lactato (D-Ala-D-Lac). O fenótipo de resistência de baixo nível à vancomicina (MIC 4 a 32 µg/mL) e suscetibilidade à teicoplanina é produto da produção de ligases codificadas pelos genes *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* e *vanN* que catalisam a formação de D-alanil-D-serina (D-Ala-D-Ser) que incorporada aos precursores do peptideoglicano tem baixa afinidade de ligação à vancomicina.

(BRYANT; WILBECK, 2007; BOYD et al., 2008; WERNER et al., 2008; XU et al., 2010; LEBRETON et al., 2011).

No Brasil o primeiro VRE isolado foi da espécie *E. faecium*, em 1996 (COSTA et al., 1998), que posteriormente foi caracterizado como do fenótipo VanD (COSTA et al., 2000). Em junho de 1997, em São Paulo, foi isolada a primeira amostra de *E. faecium* do fenótipo VanA, de uma paciente de 63 anos com quadro clínico de meningite (ZANELLA et al., 1999). Posteriormente, um surto por VRE foi documentado no mesmo hospital, sendo 50 amostras isoladas de diferentes espécimes clínicos e 97 de pacientes colonizados (ZANELLA et al., 2001). O primeiro caso de VRE (genótipo *vanA*) em Minas Gerais foi descrito em 2003 em uma paciente politraumatizada submetida a várias cirurgias e tratada com cefalosporinas de terceira geração e vancomicina, internada no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (RIBAS et al., 2007). Desde então, vários outros estudos tem relatado a presença e disseminação desse micro-organismo no estado (CONCEIÇÃO et al., 2010; OLIVEIRA; BETTCHER, 2010).

Além da resistência à vancomicina, amostras de VRE apresentam níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos, ocorrendo geralmente pela produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos como 6-acetil-transferase (*aac-6'*) e a 2-fosfo-transferase (*aph-2''*). Os genes responsáveis pela produção das enzimas estão localizados em plasmídeos, com exceção da *aac-6'* do *E. faecium*, a qual é cromossomicamente modificada. A importância da detecção do alto grau de resistência aos aminoglicosídeos é justificada pela perda de sinergismo que ocorre com os antimicrobianos glicopeptídeos e beta-lactâmicos comprometendo o efeito bactericida no tratamento de infecções graves por enterococos (SHEPARD; GILMORE, 2002).

De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013) o elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos é caracterizado a partir de concentrações inibitórias mínimas superiores a 500 µg/mL para gentamicina e 2000 µg/mL para estreptomicina, não sendo necessário testar rotineiramente aminoglicosídeos como tobramicina, amicacina e canamicina considerando que a gentamicina é um bom preditor de suscetibilidade a esses antimicrobianos.

Já a resistência aos β-lactâmicos pode ocorrer devido a alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) ou através da produção de β-lactamases (MURRAY, 1992; FONTANA et al., 1994). A resistência à ampicilina e penicilina é mais frequente,

sendo que os níveis elevados de resistência em amostras clínicas de *Enterococcus faecium* é atribuído ao aumento da expressão da PBP5 e mutações nessa proteína, o que diminui ainda mais a sua afinidade pelos β-lactâmicos (FONTANA et al., 1994). A resistência β-lactamase-mediada é descrita quase que exclusivamente para o *E. faecalis* e é atribuída na maioria dos casos, à aquisição do operon responsável pela produção de β-lactamase do *Staphylococcus aureus* (ZSCHECK; MURRAY, 1991; MURRAY, 1992).

De acordo com a literatura, pacientes colonizados geralmente apresentam maior risco de infecção, com isso estudos recentes têm reportado que a pressão de colonização é fator de risco independente para aquisição de micro-organismos hospitalares (ARVANITI et al., 2012). Como na casuística de Bonten et al. (1998), que avaliando pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) submetidos diariamente a triagem para colonização retal por VRE durante 19 semanas mostrou que a pressão de colonização, o uso de antibióticos e de nutrição enteral afetaram significativamente aquisição de VRE, entretanto a pressão de colonização foi considerada a principal variável envolvida. A literatura mostra que na maioria dos países da Europa as taxas de colonização são baixas variando de 1,5 a 14,9% na Holanda (BRAAK et al., 2000), 5% na França (BOISIVON; THIBAULT; LECLERCQ, 1997), e 3,5% na Bélgica (GORDTS et al., 1995). Entretanto nos últimos anos a incidência na América Latina aumentou variando de 12 a 28% na Argentina (LITTVIK et al., 2006) e no Brasil essa colonização varia em diferentes regiões de 14,4% a 32,6% (FURTADO et al., 2005; FREITAS et al., 2006).

A epidemiologia de infecções hospitalares e da colonização por micro-organismos multirresistentes é complexa, multifatorial e sofre mudanças ao longo do tempo, influenciadas sobretudo pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos, políticas de controle e as condições dos pacientes (MOREIRA et al., 2009; WOODFORD; LIVERMORE, 2009). Existem diferentes estudos que exemplificam a relação entre o consumo de antibióticos e a emergência de resistência bacteriana entre os principais fenótipos relacionados a infecção relacionada à assistência à saúde (MCGOWAN, 1987; MEYER et al., 2003; SANTOS et al., 2007). Outros fatores de risco também são relacionados ao aumento nas taxas dessas infecções por micro-organismos resistentes e multirresistentes nos hospitais, incluindo maior gravidade da doença de base, imunocomprometimento, uso de procedimentos invasivos, tempo de

hospitalização prolongado, introdução de micro-organismos resistentes e multirresistentes da comunidade e práticas de prevenção e controle ineficazes, entre outros (CHAMBERS, 2001; ARANTES et al., 2003; GONTIJO-FILHO, 2006; SAKKA et al., 2008). No Brasil o problema é mais evidente pela presença significativa de pacientes internados com infecções de natureza comunitária, o que contribui para que os antibióticos estejam entre os medicamentos mais prescritos nos hospitais (PRADE et al., 1995).

A capacidade que os enterococos têm de causar infecção são pouco conhecidas e não apresentam a mesma virulência de organismos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (MOELLERING, 1992) e ao contrário de *E. faecalis*, pouco se sabe sobre a virulência de *E. faecium* (GILMORE et al., 2002). Entre os fatores que contribuem para a virulência em enterococos, destacam-se a presença da proteína de agregação codificada pelo gene plasmidial *asa1*, que facilita a transferência genética durante a conjugação bacteriana (CLEWELL, 1993); a produção de gelatinase, codificada pelo gene cromossomal *gelE*, uma endopeptidase que hidrolisa colágeno e tem sido estudada em casos de endocardite em modelos experimentais (THURLOW et al., 2010); o gene *hyl* que codifica a hialuronidase, com função ainda desconhecida em enterococos (RICE et al., 2003) e o gene *esp*, que codifica a proteína de superfície enterocócica responsável por promover adesão e formação de biofilme e participar da evasão da resposta imune do hospedeiro (SHANKAR et al., 2001).

Outros fatores de virulência incluem o antígeno secretado SagA e o Acm, capazes de se ligar a matriz extracelular. Ao contrário da adesina Acm que é específica na ligação de colágeno, SagA tem amplo espectro de ligação ao fibrinogênio, colágeno tipo I e tipo IV, fibronectina e laminina. Embora o papel exato dessas proteínas na patogênese de infecções por *E. faecium* ainda não seja conhecido, a adesão a matriz extracelular pode ser a primeira etapa na colonização do hospedeiro (NALLAPAREDDY et al., 2003; TENG et al., 2003).

Os métodos de tipagem molecular são essenciais para determinar em detalhes a epidemiologia de VRE e aspectos relacionados a sua resistência e virulência, além da identificação de surtos nos hospitais. Entre esses métodos destaca-se o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) que é considerado por muitos pesquisadores como padrão ouro para tipagem de vários micro-organismos hospitalares (STRANDÉN; FREI; WIDMER, 2003; MORALES et al., 2004; DURMAZ et al., 2009). Entretanto mais recentemente outros métodos de tipagem tem sido utilizados, entre eles o *Multilocus sequence typing*

(MLST). De acordo com essa nova técnica, as amostras de *E. faecium* resistentes à vancomicina (VRE<sub>fm</sub>) hospitalares recuperadas de surto fazem parte de uma subpopulação genética conhecida como Complexo Clonal 17 (CC17), a qual é caracterizada também pela resistência à ampicilina e fluoroquinolonas (CATTOIR; LECLERCQ, 2013). A importância desse complexo clonal reside na capacidade dessas amostras de disseminar no ambiente e/ou causar infecções nos pacientes hospitalizados (WILLEMS et al., 2005). Outro aspecto importante que tem sido relatado na literatura, diz respeito a presença do gene de virulência *esp*, o que parece ser restrito a amostras hospitalares de VRE<sub>fm</sub> pertencentes a esse complexo clonal (BONTEN; WILLEMS; WEINSTEIN, 2001; WILLEMS et al., 2001).

## 2 JUSTIFICATIVAS

Os resultados deste trabalho reuniram dados suficientes para determinar a incidência de colonização e subsequente desenvolvimento de infecção por VRE durante períodos caracterizados como epidêmico e endêmico e sua associação com características epidemiológicas, permitindo estudar a sua relação com fatores de risco intrínsecos e extrínsecos, uso de antimicrobianos e a pressão de colonização.

É muito importante que se estude fatores de virulência em linhagens hospitalares de VRE estabelecendo a frequência desses genes em amostras recuperadas de pacientes colonizados e infectados e sua correlação com a utilização de antibióticos, o que é pouco avaliado pelos pesquisadores. Diante do exposto, entende-se como relevante a realização de um estudo epidemiológico avaliando a presença de VRE em ambientes hospitalares.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

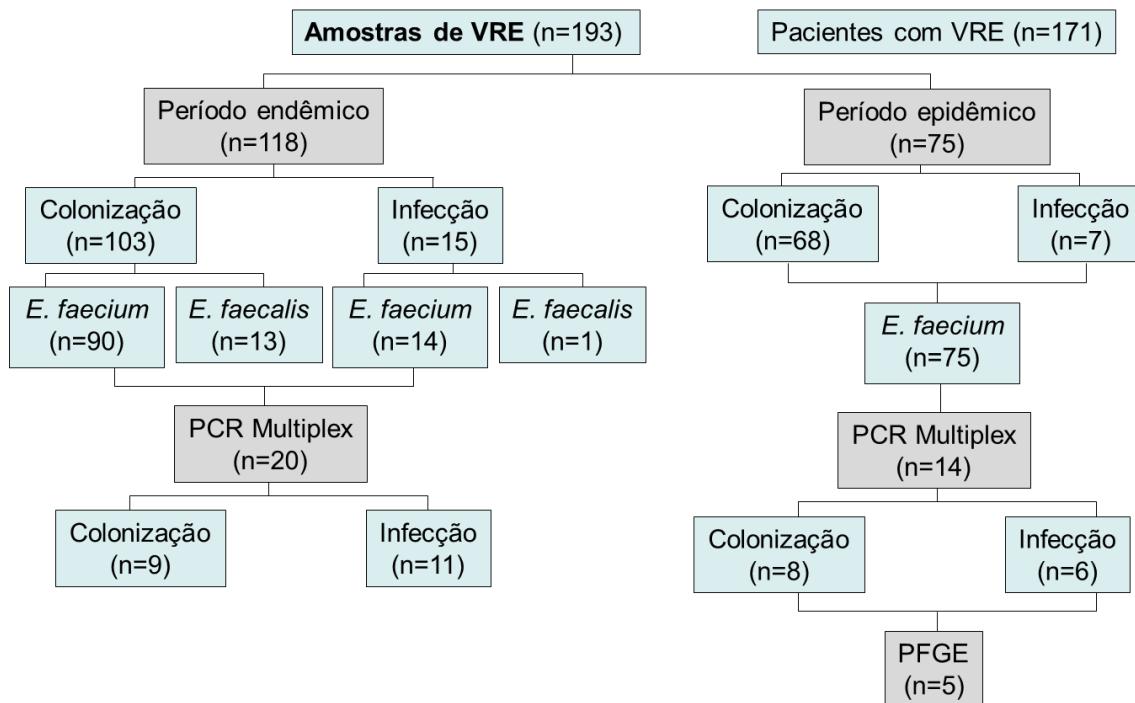
Caracterizar epidemiologicamente um surto de infecção e colonização por VRE e sua relação com fatores de risco intrínsecos e extrínsecos com o consumo de antibióticos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a incidência de colonização e subsequente desenvolvimento de infecção pelo VRE durante o período epidêmico e endêmico;
- Avaliar a dose diária definida (DDD) dos seguintes antimicrobianos: vancomicina, teicoplanina, gentamicina, amicacina, ceftriaxona, cefepime e metronidazol e sua relação com o aumento nas taxas de VRE no hospital;
- Calcular a pressão de colonização e sua influência no desenvolvimento de infecção;
- Determinar os genes responsáveis pela resistência à vancomicina (*vanA*) e de virulência (*asa1*, *gelE*, *hyl* e *esp*) por reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Detectar *clusters* de pacientes com VRE a partir da relação temporal-espacial entre os casos;
- Avaliar a sensibilidade à ampicilina e penicilina, e altos níveis de resistência à gentamicina e estreptomicina entre as amostras de infecção por VRE<sub>fm</sub> e colonização por VRE<sub>fc</sub>.
- Determinar a relação clonal entre as linhagens responsáveis pelo surto por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

A estratégia experimental proposta nesse projeto para o estudo da colonização e infecção por VRE, dos determinantes de virulência e da relação clonal, está representada na Figura 1.



**Figura 1:** Organograma da população estudada quanto à colonização e infecção por VRE.

### 4.1 Hospital

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG) é um complexo hospitalar público, universitário, de assistência terciária e com capacidade para 530 leitos. É referência para uma população estimada de mais de dois milhões de habitantes, moradores de Uberlândia e de 81 municípios das regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Nos últimos anos, tem sido responsável por praticamente todo o atendimento hospitalar vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Uberlândia. Possui clínicas de várias especialidades e, por ser um hospital de alta complexidade que atua como referência regional, grande parte dos seus pacientes exige cuidados complexos.

### 4.2 Desenho do estudo e amostras bacterianas

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2012 (2 anos e 6 meses) em que foram recuperadas do Laboratório de

Microbiologia do Hospital 193 amostras de VRE, sendo 179 de *E. faecium* e 14 de *E. faecalis* resistentes a vancomicina de pacientes internados em diferentes unidades do HC-UFU. A coleta das amostras seguiu protocolos específicos para cada procedimento e foram incluídos apenas o primeiro isolado de VRE de cada paciente e aqueles que apresentaram MIC para vancomicina  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ . Os isolados bacterianos identificados como VRE foram armazenados a -20°C para realização dos testes posteriores. As amostras controle que foram utilizadas no estudo estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Amostras controle que foram utilizadas em cada experimento.

Linhagem controle	Experimento
<i>Enterococcus faecalis</i> – ATCC 29212	PCR para identificação de <i>E. faecalis</i> Teste de sensibilidade
<i>E. faecalis</i> – ATCC 51299	Teste de sensibilidade
<i>E. faecium</i> – ATCC 12805	PCR para identificação de <i>E. faecium</i>
<i>E. faecalis</i> - ATCC 51559	PCR para gene <i>vanA</i>
<i>E. faecalis</i> - JH2ss	PCR para <i>asa1</i>
<i>E. faecalis</i> - OG1RF	PCR para <i>gelE</i>
<i>E. faecium</i> - TX0016	PCR para <i>hyl</i>
<i>E. faecalis</i> - MMH594	PCR para <i>asa1</i> , <i>gelE</i> e <i>esp</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> - ATCC 25923	Teste de sensibilidade

#### 4.3 Coleta e Identificação das espécies

A pesquisa de colonização intestinal foi realizada semanalmente pela equipe de enfermagem através de cultura de vigilância nas unidades em que o VRE foi identificado. Espécimes obtidos a partir de suabe retal foram cultivados em caldo BHI com 4% de NaCl incubados "overnight" a 37°C e então subcultivados em Ágar Enterococsel com vancomicina na concentração de 6  $\mu\text{g/mL}$  para detecção de amostras resistentes à glicopeptídeos.

