



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À COLONIZAÇÃO POR  
VRE E MRSA EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE ADULTOS.**

Deivid William da Fonseca Batistão

Uberlândia – MG  
Julho 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À COLONIZAÇÃO POR  
VRE E MRSA EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE ADULTOS.**

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

Deivid William da Fonseca Batistão

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas (orientadora)

Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho (co-orientador)

Uberlândia – MG  
Julho 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- B333e    Batistão, Deivid William da Fonseca, 1986-  
          Epidemiologia e fatores de risco associados à colonização por  
          VRE e MRSA em uma unidade de terapia intensiva de adultos /  
          Deivid William da Fonseca Batistão. - 2010.  
          69 f. : il.
- Orientadora: Rosineide Marques Ribas.  
          Co-orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.  
          Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
          Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
          Inclui bibliografia.  
          1. Infecção hospitalar - Teses. I. Ribas, Rosineide Marques. II.  
          Gontijo Filho, Paulo Pinto. III. Universidade Federal de Uberlândia.  
          Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616.98:615.478

---



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Telefax: (034)3218-2333 E-Mail [coipa@ufu.br](mailto:coipa@ufu.br)  
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



### **Deivid William da Fonseca Batistão**

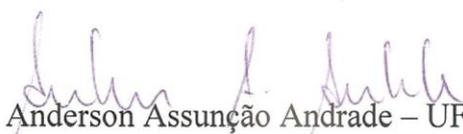
“Epidemiologia e fatores de risco associados à colonização por VRE e MRSA em uma unidade de terapia intensiva de adultos”

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

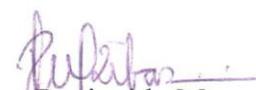
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 12 de julho de 2010.

  
Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade – UFTM

  
Prof. Dr. Geraldo Batista Melo – ICBIM/UFU

  
Prof. Dra. Rosineide Marques Ribas – ICBIM/UFU

“É preciso que não se tenha medo de dizer alguma coisa que possa ser considerada como erro. Porque tudo que é novo, aparece aos olhos antigos como coisa errada. É sempre nesta violação do que é considerado certo, que nasce o novo e há a criação...”

**Mário Schenberg**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela presença constante em cada segundo de minha vida e caminhada, por sua benevolência em me dar saúde para trabalhar, sabedoria para aprender e determinação para alcançar essa vitória tão significativa na minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas por me acolher no Laboratório de Microbiologia, por seus ensinamentos, seu exemplo de profissional e de pessoa. Mais do que orientadora você foi uma grande amiga, obrigado por acreditar em mim e me ajudar a tornar tudo possível. Eu sei que você sempre quis o melhor!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho pelo exemplo de pesquisador, pelo apoio e incentivo. É uma honra trabalhar sob sua co-orientação!

Aos meus pais, os primeiros responsáveis por minha educação, meus primeiros mestres, que me ensinaram o certo e o errado, me ensinaram a aprender... Ainda há muito pela frente e o que me motiva é saber que vocês sempre estarão comigo, em cada passo, em cada conquista.

A toda a minha família, em especial aos meus avós maternos e paternos, meu irmão Dênis e minha irmã Danielle, por ser sempre meu apoio, meu porto seguro, minha razão de continuar.

Ao meu amigo/irmão Gustavo e toda a sua família: Tia Neusa e Tio Reginaldo, Júnior, Deila, Bruninha, Jeniffer, Vó Aurora, que hoje tenho enorme satisfação de considerar também como minha família. Obrigado por me acolher, apoiar e se preocupar comigo... Ao Gustavo pela convivência diária em Uberlândia, pelas risadas, conselhos, discussões e tantas histórias vividas, por acreditar em mim e me dar forças para trilhar esse caminho.

A todos os meus amigos do laboratório de Microbiologia, especialmente, Ana Paula, Daiane, Raquel e Juliana pela convivência diária, por tornar os dias mais leves e divertidos, por todas as festas, conversas e conselhos, pela ajuda durante meu trabalho, sem o apoio de vocês tudo teria sido muito mais difícil! Ainda que exista distância física entre nós, estaremos sempre juntos.

À Lizandra, a primeira a me acolher no laboratório, por seu exemplo e presença sempre agradável.

Aos colegas de mestrado que compartilharam das mesmas dificuldades e que tornaram a convivência uma experiência inesquecível.

Aos meus companheiros de laboratório: Dayane Otero, Elias, Cristiane, Karine, Lílian, Mariana, Luiz Fernando, Marcília, Munick, Jaqueline, Ana Luiza, Júlia, Carol, Nayara, Laura, Priscila, Meline, Paola e tantos outros pela convivência, apoio e respeito.

Ao colega Michel por ceder os cálculos de DDD que muito contribuíram com o trabalho.

Agradeço também aos professores da Microbiologia: Prof. Dr. Geraldo e Prof. Dra. Denise, pela ajuda sempre disponível.

Aos técnicos do Laboratório Claudete, Ricardo e Samuel pelo apoio técnico, pela paciência e pelas dicas de muita experiência.

As secretárias da coordenação do PPIPA, Lucélia e Lucileide pela atenção, auxílio amizade.

Ao Prof. MSc. Marcelo Costa Araújo pela ajuda na identificação das espécies de *Enterococcus*, pelo exemplo de profissional comprometido, dedicado e competente, pela amizade e por me estimular ao estudo da microbiologia.

À Profa. Dra. Adriana Gonçalves de Oliveira e a Doutoranda Natália Conceição pela ajuda durante meu trabalho, pelas dicas e, principalmente, a realização das reações de PCR que tanto acrescentaram ao trabalho.

A toda equipe de profissionais da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas: à direção que acreditou no trabalho e permitiu a realização da pesquisa na Unidade e, especialmente, a toda a equipe da Enfermagem, pela colaboração com a realização das coletas e pelo exemplo de humildade, profissionalismo e amor ao próximo.

Agradeço aos integrantes da minha banca por aceitarem participar da minha defesa e pelo muito que vão acrescentar ao meu trabalho e colaborar com o meu desenvolvimento.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma me apoiaram, me incentivaram e contribuíram com a realização deste trabalho.

Ao CNPq por subsidiar-me com a bolsa de estudo.

Finalmente, expresso o meu mais profundo e respeitoso agradecimento aos meus pacientes, com os quais aprendi muito mais do que em todos os livros que consegui ler. Sem eles o trabalho jamais seria possível!

**Muito Obrigado!**

## Lista de Abreviaturas e Siglas

$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{L}$	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
AE	<i>Elution buffer</i> , Tampão de Eluição
AL	<i>Lysis Buffer</i> , Tampão de lise
ATB	Antibiótico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AW1	<i>Wash Buffer 1</i> , Tampão de lavagem 1
AW2	<i>Wash Buffer 2</i> , Tampão de lavagem 2
BHI	<i>Brain and Heart Infusion</i> , Ágar/Caldo infusão de cérebro e coração
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CVC	Cateter Venoso Central
D-Ala-D-Ala	D-alanina-D-alanina
D-Ala-D-Lac	D-alanina-D-lactato
D-Ala-D-Ser	D-alanina-D-serina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
<i>et al</i>	E colaboradores
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HCl	Ácido Clorídrico

HLAR	<i>High level aminoglycoside resistance</i> , resistência a altos níveis de aminoglicosídeos
HLGR	<i>High level gentamicin resistance</i> , resistência a altos níveis de gentamicina
HLSR	<i>High level streptomycin resistance</i> , resistência a altos níveis de estreptomicina
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> , Concentração Inibitória Mínima
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRSA	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NHSN	<i>The National Healthcare Safety Network</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance System</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	Pares de base
PBP	<i>Penicillin-binding proteins</i> , Proteínas Ligadoras de Penicilina
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
pmols	Picomols
PYR	L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida
rpm	Rotações por minuto
SCoN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa
SNG	Sonda nasogástrica
SNE	Sonda nasoenteral
SOG	Sonda orogástrica
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Tris	Hidroximetil amino metano

TTC	Cloreto 2,3,5-Trifenil Tetrazólio
TTF	Trifenil Formazan
UTIA	Unidade de Terapia Intensiva de Adultos
VM	Ventilação Mecânica
VRE	<i>Vancomycin resistant enterococci, Enterococcus</i> resistente à vancomicina

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>21</b>
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO .....	22
4.1.1 <b>Vigilância por busca ativa</b> .....	22
4.1.2 <b>Vigilância Laboratorial</b> .....	23
4.1.3 <b>Avaliação dos fatores de risco</b> .....	23
4.2 DEFINIÇÕES .....	23
4.3 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS .....	24
4.3.1 <b>Cultivo Primário e Isolamento</b> .....	24
4.3.2 <b>Amostras Controles</b> .....	25
4.3.3 <b>Caracterização do Gênero <i>Enterococcus</i></b> .....	25
4.3.4 <b>Produção de Catalase</b> .....	25
4.3.5 <b>Hidrólise da L-pirrolidonil-<math>\beta</math>-naftilamida (PYR)</b> .....	25
4.3.6 <b>Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i></b> .....	26
4.3.6.1 <b>Produção de pigmento</b> .....	26
4.3.6.2 <b>Prova da Motilidade</b> .....	27
4.3.6.3 <b>Teste de utilização de carboidratos</b> .....	27
4.3.6.4 <b>Desaminação da arginina</b> .....	28
4.3.7 <b>Identificação do gênero <i>Staphylococcus</i> e da espécie <i>S. aureus</i></b> .....	29
4.3.7.1 <b>Produção de coagulase livre</b> .....	29
4.3.8 <b>Teste de difusão com disco</b> .....	29
4.3.9 <b>Teste D</b> .....	30
4.3.10 <b>Deteção de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos</b> .....	30
4.3.11 <b>Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Vancomicina</b> .....	30
4.4 TÉCNICAS MOLECULARES .....	32

4.4.1 Extração do DNA .....	32
4.4.2 Confirmação das espécies por Multiplex PCR.....	33
4.4.3 Detecção dos genótipos de resistência.....	34
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....	35
6. RESULTADOS .....	36
7. DISCUSSÃO .....	51
8. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO I.....	65
ANEXO II .....	66
ANEXO III.....	67
APÊNDICE I.....	68
APÊNDICE II .....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Teste de Hidrólise da L-pirrolidoni-β-naftilamida (PYR) .....	26
<b>Figura 2:</b> Teste de produção de pigmento .....	26
<b>Figura 3:</b> Teste de motilidade (SIM acrescido de 0.01% TTC) .....	27
<b>Figura 4:</b> Teste de utilização de carboidratos (Sorbitol, Arabinose) .....	28
<b>Figura 5:</b> Teste de desaminação da arginina .....	28
<b>Figura 6:</b> Teste de disco difusão com os discos de Gentamicina (120µg) e Estreptomicina (300µg) para detecção de resistência em nível elevado aos aminoglicosídeos e fita de E-test para determinação do MIC de vancomicina.....	31
<b>Figura 7:</b> Fita de E-test para determinação da concentração inibitória mínima de vancomicina .....	31
<b>Figura 8:</b> Organograma da população estudada quanto à colonização por VRE .....	38
<b>Figura 9:</b> Organograma da população estudada quanto à colonização por MRSA .....	39
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes <i>vanA</i> e <i>vanB</i> .....	40
<b>Figura 11:</b> Pacientes colonizados por VRE e MRSA de acordo com o momento das coletas .....	43
<b>Figura 12:</b> Colonização por VRE, MRSA, co-colonização e infecção entre os pacientes colonizados por MRSA de Abril de 2009 a Janeiro de 2010 .....	43
<b>Figura 13:</b> Relação entre os microrganismos isolados de colonização e a densidade de uso da vancomicina (DDD por 1000 pacientes-dia) na UTI de adultos do HC-UFU de abril de 2009 a janeiro de 2010.....	44
<b>Figura 14:</b> Gráfico de correlação entre a DDD de vancomicina e a taxa de colonização por 1000 pacientes-dia.....	45
<b>Figura 15:</b> Gráfico de correlação entre a DDD de carbapenêmicos e a taxa de colonização por 1000 pacientes-dia .....	45
<b>Figura 16:</b> Progressão dos casos de colonização por VRE em função da relação espacial/temporal na UTI de Adultos do HC-UFU no período de abril de 2009 a janeiro de 2010 .....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> <i>Primers</i> utilizados na realização das reações de PCR para confirmação das espécies e detecção dos genes de resistência .....	34
<b>Tabela 2:</b> Características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos na pesquisa .	37
<b>Tabela 3:</b> Distribuição de espécies de enterococos isoladas do trato gastrointestinal dos pacientes estudados.....	40
<b>Tabela 4:</b> Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco difusão das amostras de enterococos isolados de pacientes da UTIA do HC-UFU no período de abril/2009 a janeiro/2010.....	41
<b>Tabela 5:</b> MIC 50 e MIC 90 para vancomicina em 92 isolados de <i>Enterococcus</i> spp....	41
<b>Tabela 6:</b> Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco difusão das amostras de MRSA isolados de pacientes da UTIA do HC-UFU no período de abril/2009 a janeiro/2010.....	42
<b>Tabela 7:</b> Fatores de risco para colonização por <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina na UTIA do HC-UFU e mortalidade total em pacientes colonizados .....	49
<b>Tabela 8:</b> Regressão Logística Múltipla dos fatores de risco para colonização por <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina na UTIA do HC-UFU .....	49
<b>Tabela 9:</b> Evolução clínica de pacientes colonizados por MRSA, co-colonização por VRE e mortalidade total .....	50

## RESUMO

Foi analisado um total de 78 pacientes colonizados por *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e 17 pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) através de estudo de incidência no período de abril de 2009 a janeiro de 2010. Foram avaliadas as taxas de infecção/colonização por esses fenótipos, fatores de risco para colonização, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e caracterização do gene *vanA* em amostras de VRE com alto nível de resistência à vancomicina. A identificação dos *S. aureus* e das espécies de enterococos foi realizada por testes bioquímicos convencionais. A concentração inibitória mínima (MIC) para vancomicina foi avaliada pelo método de E-test. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a resistência em nível elevado aos aminoglicosídeos foi realizada por disco difusão. Para avaliar o genótipo das cepas de VRE foi utilizado o PCR. Dados epidemiológicos foram registrados de todos os pacientes incluídos nesse estudo e para análise dos fatores de risco para colonização por VRE foi realizado um estudo caso x controle sendo definidos como caso os pacientes colonizados por VRE sem infecção por qualquer microrganismo (n=21) e como controle os pacientes sem colonização e infecção por VRE (n=143). Um total de 333 pacientes hospitalizados foi incluído nessa investigação. Dos 90 pacientes colonizados por *Enterococcus* spp., 92 amostras foram isoladas. Setenta e sete pacientes (23,1%) estavam colonizados com *Enterococcus* resistentes à vancomicina do fenótipo VanC e apenas um paciente (0,3%) com VanA. Quatro das 92 amostras foram identificadas como *Enterococcus faecium*, 11 como *Enterococcus faecalis*, 26 como *Enterococcus gallinarum* e 51 como *Enterococcus casseliflavus*. Os fatores de risco que foram significativamente associados com a colonização por VRE incluíram nefropatia, diabetes mellitus, uso de antibiótico prévio à UTI, uso de vancomicina e carbapenêmicos na unidade sendo o uso de antibiótico prévio à UTI ( $P = 0,03$ ), uso de carbapenêmicos na unidade ( $P < 0,001$ ) e nefropatia ( $P < 0,001$ ) fatores de risco independentes para colonização. Nossa investigação evidenciou baixa frequência de colonização por MRSA (5,1%) durante o período estudado com 23,5% dos pacientes colonizados evoluindo com infecção por esse microrganismo ( $P < 0,001$ ; OR = 32,1), com destaque para os casos de sepse ( $P = 0,01$ ; OR = 20,9). A colonização por VRE, predominantemente do fenótipo VanC, foi frequente na UTI e embora de pouca importância clínica, esses microrganismos são considerados reservatórios de genes de resistência. Houve correlação positiva entre o uso de vancomicina e carbapenêmicos e a colonização por VRE. Apesar da baixa colonização por MRSA, observou-se uma relação entre a colonização e o desenvolvimento de sepse por esse microrganismo.

