

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina**

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

***Enterococcus* spp. Resistente à Vancomicina:**

Tipagem Molecular, Caracterização Clínica e Associação com Mortalidade

ANA MARIA SANDRI

**Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth
Co-Orientador: Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, 2004.

À minha família, em especial ao meu pai (*in memoriam*), pelos valores transmitidos, pelo incentivo ao estudo, pelo amor e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Afonso Luís Barth, agradeço pela forma tranqüila e segura com que me apoiou e participou de todas as etapas deste estudo, pelo exemplo de profissionalismo e ética e pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner, meu reconhecimento pelo inteligente manejo do banco de dados e da análise estatística, pelo incentivo e pela amizade nesta jornada.

As colegas do Serviço de Controle de Infecção do Hospital São Lucas da PUCRS, enfermeiras Micheline Gisele Dalarosa e Luciana Ruschel de Alcântara, farmacêutica Laura Elias e secretária Rosângela França Dornelles, toda minha gratidão pelo incentivo e apoio irrestritos que viabilizaram a finalização deste trabalho.

Aos membros do Serviço de Infectologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo coleguismo e sugestões dadas no decorrer deste estudo.

Aos colegas da Infectologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, pela amizade e apoio constante, facilitando as várias etapas de realização deste trabalho.

A Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente às farmacêuticas-bioquímicas Daniela de Souza Martins e Larissa Lutz, pela realização da técnica de PFGE e pela simpatia na transmissão de novos conhecimentos.

Ao Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS, especialmente ao Dr. Luis Fernando Rodrigues, Fabiana Correa Soares e Cláudia Meirelles Leite, pelo fornecimento das amostras.

E, finalmente, ao Dr. Gley Costa, um agradecimento muito especial, que vai além de qualquer palavra.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
REVISÃO DA LITERATURA	7
PERSPECTIVA HISTÓRICA	7
AGENTE ETIOLÓGICO	9
Métodos Convencionais para a Caracterização do Gênero Enterococo ...	10
Tipagem do Gênero Enterococo	13
Métodos de Tipagem Fenotípica	13
Métodos de Tipagem Genotípica	14
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	17
Mecanismos de Resistência à Vancomicina	19
RESERVATÓRIOS	23
INFECÇÕES CAUSADAS PELOS ENTEROCOCOS	25
Histórico	25
Infecções Associadas	26
OBJETIVOS	29
OBJETIVO GERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
REFERÊNCIAS	30
ARTIGO EM INGLÊS	36
ARTIGO EM PORTUGUÊS	58
ANEXOS	81

INTRODUÇÃO

O *Enterococcus* spp. é um germe de importância crescente nos últimos 20 anos devido à frequência com que tem sido identificado no ambiente hospitalar e por sua resistência intrínseca e adquirida a múltiplas drogas. Tradicionalmente este germe é conhecido por sua baixa virulência, se comparado com outros cocos Gram-positivos; em contrapartida, é uma bactéria com alta capacidade de adaptação e sobrevivência em meios adversos o que lhe confere condições perfeitas para obter sucesso como patógeno nosocomial. Dados do Programa de Vigilância em Antimicrobianos, SENTRY, apontam o enterococo como a quarta causa de bacteremias hospitalares nos Estados Unidos e Canadá. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais encontradas no homem com 80 a 90% e 5 a 10% dos casos, respectivamente. Infecções por *E. faecium* apresentam maior dificuldade de tratamento, pois, diferentemente do *E. faecalis*, cerca de 70% dos isolados mostram-se resistentes à ampicilina e penicilina.

A partir de 1986, quando o primeiro *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (ERV) foi identificado, a comunidade científica internacional voltou sua atenção sobre este germe. Em junho de 2002, ao ser descrito o primeiro caso de infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina, foi sugerida a transferência dessa resistência a partir do enterococo. Esta situação clínica, prevista desde o surgimento do ERV, é de extrema gravidade em função das restritas opções terapêuticas disponíveis frente a um germe, notadamente, de alta virulência.

No Brasil, o primeiro caso de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina foi descrito em 1996, no Estado do Paraná e, posteriormente, no Estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul, o isolamento do primeiro caso de ERV se deu em 2000 e mobilizou a criação, por parte da Secretaria Estadual da Saúde, de uma Comissão de

Controle de Infecção Hospitalar que se propôs a monitorizar a presença de surtos por germes com perfil de resistência epidemiologicamente significativo. No Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS), onde ocorreu esse primeiro isolamento, foram estabelecidas medidas de bloqueio rigorosas, conforme preconizado para contenção desse germe, as quais implicaram grande consumo de tempo e dinheiro. A presença dessa bactéria passou a ser evidenciada rapidamente em outros hospitais de Porto Alegre e, atualmente, a maioria das Instituições de atendimento terciário já a notificou a Secretaria da Saúde do Estado.

A facilidade de sobrevivência do ERV no meio ambiente e a sua persistência como colonizante no homem, por longos períodos, tornam essa bactéria de difícil erradicação. O uso restrito de antimicrobianos, especialmente vancomicina e cefalosporinas de terceira geração, associado a medidas rigorosas de bloqueio epidemiológico de contato, especialmente lavagem de mãos, são as práticas preconizadas até o momento para sua contenção. A experiência acumulada em controle de infecção aponta para uma grande dificuldade no cumprimento dessas práticas, de forma que podemos prever que o ERV tornar-se-á endêmico em nosso meio.

Apesar de existir um surto de ERV na cidade de Porto Alegre atualmente e de haver consenso nas medidas indicadas para impedir sua disseminação, a verdadeira importância clínica da necessidade de adoção de tais medidas não é clara. Este questionamento, somado à ausência de dados locais sobre o ERV, justificou a realização deste trabalho. As características clínicas dos pacientes com isolamento de ERV, a sua forma de disseminação e a sua associação com a mortalidade foram os tópicos abordados.

REVISÃO DA LITERATURA

PERSPECTIVA HISTÓRICA

O nome enterococo é proveniente da palavra francesa *entérocoque* a qual foi utilizada pela primeira vez por Thiercilin, em 1899 com a finalidade de enfatizar a origem intestinal desse coco Gram-positivo (1). O nome *Streptococcus faecalis* (*faecalis* para relacionar com fezes) foi proposto por Andrewes e Horder, em 1906, os quais isolaram esse microrganismo de um paciente com endocardite e consideraram esse estreptococo tão característico da flora intestinal humana que o termo claramente se justificava (1). Em 1919, Orla-Jensen descreveu um segundo organismo desse grupo, *S. faecium*, o qual diferia dos padrões de fermentação do *S. faecalis*; tal nome, no entanto, foi ignorado nos anos subseqüentes e esse microrganismo continuou com a denominação de *S. faecalis* (2). Em 1937, Sherman propôs uma classificação na qual separava os estreptococos em quatro grupos: piogênicos, viridans, lactico e enterococo (1, 2). O termo enterococo foi utilizado para microrganismos que cresciam entre 10 e 45°C, em pH 9,6, tinham tolerância a substâncias inibitórias como cloreto de sódio a 6,5% e sobreviviam por até 30 minutos sob temperatura de 60°C, sendo que a propriedade de hidrolizar a esculina também era observada (2, 3). O grupo do enterococo abrangia todas as espécies de enterococo conhecidas até aquela data. No início da década de 30, Lancefield criou uma classificação sorológica, fazendo correlação com a classificação de Sherman. Neste sistema, os enterococos reagiam com anti-soro do grupo D, o *S. pyogenes* com anti-soro dos grupos A, B, C, E, F ou G e os estreptococos do grupo viridans eram não agrupáveis; o *S. bovis*, classificado por Sherman como *S. viridans*, foi demonstrado, mais tarde, reagir com anti-soro do grupo D (1).

Inúmeros estudos realizados nos anos 40 e 50 mostraram que organismos referidos como *S. faecium* tinham características bioquímicas que os diferiam do *S. faecalis*, diferentemente do que Sherman propunha (1). Essas diferenças incluíam inibição pelo telurito de potássio, reações de fermentação e falha em reduzir o tetrazólio em formazan (1). Desta forma, apesar de o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* de 1957 não ter reconhecido oficialmente como uma espécie separada, ela foi amplamente aceita e, em meados de 1960, a espécie *S. faecium* foi incorporada à nomenclatura oficial (1).

No decorrer dos anos, vários outros enterococos foram isolados de fontes humanas e animais, de plantas e de alimentos. Enterococos móveis foram verificados em 1935 e alguns, que se assemelhavam ao *S. faecium*, ficaram conhecidos como *S. faecium* subespécie *mobilis* (1, 2); em 1950, foi identificada a produção de um pigmento amarelo por alguns enterococos móveis, e, em 1968, foi sugerido o nome *S. faecium* var. *casseliflavus* (pela cor amarela) (1, 2). Em 1950, um enterococo isolado do queijo Gouda foi chamado de *S. malodoratus* devido ao seu mau cheiro (1). Algumas cepas de enterococos foram identificadas por reagir não apenas com anti-soro do grupo D de Lancefield, mas também com o grupo Q; como esses microrganismos ocorriam de forma mais prevalente nas fezes de galinhas, foi proposta, em 1967, a denominação *Streptococcus avium* (4).

Em 1970, Kalina propôs a criação de um novo gênero para os estreptococos do grupo enterococo e sugeriu que, baseado no arranjo celular e nas características fenotípicas, *S. faecalis* e *S. faecium* e subespécies fossem denominados *Enterococcus* (2). No entanto, esta proposta não foi levada adiante e a denominação *Streptococcus* continuou a ser utilizada pela comunidade científica.

Na década de 80, com o auxílio das técnicas moleculares, a classificação dos estreptococos foi ampliada. Em 1983, Farrow apresentou dados bioquímicos e de hibridização de DNA que confirmaram a distinção entre as seguintes espécies: *S.*

faecalis, *S. faecium*, *S. casseliflavus*, *S. avium*, *S. durans* e *S. faecalis* var. *malodoratus* (1). Além disso, ficou constatado que a espécie *S. faecium* var. *mobilis* era a mesma que *S. casseliflavus*, que o *S. faecalis* subespécies *liquefaciens* e *zymogenes* eram, na realidade, uma só espécie e que o *S. gallinarum* era diferente do *S. avium* (1). Em 1984, Schleifer e Kilpper-Bälz, usando hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA, mostraram que o *S. faecalis* e o *S. faecium* eram fracamente relacionados aos estreptococos, incluindo *S. bovis*, de forma que deveriam ser transferidos para outro gênero: o gênero *Enterococcus* (1, 2). Collins, Jones e Farrow, trabalhando com Kilpper-Bälz e Schleifer, utilizando metodologia semelhante, constataram que as espécies *S. avium*, *S. casseliflavus*, *S. durans*, *S. faecalis* subsp. *malodoratus* e *S. gallinarum* também deveriam ser transferidas para o gênero *Enterococcus* (1). Estudos moleculares também foram utilizados para definir outras espécies incluindo *Enterococcus hirae* (*hirae* com o significado de intestino) e *E. mundtii* a qual inclui algumas espécies atípicas pigmentadas e imóveis. Além disso, três outras novas espécies foram propostas, *E. raffinosus*, *E. solitarius* e *E. pseudoavium* (5).

Atualmente, são conhecidas 23 espécies do gênero *Enterococo*: *E. avium*, *E. asini*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. sacharolyticus*, *E. sulfureus* e *E. villorum* (2).

AGENTE ETIOLÓGICO

Os enterococos são cocos Gram-positivos que apresentam-se aos pares, em cadeias curtas ou como células isoladas, não formadores de esporos, indistinguíveis na coloração de Gram dos estreptococos clássicos (2). Podem se apresentar como

cocobacilos em colorações de Gram preparadas de meios de cultura contendo ágar e tendem a ser ovóides e em cadeias quando preparadas de meios de cultura contendo tioglicolato (6). Os enterococos são anaeróbios facultativos capazes de crescer sob condições extremas como meios contendo NaCl a 6,5%, em pH 9,6 e em temperatura entre 10 e 45°C (embora a temperatura ótima de crescimento seja 35°C), sendo que muitos conseguem sobreviver por 30 minutos a 60°C (2, 6). Os enterococos hidrolizam esculina na presença de sais biliares a 40% (meio de bile-esculina) e a maior parte, com exceção do *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus pallens*, e *Enterococcus saccharolyticus*, hidrolizam a L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide (PYR); todas as espécies hidrolizam leucina β-naphthylamide (LAP) pela produção da enzima leucina aminopeptidase (LAPase) (2, 6). Os enterococos podem ser diferenciados dos estreptococos pela ausência de crescimento dos últimos em meios contendo NaCl a 6,5% e porque apenas 10% dos estreptococos reagem com a esculina. No entanto, desde que os gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus* e *Pediococcus* têm sido isolados de seres humanos, a identificação presuntiva de enterococos tem requerido testes adicionais além dos testes de crescimento em meio contendo NaCl 6,5% e reação com esculina (2).

Da mesma forma que os estreptococos, esses organismos não têm enzimas do citocromo oxidase sendo catalase-negativos, embora algumas cepas possam produzir pseudocatalase (isto ocorre apenas com *E. faecalis*) e aparecem como catalase-positivos com uma fraca efervescência (2).

Métodos Convencionais para a Caracterização do Gênero Enterococo

Os testes laboratoriais usualmente realizados para a identificação presuntiva do gênero *Enterococcus* incluem avaliação da sensibilidade à vancomicina, hidrólise

de PYR, hidrólise da esculina e crescimento em meios contendo NaCl a 6,5% e em temperaturas entre 10 e 45°C (6).

As espécies de enterococos, conforme proposto por Facklam, Sahn e Teixeira em 1999, podem ser divididas em cinco grupos baseando-se na formação de ácido em presença de manitol e sorbose, e na hidrólise de arginina, embora outras provas bioquímicas devam ser empregadas para definir as espécies dentro de cada um dos cinco grandes grupos (6).

As características fenotípicas das espécies de *Enterococcus* estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e gêneros relacionados (adaptada das ref. 2 e 6).

Espécies	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP	EFRO
Grupo I													
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	v	R
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	v	S
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	v	R
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	R
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	R
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	
Grupo II													
<i>E. faecalis</i>	+*	-	+*	-	+	-	+	-	-	+*	+	-°	R
<i>Lactococcus spp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	S
<i>E. faecium</i>	+*	-	+	+	v	v	-	-	-	+	-	-	S
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+*	+	v	+	-*	+*	+*	+	-	+	R
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	v	+	-	-	+	+	-	-	S
<i>E. gallinarum</i>	+*	-	+*	+	-	+	-	+*	-	+	-	+	R
Grupo III													
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	S
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	R
Grupo IV													
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	R
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	R
Grupo V													
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	-	+	v	+	v	+	+	+	v	+	
<i>E. gallinarum</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	R
<i>Vagococcus spp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	R

Abreviações e símbolos: MAN, manitol; SOR, sorbose; ARG, arginina; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; TEL, 0,04% telurito; MOT, motilidade; PIG, pigmento; SUC, sucrose; PYU, piruvato; MGP, metil-alfa-glicopiranosida; EFRO, disco de efrotomicina (100 µg); +, > 90% positivo; -, < 10% positivo; v, variável; *, exceções ocasionais (< 3% das cepas apresentam reações aberrantes); R, resistente; S, sensível.

OBS: O grupo V consiste de espécies variantes de *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. faecalis* que não hidrolizam a arginina.