A identificação do micro-organismo e a suscetibilidade antimicrobiana foi realizada utilizando-se o sistema automatizado VITEK®2 (bioMérieux) no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU. Para a identificação do micro-organismo, as amostras bacterianas foram suspensas em solução salina 0,45% com objetivo de obter uma suspensão com turbidez compatível com a escala de 0,50 a 0,63 de McFarland utilizando um turbidímetro. Em seguida, os cartões foram inseridos no aparelho e cada

teste bioquímico foi preenchido, selado e incubado automaticamente. Durante o período de incubação (7-10 horas) os cartões foram lidos a cada 15 minutos através de um sistema óptico de transmitância usando diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Os resultados são analisados pelo software do aparelho através de algoritmos e reportados automaticamente.

#### **4.4 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos**

As amostras clínicas de VRE foram submetidas aos testes de sensibilidade pelo sistema automatizado VITEK®2 para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, gentamicina, tigeciclina, ciprofloxacina, teicoplanina e vancomicina. Amostras de colonização foram avaliadas no laboratório do hospital somente para resistência à vancomicina, e os elevados níveis de resistência foram confirmados utilizando-se fitas de E-test (bioMérieux). Amostras bacterianas foram suspensas em solução salina 0,45% com objetivo de obter uma solução com turbidez compatível com a escala de 0,50 a 0,63 de McFarland e em seguida, diluídas conforme as recomendações do fabricante. Os cartões foram inseridos no aparelho e automaticamente preenchidos com as suspensões bacterianas. No cartão, os antimicrobianos são encontrados em duas a quatro concentrações diferentes. Cada poço com o antibiótico teste é avaliado automaticamente a cada 15 minutos durante 18 horas. Esses dados são usados para gerar uma curva de crescimento e, por comparação com um controle, o MIC de cada antibiótico é estimado. Esse cálculo é realizado com um algoritmo específico para cada antimicrobiano independente da espécie do micro-organismo.

##### **4.4.1 Disco difusão**

A resistência à penicilina, ampicilina e níveis elevados de resistência à gentamicina e estreptomicina foram testadas para amostras de VRE<sub>fm</sub> recuperadas de infecção e VRE<sub>fc</sub> de colonização pelo teste de disco difusão de acordo com o CLSI (2013).

Os discos testados e suas respectivas concentrações foram: ampicilina (10 µg), penicilina G (10 U), gentamicina HRL (120 µg) e estreptomicina HRL (300 µg).

Para a realização deste teste foi utilizado o ágar Mueller-Hinton (Difco, EUA), esterilizado em autoclave e distribuído em placas de petri de 150 mm, com uma altura de 4 mm. O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina estéril 0,9% a partir de

uma cultura com 16-18 horas de crescimento e ajustado para uma turvação correspondente ao tubo nº 0,5 da escala de McFarland. Essa suspensão bacteriana foi semeada no ágar MH (Mueller-Hinton) com um suave, esfregando-o em toda superfície do meio de cultura. Em seguida, os discos de antimicrobianos foram distribuídos com auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

A leitura foi feita após 24-48 horas de incubação e os halos de inibição do crescimento foram medidos e comparados com a tabela 2D do CLSI (2013; Anexo I), classificando as amostras como sensíveis ou resistentes.

A qualidade os discos foi avaliada utilizando-se amostras controle pertencentes à coleção ATCC (Tabela 1).

#### **4.5 Avaliação dos fatores de risco**

Os fatores de risco para o desenvolvimento de infecção pelo VRE foram avaliados em um estudo caso-controle, os casos sendo representados por pacientes infectados por VRE e os controles como aqueles colonizados pelo VRE e sem infecção por qualquer micro-organismo. Os seguintes fatores foram considerados: idade, sexo, diagnóstico de internação, tempo de hospitalização, cirurgia, co-morbidades, procedimentos invasivos e uso prévio de antibióticos.

Uma ficha individual foi preenchida, seguindo o modelo do NHSN (do inglês, “*National Healthcare Safety Network*”), considerando fatores demográficos e clínicos (Anexo II).

#### **4.6 Definições e indicadores epidemiológicos**

**Infecção relacionada à Assistência à Saúde** (IrAS) é qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente no hospital. As IrAS também podem se manifestar durante a internação ou após a alta, desde que estejam relacionadas com a internação ou com os procedimentos realizados durante a internação (RODRIGUES; RICHTMANN, 2008).

**VRE/1000 pacientes-dia:** a incidência de colonização e infecção por VRE por 1000 pacientes-dia foi determinada nas clínicas onde o VRE foi detectado, como se segue: número de casos novos de VRE x 1000, dividido pelo número de pacientes-dia que estiveram internados na clínica no mesmo período.

**Infecção/1000 pacientes-dia<sup>A</sup>:** número total de infecção / número pacientes-dia x 1000.

**Infecção urinária pelo VRE:** de acordo com dados do prontuário médico a infecção urinária foi considerada pela presença do VRE e critérios clínicos.

**Colonização/1000 pacientes-dia<sup>A</sup>:** número total de colonização / número pacientes-dia x 1000.

**Mortalidade total:** relação entre o número de óbitos durante a internação hospitalar dos pacientes colonizados e o número total de pacientes.

**Pressão de colonização:** calculada para prever a aquisição nosocomial da colonização pelo VRE, da seguinte maneira: número de VRE pacientes-dia x 100/número total de pacientes-dia (BONTEN et al., 1998).

**Uso prévio de antibióticos:** até 30 dias antes da colonização pelo VRE (BRASIL, 2007).

**Dose Diária Definida de antimicrobiano por 1000/pacientes-dia (DDD/1000 pacientes-dia):** foram selecionados para cálculos das densidades de uso por 1000 pacientes/dia os seguintes antibióticos: glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), cefalosporinas de amplo espectro (ceftriaxona e cefepime) e metronidazol, como proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). A densidade de uso (DDD por 1000 pacientes-dia) foi obtida pela fórmula:

$$\text{DDD} = \frac{\text{Consumo de antibióticos em gramas}}{\text{Dose diária definida (NNIS, 2004)}}$$

$$\text{DDD/1000 pacientes-dia} = \frac{\text{DDD}}{\text{Nº de pacientes-dia}^A} \times 1000$$

<sup>A</sup> **Pacientes-dia:** P x L x T

P = Período de tempo em observação, em dias.

L = Leitos disponíveis na unidade.

T = índice de ocupação no tempo considerado (%).

## 4.7 Técnicas Moleculares

### 4.7.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico das amostras de enterococos foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os enterococos foram cultivados em ágar sangue a 35°C por 24 horas. Duas a três colônias da cultura foram suspensas em 500 µL de água milli-Q e centrifugadas por 10 minutos a 5000 xg (7,500 rpm) para obtenção do *pellet*. O *pellet* foi suspenso em 180 µL da solução de lisozima (20mg/mL de lisozima; 20mM Tris-HCl, pH8,0; 2mM EDTA; 1,2% Triton) e incubado por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 20 µL de proteinase K e 200 µL do tampão AL e agitado em *vortex*. A mistura foi incubada a 56°C por 30 minutos e, em seguida, mais 15 minutos a 95°C, e então centrifugada brevemente para remoção das gotas da tampa. Foi adicionado 200 µL do tampão AL na amostra, homogeneizado por *vortex* por 15 segundos, e incubado a 70°C por 10 minutos. A solução foi centrifugada brevemente, adicionado 200 µL de etanol (96-100%) e homogeneizado por *vortex* durante 15 segundos, seguido de outra breve centrifugação.

A mistura foi aplicada à coluna Mini spin QIAamp, e então centrifugada a 6000 xg (8.000 rpm) por 1 minuto. A coluna foi transferida para um tubo limpo e o conteúdo filtrado foi descartado. À coluna foi adicionado 500 µL de tampão AW1 e centrifugado a 6000 xg (8.000 rpm), por 1 minuto. A coluna foi novamente transferida para outro tubo descartando o filtrado. Foi adicionado 500 µL de tampão AW2 à coluna e centrifugado a velocidade máxima (20,000 xg; 14,000 rpm), por 3 minutos. A coluna foi colocada em outro tubo, o filtrado descartado e novamente centrifugado por 1 minuto na velocidade máxima, para eliminar contaminação com o tampão AW2.

Para a eluição do DNA, a coluna foi transferida para outro tubo e então adicionado 100 µL de tampão AE (tampão de eluição), incubado a temperatura ambiente por 1 minuto, e em seguida, centrifugado a 6000 xg (8,000 rpm), por 1 minuto. O processo foi repetido, adicionando 100 µL de tampão AE e prolongando a incubação por 5 minutos seguido de outra centrifugação. O DNA extraído foi conservado a -20°C até sua utilização.

#### 4.7.2 Identificação das espécies *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* por Multiplex PCR

As reações em cadeia da polimerase para detecção dos genes das espécies foi realizada utilizando os *primers* específicos segundo a Tabela 2.

**Tabela 2:** *Primers* utilizados na realização das reações de PCR para confirmação das espécies

Gene Amplificado	Produto da Amplificação (pb)	Pares	Primers (5'-3')
			Sequências
ddl	550	EFE – 1	GCA AGG CTT CTT AGA GA
<i>E. faecium</i>		EFE – 2	CAT CGT GTA AGC TAA CTT C
ddl	941	E1	ATC AAG TAC AGT TAG TCT
<i>E. faecalis</i>		E2	ACG ATT CAA AGC TAA CTG

Para a amplificação dos genes das espécies foi utilizado 6 µL da suspensão de DNA extraído conforme descrição anterior. A reação foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando os seguintes reagentes: água ultra pura autoclavada, solução tampão da Taq [10 x] diluído para uma concentração final de [1 x], 1,25 µL (0,05 U) de Taq DNA polimerase com MgCl<sub>2</sub> (Promega Corporation), os quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP) na concentração de 0,2 mM (Promega Corporation) e 0,5 µL dos *primers* específicos.

As condições da reação de amplificação foram baseadas no protocolo de Dutka-Malen; Evers e Courvalin (1995), sendo a desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A análise dos produtos da reação foi realizada utilizando-se 5 µL dos produtos amplificados, transferindo-os para um gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TBE [0,5x] e 1 µL de SYBR® Safe (Invitrogen) a cada 20 mL de gel. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (BioAmerica Inc).

A eletroforese correu a 90V por cerca de 90 minutos, e o gel foi fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

#### 4.7.3 Detecção do genótipo de resistência *vanA*

A reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes de resistência foi realizada utilizando os *primers* descritos na Tabela 3 segundo o protocolo de Woodford et al. (1993).

**Tabela 3:** *Primers* utilizados na realização das reações de PCR para detecção dos genes de resistência.

Gene Amplificado	Produto da Amplificação (pb)	<i>Primers</i> (5'-3')	
		Pares	Sequências
<i>vanA</i>	399	A <sub>1</sub>	ATG GCA AGT CAG GTG AAG ATG G
		A <sub>2</sub>	TCC ACC TCG CCA ACA ACT AAC G

Para a amplificação dos genes de resistência foi utilizado 5 µL da suspensão de DNA extraído conforme descrição anterior. A reação foi preparada para um volume final de 25 µL utilizando os seguintes reagentes: água ultra pura autoclavada, solução tampão da Taq [10 x] diluído para uma concentração final de [1 x], 1,25 µL (0,05 U) de Taq DNA polimerase com MgCl<sub>2</sub> (Promega Corporation), os quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP) na concentração de 0,2 mM (Promega Corporation) e 0,5 µL dos *primers* específicos.

As condições da reação de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 25 segundos, anelamento a 52°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 50 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel foram realizadas como descrito no item 4.7.2.

#### 4.7.4 Detecção dos genes de virulência *asa1*, *gelE*, *esp* e *hyl* por PCR multiplex

A reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes de virulência foi realizada utilizando os *primers* descrito na Tabela 4 segundo o protocolo de Vankerckhoven et al. (2004).

**Tabela 4:** *Primers* utilizados na realização das reações de PCR para detecção dos genes de virulência.

Gene Amplificado	Produto da Amplificação (pb)	Primers (5'-3')
		Pares Sequências
<i>asa1</i>	375 ASA 11 ASA 12	GCA CGC TAT TAC GAA CTA TGA TAA GAA AGA ACA TCA CCA CGA
<i>gelE</i>	213 GEL 11 GEL 12	TAT GAC AAT GCT TTT TGG GAT AGA TGC ACC CGA AAT AAT ATA
<i>hyl</i>	276 HYL n1 HYL n2	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA
<i>esp</i>	510 ESP 14F ESP 12R	AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG

Para a amplificação dos genes de virulência foi utilizado 5 µL da suspensão de DNA extraído conforme descrição anterior. A reação foi preparada para um volume final de 50 µL utilizando os seguintes reagentes: água ultra pura autoclavada, solução tampão da Taq [10 x] diluído para uma concentração final de [1 x], 2,5 µL (0,05 U) de Taq DNA polimerase com MgCl<sub>2</sub> (Promega Corporation), os quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP) na concentração de 0,2 mM (Promega Corporation) e 0,5 µL dos *primers* *asa1*, *gelE* e *hyl* na concentração de 0,1 µM cada, enquanto *esp* foi preparado na concentração de 0,2 µM. O termociclador utilizado foi *Mastercycler® gradiente* (Eppendorf) e como controles positivos foram utilizadas as amostras indicadas na Tabela 1.

As condições da reação de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial de 95°C por 15 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A análise dos produtos da reação, eletroforese e documentação do gel foram realizadas como descrito no item 4.7.2.

#### 4.8 Tipagem molecular pelo PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

O PFGE foi realizado segundo o protocolo de Campanile et al. (2003), com algumas modificações. As amostras de VRE<sub>fm</sub> foram incubadas de 16 a 18 horas em 5 mL de caldo BHI a 37°C. Após incubação as células foram centrifugadas por 2 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante, removido. O precipitado foi suspenso em 1 mL de

solução tamponante PIV (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 7,6]), e a mistura foi, novamente, centrifugada por 2 minutos. O sobrenadante descartado e o precipitado, novamente, suspenso em 300 µL de solução PIV. Um total de 150 µL da suspensão foi transferida para um novo microtubo, o qual foi incubado em banho-maria a 45°C. Para a confecção dos blocos de agarose foi adicionado à suspensão, 150 µL de agarose ultra-pura 1,5% mantida em banho-maria a 45°C e distribuída nos moldes retangulares para a formação dos *plugs*, que foram solidificados na geladeira por 15 minutos. Para a lise, os *plugs* de agarose foram deixados a 37°C por 18 horas com agitação em um microtubo de 2 mL contendo: 1 mL de solução de lise (6 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 M NaCl, 100 mM EDTA (pH 7,5), 0,5% Brij 58, 0,2% deoxicolato, 0,5% lauril sarcosinato de sódio, 20 µg/ml de RNase (*DNase free*) e 1 mg/ml de lisozima. Na sequência foi retirada a solução de lise e adicionado o tampão ESP (0,5 M EDTA [pH 9 to 9,5], 1% lauril sarcosinato de sódio, 50 µg/ml de proteinase K), mantendo os tubos incubados por 18 horas a 50°C com leve agitação. Os *plugs* foram lavados três vezes por 30 minutos cada a 37°C com 1 mL de solução TE (10 mM Tris-HCl [pH 7,5], 1 mM EDTA) e estocados em TE a 4°C até o uso.