**Palavras-chave:** VRE, MRSA, colonização, fatores de risco, UTI.

## ABSTRACT

This investigation included a total of 78 VRE-colonized patients and 17 MRSA-colonized patients through study of the incidence in the period April 2009 to January 2010. We evaluated the rates of infection/colonization with these phenotypes, risk factors for colonization, antimicrobial susceptibility profile and characterization of *vanA* gene in enterococci strains with high level vancomycin resistance. The identification of *S. aureus* and enterococci species was performed by conventional biochemical tests. The vancomycin minimal inhibitory concentration (MIC) was evaluated by E-test method. The antimicrobial susceptibility profile and high level aminoglycoside resistance were carried out by disc-diffusion. To assess the genotype enterococcal strains expressing high-level vancomycin resistance, we used the polymerase chain reaction. Epidemiological data were recorded for all patients included in the study and were used for the risk factor analysis. A case-control study was then performed. The cases were defined as only patients with VRE colonization (n=21), and the controls were those without VRE colonization or infection from any organism (n=143). A total of 333 patients hospitalized were enrolled in this investigation. Of the 90 patients colonized with *Enterococcus* spp., 92 samples were isolated. Seventy seven patients (23.1%) were colonized with VanC VRE and only one patient (0.3%) with VanA-type. Four of 92 samples were identified as *Enterococcus faecium*, 11 as *Enterococcus faecalis*, 26 as *Enterococcus gallinarum* and 51 as *Enterococcus casseliflavus*. The risk factors that were determined through univariate analysis to be significantly associated with VRE colonization included nephropathy, diabetes mellitus, prior ICU antibiotic use, vancomycin and carbapenem use in the ICU. In the multivariate analysis, significant independent risk factors for VRE colonization were the nephropathy ( $P < 0.001$ ), prior ICU antibiotic use ( $P = 0.03$ ) and carbapenem use ( $P < 0.001$ ). Our investigation revealed a low frequency of MRSA colonization (5.1%) with 23.5% of colonized patients progressed to infection by this organism ( $P < 0.001$ , OR = 32.1), especially for cases of sepsis ( $P = 0.01$ , OR = 20.9). VRE colonization, particularly the VanC phenotype, was frequent in the ICU and although of little clinical importance, these microorganisms are considered reservoirs of resistance genes. There was a correlation between the vancomycin and carbapenems use and VRE colonization, although the results of multivariate analysis did not demonstrate vancomycin as an independent risk factor for VRE colonization. We found a low incidence of MRSA in the ICU and observed a significant relationship between colonization and the development of sepsis by this microorganism.

**Key-words:** VRE, MRSA, colonization, risk factors, ICU.

## 1 INTRODUÇÃO

Os cocos Gram-positivos *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., especialmente amostras multiresistentes são patógenos importantes no ambiente hospitalar restringindo as opções terapêuticas nos casos de infecções. Fenótipos de resistência epidemiologicamente importantes como o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA do inglês “Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*”) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE do inglês “Vancomycin resistant *enterococci*”) estão entre os principais microrganismos hospitalares com prevalências que variam entre os países, regiões, hospitais e unidades hospitalares (WOODFORD, LIVERMORE, 2009).

O gênero *Enterococcus* engloba um grupo de grande importância médica devido a características peculiares frente a outros microrganismos, como a resistência a maioria dos antimicrobianos e implicações clínicas quando do tratamento de infecções graves por amostras resistentes, além do risco potencial de transferência de genes de resistência para patógenos mais virulentos como o MRSA (SOOD et al, 2008). A emergência de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA do inglês “Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*”) fortalece a versão de que é necessário evitar o aumento na taxa de isolamento desses microrganismos multiresistentes (CHAMBERS; DELEO, 2009; PÉRICHON; COURVALIN, 2009).

Os enterococos fazem parte da microbiota comensal do intestino de animais e humanos, entretanto, podem ser associados a infecções do trato urinário, corrente sanguínea, intra-abdominais, endocardite, entre outras (MAZUSKI, 2008; SOOD et al, 2008). Atualmente são encontradas 37 espécies de enterococos, sendo o *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* as duas mais importantes, responsáveis por 80-90% e 5-15% das infecções enterocócicas hospitalares, respectivamente (MASCHIETO et al., 2004; SOOD et al, 2008). A importância de outras espécies de enterococos como *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*, colonizantes do trato intestinal de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, como agentes de infecções hospitalares vem aumentando (CHOI et al, 2004; DE PERIO et al., 2006; REID; COCKERILL; PATEL, 2001).

A emergência dessas espécies com alto nível de resistência à vancomicina mediado pelos genes *vanA* e *vanB* é preocupante e foi relatado em diferentes locais do mundo mas na maioria das vezes relacionado à colonização (MAHONY et al., 2010; NEVES et al., 2009).

A dinâmica das infecções adquiridas em hospitais, em especial em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) é complexa e depende das condições do hospedeiro, do agente infeccioso e do ambiente hospitalar. No que se refere aos enterococos, sua participação aumentou significativamente tornando-se o segundo microrganismo mais isolado em infecções urinárias e de incisão de sítio cirúrgico e o terceiro de bacteremias nos Estados Unidos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000; MUTNICK; BIEDENBACH; JONES, 2003).

A importância desse microrganismo nas infecções hospitalares decorre em parte de sua resistência intrínseca a maioria dos antimicrobianos incluindo as duas classes mais utilizadas na terapia de infecções hospitalares: cefalosporinas e fluorquinolonas. Atualmente, no que se refere à resistência adquirida das amostras resistentes aos poucos antibióticos disponíveis ampicilina, aminoglicosídeos e glicopeptídeos, é considerada um problema de saúde pública destacando-se os EUA onde ocupa a terceira colocação entre os microrganismos multiresistentes envolvidos em infecções hospitalares em UTIs (HIDRON et al. 2008).

O mecanismo de ação da vancomicina é a ligação a D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) dos precursores do peptidoglicano impedindo a formação desse polímero e, por consequência, inibindo a síntese da parede celular bacteriana. A resistência à vancomicina em níveis elevados é determinada pela presença dos genes *vanA*, *vanB* e *vanD* que codificam ligases que catalisam a formação de precursores alterados formados de D-alanina-D-lactato (D-Ala-D-Lac). O fenótipo de resistência de baixo nível à vancomicina (MIC 4 a 32 µg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina é provocado pela produção de ligases codificadas pelos genes *vanC*, *vanE*, *vanG* e *vanL* que catalisam a formação de D-alanina-D-serina (D-Ala-D-Ser) que incorporada aos precursores do peptidoglicano tem baixa afinidade de ligação à vancomicina (BRYANT; WILBECK, 2007; BOYD et al., 2008; WERNER et al., 2008).

Entre os enterococos com baixo nível de resistência à vancomicina já estão caracterizados três operons D-Ala-D-Ser: O operon *vanC* foi descrito em *Enterococcus gallinarum* (*vanC*) e *Enterococcus casseliflavus* (*vanC2/3/4*) e os operons *vanE*, *vanG* e *vanL* em amostras de *Enterococcus faecalis* (BOYD et al., 2008; WATANABE et al., 2009).

A emergência de amostras de VRE em UTIs de hospitais dos EUA é problema grave destacando-se pela maior morbidade, mortalidade e custos (EGGIMANN, PITTET, 2002).

A presença desse microrganismo foi relatada inicialmente no Reino Unido e França. Embora a maioria dos surtos reportados tenha ocorrido nos Estados Unidos, recentemente, esse patógeno tem sido também responsável por surtos em hospitais europeus, por outro lado,

a colonização assintomática é mais comum na Europa que nos Estados Unidos (JACOBY, 1996; LECLERCQ, 2009; TACCONELLI; CATALDO, 2008; WERNER et al., 2008). No Brasil, o primeiro VRE foi associado a um caso fatal de sepse por *E. faecium*, em uma criança de 9 anos com anemia aplástica, em Curitiba, PR. O paciente apresentava vários fatores de risco como hospitalização prolongada, imunossupressão e antibioticoterapia múltipla, incluindo cefalosporinas de terceira geração, imipenem e vancomicina durante longos períodos (COSTA et al., 1998). A seguir, outro caso foi descrito em São Paulo, relativo a uma mulher de 63 anos, com meningite por *E. faecium* do fenótipo VanA (ZANELLA et al., 1999). Posteriormente, um surto por VRE foi documentado no mesmo hospital, afetando grande número de pacientes (ZANELLA et al., 1999). Em Uberlândia, o primeiro caso de VRE (genótipo *vanA*) foi detectado em uma paciente politraumatizada, submetida a várias cirurgias, em uso de vancomicina e cefalosporinas de terceira geração, internada na enfermaria de clínica cirúrgica (RIBAS et al., 2007).

Atualmente são reconhecidos sete fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em enterococos:

- **Fenótipo VanA:** caracteriza-se pela alta resistência à vancomicina (MIC  $\geq$  64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) moderada a alta resistência à teicoplanina (MIC  $\geq$  16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sendo esta alta resistência mediada por um transposon, Tn1546 que contém os grupamentos gênicos (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* e *vanZ*) (LU et al., 2001; TACCONELLI; CATALDO, 2008).
- **Fenótipo VanB:** níveis altos de resistência induzida para vancomicina (MIC 32 a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), permanecendo susceptível a teicoplanina. A resistência é conferida pelo transposon Tn1547 que apresenta uma associação de genes (*vanR<sub>B</sub>*, *vanS<sub>B</sub>*; *vanW*, *vanH<sub>B</sub>*, *vanB* e *vanX<sub>B</sub>*) (LU et al., 2001; TACCONELLI; CATALDO, 2008).
- **Fenótipo VanC:** baixo nível de resistência à vancomicina (MIC 4 a 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e susceptibilidade a teicoplanina, sendo esta uma propriedade de espécies como *E. gallinarum*, que apresentam genes espécie-específicos como *vanC-1* e *vanC-2*. O gene *vanC-3* foi descrito em *E. casseliflavus* (NEVES et al., 2009; WOODFORD, 1998).
- **Fenótipo VanD:** caracterizado por resistência constitutiva para vancomicina (MIC  $\geq$  64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e susceptibilidade para teicoplanina (MIC = 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e é indistinguível do VanB pelos testes de susceptibilidade. Foi relatado em quatro amostras de *E. faecium*, sendo duas isoladas nos Estados Unidos (OSTROWSKY et al., 1999a), uma no Canadá (BOYD et al., 2000) e uma no Brasil (DALLA COSTA et al., 2000).

- **Fenótipo VanE:** relatado em uma amostra de *E. faecalis* com MIC de 16 µg/mL para vancomicina e 0,5 µg/mL para teicoplanina, apresenta o gene *vanE*, não é transferível e pode ser induzido pela presença de vancomicina (FINES et al., 1999).
- **Fenótipo VanG:** descrito recentemente em *E. faecalis* com nível moderado de resistência a vancomicina (MIC 16 µg/mL) e sensibilidade a teicoplanina (BOYD et al, 2006; MCKESSAR et al., 2000).
- **Fenótipo VanL:** descrito recentemente em uma amostra de *E. faecalis* com baixo nível de resistência à vancomicina (MIC 8 µg/mL) e sensibilidade a teicoplanina (BOYD et al., 2008).

Outro gênero de microrganismos de grande importância hospitalar é o *Staphylococcus* com destaque para o *Staphylococcus aureus* que é o agente etiológico mais comum nos hospitais brasileiros e sua frequência é superior a 50% nas infecções adquiridas em UTIs, tanto nos Estados Unidos quanto na Europa (HEDRON et al., 2008; JONES et al. 2004). Entre as infecções mais comuns atribuídas a esse microrganismo nessas unidades destacam-se as de sítio cirúrgico, pneumonias e de corrente sanguínea (CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010).

Nas últimas décadas o MRSA tornou-se um problema clínico e epidemiológico nos Estados Unidos, representando um desafio às práticas de controle e prevenção de infecção nos hospitais na maioria dos países (CHAMBERS; DELEO, 2009; KLEVENS et al., 2006; LEMMEN et al, 2004). No Brasil, esse fenótipo ocorre numa frequência de 40% e 80% na maioria dos hospitais, principalmente naqueles de assistência terciária e de ensino, e, ao contrário dos hospitais do hemisfério norte, está presente sem diferenças entre unidades críticas e não críticas (CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010; CAVALCANTI et al., 2006).

Entre os fatores de risco associados à aquisição de MRSA em hospitais incluem-se: internação em UTIs, idade superior a 60 anos, hospitalização prolongada, gravidade da doença, terapia antimicrobiana prolongada, procedimentos invasivos como ventilação mecânica, cateter venoso central, sonda vesical, cirurgias e a proximidade com pacientes colonizados por MRSA (SALGADO; FAIR; CALFEI, 2003). Os principais reservatórios de MRSA são pacientes infectados e colonizados na narina anterior, faringe, reto e úlcera por pressão e as mãos dos profissionais de saúde são a via de transmissão cruzada mais significativa (HARRIS et al., 2010; HONDA et al., 2010; HUMPHREYS et al, 2009).

O surgimento de amostras de MRSA, multiresistentes a maioria dos antimicrobianos disponíveis no tratamento de estafilococcias, tais como:  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas e fluorquinolonas (DELEO; CHAMBERS, 2009; JENSEN; LYON, 2009), está relacionado com a pressão seletiva de antibióticos proporcionando às amostras de MRSA vantagem seletiva para colonização e posterior infecção hospitalar, o que é justificado pela elevada densidade do uso de antimicrobianos nos hospitais brasileiros (MOREIRA et al., 2009). A identificação de *S. aureus* é importante para que a antibioticoterapia seja iniciada precocemente. Esta resistência ocorre graças à presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP do inglês *Penicillin-binding proteins*) de baixa afinidade com os beta-lactâmicos, chamada de PBP 2' ou PBP 2a, presente na membrana plasmática e codificada pelo gene cromossômico *mecA* usualmente associado a outros genes de resistência a antimicrobianos (DURENBERG; STOBBERINGH, 2008; WOODFORD, 2005).

Nos EUA mais de 10% dos leitos hospitalares são destinados às unidades críticas, ao contrário do que é observado no Brasil onde essa proporção é inferior (DORAWICHE, 2003) e essas unidades respondem por aproximadamente 40% de infecções hospitalares, de acordo com os dados de estudos multicêntricos (WENZEL; PERL, 1995). Os dados brasileiros são escassos com relatos de taxas de infecção adquiridas nas UTI de 31% no hospital São Paulo (TOUFEN JÚNIOR et al., 2003) e cerca de 50% no Hospital Clinicas da Universidade Federal de Uberlândia (RIBAS, 2003).

Vale ressaltar que a utilização crescente de vancomicina em função das infecções por MRSA nos hospitais incluindo no país resulta no aumento significativo de amostras de enterococos resistentes a esse glicopeptídeo (BRUIN; RILEY, 2007; JUNIOR et al., 2007, LEVINE, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Determinar as frequências e natureza de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) colonizando pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos (UTIA) do HC-UFU.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência da colonização nasal por MRSA e retal por VRE;
- Identificar fatores de risco inerentes do paciente e os iatrogênicos associados à colonização;
- Determinar a ocorrência de infecções por VRE e MRSA no HC-UFU;
- Determinar o perfil de susceptibilidade das amostras isoladas aos antimicrobianos;
- Determinar a presença do gene *vanA* em *Enterococcus* spp. nas amostras com MIC elevado para vancomicina.

### **3 JUSTIFICATIVA**

A elaboração deste projeto de pesquisa levou em consideração a importância que o MRSA e o VRE têm como agentes de infecções hospitalares e as evidências da prevalência significativa do primeiro e emergência do segundo no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, assim como a pouca disponibilidade de informações microbiológicas e, sobretudo epidemiológica no país. Entende-se que a realização de um estudo que permite avaliar a frequência de VRE e MRSA colonizando pacientes de UTI é extremamente relevante por permitir observar a persistência desses microrganismos no local.