O **grupo I** consiste de sete espécies que formam ácido a partir do manitol e sorbose mas não hidrolizam a arginina; as espécies nesse grupo são identificadas pelas reações com arabinose e rafinose, pela capacidade de utilizar o piruvato e pela pigmentação eventual das cepas (2). O **grupo II** consiste de cinco espécies que formam ácido a partir do manitol e hidrolizam a arginina, mas não formam ácido da sorbose. Algumas cepas atípicas não hidrolizam a arginina ou não formam ácido a partir do manitol. O *Lactococcus* sp. também aparece neste grupo devido às semelhanças apresentadas entre algumas das suas espécies isoladas em seres humanos, *L. gergoviae* e *L. lacti*, com as espécies aqui descritas (2). O **grupo III** consta de três espécies, que hidrolizam a arginina mas não formam ácido a partir de manitol, sorbose ou sorbitol (2). As três espécies do **grupo IV** não hidrolizam a arginina e não formam ácido a partir do manitol e da sorbose (2). O **grupo V** consiste de variantes de *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. faecalis* que falham em hidrolizar a arginina. Também compreende *E. columbae* e *Vagococcus*, os quais apresentam similaridade fenotípica com as espécies deste grupo (2).

É importante mencionar que a grande maioria dos Laboratórios de Microbiologia não têm condição de realizar na rotina todos os testes fenotípicos para identificar as espécies do gênero *Enterococcus*. Na maioria das vezes, a identificação laboratorial é feita, portanto, a nível de gênero. Alguns laboratórios dispõem de sistemas automatizados os quais podem ser úteis na identificação da espécie, embora, exceto a espécie *E. faecalis*, a identificação das demais pode não ser fidedigna devido à similaridade fenotípica (7,8).

Os *Enterococcus faecalis* constituem a maior parte dos isolados clínicos encontrados, correspondendo a 80 a 90% das amostras de enterococos; os *Enterococcus faecium* representam 5 a 10% e, ocasionalmente, são encontrados clinicamente *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* e *E. hirae* (6).

Enterococcus mallodoratus, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. cecorum* e *E. columbae* não têm sido isolados de fontes humanas (6).

Tipagem do Gênero *Enterococo*

No passado, as infecções causadas por enterococos eram tradicionalmente consideradas de origem endógena, e a epidemiologia dessa bactéria não atraía muita atenção. Mais recentemente, a epidemiologia do enterococo passou a merecer atenção devido à alta frequência da sua participação nas infecções hospitalares, ao desenvolvimento de resistência a múltiplos antibióticos bem como às evidências de etiologia exógena (2). Dessa forma, a caracterização molecular passou a ter um papel fundamental, auxiliando os Serviços de Controles de Infecção no entendimento de surtos intra e extra-hospitalares.

Os métodos de tipagem podem ser classificados em fenotípicos ou genotípicos, de acordo com o tipo de característica explorada.

Métodos de Tipagem Fenotípica

Os métodos fenotípicos compreendem aqueles que exploram as características bioquímicas, fisiológicas e antigênicas expressas pelo organismo.

As investigações epidemiológicas iniciais das infecções enterocócicas eram baseadas nas características fenotípicas sendo de difícil realização, de difícil reprodutibilidade e com poder discriminatório limitado (2). Os métodos tradicionais de tipagem fenotípica, usados para a investigação de diversidade entre isolados de determinadas espécies de enterococos, incluem determinação de biotipos, de sensibilidade antimicrobiana, de sorotipos, de fagotipos e análise dos padrões eletroforéticos de proteínas. Apesar de estas técnicas trazerem informações úteis, elas geralmente são demoradas e de difícil reprodução e/ou interpretação (2). Uma das

limitações destes métodos consiste na falta de variação fisiológica das espécies de enterococos que permita sua diferenciação (2). No entanto, o uso dessas técnicas, em associação aos métodos moleculares mais modernos, fornece informações valiosas.

Métodos de Tipagem Genotípica

O principal acréscimo fornecido pelas técnicas moleculares reside no esclarecimento de surtos hospitalares envolvendo germes com perfis de sensibilidade epidemiologicamente importantes. O perfil molecular gerado no estudo vai permitir o direcionamento das medidas de bloqueio quando essas forem necessárias. Desta forma, amostras bacterianas com perfil molecular idêntico ou semelhante, durante um surto, sugerem fortemente origem comum, e a conduta correta consiste em implantar medidas de barreira para impedir a disseminação do germe de forma horizontal, paciente a paciente. No entanto, se forem geradas amostras com perfis distintos, entende-se que deve ter havido uma seleção independente de mutantes resistentes a qual pode ter tido origem no largo uso de antimicrobianos, e as medidas a serem adotadas para a contenção destes germes passam por uma revisão na política de utilização dos antimicrobianos.

As primeiras técnicas moleculares desenvolvidas para a tipagem do enterococo foram a análise dos fragmentos de DNA plasmidial resultantes de sua digestão total ou parcial realizada por enzimas de restrição (endonucleases, enzimas que clivam o DNA em seqüências específicas) (2). Estes fragmentos de DNA são separados por eletroforese, e a distância migratória dos mesmos mostra o polimorfismo do DNA (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP), o qual pode ser específico para cada cepa. Essas técnicas podem ser úteis em algumas situações, porém, a inconsistência dos plasmídeos no que se refere à possibilidade de carregarem diversos determinantes de virulência, de serem sujeitos à forte pressão seletiva e de

poderem ser perdidos espontaneamente ou adquiridos de outras bactérias, limita o método (9).

A análise dos perfis de DNA cromossomal clivado com enzimas de restrição de ação rara (macrorrestrição do DNA) para o estudo epidemiológico de amostras bacterianas, foi amplamente auxiliada pelo desenvolvimento de técnicas de eletroforese de campo variável ou pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE). A técnica de PFGE foi descrita pela primeira vez em 1984 com o objetivo de examinar o DNA cromossômico de organismos eucarióticos (10). Este método consiste basicamente de uma modificação da eletroforese convencional com campo elétrico constante em que a direção da corrente elétrica sofre alterações freqüentes, permitindo a resolução de moléculas de DNA de alto peso molecular (11). O PFGE tem sido aplicado para o estudo de vários organismos e demonstrado ser altamente discriminatório e reprodutível, com desempenho superior ou comparável ao de outras técnicas (7). A discriminação alcançada por este método é grande uma vez que detecta variações em todo o genoma, podendo apresentar capacidade elevada para distinguir entre linhagens de uma espécie (12). As limitações dessa técnica residem na necessidade de equipamento especializado e caro, no tempo prolongado exigido para que as soluções e enzimas penetrem no gel e atuem e na dificuldade de interpretação dos resultados devido à complexidade dos padrões (2). Embora existam, no mínimo, sete diferentes sistemas empregando essa técnica, o sistema CHEF[®] é o mais utilizado (7).

A macrorrestrição de DNA seguida por PFGE se constitui no método de tipagem mais utilizado, considerado por muitos autores como padrão-ouro, para o estudo epidemiológico de infecções enterocóccicas hospitalares (2). A experiência acumulada com este método nos últimos anos se refere, na sua grande maioria, aos *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*. A enzima de restrição normalmente utilizada para digerir o DNA do enterococo é a *Sma*I, embora também possam ser utilizadas a *Ap*I

e a *Sfil* (2). No processo de clivagem do DNA cromossomal de *Enterococcus spp.*, são gerados, em média, 15 a 20 fragmentos de restrição, com tamanho aproximado de 5 a 400 kb (13). O uso de diferentes condições de eletroforese e de diferentes enzimas de restrição pode ser necessário para a melhor separação de fragmentos obtidos de amostras de espécies enterocóccicas. Apesar de este método ter um poder de discriminação superior a outros, a interpretação dos perfis migratórios nem sempre é definitiva devido à possibilidade da ocorrência de eventos genéticos como inversões, deleções e outros rearranjos cromossômicos, bem como inserção de transposons ou outros elementos móveis, levando a modificações substanciais nos perfis de PFGE (2). Desta forma, o uso do PFGE em associação a outra técnica de tipagem ou isoladamente, mas utilizando diferentes enzimas de restrição, é fortemente recomendado para facilitar a interpretação epidemiológica em casos de maior complexidade (2). Para a interpretação dos dados gerados, são utilizados princípios gerais baseados nas diferenças dos fragmentos. Atualmente, a utilização de sistemas de processamento de imagens para auxiliar na análise e interpretação dos perfis das bandas tem se tornado cada vez mais comum, embora ainda não esteja disponível no nosso meio.

Para a interpretação dos resultados obtidos por PFGE, foi proposto um padrão de avaliação baseado na similaridade das bandas geradas (13). Perfis migratórios idênticos traduzem origem comum (de uma mesma cepa ou clone); diferenças em até seis bandas no perfil migratório, representando um ou dois eventos genéticos diferentes, são consideradas semelhantes e pertencentes a um mesmo clone; sete ou mais bandas discordantes, representando três ou mais eventos genéticos diferentes, são consideradas amostras não relacionadas epidemiologicamente (13).

RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os enterococos, ao lado de outras bactérias aeróbicas e anaeróbicas, fazem parte da microbiota intestinal normal (14). Previamente à identificação de cepas resistentes no final da década de 70, esta bactéria de baixa virulência era considerada praticamente inócua ao organismo (14). Nos últimos 20 anos, este germe tem sido identificado como causa de infecções hospitalares com frequência crescente, paralelamente ao acréscimo de resistência às drogas utilizadas na rotina. Esta resistência, que lhe permite sobreviver em ambientes onde a intensa utilização de antibióticos determina a eliminação ou supressão das bactérias sensíveis, associada a sua capacidade de sobreviver em objetos inanimados e de se manter como colonizante sem causar doença em grande parte das situações, garante seu sucesso como patógeno hospitalar (15).

A resistência no gênero *Enterococcus*, assim como em outras bactérias, pode ser classificada em intrínseca e adquirida (Tabela 2). A resistência intrínseca é própria da espécie, e seus genes determinantes encontram-se no cromossoma. A resistência adquirida pode ser consequência de uma mutação no DNA original ou pela aquisição de material genético externo à célula bacteriana. Uma das principais razões que explica a sobrevivência do enterococo no ambiente hospitalar é a sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos utilizados rotineiramente e, talvez ainda mais importante, devido a sua habilidade em adquirir resistência a praticamente todos antibióticos disponíveis, tanto por mutação quanto por aquisição de material genético exógeno através de transferência plasmidial ou por transposons (1, 16).

A resistência crescente que vem sendo observada no enterococo acrescida a sua capacidade de transmissão destes determinantes de resistência, tornaram esse germe um dos focos de atenção de todos os profissionais que atuam na área de infecção hospitalar.

Tabela 2 – Resistência Antimicrobiana Intrínseca e Adquirida no Enterococo

(adaptada da ref. 16)

Resistência Intrínseca β - Lactâmicos (particularmente cefalosporinas e penicilinas penicilinase-resistentes)

Aminoglicosídeos em baixas concentrações

Clindamicina

Fluoroquinolonas

Sulfametoxazol-Trimetoprim

Resistência Adquirida β -Lactâmicos em altas concentrações

Aminoglicosídeos em altas concentrações

Glicopeptídeos

Tetraciclina

Eritromicina

Fluoroquinolonas

Rifampicina

Cloranfenicol

Ácido Fusídico

Nitrofurantoína

O tratamento das infecções enterocócicas representa um grande desafio, porque além de nenhum agente terapêutico isolado ter ação bactericida para esse germe, o enterococo apresenta-se intrinsecamente resistente, em algum grau, a todas as cefalosporinas, clindamicina, sulfa/trimetoprim e baixa concentração de aminoglicosídeos (17). Muitos enterococos também se adaptaram à exposição antimicrobiana no trato gastrintestinal através da aquisição de resistência a penicilinas, eritromicina, tetraciclina, altos níveis de aminoglicosídeos e vancomicina (18). Apesar de a maioria dos isolados de *E. faecalis* ainda exibirem alguma sensibilidade à penicilina e ampicilina, aproximadamente 70% dos isolados de *E. faecium* são resistentes a essas drogas, mesmo estando preservada a sensibilidade à vancomicina (15). A resistência aos beta-lactâmicos ocorre basicamente devido à baixa afinidade

das proteínas ligadoras de penicilinas (*penicilin binding proteins*, PBPs), mas também pode ocorrer por produção de enzimas de resistência, beta-lactamases (15). A penicilina e a ampicilina são as penicilinas mais eficazes contra o enterococo, seguidas pelas ureidopenicilinas como a piperacilina e carboxipenicilinas como a ticarcilina (15). A resistência de alto nível à gentamicina e à estreptomicina também pode ocorrer, limitando o tratamento em situações de maior gravidade como endocardite e meningite. A partir de 2000, duas novas drogas passaram a ser testadas para o enterococo em casos de resistência: quinopristina-dalfopristina (da classe das estreptograminas) e linezolida (da classe das oxazolidinonas). A resistência a esses dois antibióticos é rara, embora já tenha sido descrita (19).

Mecanismos de Resistência à Vancomicina

A mais recente resistência detectada que emergiu no enterococo é a resistência à vancomicina. Em 1986, os primeiros isolados de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina foram descritos na França em pacientes com leucemia e na Inglaterra em pacientes com insuficiência renal, aproximadamente 30 anos após a introdução deste antimicrobiano (20, 21). Logo após, outros países da Europa descreveram novos isolados de ERV e cepas semelhantes foram detectadas em hospitais do leste dos Estados Unidos (22, 23). Atualmente é descrita em vários países do mundo. A emergência da resistência à vancomicina causou alarme na comunidade científica internacional por vários motivos. Em primeiro lugar, devido às limitações de tratamento que isto significa; segundo, devido à possibilidade de transferência do gene de resistência para outros microrganismos, como o *Staphylococcus aureus*, e, finalmente, devido ao sucesso limitado observado com medidas para contenção dessa resistência no que se refere à adesão às práticas de bloqueio epidemiológico (19).

Em um estudo de nove anos de acompanhamento realizado na Inglaterra foi verificado que a resistência do *E. faecium* isolado de hemocultura para a vancomicina foi de 6,3%, em 1993; 20%, em 1995 e 24%, em 1998 (24). De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), a taxa de resistência do enterococo a partir de amostras de Unidades de Terapia Intensiva norte-americanas cresceu de 0,3%, em 1989, para 25,2%, em 1999 (25). Em alguns hospitais americanos, o percentual de resistência do *E. faecium* à vancomicina chega a 90% (26). No Brasil, o primeiro caso de resistência à vancomicina foi descrito em 1996 por Costa et al., na cidade de Curitiba, Estado do Paraná, e envolveu *Enterococcus faecium* isolado de uma criança de nove anos de idade submetida à transplante de medula óssea (27). No Rio Grande do Sul, o primeiro caso de resistência à vancomicina foi encontrado no *E. faecalis* isolado de secreção de sítio cirúrgico na cidade de Porto Alegre no HSL/PUCRS, em maio de 2000 (28). Atualmente, segundo dados da Vigilância Sanitária do Rio Grande do Sul, o ERV já foi notificado pela maioria dos hospitais de grande porte de Porto Alegre, tendo, possivelmente, adquirido caráter endêmico.

Os fatores de risco para aquisição do ERV na maioria das publicações incluem idade avançada, tempo prolongado de internação, internação em unidade de terapia intensiva, proximidade de um outro paciente com ERV, cirurgia abdominal, cirrose, diálise, neoplasia hematológica, neutropenia e uso prévio de antibióticos incluindo vancomicina, cefalosporinas e anaerobicidas (15, 29, 30).