Para a digestão do DNA bacteriano a enzima de restrição utilizada foi a SmaI. Os *plugs* foram divididos em até quatro partes pequenas (com até 1 mm de espessura), e uma das partes do bloco foi colocada em um microtubo, o qual foi incubado a temperatura ambiente por 30 minutos em tampão da enzima 1x (10 µl de tampão 10x e 90 µl de água ultra-pura autoclavada). Essa solução foi desprezada e outra foi preparada no momento do uso, acrescida de 25 U de enzima de restrição SmaI, e incubando de 16 a 18 horas a 30°C.

Para a corrida foi preparado 120 mL de gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x (0,089 M Tris-HCl, 0,089 M ácido bórico, 0,0025 M EDTA). Marcadores de peso molecular foram colocados nas extremidades e os *plugs* foram selados no pente com 30 µl de agarose. A corrida eletroforética foi realizada utilizando-se o equipamento CHEF-DRIII da Bio-Rad; com solução de TBE 0,5x a temperatura de 14°C, com o tempo de pulso aumentado de 5 a 30 segundos durante 20 horas a 6 V. O gel foi fotodocumentado pelo sistema L-Pix EX (Loccus Biotecnologia).

#### 4.9 Análise Estatística

A análise estatística dos fatores de risco para desenvolvimento de infecção pelo VRE em pacientes colonizados foi realizada utilizando-se o teste do  $\chi^2$  para comparação entre os valores quando o  $n$  foi maior que 5 e o teste exato de Fisher quando o  $n$  foi menor ou igual a cinco. Os números de pacientes que apresentavam determinado fator de risco foram comparados individualmente contra uma variável resposta (análise univariada) através de tabelas de contingência do tipo dois por dois (2 x 2). Para evitar o enlevar, que muitas vezes surge como uma consequência da própria análise univariada, este foi reajustado através da estratificação que é a estimação de medidas de associação (*Odds Ratio*) para cada uma das categorias da variável. As variáveis que demonstraram medidas de associação altas (*Odds Ratio*) foram submetidas à análise multivariada através de modelo de regressão logística. O nível endêmico de colonização e infecção pelo VRE por 1000 pacientes-dia foi calculado segundo Arantes et al. (2003). O teste não paramétrico de Spearman foi utilizado para correlacionar duas variáveis, DDD de glicopeptídeos por 1000 pacientes-dia e o número de VRE por 1000 pacientes-dia, enquanto o teste paramétrico de Pearson foi utilizado para correlacionar duas variáveis quando apresentaram uma distribuição normal, DDD de cefalosporinas, aminoglicosídeos e metronidazol por 1000 pacientes-dia e o número de VRE por 1000 pacientes-dia. A significância estatística foi definida para um valor de  $P$  menor que 0,05. A análise das variáveis foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism4 e Bioestat 5.0.

#### 4.10 Aprovação pelo Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-UFU sob análise final nº 597/09 para o protocolo registro CEP/UFU 039/09 (Anexo III).

## 5 RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2010 a junho de 2012 foi realizado vigilância laboratorial de pacientes com colonização e/ou infecção por *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* resistentes à vancomicina no HC-UFG.

No total, 171 pacientes foram identificados com VRE por culturas de vigilância e a partir de espécimes clínicos no hospital durante o período de estudo. Entre os pacientes colonizados, VRE<sub>fm</sub> foi o micro-organismo mais frequente (92%, 158/171) seguido de VRE<sub>fc</sub> recuperado somente em 13 pacientes hospitalizados (8%, 13/171) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Recuperação de VRE a partir de vigilância de pacientes colonizados e infectados incluídos no estudo

Pesquisa de VRE / Sítios	Pacientes (%)
Suabe Retal	
<i>Enterococcus faecium</i>	158 (92,4)
<i>Enterococcus faecalis</i>	13 (7,6)
Espécime Clínico	
<i>Enterococcus faecium</i>	21 (12,3)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (0,6)
Total	171 (100)

As características demográficas, clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo estão na Tabela 6. No total, 62% deles foram do sexo masculino, com média de idade de 52 anos (0-89 anos), 113 (66,1%) eram pacientes clínicos e 30 (17,5%) apresentaram trauma como diagnóstico de entrada. Aproximadamente 70% dos pacientes avaliados no hospital necessitaram de cirurgia. As principais co-morbidades observadas incluíram cardiopatia (36,8%), nefropatia (26,3%) e Diabetes Mellitus (14,1%). Em relação aos procedimentos invasivos observou-se maior frequência no uso de cateter venoso central (77,2%), seguido de sonda vesical (76,6%) e tubos nasoenteral, nasogástrico ou orogástrico (59,6%). A média do tempo de internação entre os pacientes foi de 68 dias (7-322 dias), e a maioria estava em uso de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações (83,0%), carbapenêmicos (56,7%) e glicopeptídeos (52,1%).

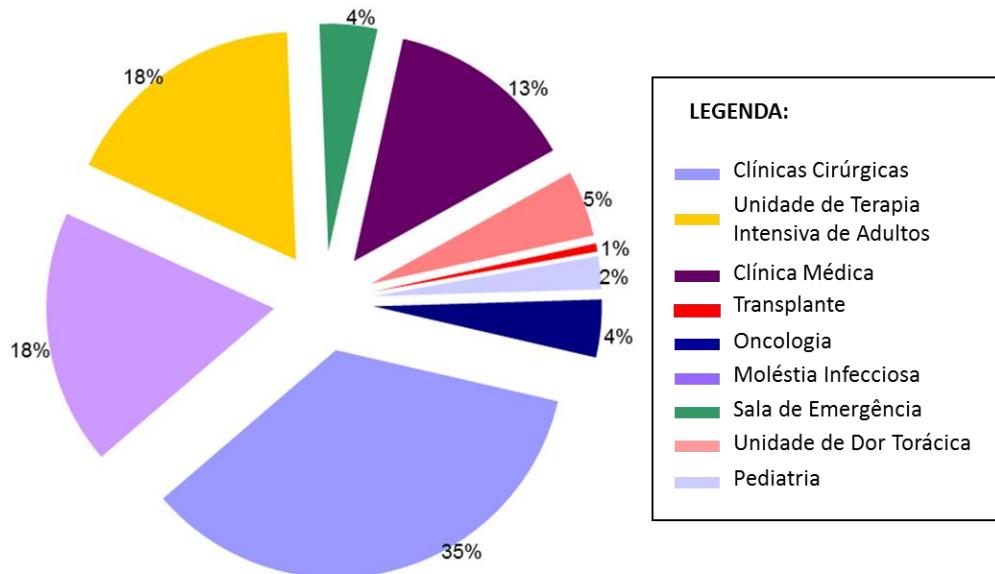
Poucas diferenças foram encontradas em relação aos pacientes com VRE<sub>fm</sub> e VRE<sub>fc</sub>, destacando o maior tempo de internação dos pacientes com VRE<sub>fm</sub> e entre os pacientes com VRE<sub>fc</sub>, a nefropatia como co-morbidade e o uso de ventilação mecânica foram mais frequentes.

**Tabela 6:** Características clínicas e demográficas dos pacientes com VRE incluídos na pesquisa

Características	Pacientes N=171 (%)	VRE <sub>fm</sub> (n=158)	VRE <sub>fc</sub> (n=13)
<b>Idade, anos, ± SD<sup>1</sup></b>	52,84 ( $\pm 21,51$ )	52,27 ( $\pm 21,36$ )	59,77 ( $\pm 23,07$ )
<b>Tempo de Internação, dias, ± SD</b>	68,20 ( $\pm 47,56$ )	69,37 ( $\pm 48,75$ )	52,76 ( $\pm 27,82$ )
<b>Sexo</b>			
Masculino	106 (62,0)	98 (62,1)	8 (61,5)
Feminino	65 (38,0)	60 (37,9)	5 (38,5)
<b>Diagnóstico de Internação</b>			
Clínico	113 (66,1)	104 (65,8)	9 (69,2)
Cirúrgico	28 (16,4)	27 (17,1)	1 (7,7)
Trauma	30 (17,5)	27 (17,1)	3 (23,1)
<b>Uso Prévio de Antibióticos</b>	<b>170 (99,4)</b>	<b>157 (99,3)</b>	<b>13 (100,0)</b>
Cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> e 4 <sup>a</sup> geração	142 (83,0)	130 (82,3)	12 (92,3)
Carbapenêmicos	97 (56,7)	90 (56,9)	7 (53,8)
Glicopeptídeos	89 (52,1)	79 (50,0)	10 (76,9)
Fluoroquinolonas	59 (34,5)	55 (34,8)	4 (30,7)
Beta-lactâmicos com inibidor	53 (30,9)	49 (31,0)	4 (30,7)
Aminoglicosídeos	26 (15,2)	22 (13,9)	4 (30,7)
<b>Procedimentos Invasivos</b>			
Cateter Venoso Central	132 (77,2)	120 (75,9)	12 (92,3)
Ventilação Mecânica	84 (49,1)	74 (46,8)	10 (76,9)
Sonda Vesical	131 (76,6)	120 (75,9)	11 (84,6)
Dreno	40 (23,4)	34 (21,5)	6 (46,2)
Sonda nasoenteral, nasogástrica ou orogástrica	102 (59,6)	93 (58,8)	9 (69,2)
Nutrição Parenteral	12 (7,0)	12 (7,6)	0 (0,0)
<b>Cirurgia</b>	<b>116 (67,8)</b>	<b>107 (67,7)</b>	<b>9 (69,2)</b>
<b>Co-morbididades</b>			
Cardiopatia	63 (36,8)	58 (36,7)	5 (38,5)
Diabetes Mellitus	24 (14,1)	22 (13,9)	2 (15,4)
Nefropatia	45 (26,3)	39 (24,7)	6 (46,2)
Doença Auto-Imune	8 (4,7)	8 (5,1)	0 (0,0)
<b>Espécime Clínico</b>	<b>22 (12,8)</b>	<b>21 (13,3)</b>	<b>1 (7,7)</b>
Urina	16 (72,8)	15 (71,4)	1 (100,0)
Líquido pancreático	1 (4,5)	1 (4,8)	0 (0,0)
Secreção traqueal	1 (4,5)	1 (4,8)	0 (0,0)
Sangue	4 (18,2)	4 (19,0)	0 (0,0)

<sup>1</sup> SD Desvio Padrão; VRE<sub>fm</sub>: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina; VRE<sub>fc</sub>: *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina.

Considerando a distribuição dos casos de colonização e infecção no HC-UFG (Figura 2), 35% foram detectados no setor de Clínicas Cirúrgicas, seguindo-se da clínica de Moléstia Infecciosa (18%) e Unidade de Terapia Intensiva de Adultos (18%).



**Figura 2:** Distribuição por clínicas dos pacientes colonizados e infectados pelo VRE no HC-UFG.

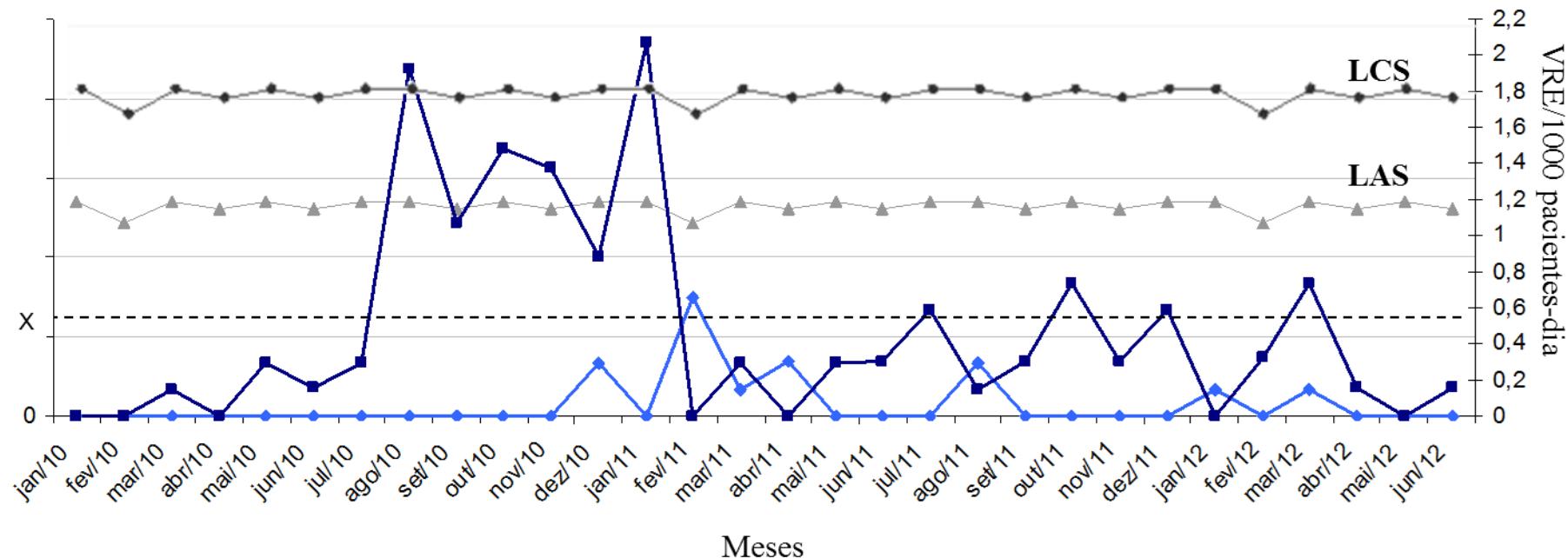
No presente estudo, as taxas de ocorrência de  $VRE_{fm}/1000$  pacientes-dia correspondentes aos meses de agosto de 2010 a janeiro de 2011 foram mais altas do que o limite de controle estabelecido em  $3\sigma$  acima da média de incidência dos casos de colonização e infecção, o que pode ser descrito como um surto (Figura 3). A taxa de aquisição do  $VRE_{fm}$  foi  $1,92/1000$  pacientes-dia no início de agosto de 2010 e caiu para 0 no final de janeiro de 2011 quando foi observado o término do surto de  $VRE_{fm}$  e início de um período de endemicidade no hospital ( $0,555$   $VRE/1000$  pacientes-dia). Casos de colonização por  $VRE_{fc}$  foram detectados esporadicamente a partir de novembro de 2010, com uma incidência mais expressiva no mês de fevereiro de 2011 ( $0,65/1000$  pacientes-dia) mantendo-se abaixo dos níveis do limite de controle estabelecidos para a detecção do surto.

Entre os pacientes infectados, houve a predominância de infecções urinárias (72%), seguido de bactеремia (18%). A maioria usou sonda vesical como procedimento invasivo mais frequente (86%) e 50% evoluiu para o óbito (Apêndice I).