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo de incidência de colonização por *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp., por meio de um sistema de busca ativa, na UTI de Adultos (UTIA) e através da vigilância de infecções por VRE no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Para avaliar os fatores de risco associados à colonização por VRE e MRSA, um estudo caso x controle foi realizado. Os sistemas de vigilância são descritos a seguir.

#### 4.1.1 Vigilância por busca ativa

Os pacientes incluídos no estudo foram àqueles internados na UTIA do HC-UFU de abril de 2009 a janeiro de 2010, acompanhados até alta ou óbito, com visitas diárias na unidade. Uma ficha individual seguindo o modelo do NHSN (“*National Healthcare Safety Network*” - APÊNDICE I) foi preenchida levando em consideração os dados demográficos, fatores de risco intrínsecos e extrínsecos e uso de antimicrobianos.

Foram coletados suabe nasal e de mucosa retal nas primeiras 24 horas de internação dos pacientes na UTIA e semanalmente até alta ou óbito ou até a confirmação da positividade para MRSA e VRE.

Os pacientes incluídos no estudo ou seus responsáveis foram esclarecidos sobre os objetivos do trabalho proposto e a coleta só foi realizada mediante a concordância e assinatura do termo de consentimento Livre e Esclarecido (ANEXOS II e III).

#### 4.1.2 Vigilância Laboratorial

Durante o período de abril de 2009 a abril de 2010, as amostras de VRE isoladas de casos de infecção foram obtidas no laboratório de microbiologia do Hospital e subcultivadas para os testes posteriores.

#### 4.1.3 Avaliação dos fatores de risco

Para avaliar os fatores de risco para colonização por VRE e o risco de pacientes colonizados por MRSA desenvolverem infecção foi realizado estudo caso x controle.

Para avaliar os fatores de risco para colonização por VRE os casos foram definidos como pacientes com colonização por VRE e sem infecção por qualquer microrganismo e os controles como aqueles sem colonização e sem infecção. Os seguintes fatores foram considerados: idade, gênero, tempo de hospitalização, cirurgia, comorbidades, uso prévio de antibióticos à internação na UTI e antibioticoterapia na unidade.

Para avaliar o risco de pacientes colonizados por MRSA desenvolverem infecção, os casos foram definidos como pacientes colonizados e os controles como aqueles sem colonização por MRSA.

## 4.2 DEFINIÇÕES

As definições de infecções hospitalares foram as recomendadas pelo “*Centers for Disease Control and Prevention*” (GAYNES; HORAN, 1995).

**Infecção Hospitalar** é aquela que não está presente ou em incubação no momento da admissão do paciente no hospital e que se manifesta após 48 horas de internação na UTI ou após alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares.

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

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

**Dose Diária Definida de antimicrobiano por 1000/pacientes-dia (DDD/1000 pacientes-dia):** Foram selecionados para cálculos das densidades de uso por 1000

pacientes/dia os seguintes antibióticos: carbapenêmicos, cefalosporinas de 3<sup>a</sup>/4<sup>a</sup> gerações e vancomicina. O consumo desses antibióticos foi medido observando a dose diária definida (DDD), como proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). A densidade de uso (DDD por 1000 pacientes-dia) foi obtida pela fórmula:

$$\text{DDD} = \frac{\text{Consumo de antibióticos em gramas}}{\text{Dose diária definida}}$$

$$\text{DDD/1000 pacientes-dia} = \frac{\text{DDD}}{\text{N}^{\circ} \text{ de pacientes-dia}} \times 1000^{\text{A}}$$

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

P = Período de tempo em observação, em dias.

L = Leitos disponíveis na unidade.

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

### 4.3 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

#### 4.3.1 Cultivo Primário e Isolamento

Espécimes obtidos a partir de suabe retal e nasal foram cultivados em caldo BHI (*Brain and Heart Infusion*) com 4% de NaCl incubados "overnight" a 37°C e então subcultivados em Ágar Enterococcosel com vancomicina na concentração de 6µg/mL para detecção de amostras resistentes à glicopeptídeos e Agar Manitol Salgado com 6µg/mL de oxacilina, para detecção de MRSA.

As colônias crescidas em ágar Enterococcosel com capacidade de hidrólise da esculina foram subcultivadas em ágar BHI para realização do teste da catalase, coloração de Gram e hidrólise de L-pirrolidonil-β-naftilamida.

As colônias crescidas em ágar Manitol Salgado com capacidade de fermentação do manitol foram subcultivadas em ágar BHI para realização do teste da catalase, coloração de Gram e coagulase livre.

#### 4.3.2 Amostras Controles

As seguintes amostras controles foram utilizadas: *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212 (susceptível à ampicilina, gentamicina e estreptomicina), *Enterococcus faecium* – ATCC 12805, *Enterococcus faecalis* CL-445 (*High level gentamycin resistance* - HLGR), *Enterococcus faecium* CL-240 (*High level streptomycin resistance* - HLAR), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensível à meticilina), *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (resistente à meticilina).

#### 4.3.3 Caracterização do Gênero *Enterococcus*

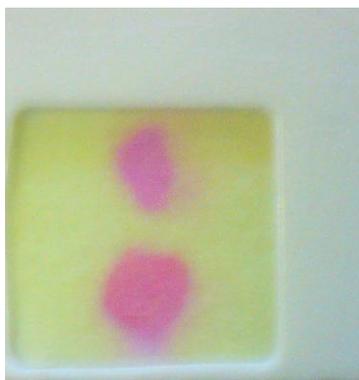
Para caracterização do gênero *Enterococcus* foi considerado o crescimento em meio Enterococcosel com hidrólise de esculina, observação das características morfo-tinturiais, ausência na produção de catalase e hidrólise da L-pirrolidoniol- $\beta$ -naftilamida.

#### 4.3.4 Produção de Catalase

A enzima catalase foi verificada em lâmina de microscopia pela mistura de uma ou duas colônias bacterianas com o peróxido de hidrogênio a 3%. A produção de bolhas foi identificada como teste positivo.

#### 4.3.5 Hidrólise da L-pirrolidoniol- $\beta$ -naftilamida (PYR)

Para realização do teste foi utilizado um kit comercial (BBL DrySlide PYR Kit, Becton, Dickinson and Company). Impregnou-se o slide de PYR com água destilada estéril. Com o auxílio de um palito de maneira estéril, fez-se um esfregão da amostra sobre o slide umedecido. Após 2 minutos a temperatura ambiente colocou-se uma gota da solução reveladora observando o desenvolvimento de uma cor rosa à fúcsia no primeiro minuto como indicativo de reação positiva. O desenvolvimento de cor amarela ou alaranjada ou o não desenvolvimento de cor era considerado negativo (Figura 1).



**Figura 1:** Teste de Hidrólise da L-pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR).

#### 4.3.6 Identificação das espécies de *Enterococcus*

A identificação a nível de espécie foi realizada através de um sistema simplificado baseado nos testes fenotípicos convencionais propostos por Teixeira, Siqueira-Carvalho, Facklam (2007). O Apêndice II mostra as características utilizadas na identificação.

Foram utilizados os seguintes testes para caracterização das espécies de enterococos:

##### 4.3.6.1 Produção de pigmento

A detecção da produção de pigmento foi realizada com o auxílio de um suabe. As colônias em ágar BHI após incubação a 35°C por 24 horas foram tocadas com o suabe e este examinado a olho nu. A presença de cor amarela forte ou amarelo-alaranjada foi considerada positivo, o creme ou amarelo pálido foi considerado negativo (Figura 2).

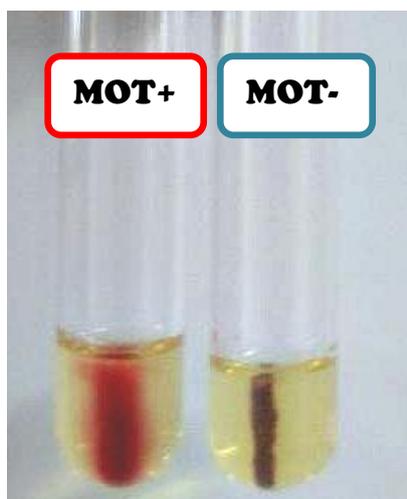


**Figura 2:** Teste de produção de pigmento.

#### 4.3.6.2 Prova da Motilidade

A prova da motilidade foi realizada no meio de Sulfeto-Indol-Motilidade (SIM) acrescido de 0,01% de cloreto 2,3,5-Trifenil Tetrazólio (TTC) . O meio foi esterilizado em autoclave e em seguida adicionado uma solução de TTC esterilizada por filtração de forma a obter uma concentração final de 0,01%.

O Trifenil Tetrazólio é um sal incolor que é reduzido a Trifenil Formazan (TTF) pelo microrganismo durante o seu crescimento. O TTF possui coloração avermelhada e por essa razão onde há crescimento bacteriano há produção de cor vermelha, o que facilita a leitura da motilidade (Figura 3).

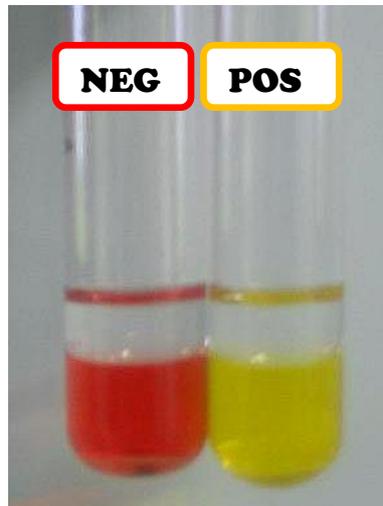


**Figura 3:** Teste de motilidade (SIM acrescido de 0.01% TTC).

#### 4.3.6.3 Teste de utilização de carboidratos

As bactérias a serem identificadas foram cultivadas em ágar BHI por 24 horas a 35°C. As colônias foram inoculadas em 2 mL de caldo vermelho de fenol e posteriormente adicionado um disco (Laborclín - Produtos para laboratório Ltda) do carboidrato a ser testado (arabinose, sorbitol) de forma a obter a concentração final de 1%. Os tubos foram selados com 1 mL de óleo mineral estéril. As leituras foram realizadas após 24 horas de incubação a

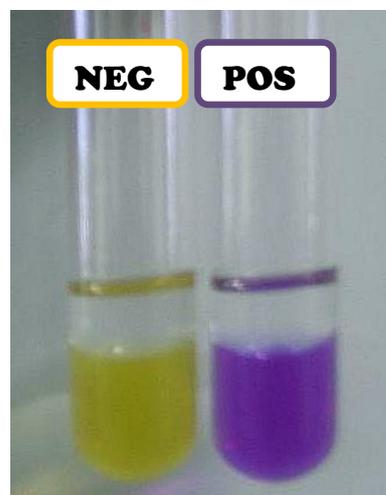
35°C, sendo considerados positivos os testes com alteração de cor de vermelho para amarelo (Figura 4).



**Figura 4:** Teste de utilização de carboidratos (Sorbitol, Arabinose).

#### 4.3.6.4 Desaminação da arginina

O teste foi realizado em meio de *Descarboxylase Base Moeller* (DIFCO), acrescido de 1% de L-arginina. Após inoculação os tubos foram selados com 1 mL de óleo mineral estéril e incubados a 35°C por até 72 horas. A presença da cor púrpura original indicava reação positiva devido à alcalinização do meio provocada pela liberação de grupos amina produtos da desaminação da arginina, enquanto a cor amarela indicava acidificação do meio devido à fermentação de glicose e, correspondia a um resultado negativo (Figura 5).



**Figura 5:** Teste de desaminação da arginina.

#### 4.3.7 Identificação do gênero *Staphylococcus* e da espécie *S. aureus*

Para caracterização da espécie *Staphylococcus aureus* foram consideradas a capacidade de crescimento em ágar Manitol Salgado com fermentação de manitol, a observação das características morfo-tinturiais, produção de catalase (idem item 4.3.4) e coagulase livre.

##### 4.3.7.1 Produção de coagulase livre

Um tubo com 0,5 mL de caldo BHI foi inoculado com 2 a 3 colônias da amostra teste e incubado por 24 horas. A seguir adicionado 0,5 mL de plasma de coelho e incubado novamente à 35°C por 24 horas. A leitura foi feita após 4 h e confirmado até 24 horas de incubação. A formação de coágulo foi considerada como resultado positivo.

#### 4.3.8 Teste de difusão com disco

As amostras foram submetidas à avaliação frente a antimicrobianos, seguindo a metodologia do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (2009), utilizando-se os seguintes discos de antimicrobianos:

- ***Staphylococcus aureus***: rifampicina (5µg), ceftriaxona (30µg), clindamicina (2µg), cefalotina 30µg), tetraciclina 30µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25µg), ampicilina (10µg), cefoxitina (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), vancomicina (30µg), cloranfenicol (30µg), imipenem (10µg), eritromicina (15µg), amicacina (30µg) e oxacilina (1µg).
- ***Enterococcus spp.***: rifampicina, ampicilina (10µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), ciprofloxacina (10µg), penicilina (10µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg).

Os inóculos bacterianos foram preparados em caldo BHI, a partir de incubação por 18 a 24 horas, a 35°C, de forma a obter uma turvação equivalente a escala de 0,5 de McFarland e

semeada em placa de ágar Müeller-Hinton. Em seguida, foram adicionados os discos contendo os antibióticos. As leituras foram realizadas após a incubação a 37°C por 24 horas.

#### 4.3.9 Teste D

O teste D foi realizado para detecção de resistência induzível à Clindamicina. Todos os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a eritromicina e sensíveis à clindamicina foram testados. O inóculo bacteriano foi preparado em caldo BHI, a partir do crescimento por 18 a 24 horas, a 35°C, de forma a obter uma turvação equivalente a escala de 0,5 de McFarland e semeado em placa de ágar Müeller-Hinton. Foi adicionado um disco de eritromicina a uma distância de 15 a 26 mm (borda a borda) do disco de clindamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O achatamento do halo de inibição, adjacente ao disco de eritromicina, com a forma da letra D foi considerado positivo e o isolado reportado como resistente à Clindamicina.

#### 4.3.10 Detecção de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos

Para detecção de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foi utilizada a técnica de disco difusão, segundo as recomendações do CLSI (2009). Os inóculos bacterianos foram preparados em caldo BHI, a partir do crescimento por 18 a 24 horas, a 35°C, de forma a obter uma turvação equivalente a escala de 0,5 de McFarland e semeada em placa de ágar Müeller-Hinton. Em seguida foram adicionados discos de gentamicina (120µg) e estreptomicina (300µg). As leituras foram realizadas após a incubação a 37°C por 24 horas (Figura 6).

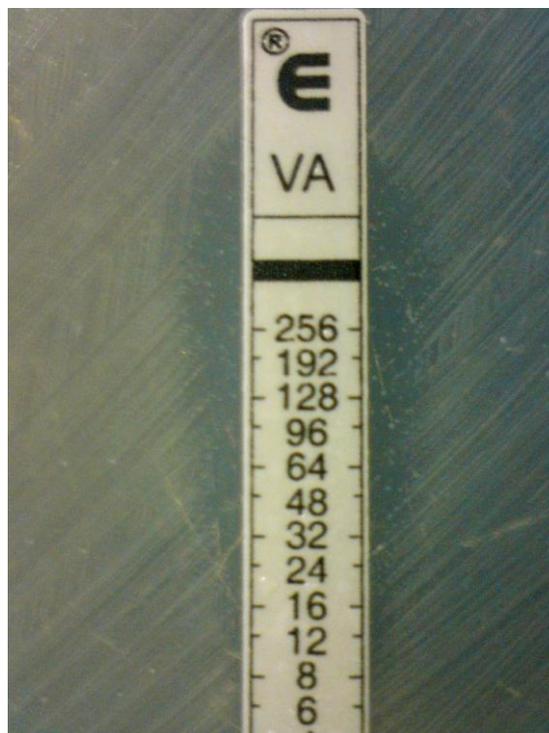
#### 4.3.11 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima para vancomicina foi realizada utilizando fita de E-test (AB Biodisk, Suécia). O inóculo bacteriano foi preparado em caldo BHI, a partir do crescimento por 18 a 24 horas, a 35°C, de forma a obter uma turvação equivalente a escala de 0,5 de McFarland e semeada em placa de ágar Müeller-Hinton.