Os métodos de difusão com discos, diluição em ágar ou microdiluição em caldo e sistemas automatizados, não apresentam problemas para a detecção de cepas com alto grau de resistência à vancomicina; porém a difusão com discos e sistemas automatizados podem falhar na detecção de resistência de níveis baixos e moderados (1).

Seis tipos de fenótipos de resistência à vancomicina foram descritos, VanA, VanB, VanC, VanD, VanE e VanG (16). Os genes para os tipos de resistência A, B, D,

E são adquiridos (*vanA*, *vanB*, *vanD* e *vanE*) e os genes para o tipo C são endógenos, espécie-específicos, componentes do *E. gallinarum* (*vanC-1*), *E. casseliflavus* e *E. flavescens* (*vanC-2/vanC-3*, respectivamente) (31). Desses seis fenótipos, VanA e VanB são os de maior relevância clínica sendo basicamente encontrados no *E. faecium* e *E. faecalis* e resultam da aquisição de novos determinantes genéticos de resistência carregados no transposon Tn 1546; o fenótipo VanA é o mais preocupante porque essa resistência é transferível (19).

O fenótipo VanA determina resistência de alto nível à vancomicina (Concentração Inibitória Mínima, CIM, $\geq 64 \mu\text{g/mL}$) e resistência de nível moderado a alto à teicoplanina (CIM $\geq 16\mu\text{g/mL}$); é mediado por plasmídio e transferível por conjugação para outras bactérias Gram-positivas (20, 32, 33). A exposição a concentrações subinibitórias de glicopeptídeos induz à síntese de inúmeras proteínas codificadas nesse determinante genético que juntos conferem resistência através do impedimento da ligação da vancomicina ao seu substrato (2). O fenótipo VanB causa resistência de nível moderado a alto à vancomicina (CIM 4-1024 $\mu\text{g/mL}$) e sensibilidade à teicoplanina (CIM $< 0,5-1 \mu\text{g/mL}$); a resistência desse fenótipo parece ser mediada por cromossomo e pode ser transferível por conjugação em certas cepas (32, 33). O VanC está envolvido com resistência intrínseca de nível moderado ou baixo à vancomicina (CIM 2-32 $\mu\text{g/mL}$) e permanece sensível à teicoplanina (CIM 0,5-1 $\mu\text{g/mL}$) (31, 34). O VanD, descrito em *E. faecium*, confere resistência de nível moderado à vancomicina (CIM 16-64 $\mu\text{g/mL}$) e sensibilidade ou baixo nível de resistência à teicoplanina (CIM 2-4 $\mu\text{g/mL}$) (35). O fenótipo VanE foi descrito em uma amostra de *E. faecalis* apresentando CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ para a vancomicina (baixo nível) e de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para a teicoplanina (sensível); é induzível, provavelmente, pela presença de vancomicina e não é transferível (36). Em 2000, foi detectado um novo determinante genético denominado *vanG*, em *E. faecalis*, que confere resistência a níveis moderados de vancomicina e sensibilidade à teicoplanina (37).

O fenótipo de resistência VanA é o melhor descrito e se constitui numa proteína de 39kDa, homóloga às ligases bacterianas (38, 39). Essas ligases bacterianas são enzimas cromossômicas que sintetizam o dipeptídeo D-ala-D-ala, o qual é incorporado ao final dos precursores do peptideoglicano e então exportadas para a superfície da bactéria (2, 7). O VanA apresenta funções semelhantes às das ligases bacterianas, mas catalisa especificamente a ligação entre D-alanina e D-lactato para produzir D-ala-D-lac, ao invés do usual D-ala-D-ala (2). Os glicopetídeos apresentam baixa afinidade por D-ala-D-lac e, portanto, não se ligam a este precursor modificado, permanecendo a polimerização do peptideoglicano na presença do antimicrobiano (32). As enzimas cromossômicas que produzem os precursores não modificados da parede da célula ainda são funcionais no enterococo resistente à vancomicina e os seus produtos (dipeptídeos) competem com os produtos modificados (depsipeptídeos) na síntese dos precursores modificados e não modificados do peptideoglicano (2). Os graus de resistência à vancomicina dependerão das respectivas proporções de cada tipo de precursor (40). A bactéria somente expressará o fenótipo de resistência quando a quantidade de precursores sensíveis à vancomicina for pequena (40).

A emergência de enterococos com resistência à vancomicina, vista predominantemente nas espécies de *E. faecium*, foi seguida por um aumento na frequência com que essas espécies têm sido recuperadas (41). De todos os enterococos, o *E. faecium* é o que apresenta maior dificuldade de tratamento por sua resistência tanto para a ampicilina quanto para a vancomicina.

Os enterococos dispõem de vários sistemas de conjugação que permitem a disseminação de genes de resistência para outras bactérias. Estes sistemas incluem os plasmídios que podem se replicar em várias outras bactérias Gram-positivas (estafilococo, estreptococo), os plasmídios responsivos a ferormônios que podem ser transferidos entre cepas de *E. faecalis* numa frequência que pode chegar a 100% e um tipo especial de transposon (um elemento que pode pular de um sítio do DNA para

outro, intracelularmente) de conjugação (ou seja, pode ser transferido de forma intercelular entre vários gêneros bacterianos e se integrar no genoma do novo hospedeiro bacteriano) (33, 42).

O achado de genes de resistência à vancomicina nesses elementos, tanto de conjugação quanto de transposição, reforça a possibilidade de transferência dessa resistência a outras bactérias, talvez mais patogênicas (32, 33, 44, 45). As descrições de trabalhos experimentais envolvendo transferência de resistência à vancomicina do enterococo para o *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus pyogenes* bem como o achado desses genes em várias espécies na natureza, favorecem essas colocações (26). Em junho de 2002, foi relatado o primeiro caso documentado de infecção relacionada a *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) (CIM > 128µg/mL) nos EUA; exames culturais identificaram infecção concomitante por ERV (45). O isolado de VRSA continha o gene *vanA*, o que sugere que a resistência poderia ter sido adquirida do ERV (45). As conseqüências clínicas desses achados são, inquestionavelmente, muito graves.

RESERVATÓRIOS

Os enterococos são bactérias amplamente distribuídas na natureza devido a sua capacidade de se desenvolver e sobreviver em condições desfavoráveis, sendo encontrados no solo, nos alimentos, na água e em uma grande variedade de animais. O principal habitat desses microrganismos parece ser o trato gastrointestinal do homem e de outros animais onde representam uma parcela significativa da flora entérica normal. Menos freqüentemente são encontrados no trato gênito-urinário, em secreções orofaríngeas, vaginais e pele, principalmente na área perineal (46). A presença do enterococo no solo e na água de superfície pode ser atribuída à contaminação dessas áreas por fezes de animais ou por material de esgotos não

tratados (38). Por quase um século os enterococos eram utilizados como indicadores de contaminação fecal de água e de alimentos para o consumo humano (47).

A identificação dos reservatórios do enterococo tem merecido cada vez mais atenção devido à frequência crescente de sua participação em infecções hospitalares e ao seu padrão de resistência. A crescente prevalência do ERV, principalmente em hospitais americanos, tem sido atribuída basicamente a uma disseminação clonal para os pacientes hospitalizados a partir de reservatórios potenciais (19). Dessa forma, entende-se que os principais reservatórios do ERV no ambiente hospitalar sejam os próprios pacientes, colonizados ou infectados e a equipe assistencial (19, 48). As superfícies ambientais e os equipamentos médicos também são fontes de ERV já tendo sido verificada sua sobrevivência em objetos inanimados, por um período superior a quatro dias (48, 49).

Fontes não humanas de ERV começaram a ser suspeitadas quando essa bactéria foi isolada em um paciente no Reino Unido que não teve contato prévio com o meio hospitalar (50). Na investigação foi identificado ERV em aves e porcos sendo sua presença relacionada ao uso do glicopeptídeo avoparcina, estruturalmente semelhante à vancomicina e teicoplanina, adicionado à ração animal como promotor do crescimento (47). Em 1997, esta prática foi proibida na União Européia e, a partir de então, tem sido observado um decréscimo de recuperação do ERV em fontes animais e humanas (51, 52). Nos Estados Unidos, a avoparcina nunca foi liberada como aditivo na ração animal, e os estudos conduzidos até o momento não identificaram a presença de ERV em animais (19).

INFECÇÕES CAUSADAS PELOS ENTEROCOCOS

Histórico

A potencial patogenicidade do enterococo para o homem foi reconhecida desde a virada do século, sendo que as primeiras revisões de literatura sobre doenças associadas a este patógeno datam de 1912 e várias publicações neste sentido ocorreram em 1920 (4). Na descrição original de Thiercilin em 1899 (1), ele encontrou o *entérocoque* em pacientes com enterite, apendicite e meningite, infecções essas que não são comumente associadas ao enterococo na atualidade. No mesmo ano de 1899, foi identificado um microrganismo, chamado de *Micrococcus zymogenes*, de um paciente com endocardite, o qual foi reconhecido mais tarde como *S. faecalis* var. *zymogenes* (4). Também foi de um paciente com endocardite que, em 1906, Andrewes e Horder (3) isolaram um germe o qual denominaram *Streptococcus faecalis*. A associação deste germe com endocardite ficou claramente confirmada a partir de 1912 por Hicks (1) e um grande número de pesquisadores. O envolvimento do enterococo com infecções do trato urinário foi descrito inicialmente por Andrewes e Horder, em 1906 (3), e a relação com sepse puerperal e infecções abdominais foi descrita por vários autores e publicada por Sherman, em 1937 (1), e por Evans e Chinn, em 1947 (3). Nestas primeiras descrições de infecções relacionadas a esta bactéria, também se encontram osteomielite, colecistite e infecções odontogênicas.

A virulência atribuída ao enterococo, em geral, é particularmente inferior a de outros cocos Gram-positivos como o *Staphylococcus aureus*, por exemplo. Fatores adjuvantes como a produção de ferormônios (substâncias produzidas por certas cepas de enterococos que estimulam a agregação de outros enterococos) e hemolisinas têm sido considerados como facilitadores para a colonização do enterococo em outros sítios além do trato gastrointestinal (1). Estudos revelam alta taxa de mortalidade

em pacientes com bacteremia por enterococos, porém, estes mesmos estudos não têm conseguido dimensionar a contribuição isolada representada pelo enterococo, uma vez que estes pacientes estão, invariavelmente, severamente doentes, e o enterococo poderia corresponder, na realidade, apenas a um marcador de gravidade (19). Em muitos casos, o enterococo faz parte de uma bacteremia polimicrobiana e sua contribuição independente para a morbimortalidade fica difícil de ser estabelecida. A resistência apresentada pelo enterococo a vários agentes antimicrobianos permite que ele prolifere e sobreviva em pacientes recebendo esse tipo de terapia e certamente contribui para a sua capacidade de causar superinfecções.

Apesar de o enterococo ser um colonizante normal do homem, as infecções a ele relacionadas podem ter origem exógena, a partir de outros pacientes ou equipe assistencial, por exemplo, e normalmente ocorrem em pacientes hospitalizados ou sob alguma condição de imunossupressão (51). De uma forma geral não ocorrem situações diretas de infecção cruzada, acontecendo primeiramente a colonização para, após, ocorrer a infecção (19). A importância do enterococo como um patógeno nosocomial tem aumentado nos últimos anos e, atualmente, está entre os três agentes mais frequentes de infecções nosocomiais nos Estados Unidos (25).

Infecções Associadas

As infecções descritas envolvendo o enterococo são as infecções do trato urinário, intra-abdominais e pélvicas, bacteremia e endocardite, cutâneas, neonatais, do sistema nervoso central e do trato respiratório.

A infecção do trato urinário (ITU) é a infecção enterocócica mais frequente no homem (51). A maioria dessas infecções têm origem hospitalar e estão associadas, principalmente, à instrumentação/cateterização prévia, a anormalidades do trato urinário, ao uso extensivo de antimicrobianos e à debilidade do paciente (53). Além de

infecções de trato urinário inferior e pielonefrites, também já foram descritos casos de prostatite e abscesso perinéfrico atribuídos a este germe (1). Raramente os enterococos causam infecções de trato urinário não complicadas em mulheres não hospitalizadas (46). A bacteremia é uma complicação rara em infecções de trato urinário enterocócicas. O grupo de infecções intra-abdominais são considerados como o segundo tipo mais freqüente relacionado ao enterococo (51). Os enterococos são encontrados fazendo parte da flora mista aeróbica e anaeróbica em infecções intra-abdominais e pélvicas, sendo que o seu papel, nestas situações, permanece controverso (46). A constatação de que o uso de esquemas antimicrobianos, com espectro basicamente direcionado para *E. coli*, *Bacteroides* spp. e outros anaeróbios parece ser satisfatório nestas infecções, sugere que estes germes tenham uma importância secundária (46).

A peritonite isolada por *Enterococcus* spp. pode ocorrer em pacientes cirróticos, e nefróticos, em pacientes em diálise peritoneal ambulatorial ou como complicação de cirurgia ou trauma abdominal (1). Estes microrganismos também podem causar abscessos e bacteremia como complicação de endometrite, cesariana e salpingite aguda (51).

Bacteremia é o terceiro tipo de infecção atribuída ao enterococo (53). Os focos mais comuns são trato urinário, infecções intra-abdominais (colangite), infecções cutâneas (úlceras de decúbito, pé diabético) e infecções relacionadas a cateter. A relação de bacteremia com endocardite é variada, ou seja, se a origem da bacteremia for hospitalar, apenas em 1% dos casos há evolução para endocardite; se a origem for comunitária, no entanto, em aproximadamente um terço dos casos há evolução para endocardite (53). A endocardite é muito menos freqüente em situações que evoluem com bacteremia polimicrobiana ao invés de monomicrobiana pelo *Enterococcus* spp. (53). Apesar de a bacteremia poder se associar a choque séptico ou à coagulação intravascular disseminada, tais complicações são raras em bacteremias

enterocóccicas puras e, quando ocorrem, geralmente estão relacionadas a bacilos Gram-negativos que acompanham os enterococos em bacteremias polimicrobianas (38). Infecções metastáticas, além de endocardite, são raras.

Os enterococos são responsáveis por 5 a 15% dos casos de endocardite infecciosa (1). O *Enterococcus faecalis* é a espécie mais freqüentemente relacionada, embora existam relatos de envolvimento do *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* e *E. raffinosus* (1). Essa doença é mais comum entre idosos e sexo masculino e segue, em geral, um curso subagudo. Acomete mais freqüentemente pacientes com valvulopatias ou com válvulas prostéticas, embora também possa determinar infecção em válvulas previamente normais (38, 46,). Usualmente causa endocardite do coração esquerdo, sendo mais comum o envolvimento da válvula mitral do que a aórtica, mesmo em usuários de drogas (46).

Os enterococos raramente determinam celulites ou outras infecções cutâneas isoladamente; normalmente o que se encontra são estes cocos fazendo parte de infecções polimicrobianas juntamente com bacilos Gram-negativos e anaeróbios, em situações de pé diabético, queimados e úlceras de decúbito, por exemplo (38). Novamente, da mesma forma que para as infecções abdominais, seu significado é discutível. Raramente causam bacteremias a partir de lesões cutâneas e, sem dúvida, sua virulência é muito inferior se comparada a de outros germes como, por exemplo, *S. aureus*.