LEGENDA:

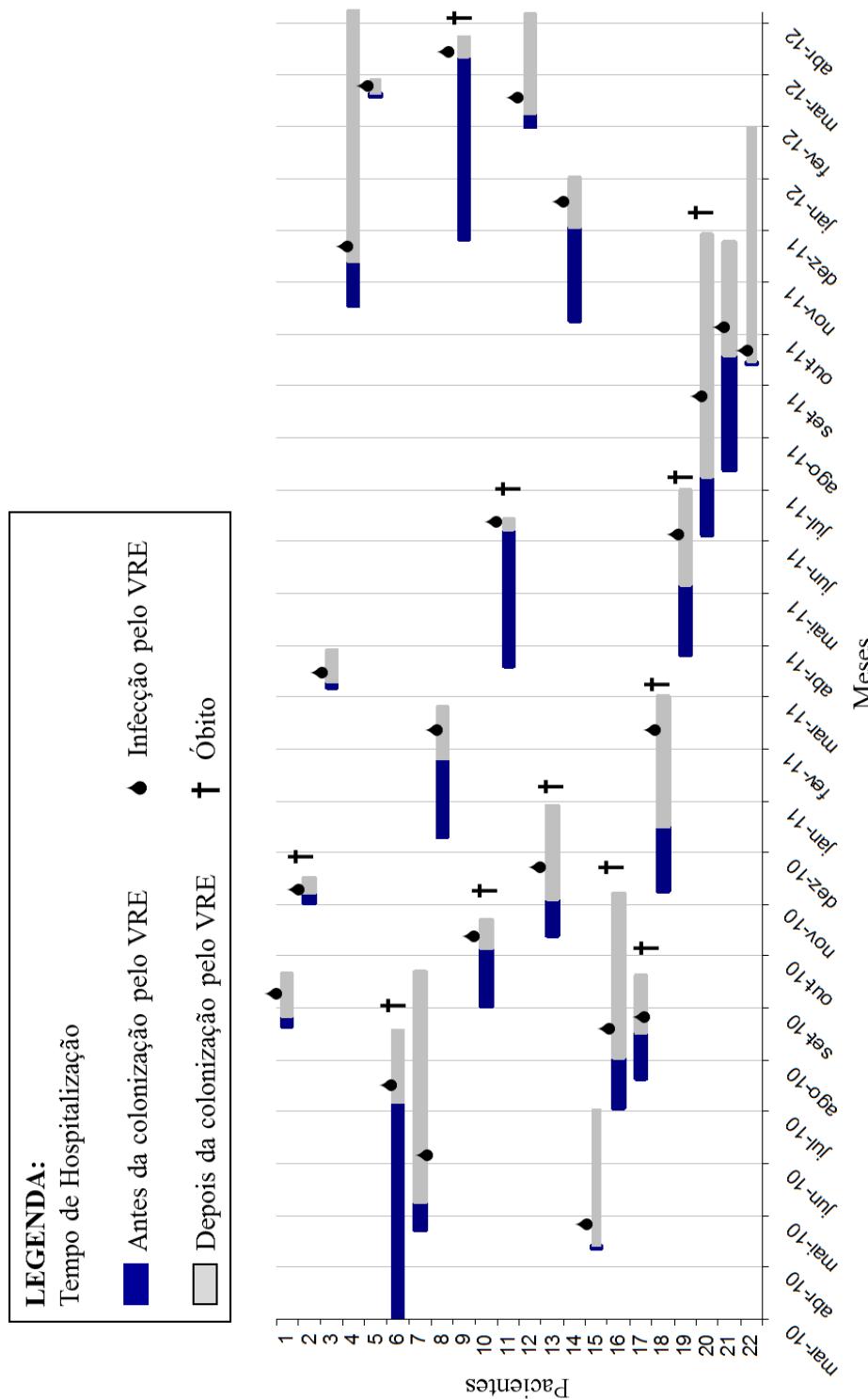
- █ VRE<sub>fm</sub>/1000 pacientes-dia
- █ VRE<sub>fc</sub>/1000 pacientes-dia

LCS: limite de controle superior ( $3\sigma + X$ ); LAS: limite de alerta superior ( $2\sigma + X$ );  
X: linha central (taxa média de VRE/1000 pacientes-dia = 0,555)



**Figura 3:** Nível endêmico de colonização e infecção pelo VRE por 1000 pacientes-dia de janeiro de 2010 a junho de 2012.

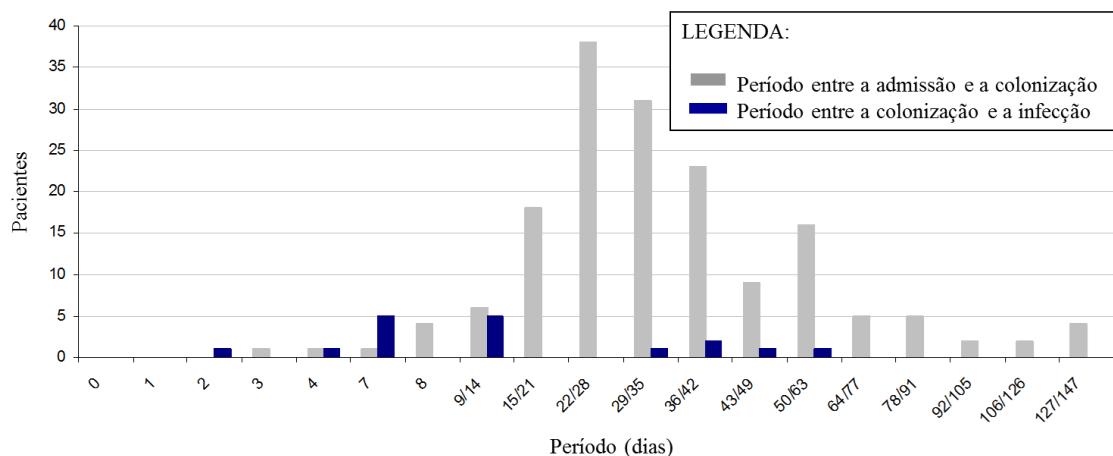
A figura 4 mostra as relações espacial e temporal entre os 22 pacientes infectados por VRE, incluindo a sua evolução para o óbito. Essa relação foi verificada em 9 dos 22 pacientes (40,9%), com a detecção de 3 *clusters*, sendo um na enfermaria da Clínica Médica (maio/2010 a agosto/2010) e dois na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos (agosto/2010 a setembro/2010; junho/2011 a dezembro/2011).



**Figura 4:** Relação espacial/temporal nas diferentes clínicas do HC-UFG de março de 2010 a junho de 2011. Pacientes: 1-5: Clínicas Cirúrgicas; 6-9: Clínica Médica, 10 e 11: Moléstia Infectiosa, 12: Oncologia, 13: Serviço de Emergência, 14: Transplante, 15: Unidade de Dor Torácica; 16-22: Unidade de Terapia Intensiva de Adultos. **Paciente 3 Infecção por VRE<sub>lc</sub>.**

A partir da detecção dos *clusters* foi realizado um gel de eletroforese para padronização da técnica de PFGE utilizando cinco amostras de VRE<sub>fm</sub>. Pela análise preliminar observamos mais de um clone visível, entretanto não foi possível até o momento incluir mais dados sobre o perfil clonal das amostras, considerando que houveram vários problemas operacionais que impossibilitaram a realização da técnica. Vale ressaltar que esses problemas já foram solucionados e que as amostras serão analisadas a partir do mês de agosto deste ano.

Todos os pacientes infectados pelo VRE foram previamente colonizados pelo mesmo micro-organismo, considerando uma média de 37 dias (variação 3-142) entre a admissão e o desenvolvimento de colonização, especificamente 37,5 dias para VRE<sub>fm</sub> e 31 dias para VRE<sub>fc</sub>. Uma vez colonizado o paciente se tornou infectado em média 14 dias (variação 0-53) após a colonização (Figura 5).



**Figura 5:** Duração em dias entre a admissão do paciente e o desenvolvimento de colonização e desde a colonização até o desenvolvimento de infecção pelo VRE.

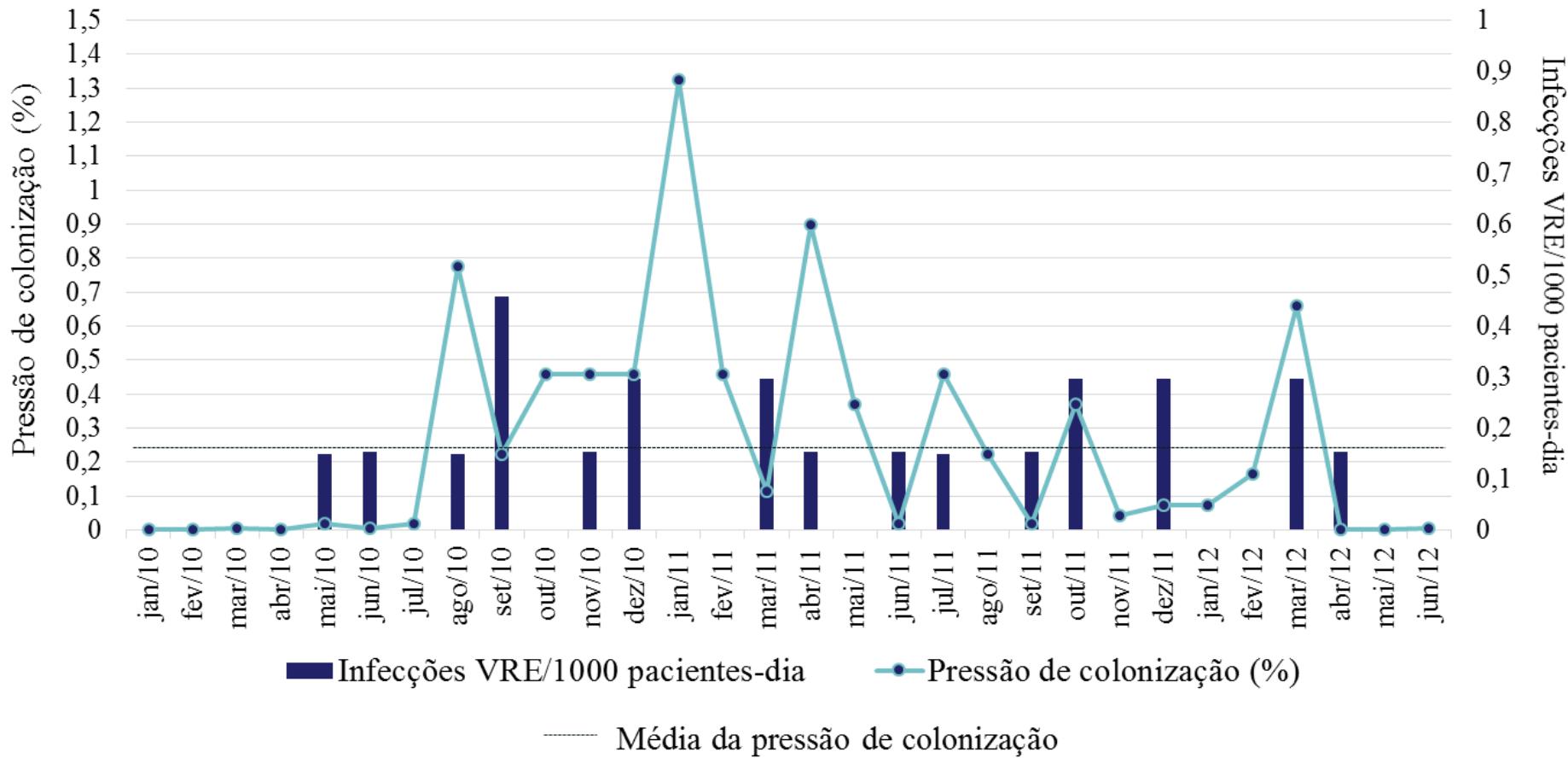
Durante os 30 meses de estudo, em 15 meses não houve casos de infecção pelo VRE. O número de VRE hospitalar por 1000 pacientes-dia de janeiro de 2010 a dezembro de 2010 foi 7,95; 11,50 de janeiro de 2011 a dezembro de 2011 e 3,36 de janeiro de 2012 a junho de 2012. O número total de pacientes-dia foi 198,598 e a média do número de VRE paciente-dia foi  $17,09 \pm 21,94$ . A pressão de colonização mensal variou de 0,004 a 1,32% durante o período estudado e os valores determinados para os indicadores epidemiológicos podem ser analisados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Taxas e indicadores epidemiológicos de infecção relacionada à assistência à saúde e colonização por Enterococos Resistentes à Vancomicina no HC-UFG

Variáveis	Indicadores
Paciente-dia	16,65
IrAS /1000 paciente-dia	3,30
Colonização/1000 paciente-dia	25,90
VRE/1000 paciente-dia	198,60
Pressão de colonização	7,70
Mortalidade total em 171 pacientes	28,1

A transmissão nosocomial foi observada em 15 dos 30 meses avaliados, no entanto nenhuma associação estatística foi observada entre a pressão de colonização e o desenvolvimento de infecção. Nos últimos 13 meses, observou-se pouca variação no número de casos apesar de um declínio significativo na pressão da colonização mensal. A distribuição mensal da aquisição do VRE hospitalar e a pressão de colonização são mostrados na figura 6.

O consumo de glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), cefalosporinas de terceira e quarta gerações (ceftriaxona e cefepime) e metronidazol no hospital, representado pelo DDD por 1000 pacientes-dia, variou durante o período de estudo (Figura 7, Tabela 8). Em média, o DDD de glicopeptídeos, cefalosporinas, aminoglicosídeos e metronidazol foi 111,68/1000 pacientes-dia, 543,82/1000 pacientes-dia, 8,08/1000 pacientes-dia e 52,97/1000 pacientes-dia, respectivamente.

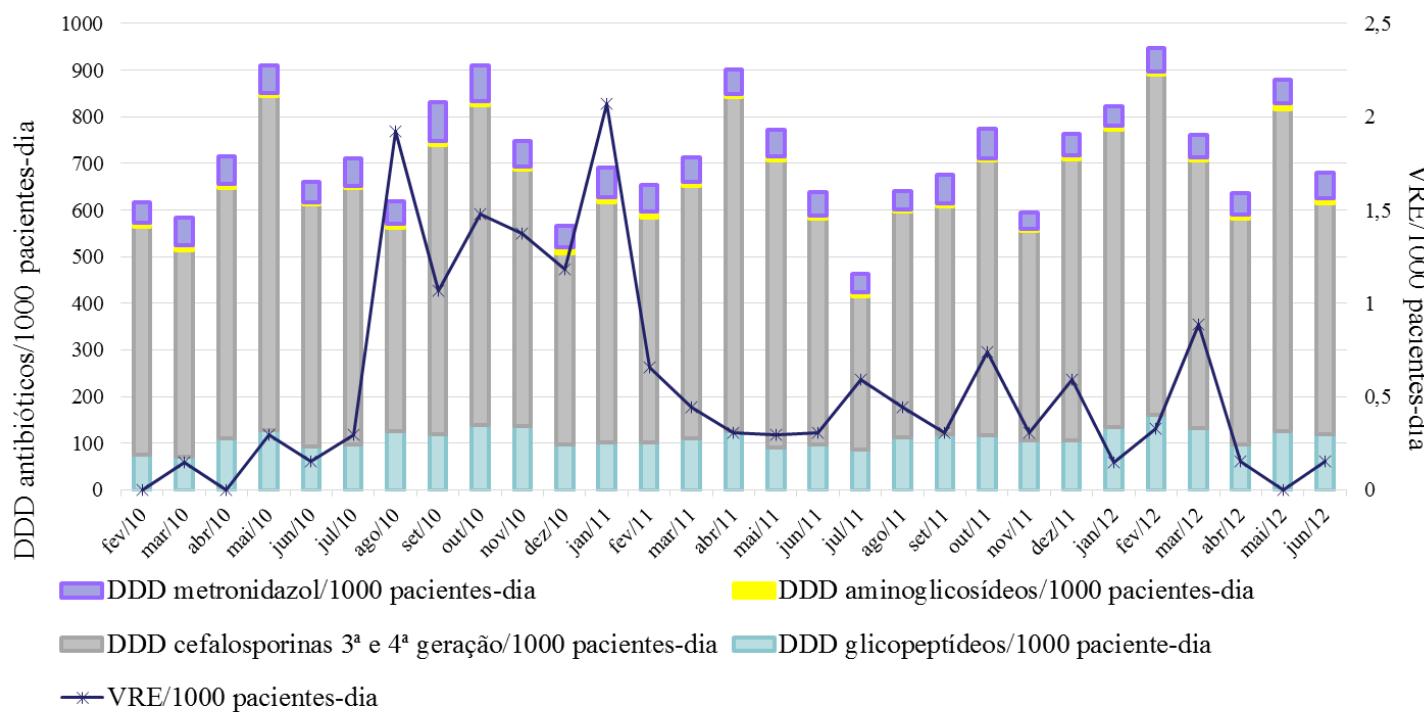


**Figura 6:** Pressão de colonização e densidade de incidência do VRE/1000 pacientes-dia de 2010 a 2012.

**Tabela 8:** Média da somatória do consumo de antibióticos em DDD/1000 pacientes-dia de glicopeptídeos, cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações, aminoglicosídeos e metronidazol no HC-UFU, entre janeiro de 2010 a junho de 2012\*

Antibióticos	2010-2012											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Glicopeptídeos	115.4	112.7	105.4	110.9	114.9	102.9	91.8	119.1	118.9	127.9	122.5	102.0
Cefalosporinas	534.1	566.8	518.9	579.8	673.9	500.6	438.6	460.3	555.0	638.1	498.7	505.6
Aminoglicosídeos	7.9	9.2	9.0	7.9	10.1	7.3	7.4	6.8	7.4	7.1	5.4	10.3
Metronidazol	53.3	50.1	52.8	52.3	54.7	49.5	48.9	44.2	72.0	68.8	44.6	47.2

\* a tabela não inclui os valores correspondentes aos meses de julho de 2012 a dezembro de 2012.