Adicionou-se uma fita de E-test de vancomicina. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas. A leitura foi realizada considerando o valor do MIC o ponto de intersecção entre o halo de inibição e a fita de E-test (Figuras 6 e 7).



**Figura 6:** Teste de disco difusão com os discos de Gentamicina (120 $\mu$ g) e Estreptomicina (300 $\mu$ g) para detecção de resistência em nível elevado aos aminoglicosídeos e fita de E-test para determinação do MIC de vancomicina



**Figura7:** Fita de E-test para determinação da concentração inibitória mínima de vancomicina.

#### 4.4 TESTES MOLECULARES

As amostras de enterococos com nível elevado de resistência à vancomicina foram submetidas a testes moleculares para confirmação das espécies e dos genótipos de resistência.

##### 4.4.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico das amostras de enterococos foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os enterococos foram cultivados em ágar sangue a 35°C por 24 horas. Duas a três colônias da cultura foram suspensas em 500µL de água milli-Q e centrifugadas por 10 minutos a 5000xg (7.500rpm) para obtenção do pellet. O pellet foi suspenso em 180µL da solução de lisozima (20mg/mL de lisozima; 20mM Tris-HCl, pH8,0; 2mM EDTA; 1,2% Triton) e incubado por 30 minutos a 37°C. Em seguida, adicionou-se 20µL de proteinase K e 200µL do tampão AL e agitou-se em vortex. A mistura foi incubada a 56°C por 30 minutos e, em seguida, mais 15 minutos a 95°C, e então centrifugada brevemente para remoção das gotas da tampa. Adicionou-se 200µL do tampão AL na amostra, homogeneizou-se por vortex por 15 segundos, e incubou-se a 70°C por 10 minutos. A solução foi centrifugada brevemente, adicionou-se 200µL de etanol (96-100%) e homogeneizou-se por vortex por 15 segundos seguido de outra centrifugação breve.

A mistura foi aplicada à coluna Mini spin QIAamp e centrifugada a 6000xg (8.000rpm) por 1 minuto. A coluna foi transferida para um tubo limpo e o conteúdo filtrado descartado. Adicionou-se a coluna 500µL de tampão AW1 e centrifugou-se a 6000xg (8.000 rpm) por 1 minuto. A coluna foi novamente transferida para outro tubo descartando o filtrado. Adicionou-se 500µL de tampão AW2 à coluna e centrifugou-se a velocidade máxima (20.000xg; 14.000 rpm) por 3 minutos. A coluna foi colocada em outro tubo, o filtrado descartado e novamente centrifugou-se por 1 minuto na velocidade máxima para se eliminar contaminação com o tampão AW2.

Para a eluição do DNA, a coluna foi transferida a outro tubo e então adicionado 100µL de tampão AE (tampão de eluição), incubada a temperatura ambiente por 1 minuto, e em seguida, centrifugada a 6000xg (8.000rpm) por 1 minuto. O processo foi repetido, adicionando-se 100µL de tampão AE prolongando a incubação por 5 minutos seguindo-se outra centrifugação. O DNA extraído foi então conservado a -20°C até a utilização.

#### 4.4.2 Confirmação das espécies por Multiplex PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada com a finalidade de confirmar a identificação fenotípica das amostras de enterococos com nível elevado de resistência à vancomicina. A identificação foi realizada utilizando os primers específicos de cada espécie segundo a Tabela 1.

Para a amplificação dos genes das espécies foi utilizado 8µL da suspensão de DNA extraído conforme descrição anterior. A reação foi preparada para um volume final de 25µL utilizando os seguintes reagentes: água ultra pura milli-Q, solução tampão da Taq 5X diluído para uma concentração final de 1X, 1mM de cloreto de magnésio, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Promega Corporation), os quatro desoxiribonucleotídeos (dNTP) na concentração de 0,2 mM (Promega Corporation), 37,5 pmols dos primers específicos para cada espécie. O termociclador utilizado foi *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Como controles da reação foram utilizadas amostras de *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*.

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

A análise dos produtos da reação foi realizada adicionando-se 2µL de azul de bromofenol a 6µL do produto amplificado, transferindo-os para um gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE 1X e 5µL de brometo de etídio (10 mg/mL) a cada 100 mL de gel. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (BioAmerica Inc).

A eletroforese foi corrida a 90V por cerca de 60 minutos, no tampão de corrida também foi adicionado 5µL de brometo de etídio para cada 100 mL de tampão. O gel foi então visualizado usando um transluminador. A foto do gel foi retirada utilizando uma câmera digital de 2 Megapixel com efeito preto e branco.

**Tabela 1:** *Primers* utilizados na realização das reações de PCR para confirmação das espécies e detecção dos genes de resistência

Gene Amplificado	Produto da Amplificação (pb)	Primers (5'-3')		Referência
		Pares	Sequências	
ddl <i>E. faecalis</i>	941	EFS – A	ATC AAG TAC AGT TAG TCT T	Dukta-Malen, Evers, Courvalin, 1995
		EFS – B	ACG ATT CAA AGC TAA CTG	
ddl <i>E. faecium</i>	550	EFE – 1	GCA AGG CTT CTT AGA GA	Dukta-Malen, Evers, Courvalin, 1995
		EFE – 2	CAT CGT GTA AGC TAA CTT C	
vanC 1 <i>E. gallinarum</i>	822	vanC - 1A	GGT ATC AAG GAA ACC TC	Dukta-Malen, Evers, Courvalin, 1995
		vanC - 1B	CTT CCG CCA TCA TAG CT	
vanC 2-3 <i>E. casseliflavus</i>	439	vanC - 2/3A	CTC CTA CGA TTC TCT TG	Dukta-Malen, Evers, Courvalin, 1995
		vanC - 2/3B	CGA GCA AGA CCT TTA AG	
vanA	399	A <sub>1</sub>	ATG GCA AGT CAG GTG AAG ATG G	Woodford et al., 1993
		A <sub>2</sub>	TCC ACC TCG CCA ACA ACT AAC G	
vanB	589	B <sub>1</sub>	TCT GTT TGA ATT GTC TGG TAT	Woodford et al., 1993
		B <sub>2</sub>	GAC CTC GTT TAG AAC GAT G	

#### 4.4.3 Detecção dos genótipos de resistência

A reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes de resistência foi realizada utilizando os “*primers*” descritos na tabela 1 segundo o protocolo de Woodford et al. (1993).

Para a amplificação dos genes das espécies foi utilizado 5µL da suspensão de DNA extraído conforme descrição anterior. A reação foi preparada para um volume final de 25µL utilizando os seguintes reagentes: água ultra pura milli-Q, solução tampão da Taq 5X diluído para uma concentração final de 1X, 1mM de cloreto de magnésio, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Promega Corporation), os quatro desoxiribonucleotídeos (dNTP) na concentração de 0,2 mM (Promega Corporation), 25 pmols dos “*primers*” específicos para cada gene. O termociclador utilizado foi *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) e como controle da reação foi utilizado uma amostra de *E. faecium vanA*.

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

A análise dos produtos da reação, eletroforese, visualização e documentação do gel foram realizadas como descrito no item 4.4.2.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos fatores de risco para colonização foram realizadas utilizando-se o teste do  $\chi^2$  para comparação entre os valores quando o n foi maior que 5 e o teste exato de Fisher quando o n foi menor ou igual a cinco. Os fatores de risco foram comparados individualmente contra uma variável resposta (análise univariada) através de tabelas de contingência do tipo dois por dois (2 x 2). Para evitar o enlear, que muitas vezes surge como uma consequência da própria análise univariada, este foi reajustado através da estratificação que é a estimação de medidas de associação (*Odds Ratio*) para cada uma das categorias da variável. As variáveis que demonstraram medidas de associação altas (*Odds Ratio*) foram submetidas à análise multivariada através de modelo de regressão logística. O teste t de *Student* foi utilizado para comparar médias. A significância estatística foi definida por um valor de p menor que 0,05. A análise das variáveis foi realizada utilizando-se os programas estatísticos GraphPad Prism 4 e o EpiInfo Software versão 2000 (CDC, Atlanta).

#### 5 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia sob o número de protocolo 039/09 (ANEXO I). O modelo dos termos de consentimento livre e esclarecido assinados pelos pacientes incluídos no estudo ou seus responsáveis encontra-se em anexo (ANEXOS II e III, respectivamente).

## 6 RESULTADOS

Durante o período de Abril de 2009 a Janeiro de 2010 foi realizada vigilância da incidência de colonização por *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos (UTIA) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).

As características demográficas, clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo estão na Tabela 2. As taxas de infecção hospitalar entre os pacientes foram de 44,4%, com 96,5% delas adquiridas na própria unidade. Dos pacientes incluídos no estudo, 65,5% foram do gênero masculino, com média de idade de 49 anos (14-89 anos), 94 (28,2%) eram pacientes cirúrgicos seguido de 70 (21%) apresentando trauma como diagnóstico de entrada.

Aproximadamente 52% dos pacientes admitidos na unidade necessitaram de cirurgia. As principais comorbidades observadas incluíram Cardiopatia (31,5%), Doença Vascular (19,5%), Diabetes Mellitus (15,9%) e Nefropatia (12,6%). Em relação ao uso de procedimentos invasivos observou-se maior frequência no uso de sonda vesical (90,4%), seguido de cateter venoso central (88,8%) e ventilação mecânica (63,9%). A média do tempo de internação entre os pacientes foi de 12,7 dias (1-95 dias) e uma taxa de mortalidade total na unidade de 17,7%.

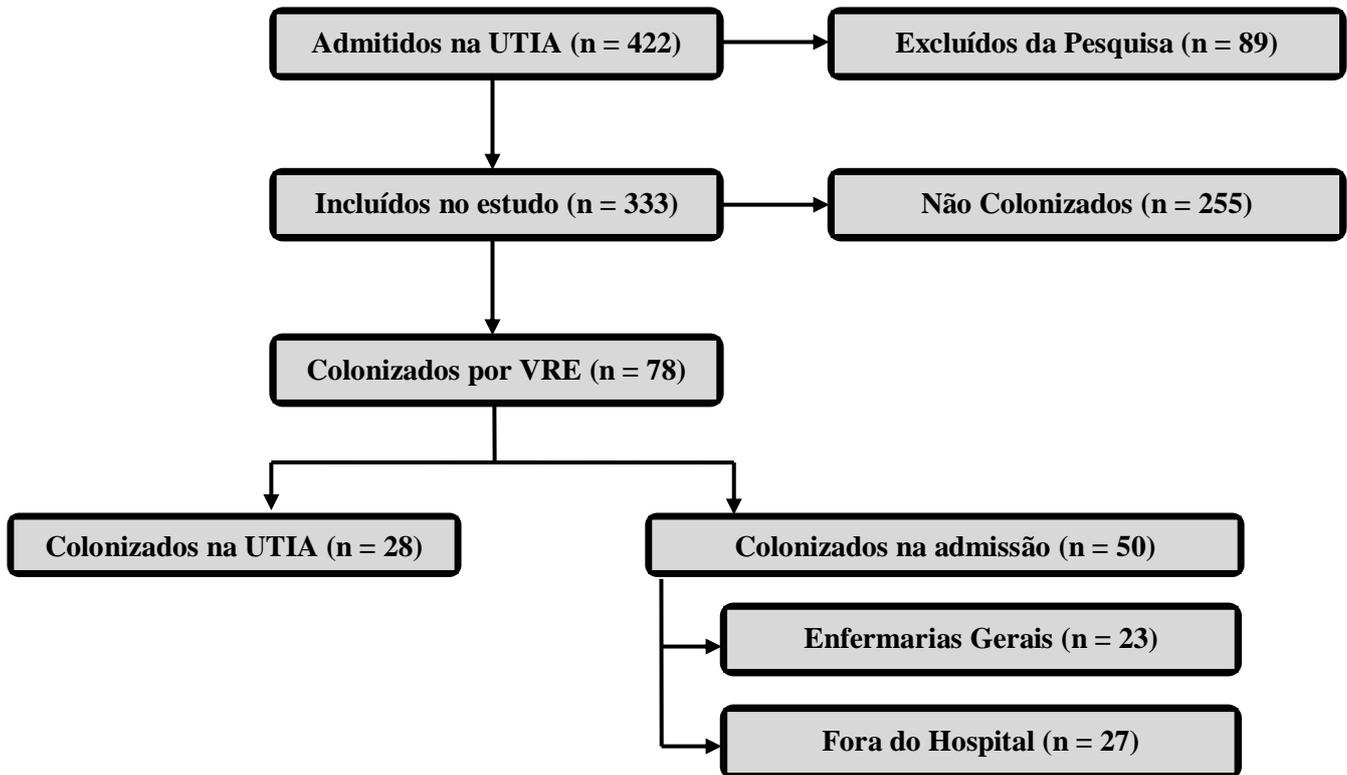
**Tabela 2:** Características clínicas e demográficas dos pacientes incluídos na pesquisa

<b>Características</b>	<b>Pacientes N=333 (%)</b>
<b>Idade, anos, <math>\pm</math> SD<sup>1</sup></b>	49,12 ( $\pm$ 18,35)
<b>Tempo de Internação, dias, <math>\pm</math> SD</b>	12,68 ( $\pm$ 12,99)
<b>Gênero</b>	
Masculino	218 (65,5)
Feminino	115 (34,5)
<b>Diagnóstico de Internação</b>	
Clínico	169 (50,7)
Cirúrgico	94 (28,2)
Trauma	70 (21,1)
<b>Uso Prévio de Antibiótico</b>	83 (24,9)
Glicopeptídeos	31 (9,3)
Cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> e 4 <sup>a</sup> geração	55 (16,5)
Outras classes	35 (10,5)
<b>Procedimentos Invasivos</b>	
Cateter Venoso Central	296 (88,8)
Ventilação Mecânica	213 (63,9)
Sonda Vesical	301 (90,4)
Dreno	88 (26,4)
Sonda nasoenteral, nasogástrica ou orogástrica	156 (46,8)
Nutrição Parenteral	27 (8,1)
<b>Cirurgia</b>	173 (51,9)
<b>Comorbidades</b>	
Cardiopatia	105 (31,5)
Doença Vascular	65 (19,5)
Diabetes Mellitus	53 (15,9)
Nefropatia	42 (12,6)
DPOC <sup>3</sup>	16 (4,8)
Doença Auto-Imune	15 (4,5)
<b>Mortalidade Total</b>	78 (23,4)
Dentro da UTI <sup>2</sup>	59 (17,7)
Fora da UTI	19 (5,7)

<sup>1</sup> SD Desvio Padrão; <sup>2</sup> UTI, Unidade de Terapia Intensiva, <sup>3</sup> DPOC, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