Infecções menos freqüentes causadas pelo enterococo incluem infecções neonatais, do Sistema Nervoso Central e do trato respiratório, normalmente envolvendo pacientes com múltiplas invasões ou muito debilitados (51).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Descrever características epidemiológicas dos pacientes com isolamento de *Enterococcus spp.* resistente à vancomicina no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul desde o seu surgimento, em maio de 2000, até maio de 2002.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar as características clínicas e demográficas dos pacientes com isolamento de *Enterococcus spp.* com resistência à vancomicina, comparando-os com pacientes sem ERV.
2. Avaliar a associação entre mortalidade e presença de ERV.
3. Determinar o perfil genotípico das cepas de ERV isoladas, de maneira a indicar sua forma de transmissão.

10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 1997;426-39.
11. Sader H, Pignatari AC. Epidemiologia molecular no âmbito hospitalar. In: Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Alves Filho MB, Grinbaum RS, Richtmann R. *Infecções hospitalares, prevenção e controle*. São Paulo: Sarvier; 1997.p. 549-60.
12. d'Azevedo PA. Diversidade fenotípica e genotípica de *Enterococcus* isolados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2001, RJ.
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-39.
14. Boyle JF, Soumakis AS, Rendo A. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1280-85.
15. Lautenbach E, Bilker WB, Brennan PJ. Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20:318-23.
16. Cetinkaia Y, Falk P, Mayhall GC. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:686-707.
17. Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32(Suppl. 2):S133-S145.

18. Landry SL, Kaiser DL, Wenzel RP. Hospital stay and mortality attributable to nosocomial enterococcal bacteremia: a controlled study. *Am J Infect Control* 1989; 17: 323-29.
19. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, Johnson CN et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* 2003; 53:159-71.
20. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988; 319:157-62.
21. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988; 1:57-58.
22. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin- United States 1989-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993; 42:597-99.
23. Boyce JM. Vancomycin-resistant enterococci: pervasive and persistent pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 116:676-79.
24. Reacher MH, Shah A, Livermore DM. Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. *BMJ* 2000; 320:213-16.
25. Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS) report, data summary from January 1992 – April 2000. *Am J Infect Control* 2000; 28:429-48.
26. Kak V, Chow JW. Acquired antibiotic resistance in enterococci. In: Gilmore MS. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington DC: ASM Press; 2002.p.355-83.

27. Costa LM, Souza DC, Martins LTF, Zanella RC, Brandileone MC, Bokermann S, Sader HS et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brasil. Braz J Infect Dis 1998; 2:160-63.
28. d'Azevedo PA, Kacman SB, Schmalfuss SB, Rodrigues, LF. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente à vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. Anais do 34º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial 2000.p.140.
29. Zaas AK, Song X, Tucker P, Perl TM. Risk factors for development of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection in patients with cancer who are colonized with vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis 2002; 35:1139-46.
30. D'Agata EMC, Green WK, Schulman G, Li H, Tang YW, Schaffner W. Vancomycin-resistant enterococci among chronic hemodialysis patients: a prospective study of acquisition. Clin Infect Dis 2001; 32:23-29.
31. Clarck NC, Teixeira LM, Facklam RR, Tenover FC. Detection and differentiation of *van-C1*, *van-C2* and *van-C3* glycopeptide resistance genes in enterococci. J Clin Microbiol; 1998; 36:2294-97.
32. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin Infect Dis 1997; 24:545-46.
33. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Engl J Med 2000; 342:710-21.
34. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. Antimicrob Agents Chemother 1992b; 36:2005-08.
35. Perichon B, Reynolds PE, Courvalin P. VanD type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4349. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2016-18.
36. Fines M, Perichon B, Reynolds P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2161-64.

37. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3224-28.
38. Edmond MB. Multidrug-resistant enterococci and the threat of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. In: Wenzel RP. *Prevention and control of nosocomial infections*, 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997.p.339-55.
39. Nicas TI, Cole CT, Preston DA. Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1477-81.
40. Arthur M, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasm peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol Microbiol* 1996; 21:33-44.
41. Iwen PC, Kelly DM, Linder J. Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood over a period of eight years. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:494-95.
42. Woodford N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. *J Med Microbiol* 1998; 47:849-62.
43. Arthur M, Reynolds PE, Depardieu F. Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *J Infect Dis* 1996; 32:11-16.
44. Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:10-15.
45. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin- United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51:565-67.
46. Moellering RC Jr. *Enterococcus spp, Streptococcus bovis* and *Leuconostoc spp*. In Mandell GL, Bennett JE and Dolin R. *Principles and practice of infectious diseases*, 5^a ed. New York: Churchill Livingstone;2000.p.2147-52.

47. Aarestrup FM, Butaye P, Witte W. Nonhuman Reservoirs of Enterococci. In: The Enterococci, pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington, DC: ASM Press; 2002.p.55-100.
48. Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environment surfaces. Infect Control Hosp Epidemiol 1995; 16:577-81.
49. Livornese LLJ, Dias S, Samel C. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. Ann Intern Med 1992; 117:112-16.
50. Bates J, Jordens Z, Selkon JB. Evidence of an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1993; 342:490-91.
51. Climo MW, Archer GL, Monroe S. Vancomycin-resistant Gram-positive pathogens: potential approaches for prevention and control. In: Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections, 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 2003.p.169-85.
52. Pantosti A, Del Grosso M, Tagliabue S. Decrease of vancomycin-resistant enterococci in poultry meat after avoparcin ban. Lancet 1999; 354:741-42.
53. Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis 1992; 14: 1173-8.

Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp:

Molecular Typing, Clinical Characterization and its Association with Mortality

Ana Maria Sandri* , Mário Bernardes Wagner, Afonso Luis Barth*****

*M.D., Infectologist; Assistant Professor in the Departamento de Medicina Interna da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

** PhD in Epidemiology. Associate Professor in the Departamento de Medicina Social da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Associate Professor in the Departamento de Medicina Interna da PUCRS. Head of the Epidemiology and Biostatistics Service.

*** PhD in Clinical Microbiology. Head of the Biomedical Research Unit in the Clinical Pathology Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Associate Professor in the Departamento de Análises da UFRGS. Permanent Professor in the Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS.

This study was performed at Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre and at Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, supported by FIPE- Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Requests for off-prints to Ana Maria Sandri, M.D., Serviço de Controle de Infecção do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6690, Porto Alegre- Rio Grande do Sul, Brazil. CEP 90610-000 E-mail: amsandri@aol.com.

ABSTRACT

The presence of *Enterococcus* spp with a pattern of resistance to vancomycin (VRE) for the first time in the state of Rio Grande do Sul, at a 600-bed university hospital, led to this study. A controlled historical cohort was studied to evaluate the clinical importance of VRE by analyzing the clinical and demographic profile of the patients involved and the mortality associated to the presence of this germ. A second study, with a cross-sectional design, was performed in order to investigate how the VRE is disseminated. The clinical stage was performed at Hospital São Lucas, an University Hospital of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS-Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) and the laboratory work was done at the Biomedical Research Unit of the Clinical Pathology Service (Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The first study included 317 patients, 107 of whom with isolated VRE and 207 in whom VRE had not been isolated. Total length of hospitalization and total length of stay in the Intensive Care Unit (ICU), number of associated hospital infections (HI), antimicrobial consumption and isolation of other germs in clinical materials were morbidity factors that attained statistical significance in bivariate analysis. Mortality was evaluated in a logistic regression model with an odds ratio (OR) adjusted for age, gender, length of stay in the ICU, surgeries performed, HI development, use of mechanical ventilation and total parenteral nutrition. Comparisons were made categorizing the patients with VRE according to the source of their isolation (rectal swab, urine/secretions, blood) and using as control, patients without VRE. Only the presence of VRE in the blood presented a higher risk of mortality as compared to the general group of patients without VRE (OR, 3.67; CI 95%, 0.88 to 15.39). To define the form of germ dissemination, a molecular typing of 47 samples of VRE from patients in the study was done. DNA macrorestriction was performed, followed by pulsed field gel

electrophoresis. A single clone was identified in 93.5% of the samples, characterizing a common source with later horizontal dissemination of the bacteria. Our study demonstrates that the presence of VRE is related to higher morbidity and that it presents an association with mortality when isolated in the blood. The form of clonal dissemination of VRE was clearly determined, which means that measures must be taken to block the epidemiological contact and contain the outbreak.

Key Words: *Enterococcus* spp.; vancomycin-resistant *Enterococcus* spp (VRE); vancomycin; pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

INTRODUCTION

Enterococci are facultative anaerobes that are part of the normal intestinal microbiota of most mammals and birds, and can also be found in soil, plants and water (1,2). They are less virulent as compared to other Gram-positive germs such as *S. aureus*, for instance; however, they are an organism with a capacity for survival under environmental conditions that are generally deleterious to other species (3, 4). Their capacity to colonize for long periods, to survive in inanimate objects, and to be intrinsically resistant to multiple antibiotics ensure their success as a nosocomial pathogen (3). Genus *Enterococcus* currently covers 23 species of which *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are most often found, corresponding to 80-90% and 5-10% of the clinical isolates, respectively (2,5). This proportion has undergone modifications in the last few years, with increased participation of *E. faecium* and reduction of *E. faecalis*, although in Latin America, as compared to Canada, the United States, Europe and Asia, this situation is less often observed (6). The frequency of enterococci participation in hospital infections has increased substantially. Data from the SENTRY antimicrobial surveillance program of 1997 showed *Enterococcus* spp as the fourth cause of hospital bacteremias in the United States and in Canada (9.1 to 9.6% of the bloodstream infections); in Latin America, again, the situation observed is different, the enterococci having been identified in only 2.9% of the bacteremias (6). The impact of this multiresistant pathogen was intensified with the emergence of resistance to vancomycin, identified for the first time in 1986 (7,8). In Brazil, the first case of infection caused by vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.(VRE) occurred in 1996 in the state of Paraná (9), and from 1997 onwards in the city of São Paulo (10). In Rio Grande do Sul, VRE was isolated for the first time in May 2000 in a surgical site in a patient submitted to heart surgery(11). The participation of VRE in the hospital statistics has grown disquietingly since its onset. According to data from the National

Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS) in the United States the frequency with which it was isolated was 0.3 to 7.9% in the open units and 0.4 to 13.6% in the intensive care units (ICU) between 1989 and 1993 (12), reaching 26.3% in 2000 in the ICUs (13). The risk factors most frequently described for the rise of VRE are previous use of antimicrobials, especially vancomycin, third-generation cephalosporins and anaerobicides (14, 15). However, the growing prevalence of this microorganism has been more widely related to its clonal dissemination to patients in hospital, from potential reservoirs than to being secondary to mutations resulting from antimicrobial exposure (3). The isolation of *S. aureus* with intermediate resistance to vancomycin (16), described for the first time in 1996, added to the prevailing questions. The possibility of *in vitro* transfer of *vanA* resistance genes from enterococcus to *S. aureus*, or to other Gram-positive microorganisms had already been demonstrated by means of conjugation plasmids (17). The *in vivo* transmission of this resistance, although expected, had its first report suggested in May 2002 when the first case of infection caused by *S. aureus* with complete resistance to vancomycin, VRSA (MIC > 128 ug/mL) was described (18). Cultures identified the concomitant presence of VRE and the analysis of VRSA identified the presence of gene *vanA*, thus suggesting its transmission (18).

Considering this scene and the lack of local data, the purpose of our study was to make a more detailed evaluation of cases in which VRE was isolated, identifying the clinical characteristics of the patients involved, the form of germ dissemination and its association with mortality.

MATERIALS AND METHODS

COHORT STUDY

A controlled historical cohort was performed to characterize the patients involved in this study clinically. The research study was performed at Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS), a 600-bed tertiary-level teaching institution. The period of the study was from May 2000, when the VRE was isolated for the first time in the General Intensive Care Unit (GICU) of this hospital, to May 2002. The GICU is a unit with 14 beds, to which adult patients with clinical or surgical pathologies are admitted. The study involved a sequential sample of all the patients hospitalized in the GICU for a period equal to or greater than 24 hours, and in whom VRE had been isolated and its controls were patients selected randomly, who had been hospitalized in the same unit and period and in whom VRE was not detected. Routinely, since VRE first appeared, all patients who are hospitalized in this ICU have been submitted to rectal swab (RS) to search for this bacterium at the time of admission, every seven days and when they are discharged. The VRE isolates included in this study came from the surveillance rectal swab, and from the clinical materials sent to the Microbiology Laboratory.

Demographic and clinical data on all patients were evaluated, beginning with the review of the admission records. Only the admission in which VRE was isolated for the first time was considered for evaluation in this study; previous or later hospitalizations were not reviewed. Patients who had been hospitalized at other hospitals in the previous three months were excluded, because they might have presented associated morbidity factors or even already have VRE. The data surveyed included age, gender, total length of hospitalization and stay in the GICU, associated hospital infections (HI), positive clinical cultures besides VRE, length of antimicrobial use, number of antimicrobials used, surgeries performed, comorbidities (AIDS,

diabetes, neoplasm, Central Nervous System diseases, Cardiovascular diseases and cirrhosis), length of mechanical ventilation, length of use of total parenteral nutrition and mortality. To improve data characterization the positive cultures were described according to their origin. No severity scales were used due to the fact that the data available did not always fulfill the necessary requirements. Hospital infections were described according to the criteria of the National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS, 2000) (13). Only a single positive clinical culture, for the same microorganism, in a period of less than three days, was considered for a same patient.

CROSS-SECTIONAL STUDY

A cross-sectional study was performed to define the genotypic profile of the enterococci involved in the study.

The isolation of *Enterococcus* spp. and its characterization as a genus were done in the Laboratory of Microbiology at HSL/PUCRS using conventional tests. Enterococci isolated from a rectal swab were tested for sensitivity with the disk-diffusion method (Kirby-Bauer) only for ampicillin and vancomycin, according to a routine established with the Infection Control Service, strictly for the purpose of epidemiological investigation and the definition of epidemiological block measures. The sensitivity of enterococci from clinical samples was evaluated using the disk diffusion method for the following antimicrobials: ampicillin, penicillin, ciprofloxacin, gentamicin/streptomycin (high degree of resistance) and vancomycin; norfloxacin and nitrofurantoin were added when urine was the material studied. The categorization of the samples as sensitive, intermediate or resistant was performed according to the criteria established by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002) (19). Samples considered vancomycin-resistant in the disk-diffusion test were confirmed by determining the minimum inhibitory concentration of the antibiotic using the E-test technique.

Molecular Typing (genotyping) with DNA macrorestriction

The genotypic profile was determined at the Biomedical Research Unit of the Clinical Pathology Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Samples of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. of the patients studied, from clinical materials and rectal swabs taken for surveillance purposes were tested. For comparison purposes, a few samples of vancomycin-sensitive *Enterococcus* spp were also studied. The bacterial DNA macrorestriction technique was used, followed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

1. DNA Preparation

The genomic DNA of the enterococci samples analyzed was prepared in agarose blocks according to the protocol described by Kaufmann et al (20), with a few modifications. Having obtained the colonies, after 24 hours of growth in blood agar, a bacterial suspension of approximately 10^9 UFC/mL for each sample was prepared. These suspensions were resuspended in 300 μ L of SE buffer (75 mM NaCl and 25 mM EDTA Na₂ (pH 7.5) and mixed in an equal volume of agarose with a low fusion point at 2% (GIBCO BRL, New York), in a water bath at 56°C. The mixture was placed in a mold for 100 μ L agarose blocks (Bio-Rad, California). After solidification, the agarose blocks were sequentially incubated in the following solutions and for the lengths of time indicated: 1.5 mL lysis buffer (6mM Tris-HCl, 100 mM EDTA [pH 7.5], 1 M NaCl, 0.5% Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium lauryl sarcosine) containing lysozyme at 1800 μ g/mL (Sigma, St. Louis) and lysostaphin at 10 U/ μ L (Sigma, St. Louis) overnight at 37°C; 2 X 1.5 mL of proteolysis buffer with proteinase K (GIBCO BRL, New York) at 50 mg/mL (0.5 M EDTA [pH 9.5], 1% sodium lauryl sarcosine), which were mixed at the time of use and later incubated for 24 hours at 56°C; and 1.5 mL of diluted TE buffer (10 mM Tris (hydroxymethyl) methylamine, 10 mM EDTA Na₂[pH 7.5])

for 10 minutes at 4°C. The blocks were washed 4 times with TE buffer for 10 minutes at 4°C to inactivate proteinase K. After washings, the agarose blocks were finally stored at 4°C until digestion with a restriction enzyme.