**Figura 7:** Relação entre a dose diária definida dos antimicrobianos por 1000 pacientes-dia e o número de pacientes colonizados/infectados por VRE por 1000 pacientes-dia no HC-UFU no período de estudo.

Somente o DDD de glicopeptídeos foi relacionado com o aumento na incidência de VRE por 1000 pacientes-dia de acordo com a correlação de Spearman ( $rs= 0,717$ ,  $P=0,03$ ), enquanto que utilizando-se a correlação de Pearson, o DDD de aminoglicosídeos/1000 pacientes-dia, cefalosporinas de amplo espectro e metronidazol, não foram relacionados ( $r= 0,408$ ,  $P=0,27$ ;  $r= 0,056$ ,  $P=0,88$  e  $r= 0,240$ ,  $P=0,53$ , respectivamente) a emergência desse fenótipo no hospital.

Os fatores de risco para o desenvolvimento de infecção pelo VRE foram avaliados, considerando estudo caso (22 pacientes infectados pelo VRE) e controles (45 pacientes sem infecção por nenhum micro-organismo), como previamente descrito no desenho do estudo. Os resultados das análises univariada e de regressão logística multivariada são mostrados na tabela 9. Pela análise univariada, os grupos casos e controles diferiram significativamente nos seguintes fatores: presença de dois ou mais procedimentos invasivos ( $P=0,0377$ ), uso de cateter venoso central ( $P=0,0012$ ), sonda nasogástrica ou nasoenteral ( $P=0,0193$ ), uso prévio de glicopeptídeos ( $P=0,0119$ ), carbapenêmicos ( $P=0,0002$ ) e aminoglicosídeos ( $P=0,0004$ ). Na análise multivariada, somente o uso prévio de aminoglicosídeos foi fator de risco independente para aquisição de infecção pelo VRE ( $P=0,0013$ ).

**Tabela 9:** Análise univariada e regressão logística multivariada identificando variáveis associadas com o desenvolvimento de infecção pelo VRE em pacientes colonizados

	Análise univariada		Análise multivariada	
	OR <sup>1</sup> (IC <sup>2</sup> )	P	OR <sup>1</sup> (IC <sup>2</sup> )	P
<b>Idade ≥ 60 anos</b>	1,977	0,1942		
<b>Sexo Masculino</b>	0,963	0,9432		
<b>Internação prévia</b>	1,149	0,0605		
<b>Cirurgia prévia</b>	1,778	0,3076		
<b>Causa Internação</b>				
Clínica	2,860	0,1469		
Cirúrgica	0,543	0,7066		
Trauma	0,259	0,2560		
<b>Co-morbidades</b>				
Diabetes Mellitus	1,026	1,0000		
Nefropatia	2,533	0,1241		
Neoplasia	1,500	0,5024		
<b>Procedimentos Invasivos</b>				
Uso ≥ 2	5,517	0,0377*	17.363	0,6465
Cateter Venoso Central	9,565	0,0012*	32.478	0,2888
Ventilação Mecânica	2,618	0,0679		
Sonda Vesical	2,860	0,1469		
SNG/SNE	3,529	0,0193*	0,4209	0,381
Dreno	2,036	0,2547		
Nutrição Parenteral	11,100	0,1045		
<b>Uso prévio antimicrobianos</b>				
≥ 2	4,541	0,2525		
Cefalosporinas 3 <sup>a</sup> / 4 <sup>a</sup>	5,250	0,1474		
Glicopeptídeos	4,000	0,0119*	0,8475	0,8516
Carbapenêmicos	8,242	0,0002*	12.486	0,8459
Fluorquinolonas	0,484	0,2747		
Aminoglicosídeos	11,670	0,0004*	32.892	0,0013*

SNG: Sonda nasogástrica; SNE: Sonda nasoenterica. \*P significativo < 0,05.

<sup>1</sup> OR – Odds Ratio. <sup>2</sup> IC – Intervalo de Confiança

No total foram identificados 13 pacientes colonizados com VRE<sub>fc</sub> e apenas 1 evoluiu para infecção durante o período de estudo. A maioria (69,2%) dos pacientes colonizados apresentavam idade igual ou superior a 60 anos, do sexo masculino (61,4%), a maioria estava usando cefalosporinas de amplo espectro e glicopeptídeos previamente por período prolongado (uso ≥ 10 dias) e estavam internados por um longo período (média igual a 52,8). A presença do VRE<sub>fc</sub> ficou restrita basicamente a 3 unidades (CM, UTI e CIR), 38,5% evoluiu para o óbito, entretanto a mortalidade foi atribuída na maioria das vezes à infecção de corrente sanguínea por outro micro-organismo (Tabela 10).

**Tabela 10:** Características demográficas e clínicas dos pacientes colonizados e infectados por VRE<sub>fc</sub> no HC-UFG

Pct**	Gênero	Idade	Clínica <sup>2</sup>	Tempo de Internação (dias)	Uso SV <sup>3</sup>	Nefropatia /Diabetes Mellitus	Uso prévio dos antibióticos*:						Infecção <sup>1</sup>			
							TEC	VAN	CEF	CAR	FLU	B+I	AMI	por VRE	outra	Evolução
1	M	60	CIR	22	-	-/-	-	+ (24)	+	-	-	-	-	U	-	Alta
2	F	75	UDT	27	+	-/-	+ (10)	-	+	-	-	-	-	-	-	Alta
3	F	30	CM	67	+	-/-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	Alta
4	M	72	SE	7	+	+/+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Alta
5	F	16	MI	49	-	-/-	-	-	+	+	+	-	-	-	U	Óbito
6	M	74	CIR	111	+	+/-	+ (06)	+ (06)	+	+	-	+	-	-	S+U	Óbito
7	F	75	CM	43	+	-/-	+ (12)	-	+	-	-	-	-	-	S	Alta
8	M	73	CM	63	+	+/-	+ (14)	+ (02)	+	+	-	+	+	-	St	Alta
9	M	26	UTI	81	+	+/-	+ (37)	+ (07)	-	+	+	+	+	-	St	Alta
10	M	89	CIR	37	+	+/-	+ (20)	-	+	-	-	-	-	-	Sf	Alta
11	M	46	UTI	71	+	-/-	-	+ (35)	+	+	-	+	-	-	S	Óbito
12	F	61	UTI	40	+	-/-	-	+ (27)	+	+	+	-	-	-	S	Óbito
13	M	80	CM	68	+	+/+	+ (13)	-	+	+	+	-	+	-	S	Óbito

\*TEC, Teicoplanina; VAN, Vancomicina; CEF, Cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações; FLU, Fluoroquinolonas; B+I, β-lactâmico com inibidor de β-lactamase; AMI, Aminoglicosídeos. Número entre parênteses equivale ao número de dias em uso do antibiótico.

1 Infecção por VRE ou por outros micro-organismos; U, Urina; S, Sangue; St, Secreção traqueal; Sf, Secreção de ferida.

\*\*Paciente

2 CIR, Clínicas Cirúrgicas; UDT, Unidade de Dor Torácica; CM, Clínica Médica; SE, Sala de Emergência; MI, Moléstia Infecciosa; UTI, Unidade de Terapia Intensiva de Adultos;

3 SV, Sonda Vesical.

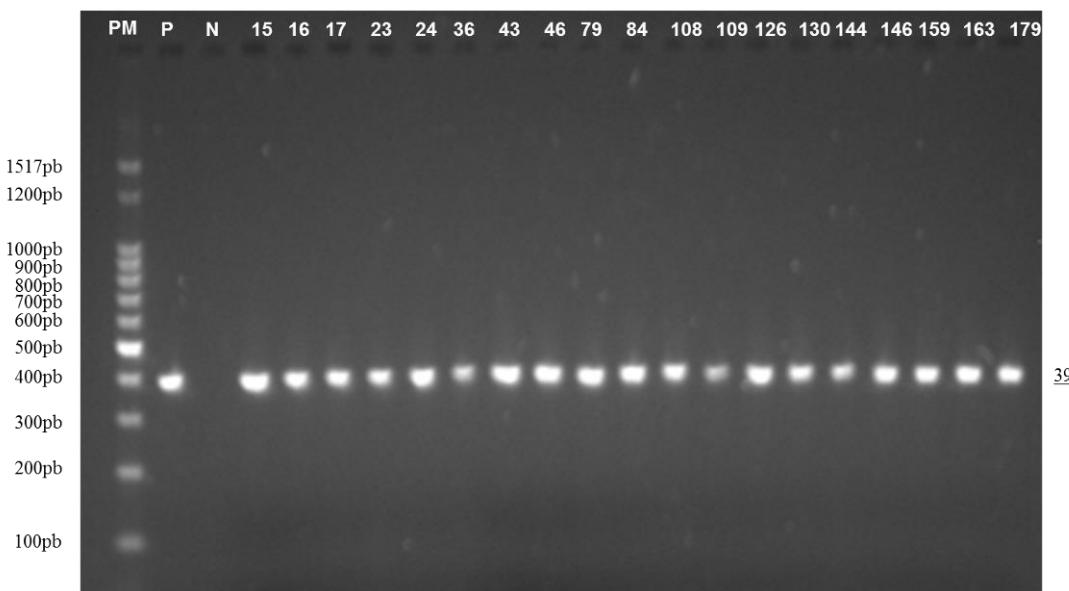
O perfil de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos foi avaliado somente para amostras de infecção por VRE<sub>fm</sub> e colonização por VRE<sub>fc</sub>. Foi observada associação entre as amostras com elevados níveis de resistência à estreptomicina (HLSR) e resistência à penicilina e ampicilina nas amostras de VRE<sub>fm</sub>. Entretanto para as amostras de VRE<sub>fc</sub> o elevado nível de resistência à gentamicina (HLGR) foi mais frequente (77%) associado somente com a resistência à penicilina. Entre as 25 amostras com elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR), 100% foram resistentes à penicilina e 60% resistentes à ampicilina. O fenótipo penicilina resistente e ampicilina sensível só foi observado entre os isolados de VRE<sub>fc</sub> na proporção de 61,5% (Tabela 11; Apêndice II).

**Tabela 11:** Perfil de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos em amostras de infecção por VRE<sub>fm</sub> e colonização por VRE<sub>fc</sub>\*

<b>Amostras</b>	<b>Ampicilina</b>	<b>Penicilina G</b>	<b>Gentamicina</b>	<b>estreptomicina</b>
			<b>HLR</b>	<b>HLR</b>
VRE <sub>fm</sub> (n=17)				
Sensível	0 (0)	0 (0)	16 (94,1)	6 (35,3)
Resistente	17 (100)	17 (100)	1 (5,9)	11 (64,7)
VRE <sub>fc</sub> (n=13)				
Sensível	8 (61,5)	0 (0)	3 (23,1)	10 (76,9)
Resistente	5 (38,5)	13 (100)	10 (76,9)	3 (23,1)

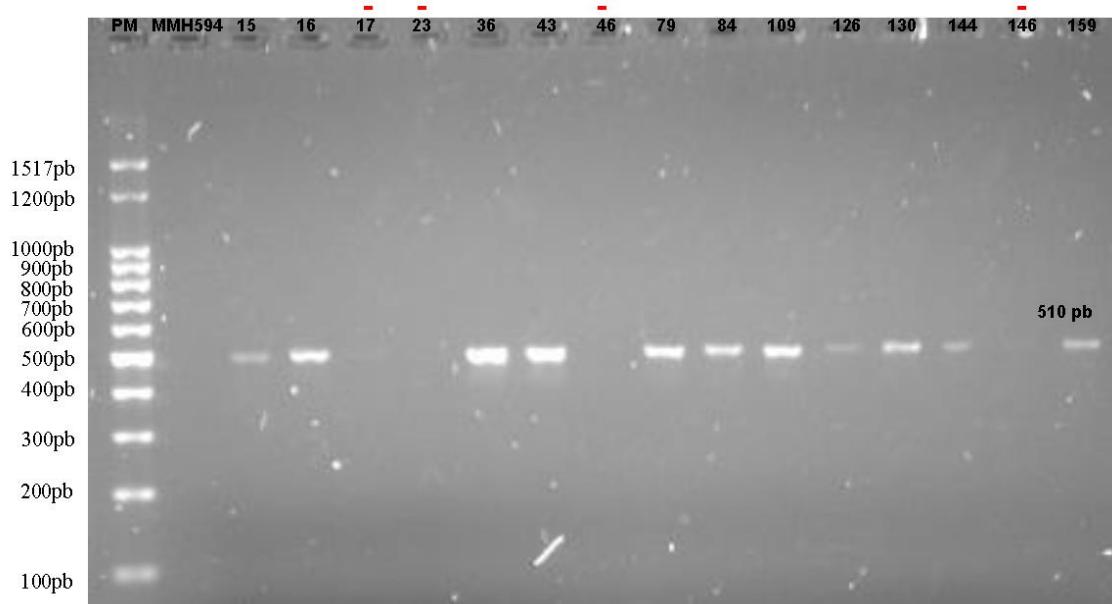
\*amostra de VRE<sub>fc</sub> foi perdida

Todos os isolados de VRE<sub>fm</sub> carreavam o gene *vanA*, demonstrado pelo PCR (Figura 8). Eles foram resistentes à teicoplanina e expressaram elevados níveis de resistência à vancomicina ( $MIC \geq 256 \mu\text{g/ml}$ ). Todos os VRE<sub>fm</sub> isolados de infecção foram resistentes à ampicilina, ciprofloxacina e susceptíveis a tigeciclina.