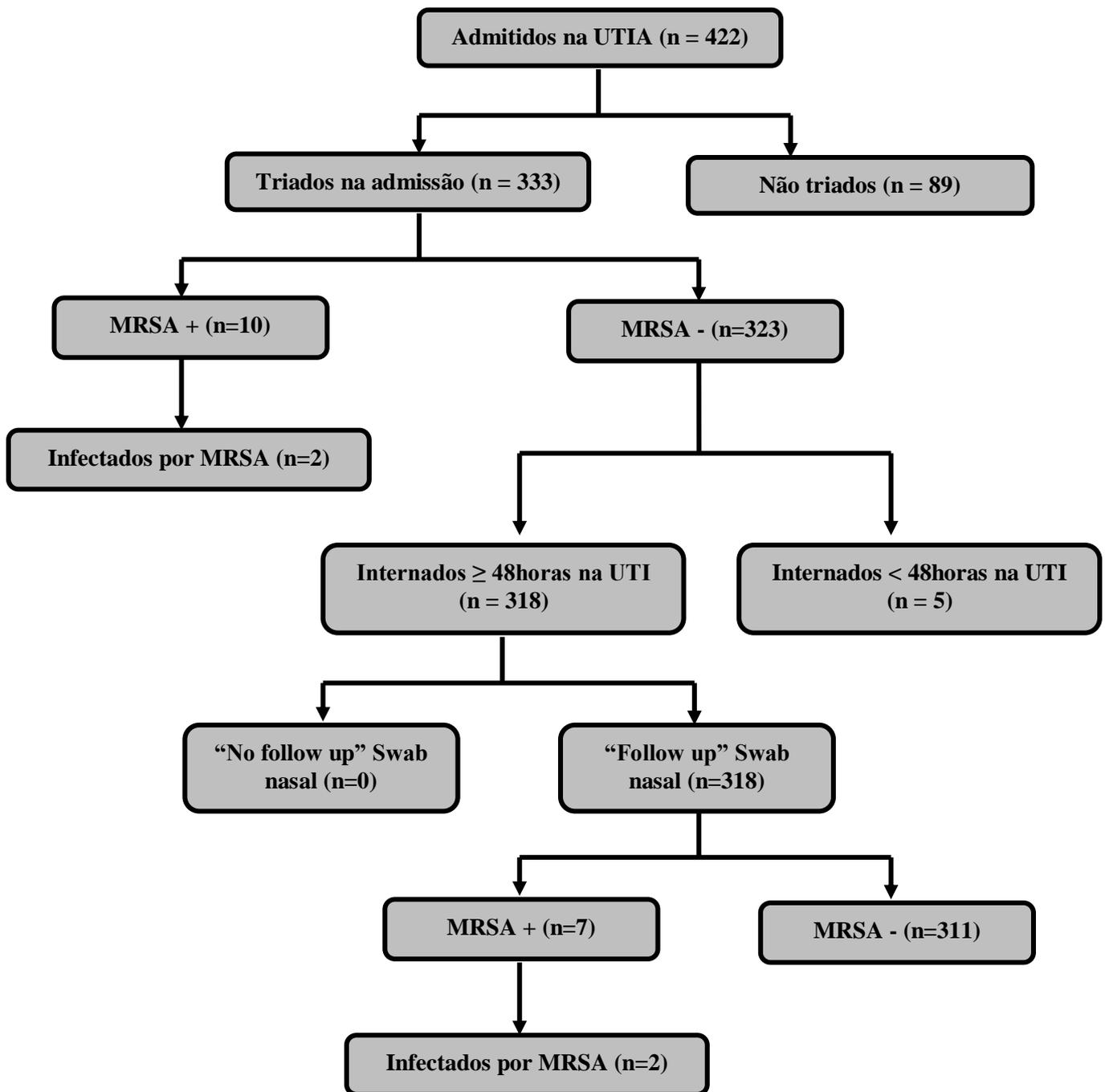
Durante o período de estudo foram internados na unidade 422 pacientes dos quais 89 foram excluídos por impossibilidade de coleta do espécime clínico. Dos 422 pacientes admitidos na UTI, 328 permaneceram por mais que 48 horas. Nós observamos uma taxa de colonização de 23,4% (78 de 333 pacientes) sendo que 50 dos 78 pacientes estavam

colonizados com VRE no momento da admissão na UTI, dos quais 46% (23 de 50 pacientes) foram transferidos de enfermarias gerais e 54% (27 de 50 pacientes) de fora do hospital (Figura 8).



**Figura 8:** Organograma da população estudada quanto à colonização por VRE

Do total dos pacientes triados 5,1% estavam colonizados com MRSA, sendo 3,0% no momento da admissão. 318 pacientes permaneceram internados na unidade por mais de 48 horas, com 100% de triagem nasal. Sete (2,1%) colonizaram durante a estadia na unidade, sendo que dois pacientes evoluíram para sepse por MRSA (Figura 9).

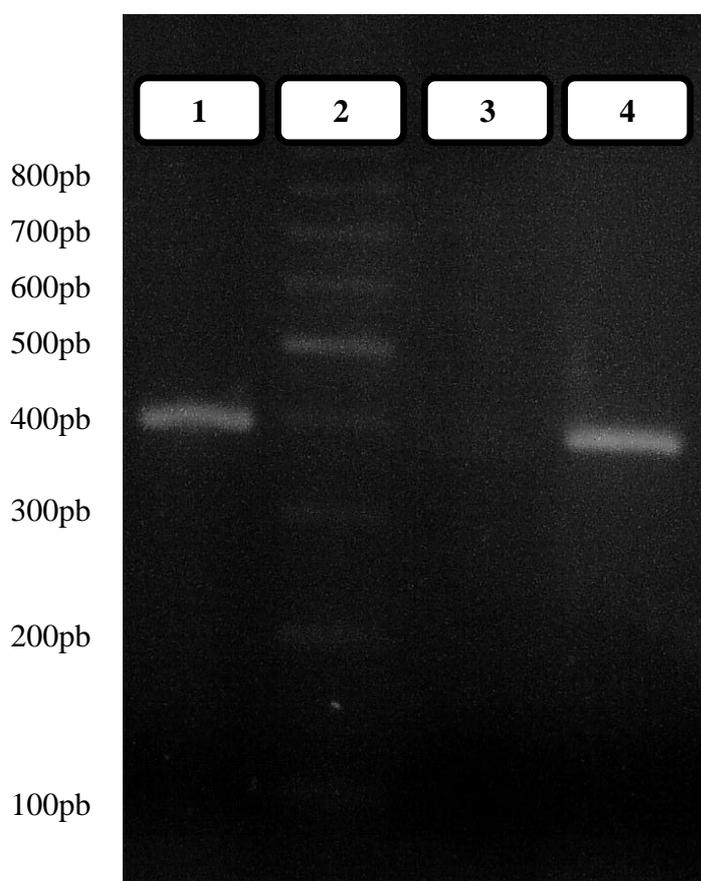


**Figura 9:** Organograma da população estudada quanto à colonização por MRSA

*Enterococcus* spp. foi isolado em 90 (27%) dos 333 pacientes incluídos no estudo, e dois deles (2,2%) possuíam duas espécies de enterococos nas amostras fecais. As espécies de enterococos isoladas em nosso estudo incluíram: *Enterococcus casseliflavus* (55,4%), seguido de *Enterococcus gallinarum* (28,3%), *Enterococcus faecium* (12%) e *Enterococcus faecalis* (4,3%), como indicado na tabela 3. Nós isolamos apenas uma amostra de *Enterococcus faecalis* carregando o gene *vanA*, detectado pelo PCR (Figura 10).

**Tabela 3:** Distribuição de espécies de enterococos isoladas do trato gastrointestinal dos pacientes estudados

Espécies	N = 92 (%)
<i>E. faecium</i>	4 (4,3)
<i>E. faecalis</i>	11 (12,0)
<i>E. gallinarum</i>	26 (28,3)
<i>E. casseliflavus</i>	51 (55,4)



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes *vanA* e *vanB*. Linhas 1: *E. faecium vanA*; 2: marcador de peso molecular 100pb (PM); 3: Controle Negativo (H<sub>2</sub>O); 4: Isolado de colonização do HC-UFU (A1).

Em relação aos padrões de resistência “*in vitro*” dos 92 isolados de enterococos, observamos que a resistência a eritromicina foi a mais frequente (45,7%), seguida de tetraciclina (32,6%), ciprofloxacina (17,3%) e cloranfenicol (10,9%). Nenhum dos isolados foi resistente à ampicilina e a resistência à vancomicina foi rara, detectada apenas em um

isolado (1,3%). 16,3% dos isolados apresentaram alto nível de resistência para gentamicina (HLGR) e estreptomicina (HLSR) conforme indicado na tabela 4.

Foi observada associação entre isolados com HLGR e HLSR e resistência à eritromicina. Entre os 15 isolados com resistência de nível elevado aos aminoglicosídeos 93.3% foram também resistentes à eritromicina. Ao contrário, somente três (20%) dos isolados foram resistentes à ciprofloxacina. Apenas um isolado apresentou simultaneamente alto nível de resistência aos dois aminoglicosídeos testados.

**Tabela 4:** Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco difusão das amostras de enterococos isolados de pacientes da UTIA do HC-UFU no período de abril/2009 a janeiro/2010

Antimicrobiano	Sensível N(%)	Intermediário N(%)	Resistente N(%)
Rifampicina	90 (97,8)	1 (1,1)	1 (1,1)
Cloranfenicol	82 (89,1)	0 (0)	10 (10,9)
Vancomicina	91 (98,9)	0 (0)	1 (1,1)
Eritromicina	50 (54,3)	17 (18,5)	25 (27,2)
Penicilina	90 (97,8)	0 (0)	2 (2,2)
Ciprofloxacina	76 (82,7)	12 (13,0)	4 (4,3)
Tetraciclina	62 (67,4)	29 (31,5)	1 (1,1)
Ampicilina	92 (100)	0 (0)	0 (0)
HLGR <sup>1</sup>	89 (96,7)	0 (0)	3 (3,3)
HLSR <sup>2</sup>	80 (87,0)	0 (0)	12 (13,0)

<sup>1</sup>HLRG, *High level gentamicin resistance*, resistência a altos níveis de gentamicina;

<sup>2</sup>HLSR, *High level streptomycin resistance*, resistência a altos níveis de estreptomicina

O MIC50 e MIC90 para vancomicina das espécies de *Enterococcus* são indicados na tabela 5. A Concentração Inibitória Mínima requerida para inibir 90% dos isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* foi 4µg/mL e para *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* foi 8µg/mL.

**Tabela 5:** MIC 50 e MIC 90 para vancomicina em 92 isolados de *Enterococcus* spp.

Antimicrobiano	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. casseliflavus</i>		<i>E. gallinarum</i>	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
Vancomicina	4µg/mL	4µg/mL	3µg/mL	4µg/mL	6µg/mL	8µg/mL	6µg/mL	8µg/mL

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) recuperados durante o estudo mostraram perfil de multiresistência, definido como resistência a todos os beta-

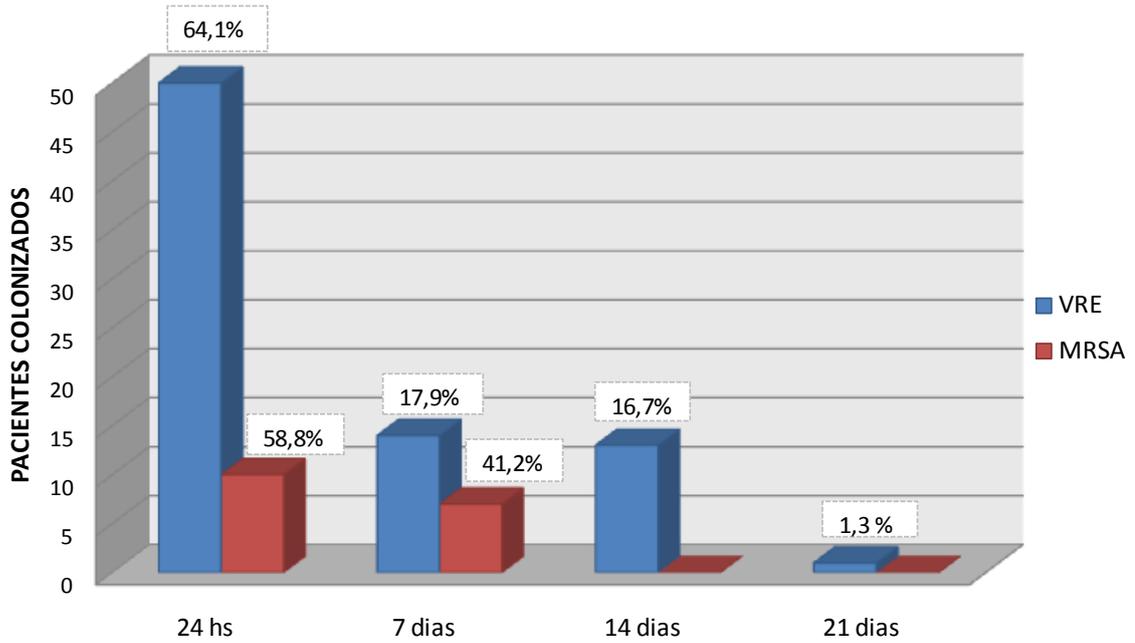
lactâmicos além da resistência a outras classes de antimicrobianos conforme demonstrado na tabela 6.

**Tabela 6:** Perfil de suscetibilidade de acordo com o método de disco difusão das amostras de MRSA isolados de pacientes da UTIA do HC-UFU no período de abril/2009 a janeiro/2010

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Sensível N(%)</b>	<b>Intermediário N(%)</b>	<b>Resistente N(%)</b>
Vancomicina	17 (100)	0 (0)	0 (0)
Clindamicina	4 (23,5)	0 (0)	13 (76,5)
Eritromicina	0 (0)	2 (11,8)	15 (88,2)
Penicilina	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Oxacilina	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Cefoxitina	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Cefepime	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Rifampicina	17 (100)	0 (0)	0 (0)
Cloranfenicol	15 (88,1)	1 (5,2)	1 (5,2)
Gentamicina	9 (52,9)	0 (0)	8 (47,1)
Ciprofloxacina	4 (23,5)	0 (0)	13 (76,5)
Tetraciclina	9 (52,9)	0 (0)	8 (47,1)
Sulfazotrim <sup>1</sup>	9 (52,9)	0 (0)	8 (47,1)
Ceftriaxona	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Ampicilina	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Amicacina	5 (29,4)	4 (23,5)	8 (47,1)
Cefalotina	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Imipenem	0 (0)	0 (0)	17 (100)

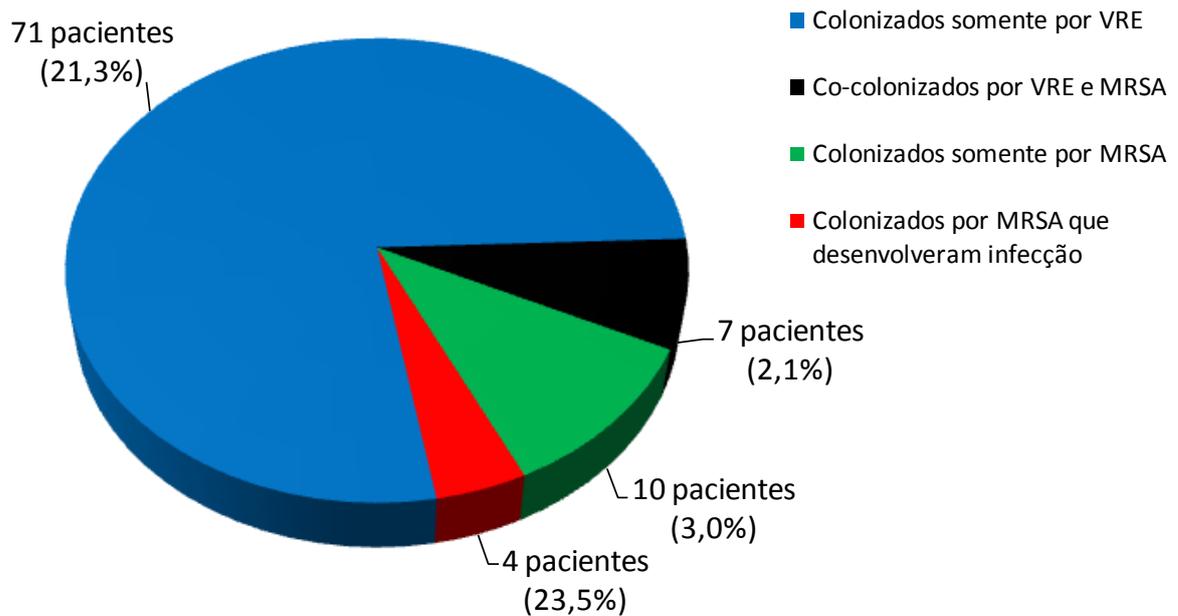
<sup>1</sup>Sulfazotrim, Sulfametoxazol-Trimetoprim

Na figura 11 estão demonstrados os pacientes colonizados por VRE no trato intestinal de acordo com o momento das coletas. A maioria dos pacientes (64,1%) chegou colonizado na unidade, e o restante (28 pacientes, 35,9%) adquiriu a colonização nas duas semanas seguidas à internação na UTI.