2. DNA Digestion

Before the digestion of bacterial DNA with the restriction enzyme, the agarose blocks were cut with a sterilized scalpel. One third of these blocks were placed in appropriately numbered Eppendorfs, containing 98 µL of reaction buffer and incubated at 4°C for 30 minutes.

The reactions were performed adding 98 µL/solution isolate containing 10 U of the *Sma*I restriction enzyme, as indicated by the manufacturer (GIBCO BRL, New York). Digestion was performed for 20 hours in a 30°C water bath. After digestions, the samples were applied in the gel to perform PFGE.

3. PFGE

The already digested DNA blocks were applied in the respective agarose gel wells at 1%. A 50 to 1000 kb molecular weight marker (Sigma, ST. Louis) was applied to the extremities of the gel. The macrorestriction fragments were separated by the commercial pulsed gel electrophoresis (CHEF-DR® II; Bio-Rad, California). Electrophoresis was performed in a TBE 0.5x buffer (TBE 10x was prepared using 44.5 mM Tris [pH 7.4], mM EDTA and 44.5 mM boric acid) at 14°C. The conditions for the action of *Sma*I in PFGE required a programmed migratory run alternating electric current and an initial pulse of 5 and final one of 30 seconds, for a 22-hour period at 5.9 V/cm. Once electrophoresis was finished, the gel was stained in 500 mL of distilled water containing 1 µg of ethidium bromide per mL (GIBCO BRL, New York). The discoloration involved 3 washings with distilled water, every 30 minutes each. The DNA

bands were viewed under ultraviolet light and the images were recorded using a Polaroid® camera.

DATA ANALYSIS

The demographic and clinical characteristics were described for the group of patients with VRE isolation (exposed) and for the group of patients without VRE isolation (non-exposed), by using the absolute and percentile number for the categorical variables and mean \pm standard deviation or median (interquartile range: P25-P75) for the continuous variables. The P value was calculated using the χ^2 test for the categorical variables and analysis of variance (ANOVA) for the quantitative variables. In situations with significant difference, *post hoc* procedures for ANOVA and for χ^2 were performed. The logistic regression model was used to evaluate the mortality between the two groups adjusted for potential bias.

The level of significance adopted was $\alpha = 0.05$. The statistical analyses were performed using SPSS, version 10.0.

ETHICAL CONSIDERATIONS

The study was approved by the Committee for Ethics in Research at HSL/PUCRS. It was not found necessary to have a letter of informed consent, since no additional tests were made beyond the usual routine at the institution. The data collected were demographic and clinical information and bacterial samples, so that the patient privacy was maintained.

RESULTS

1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERIZATION

Initially, 116 patients with VRE and 220 without VRE were eligible for the study. Among the group of exposed patients, nine were excluded due to incomplete data when the records were reviewed, and in the non-exposed group thirteen were excluded for the same reason. A total of 314 patients was evaluated, 107 with VRE and 207 without VRE.

The results of bivariate analysis with the demographic and clinical characteristics of the patients according to the presence or not of VRE have been described in table 1. The patients with VRE were stratified according to the material from which it was isolated, prioritizing blood, followed by secretion/urine and, finally, rectal swab. The secretions basically include surgical site, lesion, bedsore and peritoneal, pleural, synovial and pericardial materials. The secretions and urine were put at the same group. The variables that had statistical significance in bivariate analysis were total length of hospital stay, length of stay in the GICU, the number of patients developing hospital infection, the concomitant presence of other germs; the length of use of antibiotics and the mean of antimicrobials used. The following variables were not statistically relevant in the present study: performing surgical procedures, the presence of debilitating diseases such as AIDS, diabetes, neoplasm, cirrhosis and diseases of the Central Nervous System and Cardiovascular System and the use of Mechanical Ventilation and Total Parenteral Nutrition.

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of patients with and without VRE.

Characteristics	VRE-RS n=76	VRE-URO+SEC n=16	VRE-HEMO n=15	n-VRE n=207	P
Age, years	59,9 ± 20,2	61,6 ± 20,6	65,5 ± 17,2	57,8 ± 19,7	0.43
Female	38 (50,0)	9 (56,3)	8 (53,3)	98 (47,3)	0.87
Length of hospitalization (days)	35,5 (23,5 – 52,7) ^a	35,5 (17,7 – 126,5) ^{a,b}	37,0 (27,0 – 77,0) ^a	24 (13,0 – 38,0) ^b	<0.01
Length of stay in ICU (days)	16,0 (7,5 – 31,7) ^a	11,5 (2,0 – 26,5) ^a	16,0 (2,0 – 31,0) ^a	10,0 (6,0 – 19,0) ^b	0.01
Patients with HI	62 (81,6) ^{a,b}	13 (81,3) ^{a,b}	15 (100,0) ^a	138 (66,7) ^b	<0.01
Patients with germs isolated in					
blood culture	41 (53,9) ^a	5 (31,3) ^{a,b}	9 (60,0) ^{a,b}	64 (30,9) ^b	<0.01
urine culture	28 (36,8) ^a	4 (25,0) ^{a,b}	6 (40,0) ^{a,b}	42 (20,3) ^b	0.03
secretion	52 (68,4) ^a	9 (56,3) ^{a,b}	8 (53,3) ^{a,b}	99 (47,8) ^b	0.02
Length of antibiotics use: days	23,5 (8,0 – 44,5) ^a	33,0 (11,5 – 82,7) ^{a,b}	29,0 (22,5 – 97) ^{a,b}	37,0 (14,0 – 65,5) ^b	0.03
Number of antibiotics used	5,0 (3,0 – 7,0) ^a	5,5 (2,0 – 9,7) ^{a,b}	6,0 (5,0 – 8,0) ^a	4,0 (2,0 – 6,0) ^b	<0.01
Patients exposed to surgeries	42 (55,3)	9 (56,3)	10 (66,7)	105 (50,7)	0.07
Comorbidities					
AIDS	1 (1,3)	2 (12,5)	0 (0,0)	9 (4,3)	0.16
DM	17 (22,4)	4 (25,0)	2 (13,3)	27 (13,0)	0.22
Neoplasm	17 (22,4)	6 (37,5)	8 (53,3)	62 (30,0)	0.11
CNS diseases	23 (30,3)	4 (25,0)	5 (33,3)	63 (30,4)	0.96
CV diseases	50 (65,8)	8 (50,0)	6 (40,0)	111 (53,6)	0.16
Cirrhosis	2 (2,6)	0 (0,0)	1 (6,7)	6 (2,9)	0.66
Mechanical Ventilation	59 (78,7)	8 (50,0)	10 (66,7)	154 (74,4)	0,14
Total Parenteral Nutrition	12 (15,8)	4 (25,0)	3 (20,0)	33 (15,9)	0,81
Number of deaths	37 (48,7)	6 (37,5)	11 (73,3)	105 (50,7)	0.23

The data are presented as nr.(percentage), mean ± standard deviation or median (interquartile range :P25-P75).VRE-RS: subgroup of patients with vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.isolated only in rectal swab; VRE-URO+SEC: subgroup of patients with VRE isolated in the urine or in secretions (who may have VRE in a RS); VRE-HEMO: subgroup of patients with VRE isolated in a blood culture (may have VRE in a RS or in urine/secretion); n-VRE: patients without vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.; ICU: intensive care unit; HI: hospital infection; AIDS- Acquired Immunodeficiency Syndrome; DM: Diabetes Mellitus; CNS diseases: Central Nervous System diseases; CV diseases: Cardiovascular System diseases. PS:The same superscript letters (a, b, c) indicate values with no statistical significance (P > 0,05) in *post hoc* test.

2. RISK OF DEATH

The risk of death for each group was established using the logistic regression model, as shown in table 2. In order to control possible biases, the variables in table 1 were selected according to clinical relevance. Using multivariable analysis, it was found that the presence of VRE in a rectal swab and urine/secretions was not a risk factor for death compared to patients without VRE. However, after adjusted for many biases, the presence of VRE in the blood presented a substantially higher mortality compared to patients without VRE, unless the classic significance was not achieved (P= 0.076).

Table 2. Evaluation of the association between the presence of VRE and death

Bacteria	n	Death		ORadj	CI95%	P
		f	%			
n-VRE	207	105	50.7	-		
VRE-RS	76	37	48.7	0.77	0.41-1.47	0.43
VRE-URO+SEC	16	6	37.5	0.72	0.19-2.67	0.62
VRE-HEMO	15	11	73.3	3.67	0.88-15.39	0.076

n-VRE: patients without vancomycin-resistant *Enterococcus* spp.; VRE-RS: patients with isolation of VRE only in a rectal swab; VRE-URO+SEC: presence of VRE in secretions and urine culture (it may also be present in a RS); VRE-HEMO: presence of VRE in the blood (it may also be present in a RS and urine/secretions); OR adj.: adjusted odds ratio in a logistic regression model containing the factors gender, age, surgery, hospital infection; length of stay in the Intensive Care Unit; mechanical ventilation and use of total parenteral nutrition.

3. MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* was identified in 106 patients and *Enterococcus gallinarum* in one patient, all of them being sensitive to ampicillin. No case of *Enterococcus faecium* was identified. The first VRE isolated in the patients was from a rectal swab in 79 cases and from clinical materials in 28 cases (secretion in 6 cases, blood in 12 cases and urine in 10 cases). In some patients in whom VRE was initially isolated in a rectal swab, VRE was later identified in clinical materials, i.e.: 2 in secretion, 3 in urine and 3 in blood. The mean number of days elapsed between hospitalization in the GICU and the isolation of VRE was 13.4 days. Vancomycin-sensitive *Enterococcus faecalis* (VSE) was identified in 140 patients, 111 of which in a rectal swab and 29 in clinical material (12 in secretion, 10 in urine and 7 in blood). Of these 140 patients with isolated VSE, 30 also presented isolation of VRE during the same hospital stay.

Molecular typing was done of 47 samples of VRE, 37 of which were from a rectal swab, 5 from secretion, 4 from blood and 1 from urine. The genotype of sample 97 could not be determined, since it did not present a migratory profile after being digested with the *Sma*I enzyme. Homogeneous migratory profiles could be observed among the VRE evaluated. The analysis of interpatient migratory profiles indicated an identical profile in 39 samples, because they did not present any visible difference between the bands, called profile A. Three samples showed themselves to be closely related to the first of these, because they were distinguished only into two bands that were called genotype A1. Sample 80 was characterized as a subclone with genotype A2, since it presented a difference in three bands as to profile A. Samples 162, 175 and 85, presented migratory profiles with more than seven different bands, and were considered different from the standard clone and called B,C, D, respectively. The discriminatory power of PFGE was evaluated by comparing the samples of VRE to

samples of VSE at HSL/PUCRS. The strain of VSE, presented different migratory profiles in relation to clone A (and its subclones).

Table 3 - Distribution of isolates of VRE from 47 patients according with its macrorestriction profile.

Sample	Specimen	Date ^b	Macrorestriction Profile ^c
77	RS	19/12/00	A
78	RS	18/11/00	A
81	RS	01/02/01	A
82	RS	06/03/01	A
83	RS	07/03/01	A
84	RS	19/02/01	A
86	RS	12/02/01	A
88	RS	28/11/00	A
89	RS	13/03/01	A
91	RS	23/02/01	A
92	RS	20/02/01	A
93	RS	07/02/01	A
94	RS	15/01/01	A
95	RS	12/02/01	A
97	RS	12/02/01	NT ^d
98	RS	26/03/01	A
159	Secretion	12/07/00	A
160	Secretion	12/06/00	A
161	Blood	10/05/00	A
165	RS	12/12/00	A
166	RS	26/12/00	A
167	Secretion	10/11/00	A
168	RS	12/12/00	A
169	RS	19/12/00	A
171	RS	21/12/00	A
173	RS	01/12/00	A
174	Blood	22/05/01	A
176	Blood	21/12/00	A
177	RS	28/11/00	A
182	RS	31/10/00	A
183	Secretion	10/10/00	A
184	RS	07/11/00	A
185	RS	31/10/00	A
186	RS	29/08/00	A
187	RS	10/10/00	A
188	RS	25/07/00	A
189	RS	25/07/00	A
190	RS	07/11/00	A
191	RS	22/08/00	A
197^e	Secretion	10/05/00	A
79	RS	19/12/00	A ₁
90	RS	16/01/01	A ₁
170	RS	19/12/00	A ₁
80	RS	11/02/01	A ₂
162	Urine	10/05/00	B
175	Blood	25/08/00	C
85	RS	19/02/01	D

^a RS: material from rectal swab . ^b Date: day, month and year when the material was collected. ^c The letters A, B, C, D, represent PFGE migration profiles; the numbers after the letters represent the subtypes; ^d Not typeable due to excessive DNA degradation; ^e Index-case.

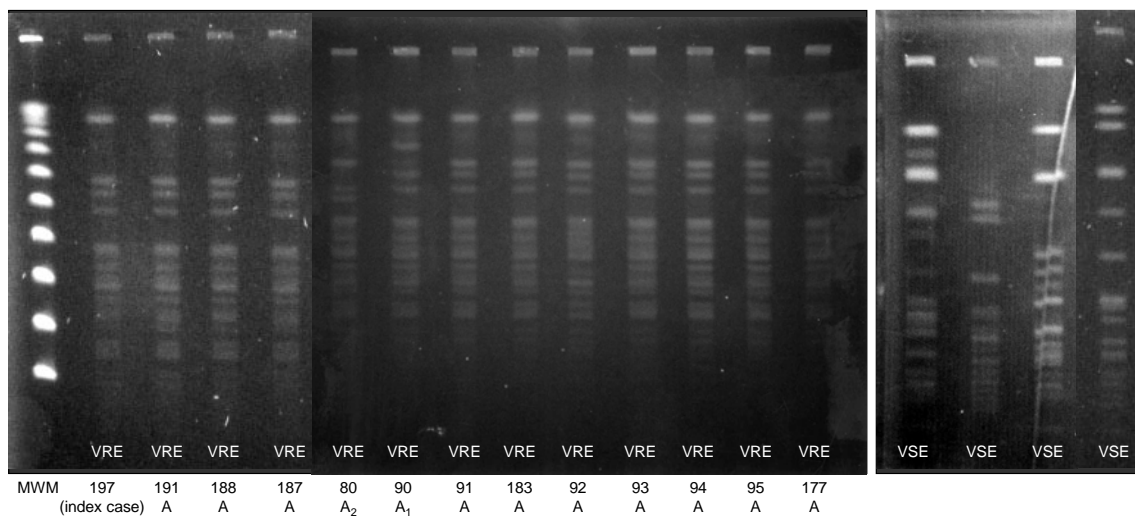


Figure: DNA macrorestriction profile of *Enterococcus faecalis* samples by PFGE.