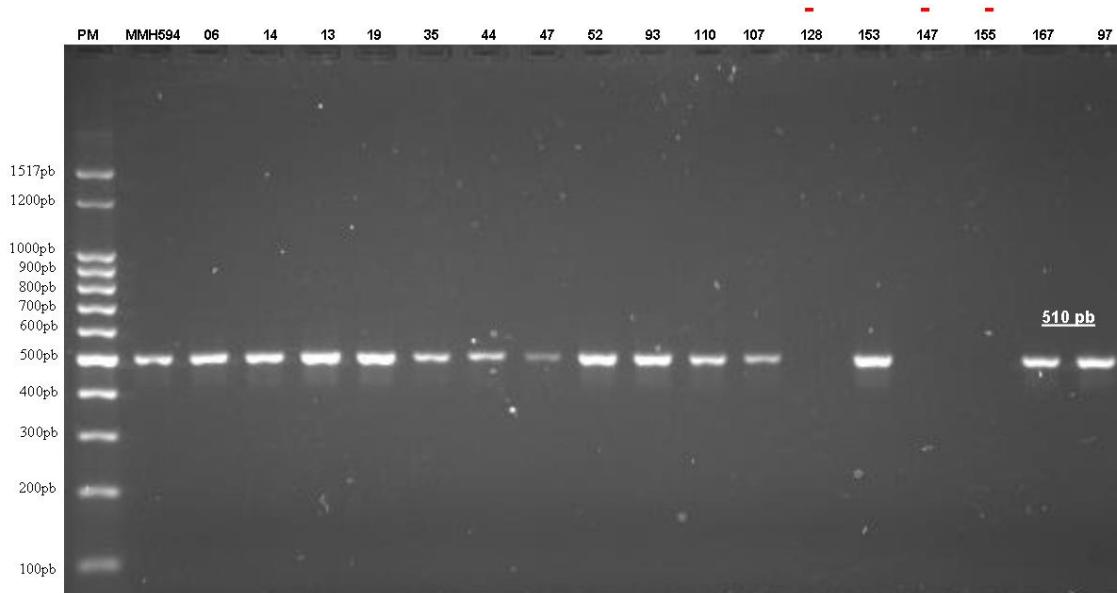


**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *vanA* nas amostras de VRE<sub>fm</sub> recuperadas de pacientes colonizados e infectados (o gel é ilustrativo, indicando apenas parte das amostras testadas). PM: Marcador de peso molecular 100pb; P: Controle positivo *E. faecium* *vanA*; N: Controle Negativo ( $H_2O$ ); 15 a 179: Amostras de infecção por VRE<sub>fm</sub>.

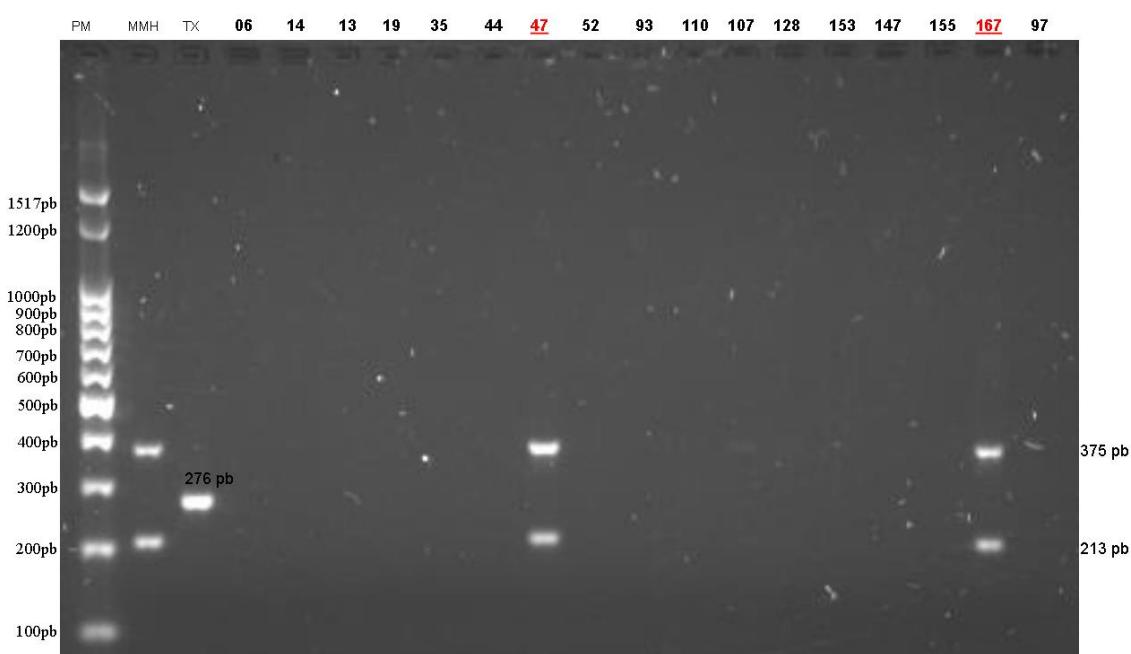
A detecção dos genes de virulência por PCR foi comparada entre 17 isolados de VRE<sub>fm</sub> de infecção e 17 de colonização. O gene *esp* foi encontrado em 82,4% das amostras de colonização e em 76,5% dos isolados clínicos de VRE<sub>fm</sub> (Figuras 9 e 10). Os genes *asa1* e *gelE* foram detectados em 2 (11,8%) amostras e nenhum isolado apresentou o gene *hyl* (Figura 11; Tabela 12).



**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *esp* em amostras de VRE<sub>fm</sub> recuperadas de pacientes infectados. PM: Marcador de peso molecular 100pb; MMH594: Controle positivo; 15 a 159: Amostras de infecção por VRE<sub>fm</sub>.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *esp* em amostras de VRE<sub>fm</sub> recuperadas de pacientes colonizados.  
PM: Marcador de peso molecular 100pb; MMH594: Controle positivo; 08 a 97: Amostras de colonização por VRE<sub>fm</sub>.



**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes *asal*, *gelE* e *hyl*.  
PM: Marcador de peso molecular 100pb; MMH594 e TX0016: Controles positivos;  
06 a 97: Amostras de colonização por VRE<sub>fm</sub>.

**Tabela 12:** Características e genes de virulência e resistência de amostras de VRE<sub>fm</sub> recuperadas de diferentes sítios de pacientes internados no HC-UFG

Amostra	Sítio de isolamento	Data	Genes de virulência <sup>1</sup>				Gene de resistência
<b>Colonização</b>							
6	Suabe retal	06/08/2010	<i>esp</i>	-	-	-	<i>van A</i>
14	Suabe retal	27/08/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
13 <sup>a</sup>	Suabe retal	27/08/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
19 <sup>b</sup>	Suabe retal	10/09/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
35 <sup>c</sup>	Suabe retal	29/10/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
44	Suabe retal	26/11/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
47	Suabe retal	29/12/2010	+	+	+	-	<i>van A</i>
52 <sup>d</sup>	Suabe retal	07/01/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
93	Suabe retal	29/04/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
97	Suabe retal	16/07/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
110	Suabe retal	22/07/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
107 <sup>e</sup>	Suabe retal	27/05/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
128	Suabe retal	23/09/2011	-	-	-	-	<i>van A</i>
153 <sup>f</sup>	Suabe retal	01/12/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
147	Suabe retal	13/01/2012	-	-	-	-	<i>van A</i>
155 <sup>g</sup>	Suabe retal	24/02/2012	-	-	-	-	<i>van A</i>
167	Suabe retal	09/03/2012	+	+	+	-	<i>van A</i>

<sup>1</sup> Símbolos representam: +, presença do gene de virulência; -, ausência do gene de virulência.

Letras iguais entre amostras de colonização e infecção indicam que foram isoladas do mesmo paciente.

**Tabela 12:** Características e genes de virulência e resistência de amostras de VRE<sub>fm</sub> recuperadas de diferentes sítios de pacientes internados no HC-UFG

Amostra	Sítio de isolamento	Data	Genes de virulência <sup>1</sup>				Gene de resistência
<b>Infecção</b>							
15	Urina	17/06/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
16	Urina	06/08/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
17 <sup>a</sup>	Urina	10/09/2010	-	-	-	-	<i>van A</i>
23 <sup>b</sup>	Urina	19/09/2010	-	-	-	-	<i>van A</i>
36 <sup>c</sup>	Sangue	03/11/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
43	Urina	06/12/2010	+	-	-	-	<i>van A</i>
46	Sangue	03/12/2010	-	-	-	-	<i>van A</i>
79 <sup>d</sup>	Urina	01/03/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
84	Urina	04/04/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
109 <sup>e</sup>	Urina	09/07/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
126	Urina	05/09/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
130	Urina	07/10/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
144 <sup>f</sup>	Urina	05/12/2011	+	-	-	-	<i>van A</i>
146	Urina	26/12/2011	-	-	-	-	<i>van A</i>
159 <sup>g</sup>	Urina	01/03/2012	+	-	-	-	<i>van A</i>
163	Urina	12/03/2012	+	-	-	-	<i>van A</i>
179	Urina	02/04/2012	+	-	-	-	<i>van A</i>

<sup>1</sup> Símbolos representam: +, presença do gene de virulência; -, ausência do gene de virulência.

Letras iguais entre amostras de colonização e infecção indicam que foram isoladas do mesmo paciente.

## 6 DISCUSSÃO

Globalmente, VRE continua sendo causa importante de infecção relacionada à assistência à saúde, e neste estudo, foi avaliada a ocorrência de VRE nosocomial em uma instituição e constatado aumento no número de casos observados entre 2010 e 2012, sugerindo que esse micro-organismo está em emergência, como causa significativa de infecção e colonização no ambiente deste hospital. Na literatura, os dados de vigilância demonstraram taxas de incidência de VRE na Europa de 2 a 14,3%, dependendo do genótipo de resistência e com aumento de  $VRE_{fm}$  nos Estados Unidos de 28,9% em 1993 para 72,4% em 2002 (SCHOUTEN et al., 2000; TREITMAN, et al.; 2005).

No HC-UFU, até 2009, houve predominância de casos esporádicos de *E. faecalis* resistente à vancomicina, mas em 2010, *E. faecium* resistente à vancomicina foi responsável por um surto e continuou como a principal causa da colonização e infecção por enterococos entre os pacientes hospitalizados. De acordo com dados do programa SENTRY (SADER et al., 2009), a porcentagem de VRE no Brasil aumentou de 6,9% em 2003, para 31,1%, em 2008, sendo a maioria (68,5%) dos isolados da espécie *E. faecium*. As taxas foram muito maiores no nosso hospital do que aquelas observadas em outros hospitais de países latino-americanos, como relatou Panesso et al. (2010) durante o período de 2006-2008, em 32 hospitais na Colômbia, Peru, Equador e Venezuela, evidenciando taxa média total de 6%.

Variações nas taxas de incidência de infecções em ambientes hospitalares são comuns durante a vigilância epidemiológica (ARANTES et al., 2003). No presente estudo, a taxa de  $VRE_{fm}$  de agosto de 2010 a janeiro de 2011 ultrapassou o limite de controle, estabelecida em  $3\sigma$  acima da incidência média desses casos, caracterizando um surto e, provavelmente, foi influenciada por fatores como o alto uso de antimicrobianos.

A literatura evidencia o papel do *Enterococcus* sp. como patógeno urinário, em alguns casos sendo considerado como a etiologia mais comum (LEWIS; ZERVOS, 1990; LAUPLAND et al., 2002). Verificamos que a principal fonte de isolamento do VRE no nosso estudo foi a urina (72,8%), seguido de hemocultura (18,2%), dados semelhantes ao estudo realizado por Warren et al. (2004), em que foi observado 4,8% de isolamento de VRE na urina e 6,5% em sangue. De acordo com o programa SENTRY (DESHPANDE et al., 2007), que analisou amostras dos Estados Unidos e Europa, 36,7% de VRE foram isolados a partir do trato urinário, seguido de 28% na corrente sanguínea. A maioria das IrAS são associadas a

procedimentos invasivos (JARVIS, 1996), e na nossa casuística, 86% dos pacientes com infecção de urina estavam em uso de sonda vesical.

A terapia com agentes antimicrobianos pode contribuir para o aumento da colonização e infecção por VRE e vários estudos concluíram que o consumo de tais agentes são fortes indicadores para aquisição desse micro-organismo (PAN et al., 2012; SOHN et al., 2013). Além disso, cerca de 40,0% dos pacientes hospitalizados recebem antimicrobianos e em aproximadamente 50,0% dos casos o seu uso é desnecessário (MANDELL; BENNETT; DOLIN, 2005). A avaliação do consumo de antibióticos no hospital é usualmente recomendada por órgãos como a Organização Mundial de Saúde e NHSN avaliando-se a Dose Diária Definida, o que permite comparar as taxas de micro-organismos e seus fenótipos de resistência aos antibióticos, favorecendo o estabelecimento de relações úteis entre eles (CURTIS; MARRIOTT; LANGLEY, 2004). Verificamos na nossa investigação que o consumo de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações predominou entre as classes de antibióticos prescritas no hospital, mas sem relação significativa com a incidência de infecções por VRE. O consumo de carbapenêmicos também foi elevado, mas apenas o uso excessivo de glicopeptídeos (DDD=111,68), refletiu a alta frequência de pacientes com VRE<sub>fm</sub> em nosso hospital. De modo geral, as DDDs de antibióticos foram bem mais altas quando comparadas com as de outros países, principalmente em relação ao uso de cefalosporinas (MEYER et al., 2003). Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram a relação entre o consumo de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações com o aumento na incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica, tanto por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à imipenem, quanto por *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina no HC-UFG (MOREIRA et al., 2009).

A utilização de vancomicina e aminoglicosídeos foram identificadas como fatores de risco para colonização e infecção por VRE, sugerindo que a pressão do antibiótico desempenha um papel decisivo, alterando o nicho ecológico nos pacientes e desempenhando uma vantagem na seleção do VRE<sub>fm</sub> (FURTADO et al., 2006; SAKKA et al., 2008).

No caso do surto que iniciou em agosto de 2010 vale ressaltar que a grande maioria das amostras foram recuperadas a partir de suave retal. Entretanto o aumento na ocorrência de infecção e colonização por VRE continuam sendo motivos de preocupação no ambiente hospitalar, considerando as poucas opções disponíveis para o tratamento e como observado nesse estudo, os pacientes infectados pelo VRE geralmente foram de alto risco, o que poderia justificar as altas taxas de mortalidade (50%) encontradas nesse grupo.

Outros estudos têm identificado como fatores de risco para colonização e infecção por VRE: doenças de base como diabetes mellitus e nefropatia, além do uso de diálise, imunossupressão, pressão de colonização, além do uso prévio de antibióticos (PUZNIAK et al.; 2002; BATISTÃO et al., 2012; SOHN et al., 2013). Encontramos muitos desses fatores pela análise univariada, mas apenas o uso prévio de aminoglicosídeos foi considerado fator de risco independente para a aquisição de infecção por VRE. De acordo com outras publicações, o tempo de hospitalização prévio geralmente é relacionado com a aquisição de colonização por VRE<sub>fm</sub> nosocomial e consequente desenvolvimento de infecção por este micro-organismo (ZIRAKZADEH; PATEL, 2006; MCGREGOR et al., 2012). Na nossa casuística foi possível evidenciar que todos os pacientes colonizados ficaram internados previamente por um tempo médio de 37 dias.