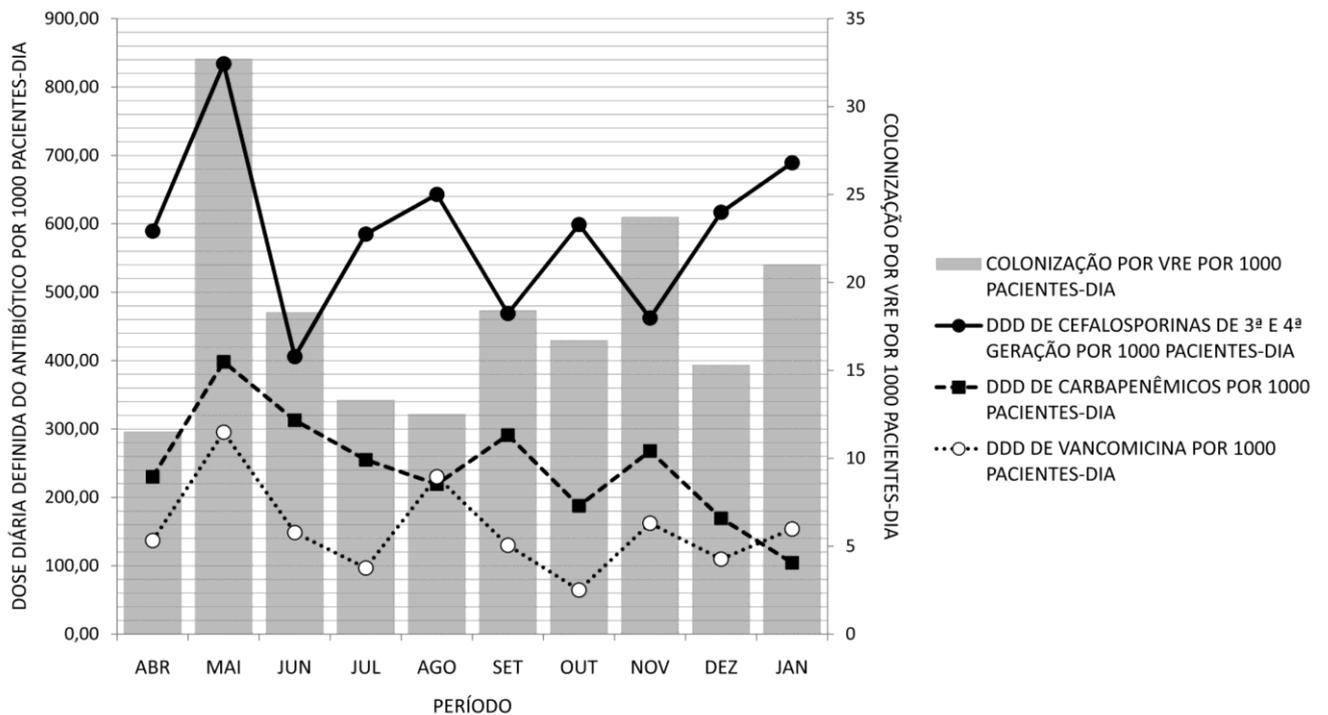
**Figura 11:** Pacientes colonizados por VRE e MRSA de acordo com o momento das coletas

Do total de pacientes 21,3% e 3,0% estavam colonizados somente por VRE e MRSA respectivamente. A co-colonização foi observada em 2,1% dos pacientes (Figura 12).

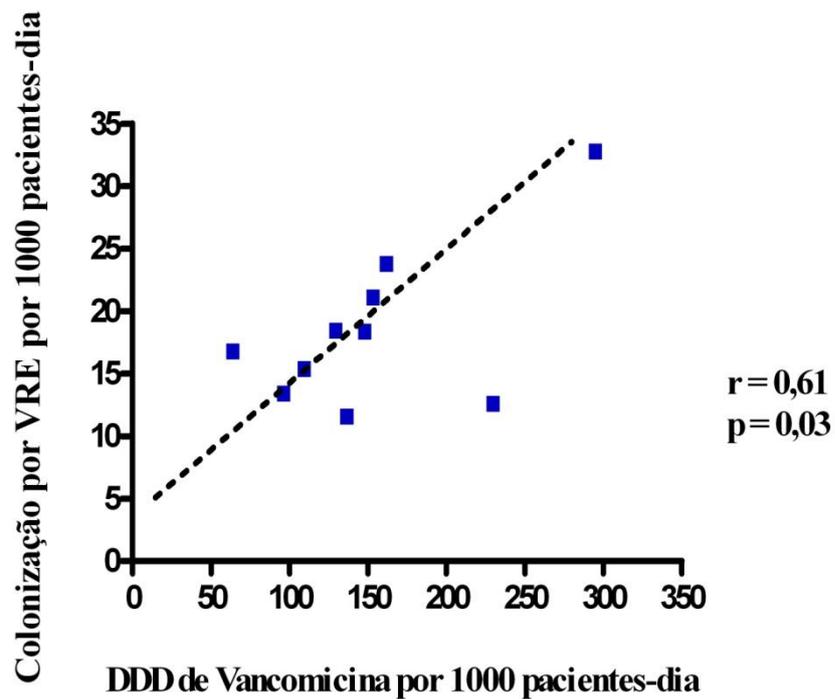


**Figura 12:** Colonização por VRE, MRSA, co-colonização e infecção entre os pacientes colonizados por MRSA de Abril de 2009 a Janeiro de 2010.

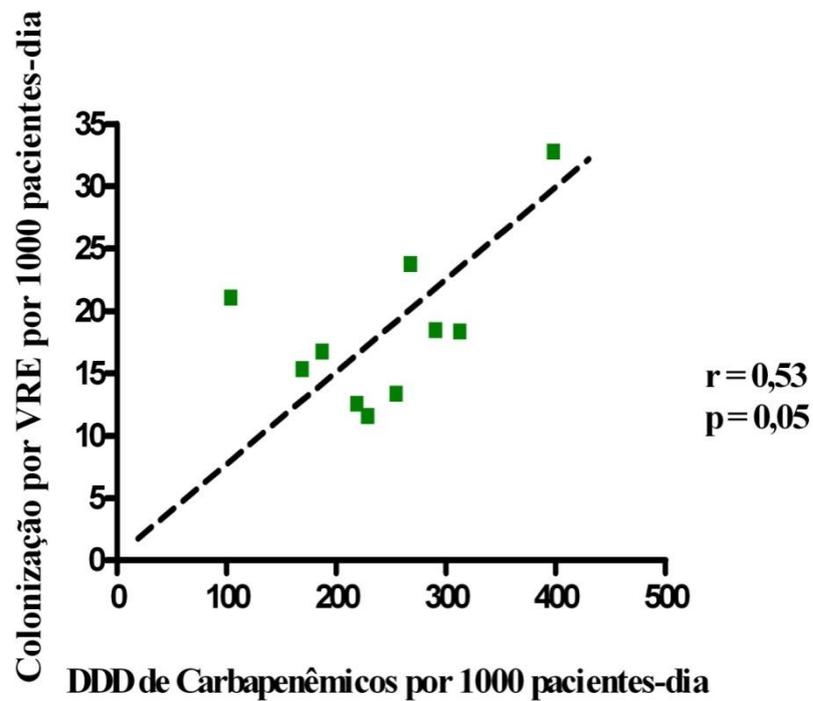
O consumo de vancomicina, carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira e quarta geração na unidade variou durante o período de estudo (Figura13). Mesmo observando alta densidade no uso dessas cefalosporinas, ( $DDD_{\text{CEFALOSPORINAS}} = 589.33/1000$  pacientes-dia) somente o uso de vancomicina ( $DDD_{\text{VANCOMICINA}} = 152.78/1000$  pacientes-dia) e carbapenêmicos ( $DDD_{\text{CARBAPENÊMICOS}} = 243.53/1000$  pacientes-dia) foram relacionadas ao aumento na incidência de colonização por VRE de acordo com a correlação de Pearson (Figuras 14 e 15).



**Figura 13:** Relação entre os microrganismos isolados de colonização e a densidade de uso da vancomicina (DDD por 1000 pacientes-dia) na UTI de adultos do HC-UFU de abril de 2009 a janeiro de 2010



**Figura 14:** Gráfico de correlação entre a DDD de vancomicina e a taxa de colonização por 1000 pacientes-dia

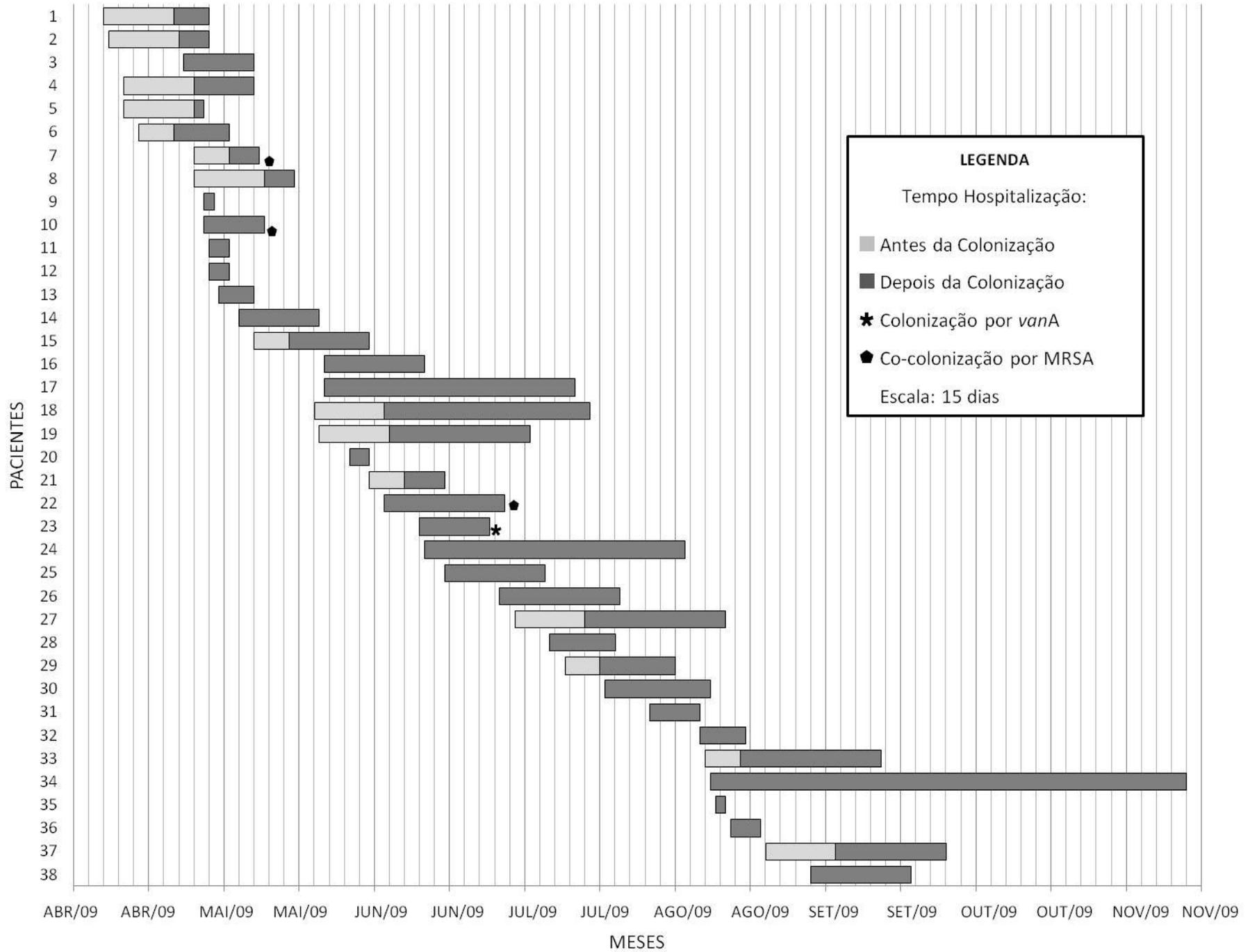


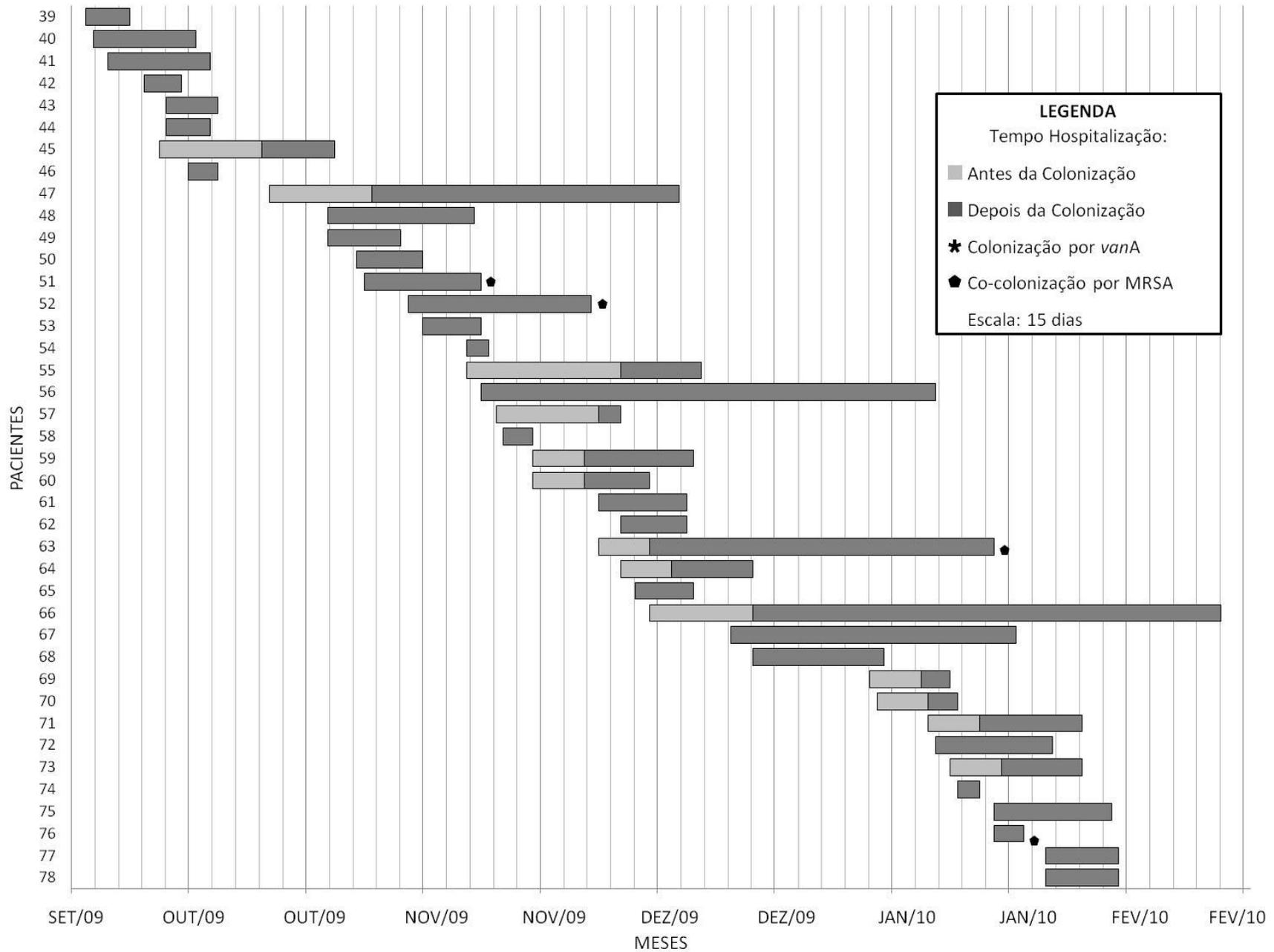
**Figura 15:** Gráfico de correlação entre a DDD de carbapenêmicos e a taxa de colonização por 1000 pacientes-dia

Observou-se uma relação temporal e espacial entre os pacientes colonizados por VRE internados na UTI de adultos do HC-UFU particularmente nos meses de abril a maio, novembro a dezembro de 2009 e janeiro de 2010, onde se observou a predominância dos pacientes não colonizados no momento da admissão na unidade e que durante a hospitalização tornaram-se colonizados (Figura 16), sugerindo uma possível transmissão cruzada na unidade.