MWM = molecular weight marker

VRE = Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*;

VSE = Vancomycin-sensitive *Enterococcus faecalis*.

DISCUSSION

This study described the clinical profile of patients with VRE, and looked at its clinical importance measured by risk of death, besides explaining how it is disseminated.

Analyzing the results achieved, we found that the presence of VRE is related to greater morbidity evaluated by a longer hospitalization (total and in the Intensive Care Unit), by higher consumption of antimicrobials, a greater number of hospital infections as well as a greater number of other germs isolated. All these factors are interdependent since, insofar as a patient stays longer in hospital, he is also exposed to a greater number of germs (including VRE) and, consequently to developing more HI and to consuming more antimicrobials. There is no way of concluding that VRE is the cause or consequence of this process; the tendency is to consider it simply a marker of severity (3, 21).

In the association between VRE and death, the significance found indicates that bacteremia due to VRE presents a higher mortality as compared to a control group without VRE. This information is perfectly justifiable insofar as we are comparing patients who have a germ in their blood to patients in clinical situations that include or not other germs besides VRE in the blood culture. The literature is not unanimous about this, and the mortality risk associated with bacteremia due to VRE varies according to study design, selection of controls and species studied (3, 22, 23). Colonization by VRE (presence in the rectal swab) and its presence in secretions and urine were not related to increased mortality. The evolution of a patient with VRE colonization to infection by the same occurred in 10% of the cases, 3.8% of which in bacteremia. This low rate may be due to the fact that we have analyzed only a single

hospitalization, because we know that VRE colonization can be maintained for long periods, and infection may occur only at a later point (22).

The identification of *E. faecalis* in practically all samples, and the lack of isolation of *E. faecium* is partly different from the distribution profile seen in the state of São Paulo and in American and European hospitals where, although *E. faecalis* is still predominant, *E. faecium* has been increasingly isolated, reaching 19.3% of the clinical isolates (6). Horizontal dissemination (person to person) of VRE was clearly defined by molecular typing in which the preponderant presence of a clone was identified, suggesting a common source. Infection control measures to be established in this dissemination model should emphasize precautions regarding contact, involving the use of barriers such as gloves, clothing, establishing cohorts, encouraging the washing of hands and appropriate cleansing: the modification of the antimicrobials consumed is not a priority in this situation (24).

In summary, the present study demonstrates that VRE is present in patients with greater morbidity and it does not increase mortality when present only as a colonizer. However, they are at increased risk of VRE bacteremia and its complications, including higher mortality rates, although the study was not powered to evaluate the last statement. The clonal dissemination of the bacteria is supported by its ability to survive long-term in the ambient, as well as by breaks in strict infection-control practices. As such, all hospitals should be encouraged to maintain an active program in epidemiologic vigilance, including DNA testing if necessary, in order to allow early detection of VRE cases. This integrative approach will permit timely preventive measures to be taken in order avoid further VRE spreading into the hospital and community.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thanks to the Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS for the samples and to the Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do HCPA, specially to the Biochemicals Daniela de Souza Martins and Larissa Lutz for the realization of the PFGE.

REFERENCES

1. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev 1990; 3:46-65.
2. Facklam RR, Carvalho MG, Teixeira L. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore MS. The enterococci- pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington, DC: ASM Press; 2002.p.1-54.
3. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, Johnson CN et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. J Hosp Infect 2003; 53:159-71.
4. Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis 1992; 14:1173-78.
5. Climo MW, Archer GL, Monroe S. Vancomycin-resistant Gram-positive pathogens: potential approaches for prevention and control. In: Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections,4rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 2003.p.169-85.
6. Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32(Suppl. 2):S133-S145.
7. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988; 1:57-58.
8. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988; 319:157-61.

9. Costa LM, Souza DC, Martins LTF, Zanella RC, Brandileone MC, Bokermann S, Sader HS et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brasil. Braz J Infect Dis 1998; 2:160-63.
10. Zanella RC. Análise Molecular de *Enterococcus* e dos elementos VanA que mediam resistência à vancomicina, isolados na casa de Saúde Santa Marcelina-São Paulo/SP, em 1998. Tese de Doutorado. Instituto Adolfo Lutz 2000. São Paulo/SP.
11. d'Azevedo PA, Kacman SB, Schmalfuss SB, Rodrigues, LF. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente à vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. Anais do 34º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial 2000.p.140.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin- United States 1989-1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993; 42:597-99.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS) report, data summary from January 1992-June 2001. AmJ Infect Control 2001; 29:404-21.
14. Boyle JF, Soumakis AS, Rendo A. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1993; 31:1280-85.
15. Lautenbach E, Bilker WB, Brennan PJ. Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20:318-23.
16. Hiramatsu K. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med 1998; 104:7S-10S.
17. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:1563-71.

18. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin- United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51:565-67.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, Pa; 2002. Twelfth Informational Supplement M100-S12.
20. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Woodford N, Johnson AP. Molecular Bacteriology, Protocols and Clinical Applications. New Jersey: Humana Press Inc; 1998.p.33-62.
21. Edmond MB. Multidrug-resistant enterococci and the threat of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. In: Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections, 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997.p.339-355.
22. Garbutt JM, Ventrappagada M, Littenberg B, Mundy LM. Association between resistance to vancomycin and death in cases of *Enterococcus faecium* bacteremia. CID 2000; 30:466-72.
23. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2000; 13:513-22.
24. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1995; 44:1-13.

***Enterococcus* spp. Resistente à Vancomicina:**

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E ASSOCIAÇÃO COM MORTALIDADE

Ana Maria Sandri*, Mário Bernardes Wagner, Afonso Luís Barth*****

*Médica Infectologista; Professora Auxiliar de Ensino do Departamento de Medicina Interna da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

**PhD em Epidemiologia. Professor do Departamento de Medicina Social da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Professor do Departamento de Medicina Interna da PUCRS. Chefe do Serviço de Epidemiologia e Bioestatística do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

***PhD em Microbiologia Clínica. Chefe da Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Professor Adjunto do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Professor Permanente do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS.

Este trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do HCPA e no Hospital São Lucas da PUCRS, apoiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) do HCPA.

Pedidos de separatas para a Médica Ana Maria Sandri, Serviço de Controle de Infecção do Hospital São Lucas da PUCRS, Avenida Ipiranga, 6690, Porto Alegre- Rio Grande do Sul, Brasil. CEP. 90610-000. E-mail: amsandri@aol.com

RESUMO

O isolamento de *Enterococcus* spp. com padrão de resistência à vancomicina (ERV) pela primeira vez no Estado do Rio Grande do Sul, em um hospital universitário de 600 leitos, mobilizou a realização deste trabalho. Foi feita uma coorte histórica controlada para avaliação da importância clínica do ERV através da análise do perfil clínico e demográfico dos pacientes envolvidos e da mortalidade associada à presença desse germe. Um segundo estudo, com delineamento transversal, foi conduzido com o objetivo de esclarecer a forma de disseminação do ERV. A etapa clínica foi realizada no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e a laboratorial, na Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram incluídos 317 pacientes no primeiro estudo dos quais 107 com isolamento de ERV e 207 sem isolamento de ERV. Tempo de internação total e na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), número de infecções hospitalares (IH) apresentadas, consumo de antimicrobianos e isolamento de outros germes associados, além do ERV, em materiais clínicos, foram fatores de morbidade que atingiram significância estatística na análise bivariada. A mortalidade foi avaliada em modelo de regressão logística com *odds ratio* (OR) ajustado para idade, gênero, tempo de internação na UTI, realização de cirurgias, desenvolvimento de IH, uso de ventilação mecânica e de nutrição parenteral total. Foram comparados pacientes com ERV em *swab* retal, urina/secreções e sangue a pacientes sem ERV. Apenas a presença do ERV no sangue apresentou um maior risco de mortalidade quando comparado com o grupo geral de pacientes sem ERV, apesar de não atingir significância clássica ($P = 0,076$). Para a definição da forma de disseminação do germe foi feita tipagem molecular de 47 amostras de ERV procedentes de pacientes do estudo. Foi realizada macrorrestrrição do DNA seguida de eletroforese em campo

pulsado. Um único clone foi identificado em 93,5% das amostras, caracterizando uma fonte comum com posterior disseminação horizontal da bactéria. Nosso estudo demonstra que a presença do ERV está relacionada com uma maior morbidade e que apresenta associação com mortalidade quando isolado no sangue. A forma de disseminação clonal do ERV ficou claramente determinada o que implica ênfase em medidas de bloqueio epidemiológico para a contenção do surto.

Palavras-chave: *Enterococcus* spp.; *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (ERV); vancomicina; eletroforese de campo pulsado (PFGE).

INTRODUÇÃO

Os enterococos são anaeróbios facultativos que fazem parte da microbiota intestinal normal da maioria dos mamíferos e pássaros podendo ser encontrados, também, no solo, nas plantas e na água (1, 2). Apresenta uma menor virulência se comparado a outros germes Gram-positivos como o *S. aureus*, por exemplo; no entanto, é um organismo com capacidade de sobrevivência em condições ambientais geralmente deletérias para outras espécies (3, 4). Sua capacidade de permanecer como colonizante por longos períodos, de sobreviver em objetos inanimados e de ser intrinsecamente resistente a múltiplos antibióticos garante seu sucesso como patógeno nosocomial (3). O gênero *Enterococcus* atualmente compreende 23 espécies das quais o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium* são as mais encontradas correspondendo a 80 a 90% e 5 a 10% dos isolados clínicos, respectivamente (2, 5). Essa proporção tem sofrido modificações nos últimos anos com aumento da participação do *E. faecium* e diminuição do *E. faecalis*, embora na América Latina, comparativamente ao Canadá, Estados Unidos, Europa e Ásia, esta situação seja menos observada (6). A frequência da participação do enterococo nas infecções hospitalares tem aumentado substancialmente. Dados do programa de vigilância de antimicrobianos SENTRY de 1997 mostraram o *Enterococcus* spp. como a quarta causa das bacteremias hospitalares nos Estados Unidos e no Canadá (9,1 a 9,6% das infecções de corrente sanguínea); na América Latina, novamente, a situação observada é diferente com o enterococo, tendo sido identificado em apenas 2,9% das bacteremias (6). O impacto deste patógeno multirresistente foi intensificado com a emergência de resistência à vancomicina, identificada pela primeira vez em 1986 (7, 8). No Brasil, o primeiro caso de infecção por enterococo resistente à vancomicina (ERV) ocorreu em 1996, no Estado do Paraná (9), e a partir de 1997, na cidade de São Paulo (10). No Rio Grande do Sul, o primeiro isolamento de ERV ocorreu em maio

de 2000 em sítio cirúrgico de um paciente submetido à cirurgia cardíaca (11). A participação do ERV nas estatísticas hospitalares tem crescido de forma inquietante desde o seu surgimento. Conforme dados do *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNISS) dos Estados Unidos, a frequência de seu isolamento foi de 0,3 a 7,9% nas unidades abertas e de 0,4 a 13,6% nas unidades de terapia intensiva (UTI) entre 1989 e 1993 (12) chegando a 26,3% em 2000 nas UTIs (13). Os fatores de risco mais freqüentemente descritos para o surgimento do ERV são a utilização prévia de antimicrobianos, principalmente vancomicina, cefalosporinas de terceira geração e anaerobicidas (14, 15). No entanto, a crescente prevalência desse germe tem sido mais amplamente relacionada a sua disseminação clonal em pacientes hospitalizados a partir de reservatórios potenciais, do que secundária a mutações decorrentes da exposição antimicrobiana (3). O isolamento de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (16), descrita pela primeira vez em 1996, trouxe acréscimo aos questionamentos vigentes. A possibilidade da transferência *in vitro* dos genes de resistência *vanA* do enterococo para o *S. aureus* ou para outros microrganismos Gram-positivos já havia sido demonstrada através de plasmídios de conjugação (17). A transmissão dessa resistência *in vivo*, embora esperada, teve seu primeiro relato sugerido em maio de 2002 quando foi descrito o primeiro caso de infecção causada por *S. aureus* com resistência completa à vancomicina, VRSA (CIM > 128 µg/mL) (18). Culturas identificaram a presença concomitante de ERV, e a análise do VRSA identificou a presença do gene *vanA*, sugerindo, portanto, sua transmissão (18).

Diante deste cenário e da falta de dados no nosso meio, nosso estudo objetivou avaliar mais detidamente os casos com isolamento de ERV, identificando as características clínicas dos pacientes envolvidos, a forma de disseminação do germe e a sua associação com mortalidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

ESTUDO DE COORTE

Foi realizada uma coorte histórica controlada para caracterização clínica dos pacientes envolvidos neste estudo. A pesquisa foi conduzida no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS), Instituição de ensino de nível terciário com 600 leitos. O período do estudo foi de maio de 2000, ocasião em que o ERV foi isolado pela primeira vez na Unidade de Terapia Intensiva Geral (UTIG) desse hospital, até maio de 2002. A UTIG é uma unidade com 14 leitos na qual internam-se pacientes adultos com patologias clínicas ou cirúrgicas. O trabalho envolveu amostra seqüencial de todos os pacientes internados na UTIG por um período igual ou superior a 24 horas e que tiveram isolamento de ERV, sendo seus controles pacientes selecionados aleatoriamente que estiveram internados nessa mesma unidade e mesmo período e nos quais não foi detectado ERV. Rotineiramente, desde o surgimento do ERV, todos os pacientes que se internam nessa UTI são submetidos à técnica de *swab* retal (SR) para pesquisa dessa bactéria no momento da baixa, a cada sete dias e por ocasião da alta. Os isolados de ERV incluídos neste trabalho foram procedentes de SR de vigilância e dos materiais clínicos enviados para o Laboratório de Microbiologia.

Foram avaliados os dados demográficos e clínicos de todos os pacientes a partir da revisão dos prontuários de internação. Foi considerada apenas a internação em que houve o isolamento do ERV pela primeira vez para avaliação neste estudo; internações prévias ou posteriores não foram revisadas. Os pacientes com internação nos últimos três meses em outros hospitais foram descartados pela possibilidade de apresentarem fatores de morbidade associados ou mesmo de já serem portadores de ERV. Os dados levantados incluíram idade, gênero, tempo de internação total e de permanência na UTIG, infecções hospitalares (IH) associadas, culturas clínicas

positivas além do ERV, tempo de uso de antimicrobianos, número de antimicrobianos utilizados, realização de cirurgias, comorbidades (AIDS, diabetes, neoplasia, doenças do Sistema Nervoso Central, doenças do Aparelho Cardiovascular e cirrose), tempo de ventilação mecânica, tempo de uso de nutrição parenteral total e mortalidade. Para melhor caracterização dos dados as culturas positivas foram descritas conforme sua origem. Não foram utilizadas escalas de gravidade porque os dados disponíveis nem sempre preenchem os requisitos necessários. As infecções hospitalares foram caracterizadas conforme os critérios do *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNISS, 2000) (13). Foi considerada apenas uma cultura clínica positiva com o mesmo germe, em um intervalo inferior a três dias, para um mesmo paciente.

ESTUDO TRANSVERSAL

Foi realizado um estudo transversal para a definição do perfil genotípico dos enterococos envolvidos no estudo.