A pressão de colonização foi proposta em muitos estudos como um indicador para a aquisição de bactérias multirresistentes, como o *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), VRE e *Clostridium difficile* (BONTEN et al., 1998; PUZNIAK et al., 2002; MULLER et al., 2006; DUBBERKE et al., 2007). Nossos resultados destacam que a transmissão cruzada é reforçada em períodos de alta e persistente concentração de pacientes portadores VRE. Durante o período de estudo, a transmissão cruzada provavelmente ocorreu devido a falhas nas medidas de controle de infecção (BORGES; KATAGUIRI; GONTIJO-FILHO, 2006; BORGES, 2009), como mostrou a relação espaço-temporal com a caracterização de *clusters* particularmente na UTI-A, e também pode estar associada com altos níveis de pressão de colonização (ROCHA, 2012).

Nesse estudo, entre as amostras testadas para resistência à β-lactâmicos, somente 26% (8/30) foram sensíveis a ampicilina. Esse é um resultado preocupante, considerando que a ampicilina é antibiótico de escolha para tratar infecção urinária por enterococos sensíveis a esse antimicrobiano, e também para VRE (HEINTZ; HALILOVIC; CHRISTENSEN, 2010). Estudos semelhantes tem demonstrado frequências elevadas de resistência à β-lactâmicos entre as amostras de enterococos, como na casuística de Sadowy et al. (2013), em que a resistência à ampicilina em amostras de VRE<sub>fm</sub> foi de 100%, enquanto o trabalho de Hayakawa et al. (2013) mostrou em amostras de VRE<sub>fc</sub> uma taxa de 5,8% de resistência. Alguns autores relatam que os *E. faecium* são de 4 até 16 vezes mais resistentes aos β-lactâmicos do que *E. faecalis* (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; SHEPARD; GILMORE, 2002), no nosso estudo o VRE<sub>fm</sub> foi 3 vezes mais resistente a esses antimicrobianos do que VRE<sub>fc</sub>.

Como mencionado anteriormente, a resistência à ampicilina pode ser mediada por  $\beta$ -lactamases, não detectadas rotineiramente por técnicas de disco-difusão, contribuindo para que a ocorrência desse mecanismo seja subestimado. Aqui não foi realizada a pesquisa de  $\beta$ -lactamase, considerando que a maioria das amostras foram de urina e de colonização e a pesquisa de resistência para esse mecanismo geralmente é avaliada em casos graves, em que o enterococo é isolado de sangue ou líquor (WELLS et al., 1992).

Observamos através do método de disco-difusão, 36,7% e 46,7% de HLR a gentamicina e estreptomicina, respectivamente, sendo que apenas 6,7% foram resistentes concomitantemente a estes dois antimicrobianos, situação observada apenas para amostras de VRE<sub>fc</sub>. Como mencionado na introdução, é importante realizar o teste de sensibilidade para esses antimicrobianos considerando diferenças nos mecanismos de resistência para gentamicina e estreptomicina (COURVALIN; CARLIER; COLLATZ, 1980) e como HLR para gentamicina geralmente é devido a produção de enzimas inativadoras, confere resistência a outros aminoglicosídeos exceto estreptomicina. Um dado interessante foi que 100% dos isolados com HLAR foram concomitantemente resistentes a penicilina e 73,3% a ampicilina. Estudos recentes (MENDIRATTA et al., 2008; VINODKUMAR et al., 2011) demonstram prevalência de HLAR semelhantes ao nosso, com tendência crescente da resistência a esses antimicrobianos nos últimos anos. Além da capacidade de disseminação de genes, a pressão seletiva do uso desses antibióticos no ambiente hospitalar, constatado nessa pesquisa, pode influenciar a maior frequência de resistência nessas amostras.

A detecção dos genes de virulência, como *esp*, *asa1* e *gelE* em algumas das nossas cepas clínicas bem como na maioria das amostras de colonização, mostra claramente a maior frequência destes genes em *E. faecium*, particularmente o gene *esp*, como tem sido anteriormente reportado (CAMARGO et al., 2008; RUZON et al., 2010).

No presente estudo, encontramos o gene *esp* na maioria das amostras de VRE<sub>fm</sub> testadas, no entanto, algumas cepas apresentaram os genes *asa1* e *gelE*, mesmo a literatura mostrando resultados divergentes quanto a frequência de detecção do gene *gelE* em *E. faecium* (VANKERCKHOVEN et al., 2004; RUZON et al., 2010). A presença da proteína de superfície enterocócica (Esp) e de substância de agregação (Asa) podem estar relacionadas com a facilitação da conjugação entre as cepas, com isso tornando a célula mais propensa a adquirir genes de resistência aos antimicrobianos. Além disso, a proteína Esp promove adesão da bactéria às células do trato urinário (SHANKAR et al., 2001), e na nossa casuística 71% das amostras foram isoladas do trato urinário e possuíam o gene *esp*. O gene *hyl* não foi encontrado em nenhuma das amostras testadas, corroborando com a literatura, resultando em

perfis de virulência semelhantes entre as amostras. Portanto o estudo da virulência entre as amostras de VRE<sub>fm</sub> isoladas de pacientes colonizados e infectados apresentam perfis de fatores de virulência semelhantes, sugerindo com isso que os pacientes podem ter sido infectados por bactérias da sua própria microbiota intestinal.

Vários tipos de intervenções tem sido propostas na tentativa de controlar micro-organismos resistentes e multirresistentes como VRE, incluindo culturas de vigilância, isolamento de pacientes portadores de VRE, incentivo e melhora na higienização das mãos, assim como na limpeza e desinfecção do ambiente e campanhas educativas. Embora a adoção dessas medidas no nosso hospital não tenha conseguido reverter o aumento da incidência de VRE, talvez devido a baixa adesão de medidas de controle (BORGES; KATAGUIRI; GONTIJO-FILHO, 2006; BORGES, 2009), as tentativas tiveram sucesso no controle do surto, com uma diminuição das taxas para níveis endêmicos.

O trabalho teve êxito na busca ativa por pacientes colonizados pelo VRE, uma vez que a participação dos profissionais de saúde do hospital nessa triagem foi fundamental, permitindo demonstrar a importância da colonização como fonte para disseminação desse micro-organismo. A avaliação epidemiológica realizada ao longo dos 2 anos e meio foi reportada à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HC-UFU como *feedback* do trabalho que estava sendo realizado, além de comunicações em congressos e simpósios brasileiros e internacionais. Seria interessante continuar realizando estudos de vigilância de VRE no hospital para avaliar a prevalência de genótipos e clones predominantes, bem como o perfil de virulência, com o objetivo de detectar possíveis alterações epidemiológicas.

Estudos que combinam vigilância epidemiológica com análise molecular têm elucidado muitos aspectos relacionados à epidemiologia do VRE nos hospitais, como a caracterização de surtos causados por um único clone ou situações de endemicidade causadas por vários clones (BOYCE et al., 1994; DONSKEY et al., 1999). A análise clonal das amostras de VRE do HC-UFU foi parcialmente realizada até o momento, entretanto por dificuldades operacionais os resultados estão sendo reavaliados para que possamos obter dados mais completos.

## 7 CONCLUSÃO

Com este estudo pôde-se concluir que:

- O surto foi caracterizado epidemiologicamente através da análise da curva endêmica, causado exclusivamente pelo VRE<sub>fm</sub>, com incidências elevadas no hospital.
- Os nossos resultados revelam uma densidade de uso de antibióticos, particularmente de cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos, muito alta, entretanto, somente o DDD de glicopeptídeos foi relacionado com o aumento na incidência de VRE/1000 pacientes-dia, sugerindo a necessidade de uma revisão na política de uso de antimicrobianos no nosso hospital.
- Pela análise multivariada somente o uso prévio de aminoglicosídeos foi considerado fator de risco independente para desenvolvimento de infecção pelo VRE; e embora a pressão de colonização não tenha sido relacionada estatisticamente com o desenvolvimento de infecção pelo VRE, nosso estudo sugere que a pressão de colonização deve ser avaliada e usada como indicador de qualidade no controle de infecção no ambiente hospitalar.
- Todas as amostras apresentavam MIC elevado para vancomicina e foram caracterizadas através do PCR contendo o gene *vanA*. A maioria das amostras de VRE<sub>fm</sub> isoladas durante o surto apresentavam o gene de virulência *esp*, confirmando perfis de fatores de virulência semelhantes entre as amostras recuperadas de pacientes colonizados e infectados.
- Foi observada relação temporal e espacial entre os pacientes infectados pelo VRE com a evidência de *clusters* na CM e UTI-A, provavelmente associada com a transmissão cruzada do micro-organismo nessas unidades.
- Foi observada associação entre as amostras com HLR à estreptomicina e resistência à penicilina e ampicilina nas amostras de VRE<sub>fm</sub>, enquanto as amostras de VRE<sub>fc</sub> o elevado nível de resistência à gentamicina foi mais frequente, associado somente com a resistência à penicilina. O fenótipo penicilina resistente e ampicilina sensível só foi observado entre os isolados de VRE<sub>fc</sub>.
- Não foi possível concluir dados sobre a relação clonal entre as cepas até o momento, e estudos adicionais devem ser realizados para elucidação da participação de clones predominantes de VRE no nosso hospital.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANTES, A. et al. Use of statistical process control charts in the epidemiological surveillance of nosocomial infections. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 768-74, 2003.
- ARVANITI, K. et al. The importance of colonization pressure in multiresistant *Acinetobacter baumannii* acquisition in a Greek intensive care unit. **Critical care**, v. 16, n. 3, p. R102, 2012.
- BATISTÃO, D. W. et al. Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 57-63, 2012.
- BOISIVON, A.; THIBAULT, M. e LECLERCQ, R. Colonization by vancomycin-resistant enterococci of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 3, n. 2, p. 175-179, 1997.
- BONTEN, M. J. et al. The role of “colonization pressure” in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. **Archives of Internal Medicine**, v. 158, n. 10, p. 1127-32, 1998.
- BONTEN, M. J.; WILLEMS, R. e WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 5, p. 314–325, 2001.
- BORGES, L. F. A.; KATAGUIRI, L. e GONTIJO-FILHO, P.P. Contaminação nas mãos de profissionais de saúde em diferentes unidades de um hospital universitário brasileiro. **Nursing**, v. 100, p. 1000-1003, 2006.
- BORGES, L. F. A. **Higiene das mãos de profissionais de saúde em um hospital brasileiro: adesão, controle de infecção e transmissão de *Staphylococcus aureus*** [tese]. Uberlândia: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. 2009. 67 p.
- BOYCE, J. M. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1148-53, 1994.
- BOYD, D. A. et al. VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.6, p. 2217–22, 2006.
- BOYD, D. A. et al. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.7, p. 2667–2672, 2008.

BOYD, D. et al. Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.6, 2000.

BRAAK, N. et al. Prevalence and determinants of fecal colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus* in hospitalized patients in The Netherlands. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 8, p. 520-4, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Investigação e Controle de Bactérias Multirresistentes**. Brasília, 2007. Disponível em: <[http://portalses.saude.sc.gov.br/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=4110&Itemid=86](http://portalses.saude.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=4110&Itemid=86)> Acesso em: 02 de maio de 2013.

BRYANT, S e WILBECK, J. Vancomycin-resistant *Enterococcus* in critical care areas. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v.19, n.1, p. 69-75, 2007.

CAMARGO, I. et al. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 273-278, 2008.

CAMPANILE, F. et al. Molecular Alterations of VanA Element in Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated During a Survey of Colonized Patients in an Italian Intensive Care Unit. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 2, 2003.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 731-742, 2013.

CETINKAYA, Y.; FALK, P. e MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, 2000.

CHAMBERS, H. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 178-182, 2001.

CHANG, S. et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1342-1347, 2003.

CLEVEL, D. B. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases**, v. 9, n. 2, p. 90-102, 1990.

CLEWELL, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. **Cell**, v. 73, n. 1, p. 9-12, 1993.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23, 2013.

CONCEIÇÃO, N. et al. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Uberaba, Minas Gerais state. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 34-36, 2010.

COSTA, L. M. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 160-163, 1998.

COSTA, L. M. et al. Characterization of a divergent vanD-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, 2000.

COURVALIN, P.; CARLIER, C. e COLLATZ, E. Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. **Journal of Bacteriology**, v. 143, n. 2, p. 541-551, 1980.

CURTIS, C.; MARRIOTT, J. e LANGLEY, C. Development of a prescribing indicator for objective quantification of antibiotic usage in secondary care. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 529-33, 2004.

DONSKEY, C. J. et al. A polyclonal outbreak of predominantly VanB vancomycin-resistant enterococci in northeast Ohio. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. 573-9, 1999.

DUBBERKE, E. R. et al. Evaluation of *Clostridium difficile*-associated disease pressure as a risk factor for *C. difficile*-associated disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, n. 10, p. 1092-7, 2007.

DURMAZ, R. et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, n. 5, p. 372-7, 2009.

DUTKA-MALEN, S.; EVERE, S. e COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.

FINES, M. et al. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, 1999.

FONTANA, R. et al. Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 9, p. 1980-3, 1994.

FREITAS, M. C. S. et al. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* fecal colonization among kidney transplant patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 133, 2006.

FURTADO, G. H. C. et al. Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 9, n. 1, p. 64-9, 2005.

FURTADO, G. H. C. et al. Risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteremia in hospitalized patients: an analysis of two case-control studies. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 7, p. 447-51, 2006.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 90-8, 2009.

GILMORE, M. S. et al. **Enterococcal virulence**. The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance. Washington: ed ASM Press, 2002. p. 301-354.

GOLDRICK, B. A. Emerging Infections: MRSA, VRE E VRSA. How do we control them in nursing homes? **America Journal of Nursing**, v. 104, n. 8, p. 50-51, 2004.

GONTIJO-FILHO, P.P. Problemas da vigilância epidemiológica de infecções hospitalares sem o uso de critérios microbiológicos no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, p. 97-102, 2006.

GORDTS, B. et al. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2842-6, 1995.

HAYAKAWA, K. et al. Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: a case-case-control study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 49-55, 2013.

HEINTZ, B. H.; HALILOVIC, J. e CHRISTENSEN, C. L. Vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 11, p. 1136-1149, 2010.

JARVIS, W. R. The Epidemiology of Colonization. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 17, n. 1, p. 47-52, 1996.

LAUPLAND, K. B. et al. Incidence and risk factors for acquiring nosocomial urinary tract infection in the critically ill. **Journal of Critical Care**, v. 17, n. 1, p. 50-7, 2002.

LEBRETON, F. et al. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4606-12, 2011.

LEWIS, C. M. e ZERVOS, M. J. Clinical manifestations of enterococcal infection. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 111-7, 1990.

LITTVIK, M. et al. Colonization with vancomycin-resistant enterococci (VRE) in intensive care unit patients in Cordoba City, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 38, n. 1, p. 28-30, 2006.

LU, J. J. et al. High prevalence of VanB<sub>2</sub> vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, 2001.

MAHONY, A. A. et al. Emergence of vanB *Enterococcus gallinarum* colonization in association with glycopeptide therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.6, p. 2319-2320, 2010.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E. e DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6<sup>a</sup> ed. Elsevier Churchill Livingstone, v. 1, cap. 43, 2005.

MCGOWAN, J. E. Is antimicrobial resistance in hospital microorganisms related to antibiotic use? **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 63, n. 3, p. 253-68, 1987.

MCGREGOR, J. C. et al. Risk factors associated with linezolid-nonsusceptible enterococcal infections. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 9, p. 886-7, 2012.

MCKESSAR, S. J. et al. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 11, p. 3224-3228, 2000.

MENDIRATTA, D. K. et al. Status of high level aminoglycoside resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in a rural hospital of central India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 369-71, 2008.

MEYER, E. et al. Design of a surveillance system of antibiotic use and bacterial resistance in German intensive care units (SARI). **Infection**, v. 31, n. 4, p. 208-15, 2003.

MOELLERING, R. C. Emergence of *Enterococcus* as a Significant Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 1173-1176, 1992.