Setenta e oito pacientes (23,4%) foram colonizados por VRE, 21 deles incluídos no grupo caso (sem infecção) e 143 (42,9%), que não tinham colonização por VRE ou infecção por nenhum outro microrganismo, incluídos no grupo controle para avaliação dos fatores de risco para colonização por VRE.

Os resultados da análise univariada e da análise de regressão logística dos fatores de risco associados à colonização por VRE são mostrados nas tabelas 7 e 8. Na análise univariada nefropatia ( $P < 0,001$ ), Diabetes Mellitus ( $P = 0,05$ ), uso prévio de antibiótico à internação na UTI ( $P = 0,001$ ), uso de vancomicina ( $P = 0,02$ ) e uso carbapenêmicos na unidade ( $P < 0,001$ ) mostraram diferenças significantes entre casos e controles. Na análise multivariada, os fatores de risco independentes para colonização por VRE foram nefropatia ( $P < 0,001$ ), uso de carbapenêmicos na unidade ( $P < 0,001$ ) e uso prévio de antibióticos ( $P = 0,03$ ).





**Figura 16:** Progressão dos casos de colonização por VRE em função da relação espacial/temporal na UTI de Adultos do HC-UFU no período de abril de 2009 a janeiro de 2010

**Tabela 7:** Fatores de risco para colonização por *Enterococcus* resistente à vancomicina na UTIA do HC-UFU e mortalidade total em pacientes colonizados.

Fatores de Risco	Frequência (%) ou média $\pm$ SD		Análise Univariada	
	Casos (N=21)	Controles (N=143)	P	OR (IC 95%)
<b>Idade, anos</b>	52,9 ( $\pm$ 17,6)	50,5 ( $\pm$ 18,9)	0,54	
<b>Gênero</b>				
Masculino	38,1	41,3	0,78	0,87 (0,34-2,24)
Feminino	61,9	58,7		1,14 (0,44-2,93)
<b>Tempo de Hospitalização na UTI<sup>1</sup></b>	7,4 ( $\pm$ 4,9)	5,8 ( $\pm$ 3,9)	0,18	
<b>Hospitalização Prévia</b>	71,4	59,4	0,29	1,70 (0,62-4,66)
<b>Comorbidades</b>				
Câncer	14,3	9,8	0,46	1,54 (0,40-5,87)
Cirurgia	52,4	53,1	0,94	0,97 (0,39-2,43)
Diabetes Mellitus	28,6	12,6	0,05	2,74 (0,95-8,08)
Cardiopatia	42,9	50,3	0,52	0,74 (0,29-1,86)
Doença Auto-Imune	4,8	2,8	0,50	1,74 (0,18-16,34)
Nefropatia	23,8	4,2	< 0,001	7,13 (1,95-26,06)
<b>Antibióticos</b>				
Uso Prévio	23,8	4,9	0,001	6,38 (1,81,22,48)
Vancomicina	19,0	4,2	0,02	5,37 (1,38-20,98)
Cefalosporina 3 <sup>a</sup> e 4 <sup>a</sup> geração	38,1	27,3	0,30	1,64 (0,63-4,26)
Fluoroquinolonas	9,5	5,6	0,62	1,77 (0,35-8,99)
Carbapenêmicos	28,6	2,8	< 0,001	13,90 (3,52-54,87)
<b>Mortalidade Total</b>	14,3	9,0	0,44	1,63 (0,43-6,29)

<sup>1</sup>UTI, Unidade de Terapia Intensiva

**Tabela 8:** Regressão Logística Múltipla dos fatores de risco para colonização por *Enterococcus* resistente à vancomicina na UTIA do HC-UFU

Fator de Risco	P	OR (IC 95%)
<b>Comorbidades</b>		
Diabetes Mellitus	0.79	1.22 (0.26-5.82)
Nefropatia	< 0.001	13.65 (3.24-57.55)
<b>Antibióticos</b>		
Uso Prévio	0.03	5.52 (1.08-28.05)
Vancomicina	0.54	1.70 (0.30-9.67)
Carbapenêmicos	< 0.001	17.29 (3.42-87.56)

Embora o número de MRSA obtidos seja pequeno, a colonização representou um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecção, particularmente sepse ( $P = 0,01$ ; OR = 20,9; Tabela 9). 41,2% dos pacientes colonizados por MRSA estavam também colonizados por VRE.

**Tabela 9:** Evolução clínica de pacientes colonizados por MRSA, co-colonização por VRE e mortalidade total.

	Colonizados por MRSA N=17	Não colonizados por MRSA N=316	<i>P</i>	OR (IC 95%)
<b>Infecção por MRSA<sup>1</sup></b>	4 (23,5)	3 (0,94)	< 0,001	32,1 (6,5-158,5)
Sepse por MRSA	2 (50,0)	2 (66,6)	0,01	20,9 (2,75-159,0)
<b>Colonização por VRE<sup>2</sup></b>	7 (41,2)	71 (22,5)	0,07	2,41 (0.89 - 6.58)
<b>Óbito</b>	6 (35,3)	53 (16,8)	0,05	2,70 (0.96 - 7.64)

<sup>1</sup>MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; <sup>2</sup>VRE, *Enterococcus* resistente à vancomicina.

## 7 DISCUSSÃO

*Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. tornaram-se patógenos hospitalares importantes e fenótipos como o *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) restringem as opções terapêuticas além de contribuírem para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade hospitalar (WOODFORD, LIVERMORE, 2009).

Uma característica marcante dos enterococos é a sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos utilizados habitualmente no tratamento de infecções como cefalosporinas, lincosamidas e penicilinas semi-sintéticas, assim como a capacidade de adquirir novos genes de resistência (BRUIN; RILEY, 2007; TEIXEIRA; SIQUEIRA-CARVALHO; FACKLAM, 2007). Embora tenha sido demonstrada a importância da origem exógena da infecção, a origem endógena ainda é a mais prevalente, sendo o trato gastrointestinal o principal reservatório e fonte potencial de amostras resistentes (SOOD et al, 2008).

Entre os sete fenótipos de resistência aos glicopeptídeos identificados até hoje, o VanA e o VanB são os mais frequentemente detectados entre as amostras de VRE e considerados os mais relevantes sob o ponto de vista epidemiológico já que apresentam o elemento genético móvel (transposon) com alto grau de transmissibilidade entre as bactérias (TACCONELLI; CATALDO, 2008; WERNER et al., 2008).

Em nosso estudo, apesar da frequência elevada de pacientes colonizados com VRE admitidos na UTI, apenas uma cepa de *Enterococcus faecalis* carregando o gene *vanA* foi isolada, embora exista o consenso que presença do VRE em UTIs hospitalares é crescente (COURVALIN, 2006; DESHPANDE et al., 2007). A maioria dos pacientes (98,7%) estava colonizado por amostras de espécies intrinsecamente resistentes à vancomicina (VanC), que foram identificadas utilizando um esquema simplificado proposto por Teixeira, Siqueira-Carvalho, Facklam (2007). Quatro amostras foram caracterizadas por testes genotípicos para confirmação dos resultados obtidos com os testes fenotípicos, encontrando-se 100% de concordância entre as técnicas.

Embora as espécies de *Enterococcus* carregando o gene *vanC* sejam raramente recuperadas de espécimes clínicos elas podem estar associadas a infecções graves particularmente em pacientes imunocomprometidos (ANTONELLO et al., 2010; COOPER et al., 2008; KOGANEMARU; HITOMI, 2008; ORTU et al. 2008; TAN et

al., 2010), entretanto não foi detectada nenhuma infecção por VRE na unidade. Por outro lado, dois casos de infecção de corrente sanguínea por *Enterococcus gallinarum* foram observados em outras unidades do hospital, ambas em pacientes apresentando condições como nefropatia, necessidade de hemodiálise, malignidade sanguínea e neutropenia febril, classicamente descritos como fatores de risco na literatura (BARBER; LAURETTA; SAEZ, 2007; CHOI et al., 2004; DE PERIO et al., 2006; REID; COCKERILL III; PATEL, 2001).

Em países como o Brasil, alguns problemas são comuns em hospitais de grande porte, como controle deficiente no uso de antimicrobianos, falta de laboratórios de microbiologia e predomínio de terapêutica empírica nos pacientes, o que intensifica o problema de resistência e multiresistência aos antibióticos. Como mencionado previamente na introdução, a exemplo do que está sendo observado internacionalmente, cerca da metade das infecções por *Staphylococcus aureus* nos hospitais brasileiros está associada ao fenótipo MRSA (CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010), resultando no aumento no uso de vancomicina (LEVINE, 2008).

No nosso estudo, o consumo de cefalosporinas predominou entre os antibióticos prescritos, com grandes variações no período observado. O uso de vancomicina e carbapenêmicos também foi alto, todos relacionados com a maior incidência de VRE. A densidade de uso de antimicrobianos na nossa unidade foi bem mais alta quando comparada com a de muitos outros países, principalmente a densidade de uso de cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos (MOREIRA et al., 2009).

O cálculo do consumo de antimicrobianos (DDD/1000 pacientes-dia) na UTI e no Hospital pode ser uma ferramenta para conhecer melhor o problema da resistência em nível local, o que pode contribuir para o uso mais apropriado de antimicrobianos.

A vancomicina e os carbapenêmicos foram identificados como fatores de risco para colonização/infecção por VRE em alguns, mas não todos os estudos (EDMOND et al., 1995; FRIDKIN et al., 2001; FURTADO, G.H. et al., 2005; SAKKA et al., 2008). A correlação positiva observada no nosso estudo entre a incidência de VRE e o consumo de vancomicina e carbapenêmicos na unidade sugere que a prescrição desses antibióticos é um importante fator de risco, particularmente, para a emergência desse fenótipo.

Vários trabalhos têm mostrado que o uso de vancomicina mantém o ambiente intestinal favorável para o crescimento do VRE e promove a possibilidade de um carreador tornar-se transmissor, além de aumentar o risco de um não carreador tornar-se

colonizado (ERGANI-OZCAN et al., 2008; FURTADO et al., 2006). O tratamento com vancomicina foi mais comum em pacientes colonizados com VRE, mas esta associação não foi estatisticamente significativa, segundo os nossos resultados. Entretanto, o uso de carbapenêmicos foi um fator de risco independente para colonização por VRE. Estes antibióticos são excretados em elevadas concentrações na bile, resultando na inibição de anaeróbios e favorecimento do crescimento de enterococos (STIEFEL; PULTZ; DONSKEY, 2007).

Além do uso de antimicrobianos e internação em UTIs, outros fatores de risco para colonização e infecção por VRE do fenótipo VanA incluem: tempo de hospitalização, transplante de órgãos sólidos, diálise crônica, admissão no hospital uma vez, duas ou mais em um período prévio de 12 meses, e hospitalização por mais de três dias antes da admissão na UTI (FURTADO et al., 2005, 2006; OSTROWSKY et al., 1999b; WARREN et al., 2003). A nefropatia como comorbidade foi fator de risco para colonização por VRE entre os pacientes incluídos na investigação. Pacientes com nefropatia tem risco aumentado de adquirir VRE em função de sua presença frequente em instituições de saúde, proximidade com outros pacientes colonizados, presença de múltiplas comorbidades, necessidade de hemodiálise e terapia prolongada com antibióticos, incluindo vancomicina e beta-lactâmicos (ASSADIAN et al., 2007; HUMPHREYS et al., 2004).

A participação do VRE em hospitais é mais prevalente em UTIs da América do Norte e em alguns hospitais da América do Sul que em países Europeus (GUZMAN-BLANCO; CASELLAS; SADER, 2000; MUTNICK; BIEDENACH; JONES, 2003). O isolamento desse microrganismo foi reportado em alguns hospitais brasileiros, principalmente em São Paulo e Porto Alegre (CEREDA et al., 1997, d'AZEVEDO et al., 2004). Na UTI do nosso hospital esse microrganismo foi descrito pela primeira vez em 2003 correspondendo a uma infecção pós-cirúrgica pelo fenótipo VanA em *Enterococcus faecalis* (RIBAS et al., 2007). Por outro lado, a resistência em nível elevado aos aminoglicosídeos não é incomum, com frequências de 18,5% em São Paulo (MASCHIETO et al., 2004) , 22% em Brasília (TITZE-DE-ALMEIDA et al, 2004) e 40,5% no Rio de Janeiro (MONDINO et al., 2003) a exemplo do observado com nossas amostras (16,3%). Nos últimos anos tem-se observado um aumento nas taxas de enterococos com nível elevado de resistência em função da disseminação de plasmídeos e transposons que codificam enzimas que inativam os aminoglicosídeos (PROTONOTARIOU, et al., 2010; SOOD, et al., 2008).

A primeira escolha no tratamento de infecções urinárias enterocócicas é a ampicilina (QUINONES et al., 2005), todas as amostras neste estudo foram susceptíveis à esse antimicrobiano. Por outro lado, foi observado elevada frequência de resistência à eritromicina e tetraciclina, já detectadas em outros estudos brasileiros (d'AZEVEDO et al., 2004).

Outro microrganismo Gram positivo que se destaca como patógeno hospitalar é o *Staphylococcus aureus* considerado endêmico na maioria dos hospitais gerais. As razões para essa endemicidade são várias incluindo características do microrganismo e particularmente as dificuldades na implementação de práticas de prevenção e controle das infecções (CARVALHO; MAMIZUKA; GONTIJO FILHO, 2010; SADER et al., 2004; TRINDADE et al., 2003).

Pacientes colonizados com *Staphylococcus aureus* apresentam maior risco de adoecimento por esse microrganismo (FRANK et al., 2010; HONDA et al., 2010). Na nossa investigação, a pesquisa de colonização nasal para MRSA foi realizada em 333 pacientes, evidenciando baixa frequência de colonização (5,1%) durante o período estudado com 23,5% dos pacientes colonizados evoluindo com infecção por esse microrganismo ( $P < 0,001$ ; OR = 32,1), com destaque para os casos de sepse ( $P = 0,01$ ; OR = 20,9). Estes dados ressaltam a importância da vigilância desse microrganismo em unidades críticas em função do risco de desenvolvimento de infecção entre os pacientes colonizados, ao contrário do que foi observado para VRE. A prevenção da transmissão do MRSA entre pacientes hospitalizados é uma das práticas mais importantes no controle de infecções por esse microrganismo. Recomendações do CDC incluem a vigilância ativa de pacientes colonizados como medida de controle, particularmente entre pacientes de risco internados em UTIs (MARTINEZ-CAPOLINO et al., 2010), considerando que há cerca de 10 pacientes colonizados por MRSA para cada paciente com infecção comprovada (KURUP et al., 2010).

Ao contrário dos nossos dados, estudos prévios realizados na mesma unidade por nosso grupo demonstraram taxas mais elevadas de pacientes colonizados por MRSA (RIBAS, 2003; SADOYAMA; GONTIJO FILHO, 2000). No momento, nosso estudo indica uma baixa taxa de colonização e infecção na unidade, entretanto, experiências de outros países mostram que isso pode mudar rapidamente. A epidemiologia de infecções hospitalares e da colonização por microrganismos multiresistentes é complexa, multifatorial e sofre mudanças ao longo do tempo, influenciadas sobretudo pela pressão

seletiva do uso de antimicrobianos, políticas de controle e as condições dos pacientes (MOREIRA et al., 2009; WOODFORD, LIVERMORE, 2009).

Em países como o Brasil, uma proporção significativa das infecções por microrganismos multiresistentes decorre de transmissão cruzada via mãos dos profissionais de saúde (LUFT; DETTENKOFER, 2010), o que pode ser visualizado claramente nesse estudo no que diz respeito à presença do VRE na unidade.