O isolamento do *Enterococcus* spp. e sua caracterização quanto ao gênero foram feitos no Laboratório de Microbiologia do HSL/PUCRS mediante testes convencionais. Os enterococos isolados a partir de SR foram testados quanto à sensibilidade através do método de disco-difusão (Kirby-Bauer) apenas para ampicilina e vancomicina, conforme rotina estabelecida junto com o Serviço de Controle de Infecção, com a finalidade estrita de investigação epidemiológica e definição de medidas de bloqueio epidemiológico. A sensibilidade do enterococo procedente de amostras clínicas foi avaliada através do método de difusão com discos para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, penicilina, ciprofloxacina, gentamicina/estreptomicina (alto grau de resistência) e vancomicina; norfloxacina e

nitrofurantoína eram acrescentadas sendo urina o material em estudo. A categorização das amostras em sensível, intermediária ou resistente foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002) (19). As amostras consideradas resistentes à vancomicina no teste de disco-difusão foram confirmadas pela determinação da concentração inibitória mínima do antibiótico através da técnica do E-test.

Tipagem Molecular (genotipagem) por macrorrestrição do DNA

A determinação do perfil genotípico foi realizada na Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram testadas amostras de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina dos pacientes estudados procedentes de materiais clínicos e de *swab* retal de vigilância. Com finalidade comparativa, foram estudadas, também, algumas amostras de *Enterococcus* spp. sensíveis à vancomicina. Foi utilizada a técnica de macrorrestrição do DNA bacteriano seguida de eletroforese em campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis*- PFGE).

1. Preparação do DNA

O DNA genômico das amostras de enterococos analisadas foi preparado em blocos de agarose de acordo com o protocolo descrito por Kaufmann (20), com algumas modificações. Com a obtenção das colônias, após crescimento por 24 horas em ágar- sangue, foi preparada uma suspensão bacteriana de, aproximadamente, 10^9 UFC/mL para cada amostra. Essas suspensões foram ressuspensas em 300 μ L de tampão SE (75 mM NaCl e 25 mM EDTA Na₂ [pH 7,5]) e misturadas em igual volume de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (GIBCO BRL, Nova Iorque) em banho-maria a 56°C. A mistura foi colocada em um molde para blocos de agarose de 100 μ L (Bio-

Rad, Califórnia). Após a solidificação, os blocos de agarose foram incubados seqüencialmente nas seguintes soluções e tempos indicados: 1,5 mL de tampão de lise (6 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA [pH 7,5], 1M NaCl, 0,5% Brij 58, 0,2% Deoxicolato de sódio, 0,5% Lauril sarcosina de sódio), contendo lisozima a 1800 µg/mL (Sigma, St. Louis) e lisostafina a 10 U/µL (Sigma, St. Louis) em *overnight* a 37°C; 2X 1,5 mL de tampão de proteólise com proteinase K (GIBCO BRL, Nova Iorque) a 50 mg/mL (0,5 M EDTA [pH 9,5], 1% Lauril sarcosina de sódio), os quais foram misturados no momento do uso e, posteriormente, incubados por 24 horas a 56°C; e 1,5 mL de tampão TE diluído (10 mM Tris (hidroximetil) metilamina, 10 mM EDTA Na₂ [pH 7,5]) por 10 minutos a 4°C. Os blocos foram lavados 4 vezes com tampão TE por 10 minutos a 4°C para inativar a proteinase K. Após as lavagens, os blocos de agarose finalmente foram estocados a 4°C até a digestão com enzima de restrição.

2. Digestão do DNA

Anteriormente à digestão do DNA bacteriano com a enzima de restrição, os blocos de agarose foram cortados com bisturi esterilizado. Um terço desses blocos foi colocado em *Eppendorfs*, devidamente numerados, contendo 98 µL de tampão de reação e incubados a 4°C por 30 minutos.

As reações foram realizadas com a adição de 98 µL/isolado de solução, contendo 10 U da enzima de restrição *Sma*I, conforme indicado pelo fabricante (GIBCO BRL, Nova Iorque). A digestão foi realizada durante 20 horas em banho-maria de 30°C. Após a digestão, as amostras foram aplicadas no gel para a realização do PFGE.

3. PFGE

Os blocos de DNA, já digeridos, foram aplicados nos respectivos poços do gel de agarose a 1%. Um marcador de peso molecular de 50 a 1000 kb (Sigma, St. Louis) foi aplicado nas extremidades do gel. Os fragmentos da macrorrestrição foram separados pelo sistema de eletroforese pulsada comercial (CHEF-DR[®]II; Bio-Rad, Califórnia). A eletroforese foi realizada em tampão TBE 0,5x (TBE 10x foi preparado com 44,5 mM Tris [pH 7,4], mM EDTA e 44,5 mM ácido bórico) a 14°C. As condições para a atuação da *Sma*I na PFGE exigiram uma corrida migratória programada com alternância de corrente elétrica com pulso inicial de 5 e final de 30 segundos durante um período de 22 horas a 5,9 V/cm. Terminada a eletroforese, o gel foi corado em 500 mL de água destilada contendo 1 µg de brometo de etídio por mL (GIBCO BRL, Nova Iorque). A descoloração envolveu 3 lavagens com água destilada, de 30 em 30 minutos cada. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta, e as imagens foram registradas utilizando-se uma câmera fotográfica Polaroid[®].

ANÁLISE DOS DADOS

As características demográficas e clínicas foram descritas para o grupo de pacientes com isolamento de ERV (expostos) e para o grupo de pacientes sem isolamento de ERV (não expostos) através do número absoluto e percentual para as variáveis categóricas, e, nas variáveis quantitativas, pela média \pm desvio-padrão ou mediana (amplitude interquartil: P25-P75) em situações de assimetria. O valor P foi calculado pelo teste qui-quadrado para as variáveis categóricas e pela análise de variância (ANOVA) para as variáveis quantitativas. Nas situações de diferença significativa foram realizados procedimentos de *post hoc* para ANOVA e para qui-quadrado. Foi utilizado o modelo de regressão logística para avaliar ocorrência de

mortalidade entre os grupos, ajustando para o efeito de potenciais fatores de confusão.

O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no SPSS, versão 10,0.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HSL/PUCRS. Não foi identificada necessidade do termo de consentimento informado, uma vez que não foram feitos exames adicionais à rotina vigente na Instituição. Os dados coletados foram informações demográficas e clínicas e amostras bacterianas, de forma que a privacidade dos pacientes foi mantida.

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E CLÍNICA

Inicialmente, foram elegíveis para o estudo 116 pacientes com ERV e 220 sem ERV. Do grupo de expostos foram excluídos nove por dados incompletos na revisão dos prontuários e do grupo de não expostos foram excluídos treze, pela mesma razão. Um total de 314 pacientes foram avaliados, 107 com ERV e 207 sem ERV.

Os resultados da análise bivariada com as características demográficas e clínicas dos pacientes de acordo com a presença ou não de ERV estão descritas na Tabela 1. Os pacientes com ERV foram classificados de acordo com o material de onde esse foi isolado, dando-se prioridade para sangue seguido de secreção/urina e, finalmente, *swab retal*. As secreções compreenderam, basicamente, materiais procedentes de sítio cirúrgico, de lesões, de escaras e de líquidos peritoneal, pleural, sinovial e pericárdico.

As variáveis que atingiram significância estatística na análise bivariada foram o tempo de internação total, tempo de permanência na UTIG, o número de pacientes com desenvolvimento de infecção hospitalar, a presença concomitante de outros germes e o uso de antimicrobianos. As variáveis que não atingiram significância estatística foram: a realização de cirurgias, a presença de doenças debilitantes como AIDS, diabetes, neoplasia, cirrose, doenças do Sistema Nervoso Central e do Aparelho Cardiovascular e o uso de ventilação mecânica e de nutrição parenteral total.

Tabela 1 - Comparação de características demográficas e clínicas entre os grupos estudados

Características	ERV-SR n=76	ERV-URO+SEC n=16	ERV-HEMO n=15	n-ERV n=207	P
Idade, anos	59,9±20,2	61,6±20,6	65,5±17,2	57,8±19,7	0.43
Gênero feminino	38 (50,0)	9 (56,3)	8 (53,3)	98 (47,3)	0.87
Internação, dias	35,5 (23,5 – 52,7) ^a	35,5 (17,7 – 126,5) ^{a,b}	37,0 (27,0 – 77,0) ^a	24 (13,0 – 38,0) ^b	<0.01
Tempo na UTI, dias	16,0 (7,5 – 31,7) ^a	11,5 (2,0 – 26,5) ^a	16,0 (2,0 – 31,0) ^a	10,0 (6,0 – 19,0) ^b	0.01
Pacientes com IH	62 (81,6) ^{a,b}	13 (81,3) ^{a,b}	15 (100,0) ^a	138 (66,7) ^b	<0.01
Pacientes com germes isolados					
em hemocultura	41 (53,9) ^a	5 (31,3) ^{a,b}	9 (60,0) ^{a,b}	64 (30,9) ^b	<0.01
em urocultura	28 (36,8) ^a	4 (25,0) ^{a,b}	6 (40,0) ^{a,b}	42 (20,3) ^b	0.03
em secreção	52 (68,4) ^a	9 (56,3) ^{a,b}	8 (53,3) ^{a,b}	99 (47,8) ^b	0.02
Tempo de antibióticos, dias	23,5 (8,0 – 44,5) ^a	33,0 (11,5 – 82,7) ^{a,b}	29,0 (22,5 – 97) ^{a,b}	37,0 (14,0 – 65,5) ^b	0.03
Nº de antibióticos usados	5,0 (3,0 – 7,0) ^a	5,5 (2,0 – 9,7) ^{a,b}	6,0 (5,0 – 8,0) ^a	4,0 (2,0 – 6,0) ^b	<0.01
Cirurgias realizadas	42 (55,3)	9 (56,3)	10 (66,7)	105 (50,7)	0.07
Comorbidades					
AIDS	1 (1,3)	2 (12,5)	0 (0,0)	9 (4,3)	0.16
DM	17 (22,4)	4 (25,0)	2 (13,3)	27 (13,0)	0.22
Neoplasia	17 (22,4)	6 (37,5)	8 (53,3)	62 (30,0)	0.11
Doenças do SNC	23 (30,3)	4 (25,0)	5 (33,3)	63 (30,4)	0.96
Doenças do ACV	50 (65,8)	8 (50,0)	6 (40,0)	111 (53,6)	0.16
Cirrose	2 (2,6)	0 (0,0)	1 (6,7)	6 (2,9)	0.66
Ventilação mecânica	59 (78,7)	8 (50,0)	10 (66,7)	154 (74,4)	0,14
Nutrição parenteral total	12 (15,8)	4 (25,0)	3 (20,0)	33 (15,9)	0,81
Número de Óbitos	37 (48,7)	6 (37,5)	11 (73,3)	105 (50,7)	0.23

Os dados são apresentados como média±desvio-padrão, nº (percentual) ou mediana (amplitude interquartil: P25–P75). ERV-SR: enterococo resistente à vancomicina isolado apenas em *swab* retal; ERV-URO+SEC: ERV isolado em urina ou secreções (podendo ter ERV em SR); ERV-HEMO: ERV isolado em hemocultura (podendo ter ERV em SR, URO ou SEC); UTI: unidade de tratamento intensivo; IH: infecção hospitalar; AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; DM: *Diabetes Mellitus*; SNC: Sistema Nervoso Central; ACV: Aparelho Cardiovascular. Letras-índice iguais em sobrescrito (a, b, c) indicam valores que não diferem significativamente entre si ($P>0,05$) em teste de *post hoc*

2. RISCO DE ÓBITO

O risco de óbito para cada grupo foi estabelecido pelo modelo de regressão logística, conforme mostra a Tabela 2. Para controle de eventuais vieses as variáveis da Tabela 1 foram selecionadas para ajuste dando-se preferência para as que apresentassem maior relevância clínica. Na análise multivariável observou-se que os ERV de *swab* retal e de urina e secreções não apresentaram um risco maior de óbito quando comparados com pacientes sem ERV. No entanto, após o ajuste para diversos fatores de confusão, o enterococo presente em hemocultura apresentou uma mortalidade substancialmente maior do que os sem ERV, apesar de não atingir significância clássica ($P = 0,076$).

Tabela 2 – Avaliação da associação entre a presença de VRE e ocorrência de óbito

Germe	n	Óbito		ORaj	IC95%	P
		f	%			
n-ERV	207	105	50.7	-		
ERV-SR	76	37	48.7	0.77	0.41-1.47	0.43
ERV-URO+SEC	16	6	37.5	0.72	0.19-2.67	0.62
ERV-HEMO	15	11	73.3	3.67	0.88-15.39	0.076

n-ERV: pacientes sem ERV; ERV-SR: pacientes com enterococo resistente à vancomicina isolado apenas em *swab* retal; ERV-URO+SEC: ERV isolado em urina ou secreções (podendo ter ERV em SR); ERV-HEMO: ERV isolado em hemocultura (podendo ter ERV em SR, URO ou SEC); Or_{aj}: *Odds ratio* ajustado em modelo de regressão logística contendo os fatores idade, gênero, presença de infecção hospitalar, realização de cirurgia, tempo de internação na Unidade de Terapia Intensiva, uso de ventilação mecânica e uso de nutrição parenteral total.

3. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR

Foi identificado *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina em 106 pacientes e *Enterococcus gallinarum* em um paciente, sendo todos sensíveis à ampicilina. Não foi identificado nenhum caso de *Enterococcus faecium*. O primeiro ERV isolado dos pacientes foi a partir de *swab* retal em 79 casos e de materiais clínicos em 28 casos (secreção em 6 casos, sangue em 12 casos e urina em 10 casos). Em alguns pacientes com isolamento inicial de ERV em *swab* retal houve identificação posterior de ERV em materiais clínicos, quais sejam: 2 em secreção, 3 em urina e 3 em sangue. O número médio de dias decorrido entre a internação na UTIG e o isolamento de ERV foi de 13,4 dias. Foi identificado *Enterococcus faecalis* sensível à vancomicina (ESV) em 140 pacientes dos quais 111 em *swab* retal e 29 em material clínico (12 em secreção, 10 em urina e 7 em sangue). Destes 140 pacientes com isolamento de ESV, 39 também apresentaram isolamento de ERV na mesma internação. Foi realizada tipagem molecular de 47 amostras de ERV das quais 37 eram procedentes de *swab* retal, 5 de secreção, 4 de sangue e 1 de urina. A amostra 97 não pôde ter seu genótipo determinado, pois não apresentou perfil migratório após ter sido digerida com a enzima *Sma*I. Foi possível observar uma homogeneidade de perfis migratórios entre os ERV avaliados de forma que foi considerada desnecessária a realização de tipagem de todas as amostras. A análise dos perfis migratórios interpacientes indicou perfil idêntico em 39 amostras, por não apresentarem nenhuma diferença visível entre as bandas, denominado perfil A. Três amostras mostraram-se altamente relacionadas a essas primeiras, por se diferenciarem em apenas duas bandas, às quais foi atribuído o genótipo A1. A amostra 80 foi caracterizada como um subclone com genótipo A2, pois apresentou diferença em três bandas em relação ao perfil A. As amostras 162, 175 e 85 apresentaram perfis migratórios com mais de sete bandas diferentes, sendo consideradas diferentes do clone padrão e denominadas B, C, D, respectivamente. O poder discriminatório do PFGE foi avaliado através da

comparação das amostras de ERV com amostras de ESV do HSL/PUCRS. As cepas de ESV apresentaram perfis migratórios diferentes do clone A (e seus subclones).