MORALES, G. et al. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Populations Analyzed by Single Nucleotide Polymorphism and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Genotyping. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 13, p. 4228-4237, 2004.

MOREIRA, M. R. et al. Consumo de antibióticos e etiologia de pneumonia associada à ventilação em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas

da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 11, n. 1, p. 11-16, 2009.

MULLER, A. et al. Effect of individual- and group-level antibiotic exposure on MRSA isolation: a multilevel analysis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 878-81, 2006.

MURRAY, B. Beta-lactamase-producing enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 11, p. 2355-2359, 1992.

MUTNICK, A. H. et al. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.46, n.1, p. 63-68, 2003.

NALLAPAREDDY, S. R.; WEINSTOCK, G. M. e MURRAY, B. E. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1733–1747, 2003.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **American Journal of Infection Control**, v. 32, p. 470-485, 2004.

NEVES, F. P. et al. Emergence of the *vanA* genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonising the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, n.3, p. 211-215, 2009.

OLIVEIRA, A. C e BETTCHER, L. Aspectos epidemiológicos da ocorrência do *Enterococcus* resistente a vancomicina. **Revista da Escola de Enfermagem - USP**, v. 44, n. 3, p. 725-731, 2010.

OSTROWSKY, B. E. et al. A *cluster* of VanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: molecular characterization and clinical epidemiology. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1177, 1185, 1999.

PAN, S. C. et al. Incidence of and risk factors for infection or colonization of vancomycin-resistant enterococci in patients in the intensive care unit. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47297, 2012.

PANESSO, D. et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1562-9, 2010.

PRADE, S. S. et al. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Revista do Controle de Infecção Hospitalar**, v. 2, n. 2, p. 11-24, 1995.

PUZNIAK, L. A. et al. To gown or not to gown: the effect on acquisition of vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 1, p. 18-25, 2002.

RIBAS, R. M. et al. Vancomycin-resistant VanA phenotype *Enterococcus faecalis*: first case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 439-40, 2007.

RICE, L. B. et al. A potential virulence gene, hyl<sub>Efm</sub>, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 3, p. 508-12, 2003.

ROCHA, L. A. Importância do ambiente (ar e superfície) e das mãos de profissionais de saúde na epidemiologia de pneumonia associada à ventilação mecânica por *Staphylococcus aureus* em unidade de terapia intensiva de adultos [tese]. Uberlândia: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. 2012. 79 p.

RODRIGUES, E. e RICHTMANN, R. IrAS: **Infecção relacionada à assistência à saúde-Orientações Práticas**. São Paulo: Sarvier, 2008.

RUZON, F. I. et al. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 814-21, 2010.

SADER, H. S. et al. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

SADER, H. S.; MOET, G. J. e JONES, R. N. Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin American hospitals. **Journal of Chemotherapy**, v. 21, n. 6, p. 611-20, 2009.

SADOWY, E. et al. High abundance and diversity of antimicrobial resistance determinants among early vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2013.

SAKKA, V. et al. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 14-21, 2008.

SANTOS, E. F. et al. Use of antibacterial agents in an intensive care unit in a hospital in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 355-9, 2007.

SHANKAR, N. et al. Role of *Enterococcus faecalis* Surface Protein Esp in the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4366-4372, 2001.

SHEPARD, B. D. e GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 4, n. 2, p. 215-24, 2002.

SCHOUTEN, M. A. et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, p. 816-822, 2000.

SOHN, K. M. et al. Duration of colonization and risk factors for prolonged carriage of vancomycin-resistant enterococci after discharge from the hospital. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e240-6, 2013.

STRANDÉN, A.; FREI, R. e WIDMER, A. F. Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Can PCR Replace Pulsed-Field Gel Electrophoresis? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3181,3186, 2003.

TACCONELLI, E. e CATALDO, M.A. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, n.2, 2007.

TENG, F. et al. An *Enterococcus faecium* secreted antigen, SagA, exhibits broad-spectrum binding to extracellular matrix proteins and appears essential for *E. faecium* growth. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5033–5041, 2003.

THURLOW, L. R. et al. Gelatinase Contributes to the Pathogenesis of Endocarditis Caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4936-4943, 2010.

TREITMAN, A. N. et al. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 462-3, 2005.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4473-9, 2004.

VINODKUMAR, C. S. et al. Isolation of bacteriophages to multi-drug resistant Enterococci obtained from diabetic foot: a novel antimicrobial agent waiting in the shelf? **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 90-5, 2011.

- WARREN, D. K. et al. Occurrence of co-colonization or co-infection with vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 2, p. 99-104, 2004.
- WELLS, D. V. et al. Infections Due to Beta-Lactamase-producing, High-Level Gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Annals of Internal Medicine**, v. 116, n. 4, p. 285-292, 1992.
- WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveillance**, v.13, n. 47, p. 1-23, 2008.
- WHO. Collaborating Center for Drug statistics methodology. Anatomical Therapeutical Chemical (ATC), **Classification index with Defined Daily Doses (DDD)**, Oslo, Norway; 2000.
- WILLEMS, R. J. et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet**, v. 357, n. 9259, p. 853–5, 2001.
- WILLEMS, R. J. et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 821–828, 2005.
- WOODFORD, N. et al. Application of DNA probes for rRNA and *vanA* genes to investigation of a nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 653-8, 1993.
- WOODFORD, N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 849-862, 1998.
- WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v.59, 2009.
- XU, X. et al. vanM, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4643-4647, 2010.
- ZANELLA, R. C. et al. Análise molecular de *Enterococcus* e seus elementos VanA que mediam resistência à vancomicina, isolados na Casa de Saúde Santa Marcelina-SP, em 1998. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 159-162, 1999.
- ZANELLA, R. C. et al. **Caracterização Fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. resistentes aos glicopeptídeos isolados durante o primeiro surto hospitalar no Brasil.** [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. 2001. 140p.

ZIRAKZADEH, A. e PATEL, R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n. 4, p. 529-36, 2006.

ZSCHECK, K. K. e MURRAY, B. E. Nucleotide sequence of the beta-lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal beta-lactamase genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 9, p. 1736-40, 1991.

## ANEXO I

Table 2D. (Continued)

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria ( $\mu\text{g/mL}$ )			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS A	Penicillin Ampicillin	10 units 10 $\mu\text{g}$	≥ 15 ≥ 17	— —	≤ 14 ≤ 16	≤ 8 ≤ 8	— —	≥ 16 ≥ 16	(5) Ampicillin is the class representative for ampicillin and amoxicillin. Ampicillin results may be used to predict susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-subactam, piperacillin, and piperacillin-tazobactam among non- $\beta$ -lactamase-producing enterococci. Ampicillin susceptibility can be used to predict imipenem susceptibility, providing the species is confirmed to be <i>E. faecalis</i> .  (6) Enterococci susceptible to penicillin are predictably susceptible to ampicillin, amoxicillin, ampicillin-subactam, amoxicillin-clavulanic, piperacillin, and piperacillin-tazobactam for non- $\beta$ -lactamase-producing enterococci. However, enterococci susceptible to ampicillin cannot be assumed to be susceptible to penicillin. If penicillin results are needed, testing of penicillin is required.  (7) Rx: Combination therapy with ampicillin, penicillin, or vancomycin (for susceptible strains), plus an aminoglycoside, is usually indicated for serious enterococcal infections, such as endocarditis, unless high-level resistance to both gentamicin and streptomycin is documented; such combinations are predicted to result in synergistic killing of the Enterococcus.  (8) Penicillin or ampicillin resistance among enterococci due to $\beta$ -lactamase production has been reported very rarely. Penicillin or ampicillin resistance due to $\beta$ -lactamase production is not reliably detected with routine disk or dilution methods, but is detected using a direct, nitrocefins-based $\beta$ -lactamase test. Because of the rarity of $\beta$ -lactamase-positive enterococci, this test need not be performed routinely, but can be used in selected cases. A positive $\beta$ -lactamase test predicts resistance to penicillin, as well as amino- and ureidopenicillins (see Glossary I).

## ANEXO I

**Table 2D Supplemental Table 1. Screening Tests for High-Level Aminoglycoside Resistance (HLAR) and Vancomycin MIC  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  in *Enterococcus* spp. for Use With Table 2D**

Screen Test	Gentamicin HLAR	Streptomycin HLAR	Vancomycin MIC $\geq 8 \mu\text{g/mL}$
Test method	Disk diffusion	Broth microdilution	Agar dilution
Medium	BHI <sup>®</sup> broth	BHI <sup>®</sup> agar	BHI <sup>®</sup> agar
Antimicrobial concentration	120- $\mu\text{g}$ gentamicin disk	Gentamicin, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Vancomycin, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Inoculum	Standard disk diffusion dilution recommendations	10 $\mu\text{L}$ of a 0.5 McFarland suspension spotted onto agar surface	1 to 10 $\mu\text{L}$ of a 0.5 McFarland suspension spotted onto agar surface
Incubation conditions	35 $\pm 2^\circ\text{C}$ ; ambient air	35 $\pm 2^\circ\text{C}$ ; ambient air	35 $\pm 2^\circ\text{C}$ ; ambient air
Incubation length	16–18 hours	24 hours	24–48 hours (if susceptible at 24 hours, reinoculate)
Results	6 mm = Resistant; 7–9 mm = Inconclusive; $\geq 10 \text{ mm} = \text{Susceptible}$ MIC correlates: R = $\geq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ S = $\leq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$	>1 colony = Resistant Any growth = Resistant MIC correlates: R >= 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (broth) and >2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (agar); S = $\leq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ (broth) and $\leq 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ (agar)	>1 colony = Presumptive vancomycin resistance >1 colony = Resistant
Further testing and reporting	Resistant: is not synergistic with cell wall-active agent (eg, ampicillin, penicillin, and vancomycin). Susceptible: is synergistic with cell wall-active agent (eg, ampicillin, penicillin, and vancomycin) that is also susceptible. If disk diffusion result is inconclusive: perform an agar dilution or broth microdilution test to confirm.	<p>Perform vancomycin MIC and test for motility and pigment production to distinguish species with acquired resistance (eg, <i>vanA</i> and <i>vanS</i>) from those with intrinsic, intermediate-level resistance to vancomycin (eg, <i>vanC</i>), such as <i>Enterococcus gallinarum</i> and <i>Enterococcus casseliflavus</i>, which often grow on the vancomycin screen plate. In contrast to other enterococci, <i>E. casseliflavus</i> and <i>E. gallinarum</i> with vancomycin MICs of 8–16 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> (intermediate), differ from vancomycin-resistant <i>enterococcus</i> for infection control purposes.</p>	

## **ANEXO II**

VIGILÂNCIA DE  
PACIENTES COM

SEPSE - UTI ADULTOS

BUSCA ATIVA E

BUSCA ATIVA E  
VIGILÂNCIA

**VIGORESCENT  
LABORATORIAL.**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ REG. \_\_\_\_\_ Admissão: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Sexo: REG. Admissão: / /

Admissão: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Idade: Diag. Entrada: Evolução: Data: / / Clín:

Evolução: Data: / / Clín:

J Clin:

Infeção: C  H  / / UTI  Fora UTI  Cirurgia: Data: / /

Fora UTI  Cirurgia:

Data: / /

Sítio de infecção: PUL  SAN  CIR  URI  OUT

Data												
<b>Procedimentos invasivos</b>												
CVC												
VM												
SV												
TRAQ												
SNG/SNE												
DRENO												
N. PARENTERAL												
<b>Co-morbidades</b>												
Diabetes	Cardiopata	Neoplasia	Vascular	Hiperglicemia	Albulinemia	Outro						

## ANEXO III



Universidade Federal de Uberlândia  
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
 COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –  
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131  
 e-mail: [cep@propp.ufu.br](mailto:cep@propp.ufu.br); [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº. 597/09 DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU 039/09

Projeto Pesquisa: Staphylococcus aureus e enterococcus spp. Resistentes à vancomicina em pacientes na unidade de terapia intensiva de adultos do hospital de clínicas da UFU.

Pesquisador Responsável: Rosineide Marques Ribas

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

#### SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

Data de entrega do relatório final: Julho de 2011.

OBS: Corrigir o telefone do CEP no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, qual seja, 3239-4131.

O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 04 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
 Coordenadora do CEP/UFU

#### Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme definida no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requerem ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista.

**APÊNDICE I:** Características demográficas e clínicas dos pacientes infectados por VRE no HC-UFG

Paciente	Clínica <sup>1</sup>	Espécime clínico	Gênero	Idade	Tempo de Internação (dias)	Uso de SV <sup>2</sup>	Nefropatia/ Diabetes Mellitus	Evolução
1	CC	Líquido ascítico	M	45	31	+	-/-	Alta
2	CC	Sangue	F	51	15	+	+/-	Óbito
3*	CC	Urina	M	60	22	-	-/-	Alta
4	CC	Urina	M	65	170	+	+/-	Alta
5	CC	Urina	M	73	10	+	-/-	Alta
6	CM	Urina	F	90	167	+	-/+	Óbito
7	CM	Urina	F	54	148	+	-/-	Alta
8	CM	Urina	F	84	75	+	-/-	Alta
9	CM	Urina	M	66	117	+	-/-	Óbito
10	MI	Sangue	M	28	51	+	-/-	Óbito
11	MI	Sangue	M	78	85	+	-/+	Óbito
12	O	Urina	M	74	65	+	-/-	Alta
13	SE	Urina	F	73	76	+	-/-	Óbito
14	T	Urina	M	53	83	+	-/-	Alta
15	UDT	Urina	F	67	81	+	-/+	Alta
16	UTI	Urina	F	62	125	+	+/-	Óbito
17	UTI	Urina	F	32	59	+	-/-	Óbito
18	UTI	Urina	M	54	113	+	+/-	Óbito
19	UTI	Urina	M	71	96	-	+/-	Óbito
20	UTI	Urina	M	31	174	+	+/-	Óbito
21	UTI	Sangue	M	78	112	+	+/-	Alta
22	UTI	Secreção traqueal	M	33	75	-	-/-	Alta

1 CC, Clínicas Cirúrgicas; CM, Clínica Médica; MI, Moléstia Infecciosa; O, Oncologia; SE, Serviço de Emergência; T, Transplante; UDT, Unidade de Dor Torácica; UTI, Unidade de Terapia Intensiva de Adultos. 2 SV, Sonda Vesical; \*Infecção por VREfc

**APÊNDICE II:** Perfil de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos em amostras de infecção por VRE<sub>fm</sub> e colonização por VRE<sub>fc</sub>.

Amostra*	Ampicilina	Penicilina G	Gentamicina	Estreptomicina
			HLR	HLR
<b>VRE<sub>fm</sub></b>				
15	R	R	S	R
16	R	R	S	R
17	R	R	S	R
23	R	R	S	R
36	R	R	S	R
43	R	R	S	R
46	R	R	S	R
79	R	R	S	R
84	R	R	S	S
109	R	R	S	R
126	R	R	S	R
130	R	R	S	S
144	R	R	S	S
146	R	R	S	S
159	R	R	S	S
163	R	R	R	S
179	R	R	S	R
<b>VRE<sub>fc</sub></b>				
83	R	R	S	S
75	S	R	R	S
86	S	R	R	S
49	S	R	R	S
120	S	R	R	S
51	S	R	R	S
71	S	R	R	S
76	R	R	S	R
88	R	R	R	S
121	R	R	S	S
77	S	R	R	R
150	S	R	R	R
78	R	R	R	S

\* VRE<sub>fm</sub>: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina; VRE<sub>fc</sub>: *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina; HLR: elevados níveis de resistência.