Esse estudo foi realizado em uma Unidade de Terapia Intensiva Clínico-Cirúrgica de um Hospital Universitário de grande porte representativa de unidades críticas de adultos de hospitais universitários no país. Algumas limitações do estudo incluem: o número relativamente pequeno de pacientes no grupo caso para avaliação dos fatores de risco para colonização por VRE, assim como colonizados e infectados por MRSA reduzindo o poder estatístico da investigação. Outra limitação foi que as informações sobre a manutenção das condições e a gravidade do "*status*" clínico dos pacientes, como por exemplo, através do APACHE II não estavam disponíveis. Entretanto, acreditamos que o melhor entendimento da colonização por microrganismos multiresistentes em pacientes da nossa UTI, além da identificação dos fatores de risco associados e de sua relação estreita com infecção oferecem perspectivas práticas para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e controle de infecções por esses microrganismos multiresistentes.

## 8 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou uma alta frequência de colonização por VRE do fenótipo VanC, que tem pouca importância para o controle de infecções, entretanto são considerados reservatórios de genes de resistência à vancomicina.

O uso de vancomicina apresentou uma correlação positiva com o VRE na unidade e o uso prévio de antimicrobianos, uso carbapenêmicos e nefropatia foram fatores de risco independentes para aquisição desse fenótipo.

Apesar da baixa incidência de MRSA, a colonização foi fator de risco para o desenvolvimento de sepse por esse microrganismo.

## REFERÊNCIAS

- ANTONELLO, V.S. et al. *Enterococcus gallinarum* meningitis in an immunocompetent host: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.52, n.2, 2010.
- ASSADIAN, O. et al. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci colonization and its risk factors in chronic hemodialysis patients in Shiraz, Iran. **BMC Infectious Disease**, v.7, 2007.
- BARBER, G.R.; LAURETTA, J.; SAEZ, R. A febrile neutropenic patient with *Enterococcus gallinarum* sepsis treated with daptomycin and gentamicin. **Pharmacotherapy**, v.27, n.6, 2007.
- BOYD, D. et al. Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.6, 2000.
- BOYD, D.A. et al. VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.6, 2006
- BOYD, D.A. et al. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.7, 2008.
- BRUIN, M.A.; RILEY, L.W. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization in hospitals? A systematic review. **BMC Infectious Disease**, v.7, 2007.
- BRYANT, S; WILBECK, J. Vancomycin-resistant enterococcus in critical care areas. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v.19, n.1, 2007.
- CARVALHO, K.S.; MAMIZUKA, E.M; GONTIJO FILHO, P.P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.14, n.1, 2010.
- CAVALCANTI, S.M. et al. Comparative study on the prevalence of *Staphylococcus aureus* imported to intensive care units of a university hospital, Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 4, 2006.
- CEREDA, R. et al. In vitro antimicrobial activity against enterococci-isolated in a University Hospital in São Paulo-Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.1, n.2, 1997.
- CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, 2000.

CHAMBERS, H.F.; DELEO, F.R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews**, v.7, 2009.

CHOI, S.H. et al. Clinical features and outcomes of bacteremia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: analysis of 56 cases. **Clinical Infectious Disease**, v.38, n.1, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S18, 2009.

COOPER, M.P. et al. Outbreak of *Enterococcus gallinarum* infections after total knee arthroplasty. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, n.4, 2008.

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

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Disease**, Supplementary article (S25-34), 2006.

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

d'AZEVEDO, P. A. et al. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 35, 2004.

DELEO, F.R.; CHAMBERS, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **Journal of Clinical Investigation**, v.119, n.9, 2009.

DE PERIO, M.A. et al. Risk factor and outcomes associated with non-*Enterococcus faecalis*, non-*Enterococcus faecium* enterococcal bacteremia. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.27, n.1, 2006.

DESHPANDE, L.M. et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, n.2, 2007.

DORAWICHE, R.O. Nosocomial bloodstream infections and second-generation vascular catheters. In: WENZEL, R.P. **Prevention and control of nosocomial infections**. 4 ed., Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, cap.20, p.281-292, 2003.

DUKTA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, 1995.

DURENBERG, R.H.; STOBBERINGH, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.8, n.6, 2008.

EDMOND, M.B. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. **Clinical Infectious Disease**, v.20, n.5, 1995.

EGGIMANN, P.; PITTET, D. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. **Clinical Microbiology**, v. 8, n. 5, 2002.

ERGANI-OZCAN, A. et al. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, n.5, 2008.

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

FRANK, D.N. et al. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. **Plos One**, v.5, n.5, 2010.

FRIDKIN, S.K. et al. The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 U.S. adult intensive care units. **Annals of Internal Medicine**, v.135, n.3, 2001.

FURTADO, G.H. et al. Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.9, n.1, 2005.

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

GAYNES, R.P., HORAN, T.C. Definitions of nosocomial infections. In: MAYHALL, C.G., ed. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1995.

GUZMAN-BLANCO, M.; CASELLAS, J.M; SADER, H.S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. **Infectious Disease Clinic of North American**, v.14, n.1, 2000.

HARRIS, S.R. et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. **Science**, v.327, n.5964, 2010.

HIDRON, A.I. et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, n.11, 2008.

HONDA, H. et al. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization and Subsequent Infection in Intensive Care Unit Patients: Does Methicillin Resistance Matter? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.31, 2010.

HUMPHREYS, H. et al. Implications of colonization of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in renal dialysis patients. Learning to live with it? **Journal of Hospital Infection**, v.58, n.1, 2004.

HUMPHREYS, H et al. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, n.2, 2009.

JACOBY, G. A. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. **Annu. Ver. Med.** v. 47, 1996.

JENSEN, S.O.; LYON, B.R. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v.4, n.5, 2009.

JONES, M. E. et al. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North American Surveillance study (2000-2002). **Annals of clinical microbiology and Antimicrobials**, London, v.3, n.14, 2004.

JUNIOR, M.S. et al. Analysis of vancomycin use and associated risk factors in a university teaching hospital: a prospective cohort study. **BMC Infectious Disease**, v.7, 2007.

KLEVENS, R.M. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. **Emerging Infectious Disease**, v.12, n.12, 2006.

KOGANEMARU, H.; HITOMI, S. Bacteremia caused by VanC-type enterococci in a university hospital in Japan: a 6-year survey. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.14, n.6, 2008.

KURUP, A. et al. Active surveillance testing and decontamination strategies in intensive care units to reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **American Journal of Infection Control**, v.38, n.5, 2010.

LECLERCQ, R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, n.3, 2009.

- LEMMEN, S.W. et al. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. **Journal of Hospital Infection**, v.56, n.3, 2004.
- LEVINE, D.P. Vancomycin: Understanding Its Past and Preserving Its Future. **Southern Medical Journal**, v.101, n.3, 2008.
- LU, J. J. et al. High prevalence of Van B<sub>2</sub> vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, 2001.
- LUFT, D.; DETTENKOFER, M. Transmission of multidrug-resistant bacteria in ambulatory settings. **Der Internist**, v.51, n.2, 2010.
- MAHONY, A.A. et al. Emergence of vanB *Enterococcus gallinarum* colonization in association with glycopeptide therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.6, 2010.
- MARTINEZ-CAPOLINO, C. et al. Impact of active surveillance on meticillin resistant *Staphylococcus aureus* transmission and hospital resource utilization. **Journal of Hospital Infection**, v.74, n.3, 2010.
- MASCHIETO, A. et al. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.7, 2004.
- MAZUSKI, J.E. Vancomycin-Resistant *Enterococcus*: Risk Factors, Surveillance, Infections, and Treatment. **Surgical Infections**, v.9, n.6, 2008.
- MCKESSAR, S. J. et al. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, 2000.
- MONDINO, S.S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals. **Microbial Drug Resistance**, v.9, n.2, 2003.
- MOREIRA, M.R. et al. Consumo de antibióticos e Etiologia de Pneumonia Associada à Ventilação em Pacientes Internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista Panamericana de Infectología**, v.11, n.1, 2009.
- MUTNICK, A.H.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.46, n.1, 2003.

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

ORTU, M. et al. *Enterococcus gallinarum* endocarditis in a diabetic patient. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.81, n.1, 2008.

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

OSTROWSKY, B.E. et al. Vancomycin-resistant enterococci in intensive care units: high frequency of stool carriage during a non-outbreak period. **Archives of Internal Medicine**, v.159, n.13, 1999b.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.11, 2009.

PROTONOTARIOU, E. et al. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. **Journal of Hospital Infection**, v.75, n.3, 2010.

QUIÑONES, D. et al. Enterococci spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.51, n.1, 2005.

REID, K.C.; COCKERILL III, F.R.; PATEL, R. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. **Clinical Infectious Disease**, v.32, n.11, 2001.

RIBAS, R. M. **Infecções Hospitalares em pacientes idosos: aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares associados à *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.*** 2003. 103p. Tese (doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

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

SADER, H. et al. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin America and Brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.8, n.1, 2004.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P.P. Risk Factors for Methicillin Resistant and Sensitive *Staphylococcus aureus* Infection in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.4, p. 135-9, 2000.

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

SALGADO, C.D.; FAIR, B.M.; CALFEI, D.P. Community acquired methicillin-resistant S.A.: a meta-analysis of prevalence and risk factors. **Clinical Infection Disease**, v. 36, 2003.

SOOD, S. et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**, v.128, n.2, 2008.

STIEFEL, U.; PULTZ, N.J.; DONSKEY, C.J. Effect of carbapenem administration on establishment of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci and *Klebsiella pneumoniae* in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.1, 2007.

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

TAN, C.K. et al. Bacteremia caused by non- *faecalis* and non- *faecium enterococcus* species at a Medical center in Taiwan, 2000 to 2008. **Journal of Infection**, v.61, n.1, 2010.

TEIXEIRA, L.M.; SIQUEIRA-CARVALHO, M.G. FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington DC: ASM Press, p.430-442, 2007.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.8, n.3, 2004.

TOUFEN JÚNIOR, C. et al. Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 58, n. 5, 2003.

TRINDADE, P.A. et al. Molecular Techniques for MRSA Typing: Current Issues and Perspectives. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.7, n.1, 2003.

WARREN, D.H. et al. The epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization in a medical intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.24, n.4, 2003.

WATANABE, S. et al. Genetic Diversity of the Low-Level Vancomycin Resistance Gene vanC-2/vanC-3 and Identification of a Novel vanC Subtype (vanC-4) in *Enterococcus casseliflavus*. **Microbial Drug Resistance**, v.15, n.1, 2009.

WENZEL, R.P.; PERL, T.M. The Significance of Nasal Carriage of S.A. and the Incidence of Postoperative Wound Infection. **Journal Hospital Infection**, v. 31, 1995.

WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveillance**, v.13, n.47, 2008.

WHO. Collaborating Center for Drug statistics methodology. Anatomical Therapeutic Chemical (ATC), **Classification index with Defined Daily Doses (DDD)**, Oslo, Norway; 2000.

WOODFORD, N. Antimicrobial resistance amongst enterococci isolated in the United Kingdom: a reference laboratory perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.32, n.2, 1993.

WOODFORD, N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, 1998.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology Infection**, v.3, 2005.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v.59, 2009.

ZANELLA, R. C. et al. Análise molecular de *Enterococcus* e seus elementos VanA que mediam resistência à vancomicina, isolados na Casa de Saúde Santa Marcelina-SP, em 1998. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, 1999.

## ANEXO I



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

ANÁLISE FINAL N.º. 597/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO  
 REGISTRO CEP/UFU 039/09

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

Pesquisador Responsável: Rosineide Marques Ribas

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.  
 O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO

Data de entrega do relatório final: Julho de 2011.

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

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

Uberlândia, 04 de novembro de 2009.

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

Orientações ao pesquisador

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

**ANEXO II****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina em pacientes da Unidade de Terapia Intensiva de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob a responsabilidade dos pesquisadores Rosineide Marques Ribas, Paulo P. Gontijo Filho, Daise Aparecida Rossi, Denise Von Dolinger de Brito, Geraldo Batista de Melo, Deivid William da Fonseca Batistão, Ana Luiza de Souza e Claudete Freitas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido por um dos pesquisadores citados.

Nesta pesquisa nós vamos observar se você apresenta Infecção Hospitalar. Na sua participação, quando você for internado na UTI, será passado um cotonete estéril no interior do seu nariz e ao redor do ânus para detectar a presença de bactérias. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Não há riscos para você em participar da pesquisa. Os benefícios serão melhor compreensão das infecções por essas bactérias além de determinar as taxas de infecção e colonização por bactérias resistentes a antibióticos além de identificar os fatores de risco associados à internação na UTI.

Você é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor poderá entrar em contato com: Profª Dra. Rosineide M Ribas (coordenadora), Laboratório de Microbiologia, Bloco 4C, Campus Umuarama, UFU, fone: 34-3218-2236 e Deivid WF Batistão (executor), aluno de mestrado da UFU.

CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-3239-4131.

Uberlândia, de de 20

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da pesquisa

**ANEXO III****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a responder pelo paciente que poderá participar da pesquisa *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina em pacientes da Unidade de Terapia Intensiva de Adultos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob a responsabilidade dos pesquisadores Rosineide Marques Ribas, Paulo P. Gontijo Filho, Daise Aparecida Rossi, Denise Von Dolinger de Brito, Geraldo Batista de Melo, Glaucio M Moura, Deivid Willian F Batistão, Ana Luiza de Souza e Claudete Freitas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido por um dos pesquisadores citados.

Nesta pesquisa nós vamos observar se o paciente apresenta Infecção Hospitalar. Na sua participação, quando for internado na UTI, será passado um cotonete estéril no interior do seu nariz e ao redor do ânus para detectar a presença de bactérias. Em nenhum momento o paciente será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Ele (a) não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Não há riscos para o paciente em participar da pesquisa. Os benefícios serão melhor compreensão das infecções por essas bactérias além de determinar as taxas de infecção e colonização por bactérias resistentes a antibióticos além de identificar os fatores de risco associados à internação na UTI.

Ele (a) é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com: Prof<sup>a</sup> Dra. Rosineide M Ribas (coordenadora), Laboratório de Microbiologia, Bloco 4C, Campus Umuarama, UFU, fone: 34-3218-2236 e Deivid WF Batistão (executor), aluno de mestrado da UFU.

CEP/UFU: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-3239-4131

Uberlândia, de de 20

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu respondo pelo paciente, aceitando participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Responsável pelo paciente



## APÊNDICE II

Características fenotípicas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e gêneros relacionados

ESPÉCIES	MAN	SORB	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
<b>Grupo 1</b>												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. pailens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. maloduratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hawaiiensis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>Grupo 2</b>												
<i>E. faecium</i>	+*	-	+	+	V	V	-	-	-	+*	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+*	+	V	+	-*	+*	+*	+	V	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+*	+	-	+	-	+*	-	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	+*	-	+*	-	+	-	+	-	-	+*	+	-
<i>E. haemoperoxidus</i>	+1	-	+1	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>E. sanguinicola</i>	+	-	+	-	-	-	+2	-	-	+	-	-
<i>Lactococcus</i> SP.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
<b>Grupo 3</b>												
<i>E. díspar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo 4</b>												
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. phoeniculicola</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. caccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>Grupo 5</b>												
<i>E. canis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. moraviensis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hermannienseis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. italicus</i>	V	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+
<i>Vagococcus fluvialis</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

**Abreviações e Símbolos:** MAN, manitol; SORB, sorbose; ARG, arginina; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; TEL, telurito 0,04%; MOT, motilidade; PIG, pigmento; SUC, sucrose; PYU, piruvato; MGP, metil-alfa-glicopiranosida; EFR, disco de efrotomocina (100g); +, >90% positividade; -, <10% positividade; V, variável; \*, exceções ocasionais (<3% das cepas); ND, Não Disponível; R, Resistente; S, Sensível, <sup>1</sup> Reação Positiva tardia (3 ou mais dias de incubação), <sup>2</sup> Reação Fraca.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)