Tabela 3 – Distribuição de isolados de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, de 47 pacientes de acordo com seu perfil de macrorrestrição

Amostra	Procedência ^a	Data ^b	Perfil Genotípico ^c
77	SR	19/12/00	A
78	SR	18/11/00	A
81	SR	01/02/01	A
82	SR	06/03/01	A
83	SR	07/03/01	A
84	SR	19/02/01	A
86	SR	12/02/01	A
88	SR	28/11/00	A
89	SR	13/03/01	A
91	SR	23/02/01	A
92	SR	20/02/01	A
93	SR	07/02/01	A
94	SR	15/01/01	A
95	SR	12/02/01	A
97	SR	12/02/01	Não migrou
98	SR	26/03/01	A
159	Secreção	12/07/00	A
160	Secreção	12/06/00	A
161	Sangue	10/05/00	A
165	SR	12/12/00	A
166	SR	26/12/00	A
167	Secreção	10/11/00	A
168	SR	12/12/00	A
169	SR	19/12/00	A
171	SR	21/12/00	A
173	SR	01/12/00	A
174	Sangue	22/05/01	A
176	Sangue	21/12/00	A
177	SR	28/11/00	A
182	SR	31/10/00	A
183	Secreção	10/10/00	A
184	SR	07/11/00	A
185	SR	31/10/00	A
186	SR	29/08/00	A
187	SR	10/10/00	A
188	SR	25/07/00	A
189	SR	25/07/00	A
190	SR	07/11/00	A
191	SR	22/08/00	A
197*	Secreção	10/05/00	A
79	SR	19/12/00	A ₁
90	SR	16/01/01	A ₁
170	SR	19/12/00	A ₁
80	SR	11/02/01	A ₂
162	Urina	10/05/00	B
175	Sangue	25/08/00	C
85	SR	19/02/01	D

^aSR: material procedente de *swab retal*. ^bData: corresponde à data de coleta do material referido. ^cAs letras A, B, C, D, representam padrões de migração de PFGE; os números seguindo as letras representam subtipos. *: Caso índice.

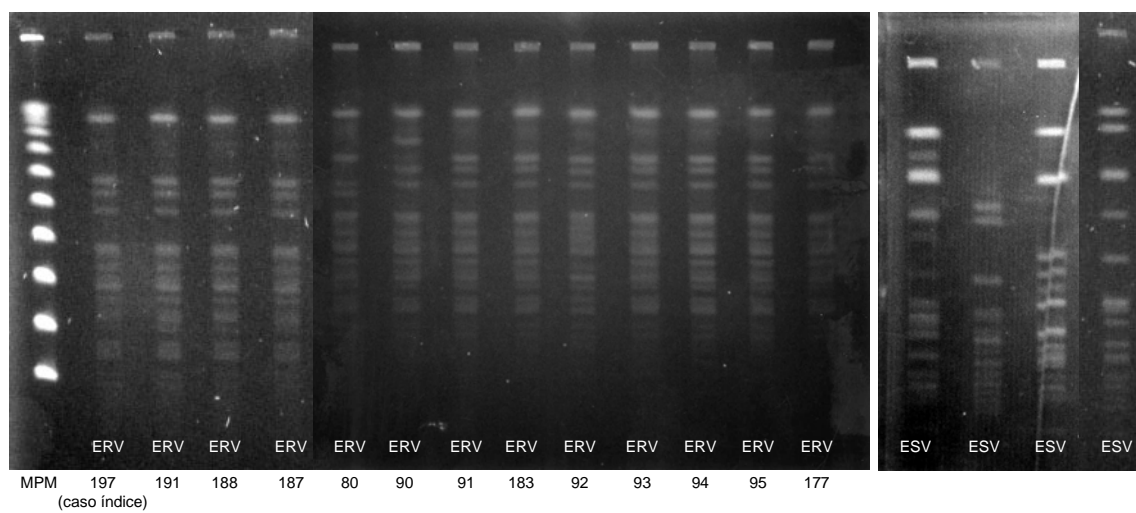


Figura: Perfil de macrorestrição de DNA por PFGE de amostras de *Enterococcus faecalis*.
MPM = marcador de peso molecular

DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou o perfil clínico dos pacientes com ERV, equacionou sua importância clínica medida através de risco de óbito e esclareceu a sua forma de disseminação.

Pela análise dos resultados alcançados, identificamos que a presença do ERV está relacionada a uma maior morbidade avaliada por um tempo de internação (total e em Unidade de Terapia Intensiva) mais prolongado, por um maior consumo de antimicrobianos, um maior número de infecções hospitalares (IH) bem como um maior número de outros germes isolados. Todos estes fatores são interdependentes, pois, à medida que um paciente permanece maior tempo hospitalizado, também está sujeito à exposição a um maior número de germes (inclusive ERV) e, conseqüentemente, a desenvolver mais IH e a consumir mais antimicrobianos. Não há como concluir que o ERV é causa ou conseqüência deste processo; a tendência é considerá-lo, apenas, como um marcador de gravidade (3, 21).

Na associação do ERV com óbito, a significância encontrada indica que a bacteremia por ERV apresenta maior mortalidade quando comparada com um grupo controle sem ERV. Este dado é perfeitamente justificável na medida em que estamos comparando pacientes com um germe presente no sangue a pacientes com situações clínicas incluindo ou não outros germes além do ERV em hemocultura. A literatura não é unânime a esse respeito, e o risco de mortalidade associado com bacteremia por ERV varia conforme o desenho do estudo, seleção dos controles e espécies estudadas (3, 22, 23). A colonização pelo ERV (presença no *swab* retal) e a sua presença em secreções e urina não foi relacionada a um acréscimo de mortalidade. A evolução de um paciente com colonização por ERV para infecção pelo mesmo ocorreu em 10% dos casos, dos quais 3,8% em bacteremia. Esta taxa modesta pode se dever ao fato de termos analisado apenas uma internação, pois sabemos que a colonização

pelo ERV pode se manter por períodos longos, vindo a ocorrer infecção apenas mais tardiamente (22).

A identificação de *E. faecalis* em, praticamente, todas as amostras e a falta de isolamento de *E. faecium* difere, em parte, do perfil de distribuição visto no Estado de São Paulo, e, principalmente, em hospitais americanos e europeus onde, apesar de o *E. faecalis* ainda ser predominante, o *E. faecium* tem tido um isolamento crescente chegando a 19,3% dos isolados clínicos (6). A disseminação horizontal (pessoa a pessoa) do ERV ficou claramente definida através da tipagem molecular na qual foi identificada a presença preponderante de um clone, sugerindo uma fonte comum. As medidas de controle de infecção a serem estabelecidas neste modelo de disseminação devem enfatizar as precauções envolvendo o uso de barreiras como luvas, aventais, estabelecimento de coortes, incentivo à lavagem das mãos e higienização apropriada (24); a modificação dos antimicrobianos consumidos não é prioritária para esta situação.

Em resumo, constatamos no nosso estudo que o ERV está presente em pacientes com maior morbidade e que não aumenta a mortalidade quando presente apenas como colonizante. No entanto, a sua evolução para bacteremia pode ocorrer e, nesse caso, confere um risco de óbito significativo. A disseminação clonal dessa bactéria é freqüentemente descrita, tanto pela sua habilidade de sobrevivência por longos períodos em superfícies ambientais, quanto pela pobre aderência às práticas de controle de infecção internacionalmente verificadas (3). O incentivo constante às medidas de bloqueio epidemiológico deve ser mantido em todos os hospitais o que pressupõe manutenção de vigilância epidemiológica ativa para sua detecção precoce, com o uso da ferramenta molecular, se necessário, bem como de ações integradas visando impedir seu surgimento e disseminação na comunidade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS pelo fornecimento das amostras e à Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do HCPA, especialmente às farmacêuticas-bioquímicas Daniela de Souza Martins e Larissa Lutz, pela realização do PFGE.

REFERÊNCIAS

1. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev 1990; 3:46-65.
2. Facklam RR, Carvalho MG, Teixeira L. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: Gilmore MS. The enterococci- pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington, DC: ASM Press; 2002.p.1-54.
3. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. J Hosp Infect 2003; 53:159-71.
4. Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis 1992; 14:1173-78.
5. Climo MW, Archer GL, Monroe S. Vancomycin-resistant Gram-positive pathogens: potential approaches for prevention and control. In: Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections, 4rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 2003.p.169-85.
6. Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001; 32(Suppl. 2):S133-S145.
7. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988; 1:57-58.
8. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988; 319:157-61.
9. Costa LM, Souza DC, Martins LTF, Zanella RC, Brandileone MC, Bokermann S, Sader HS et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brasil. Braz J Infect Dis 1998; 2:160-63.

10. Zanella RC. Análise Molecular de *Enterococcus* e dos elementos VanA que mediam resistência à vancomicina, isolados na casa de Saúde Santa Marcelina-São Paulo/SP, em 1998. Tese de Doutorado. Instituto Adolfo Lutz 2000. São Paulo/SP.
11. d'Azevedo PA, Kacman SB, Schmalfuss SB, Rodrigues, LF. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente à vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. Anais do 34º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial 2000.p.140.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin- United States 1989-1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993; 42:597-99.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS) report, date summary from January 1992-June 2001. Am J Infect Control 2001; 29:404-21.
14. Boyle JF, Soumakis AS, Rendo A, et al. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1993; 31:1280-85.
15. Lautenbach E, Bilker WB, Brennan PJ. Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20:318-23.
16. Hiramatsu K. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med 1998; 104:7S-10S.
17. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:1563-71.
18. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin- United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51:565-67.

19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) – Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, Pa; 2002. Twelfth Informational Supplement M100-S12.
20. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Woodford N, Johnson AP. Molecular Bacteriology, Protocols and Clinical Applications. New Jersey: Humana Press Inc; 1998.p.33-62.
21. Edmond MB. Multidrug-resistant enterococci and the threat of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. In: Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections, 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997.p.339-355.
22. Garbutt JM, Ventrappagada M, Littenberg B, Mundy LM. Association Between resistance to vancomycin and death in cases of *Enterococcus faecium* bacteremia. Clin Infect Dis 2000; 30:466-72.
23. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2000; 13:513-22.
24. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1995; 44:1-13.

ANEXOS

ANEXO 1

FICHA DE COLETA DE DADOS: ENTEROCOCO RESISTENTE À VANCOMICINA

Data de Coleta do Dado:
Nome do Paciente:
Registro:
Sexo:
Data de Nascimento:
Data da Internação:
Data da Alta:
Procedência do Paciente:

Data do Isolamento do 1º ERV:
Material de Isolamento: <input type="checkbox"/> SR <input type="checkbox"/> SECREÇÃO <input type="checkbox"/> URINA <input type="checkbox"/> SANGUE
Data de Isolamento de ERV Posteriores:
Material de Isolamento: <input type="checkbox"/> SR <input type="checkbox"/> SECREÇÃO <input type="checkbox"/> URINA <input type="checkbox"/> SANGUE
Material de Isolamento: <input type="checkbox"/> SR <input type="checkbox"/> SECREÇÃO <input type="checkbox"/> URINA <input type="checkbox"/> SANGUE
Material de Isolamento: <input type="checkbox"/> SR <input type="checkbox"/> SECREÇÃO <input type="checkbox"/> URINA <input type="checkbox"/> SANGUE

Outros Germes Isolados:
Germe:
Material de Isolamento: <input type="checkbox"/> SR <input type="checkbox"/> SECREÇÃO <input type="checkbox"/> URINA <input type="checkbox"/> SANGUE
Data de Isolamento:
Germe:
Material de Isolamento: <input type="checkbox"/> SR <input type="checkbox"/> SECREÇÃO <input type="checkbox"/> URINA <input type="checkbox"/> SANGUE
Data de isolamento:
Germe:
Material de Isolamento: <input type="checkbox"/> SR <input type="checkbox"/> SECREÇÃO <input type="checkbox"/> URINA <input type="checkbox"/> SANGUE
Data de isolamento:
Germe:
Material de Isolamento: <input type="checkbox"/> SR <input type="checkbox"/> SECREÇÃO <input type="checkbox"/> URINA <input type="checkbox"/> SANGUE
Data de Isolamento:

Diagnóstico(s) na Baixa : _____

Diagnóstico(s) durante a internação
Fez Infecção Hospitalar: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Tipo de Infecção: <input type="checkbox"/> ITR <input type="checkbox"/> ICS <input type="checkbox"/> ITU <input type="checkbox"/> ISC
Outro(s) diagnósticos: _____

Realização de Cirurgia: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Tipo de Cirurgia Realizada:
Data de Realização:
Outros Diagnósticos: _____
Condições da Alta: _____

ANEXO 1 - CONTINUAÇÃO

VM/ NPT e Internação na UTI (em nº de dias) :	
NPT	
VM	
UTI	

Antimicrobiano(s) Utilizado (s) (em nº dias)	
Atb. Total	
Amoxicilina	
Amox/Clav	
Amicacina	
Ampicilina	
Amp/Sulb.	
Azitromicina	
Aztreonam	
Cefalosporina 1ª ger	
Cefalosporina 2ª ger	
Cefalosporina 3ª ger	
Cefalosporina 4ª ger	
Ciprofloxacina	
Claritromicina	
Clindamicina	
Doxiciclina	
Eritromicina	
Gatifloxacina	
Gentamicina	
Imipenem	
Levofloxacina	
Meropenem	
Metronidazol	
Norfloxacina	
Oxacilina	
Polimixina B	
Rifampicina	
Roxitromicina	
SMX/TPM	
Tetraciclina	
Ticarc./ Clav.	
Vancomicina	

ANEXO 2

**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 01-212

Pesquisadores:

AFONSO LUIS BARTH

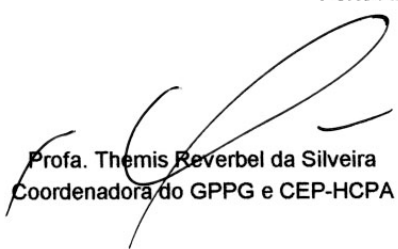
MARIO BERNARDES WAGNER

ANA MARIA SANDRI

Título: ANÁLISE MOLECULAR DE ENTEROCOCCUS SPP RESISTENTE Á VANCOMICINA E SUA RELAÇÃO COM MORBIMORTALIDADE NO HOSPITAL SÃO LUCAS DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 05 de Setembro de 2001.



Prof. Themis Reverbel da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

ANEXO 3



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS

Of. nº 286/01-CEP

Porto Alegre, 24 de agosto de 2001

Ilmo(a). Sr(a).
Dr(a). Ana Maria Sandri
N/Universidade

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, apreciou e aprovou o seu protocolo de pesquisa: "Análise molecular de *Enterococcus spp* resistente a Vancomicina e sua relação com morbimortalidade no Hospital São Lucas da PUCRS".

Atenciosamente.

Prof. Dr. Délio José Kipper
Coordenador do CEP-PUCRS

ANEXO 4



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

Porto Alegre, 01 de Novembro de 2001

Il.mo(a) Sr.(a)
AFONSO LUIS BARTH
Prezado(a) Pesquisador(a)

Gostaríamos de comunicar que em reunião realizada no dia 01/11/2001 a Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde aprovaram recursos financeiros do FIPE para o projeto GPPG:

01-212

**ANÁLISE MOLECULAR DE ENTEROCOCCUS SPP RESISTENTE À VANCOMICINA E SUA
RELAÇÃO COM MORBIMORTALIDADE NO HOSPITAL SÃO LUCAS DA PONTIFÍCIA
UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.**

FORAM APROVADOS R\$ 2.996,00 PARA AQUISIÇÃO DE MATERIAIS DE CONSUMO.

Solicitamos seu comparecimento no GPPG para esclarecimentos quanto as normas de utilização deste recurso, caso não seja do seu conhecimento.

Atenciosamente,


Profa. Themis Reverbél da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA